

# X線コントラスト変調法によって明らかになった膜蛋白質と磷脂質の相互作用のダイナミクス

豊島 近

東京大学 分子細胞生物学研究所 (現: 定量生命科学研究所) 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

乗松 良行

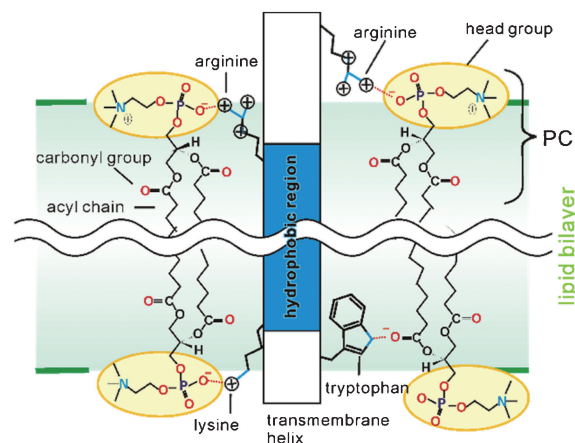
東京大学 分子細胞生物学研究所 (現: 定量生命科学研究所) 〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

**要旨** X線溶媒コントラスト変調法を開発し  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ結晶に適用した結果、これまでは1, 2分子しか見えなかった  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプを取り囲む磷脂質すべて (~45分子) を解像できた。その結果、膜蛋白質には磷脂質の「錨」として共に動くアミノ酸残基と膜に浮かぶための「浮き」となる残基が配置されており、両者の間に緊密な連携があること、脂質二重膜もイオン輸送メカニズムの一部として組み込まれていることが分かった。

## 1. はじめに

結晶化技術と蛋白質大量発現技術、電子顕微鏡技術の進歩によって、膜蛋白質そのものに関する我々の知識は飛躍的に増大したが、その一方で、膜蛋白質が活動する場である脂質二重膜そのもの、或いはその構成成分である磷脂質 (+コレステロール) と蛋白質の相互作用に関する知識は極めて限定されている<sup>1)</sup>。これまで、膜の厚さは塩基性 (正の荷電を持つ) アミノ酸残基 (リジン (Lys), アルギニン (Arg)) やトリプトファン (Trp) によって影響を受け「蛋白質-脂質ミスマッチ (予想される疎水性部分の長さが蛋白質側と脂質二重膜側で異なる)」が起ること、また、Lys・Arg は膜の疎水性部分から長い側鎖を伸ばして (snorkeling とする) 磷脂質の磷酸部分と強く結合すること (Fig. 1左)<sup>2)</sup>、Trp はおそらくカルボニル基と水素結合を作ること (Fig. 1右下)、また、磷脂質頭部の種類や脂肪酸部の長さは安定性や活性に影響を与えることはわかっていたが、45年前に提出された「流動モザイクモデル」<sup>3)</sup>からの本質的な進歩はなかったと言える。

それは、個々の磷脂質を解像できるレベルで生体膜を可視化する技術がなかったため、端的には、膜蛋白質そのものの構造決定には大変威力のあった X線結晶解析が脂質二重膜の可視化には無力であったためである。それには幾つかの理由がある。第一に、磷脂質の柔軟性によってその回折強度の大部分は  $1/10 \text{ \AA}^{-1}$  以下の低角部分に限定されるが (Fig. 2)、通常の結晶解析では極低角の反射強度の測定は行なわないし、そもそも蛋白質の原子モデルの構築のためには不必要である。さらに、通常の解析では脂質二重膜の存在は無視し、蛋白質の外側は均一な溶媒で満たされているものと仮定して精密化を行なう。これは蛋白質結晶中の脂質二重膜の現実的モデルを簡単には構築できない以



**Fig. 1** (Color online) Schematic illustration to show polar interactions between protein residues (arginine (Arg), lysine (Lys), tryptophan (Trp)) and phospholipids (phosphatidylcholine (PC) in this case) that constitute the lipid bilayer. The acyl chain of phospholipid varies between 14–20 carbon chain and partially cut out in this figure.

上、いたし方のないことではあるが、このような結晶解析はすべて誤りを含んでいることは忘れてはなるまい。実際、比較的低分解能領域の寄与が大きい (熱運動の激しい) ループ部分ではモデルが間違っていることもある (筆者の経験的事実)。

それでは、(0, 0, 1) 反射のような最低角からのすべての反射強度を測定すれば十分かという点、残念ながらそうではない。このような低角領域では脂質二重膜に由来する反射強度は蛋白質に由来する強度より大きくなるため (Fig. 2)、反射点の位相は蛋白質に由来する位相とは大きく異なるからである。実際、すべての反射点を用い、蛋白質原子モデル由来の位相で電子密度図を書いてみると、膜

は見事に消し去られている (Fig. 3b)。部分的に低角を入れたときに見える電子密度 (Fig. 3c) は、堂々と論文になったりしているが<sup>4)</sup>、雑音に過ぎない。

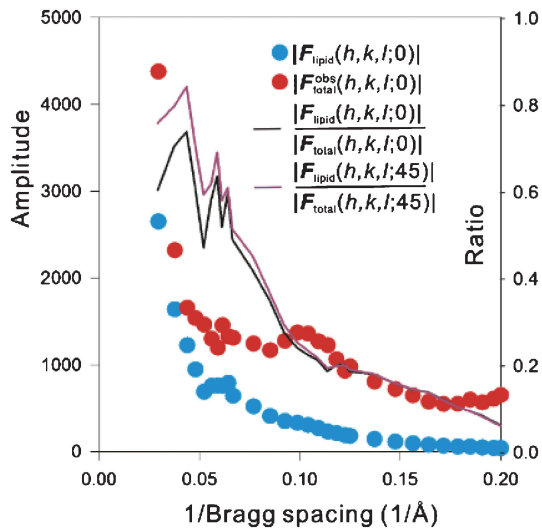
実際、通常の結晶解析では、蛋白質の膜貫通領域と直接接触している first layer の磷脂質すら解像されず、蛋白質のセグメント間 (膜貫通ヘリックス間の隙間とか、隣接する蛋白質分子との隙間とか) に挟まれて固定されている場合にのみ解像される。すなわち、アクアポリン0の二次元結晶のような例外的な場合を除き、first layer の磷脂質のせいぜい2, 3分子が解像されるに過ぎない<sup>5)</sup>。筆者にしても、X線溶媒コントラスト変調法による脂質二重膜の可視化に成功し (Fig. 3a), 磷脂質頭部の原子モデルの構築と精密化がうまくいくまでは、そもそも first layer 磷脂

質を解像できるほどの信号が回折パターン中に存在するのか自信はなかった。

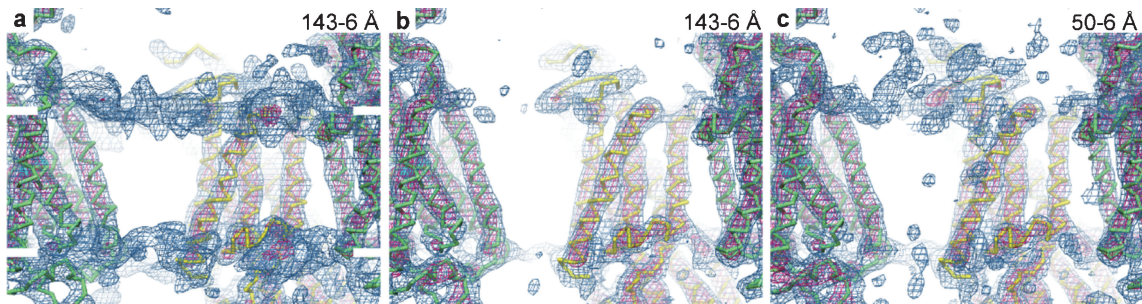
## 2. 脂質二重膜の可視化によって理解されたこと

脂質二重膜を可視化しようと考えたのは、不完全な結晶解析に不満だったためだけではない。私たちは  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ SERCA1a を対象に、その反応過程のほぼ全体をカバーする10状態の結晶構造を決定し、イオン能動輸送機構の原子構造に基づく理解を推進してきた<sup>6)</sup>。その結果、膜貫通ヘリックスは膜に垂直な方向にも10 Å以上動くこと、脂質二重膜はポンプのメカニズムの一部として組み込まれているらしいことは理解された<sup>7)</sup>。しかし、たとえば、膜貫通ヘリックスの大きな動きに対し磷脂質は追従して一緒に運動するのか、そもそも二重膜はどれほど凸凹しているのか、10本ある膜貫通ヘリックスのうち M7-M10 はほとんど構造変化を起こさないから反応サイクル中、ずっと同じ向きで膜に挿入されると考えてよいのか、といった基本的疑問には答えるすべがなかった。従って、イオンポンプの原子構造に基づく機能の理解のためには、少なくとも、first layer の磷脂質分子すべてを解像し相互作用の詳細を知る必要がある。つまり、当たり前のことなのだが、膜蛋白質を理解するためには脂質二重膜をも知る必要があり、構造決定のための実験的手法を確立する必要があると確信するに至った。

そこで、脂質二重膜の可視化のためにX線溶媒コントラスト変調を利用することを考え、方法論的開発とデータ収集を行ってきた。研究は15年かけて完成し、 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの4つの状態 ( $\text{Ca}^{2+}$  結合直後の  $\text{E1} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ 、ATP から蛋白質への磷酸転移反応の遷移状態であり細胞質側ゲートは閉位置にある  $\text{E1} \sim \text{P} \cdot \text{ADP} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$ 、膜内に結合していた  $\text{Ca}^{2+}$  を小胞体内腔側に放出した直後であり蛋白質に結合した磷酸の加水分解反応の遷移状態である  $\text{E2} \sim \text{P}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  を放出し終わった後の安定状態  $\text{E2}$ ) に関し、脂質二

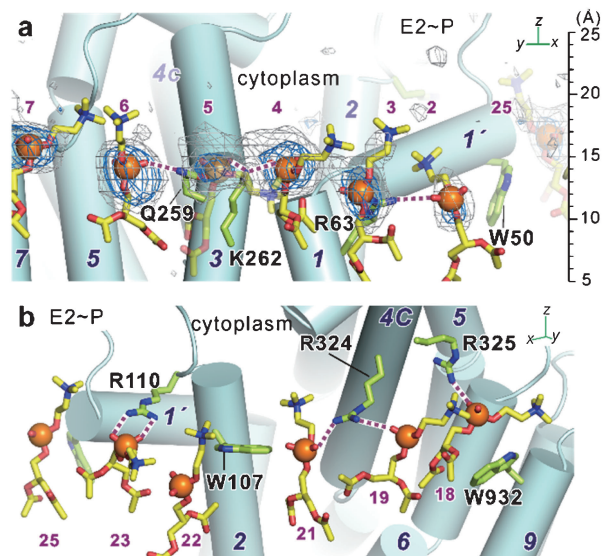


**Fig. 2** (Color online) Contribution of the lipid bilayer to the structure factor at 0% (black line) and 45% (purple line) iohexol. Electron density of protein matches with the solvent around 45% iohexol, making the contribution of the lipid bilayer more visible. The effect of iohexol is appreciable at Bragg spacing of 10 Å or larger. Note that the contribution of the lipid bilayer exceeds 50% at Bragg spacing of 15 Å ( $0.07 \text{ \AA}^{-1}$ ) or larger.

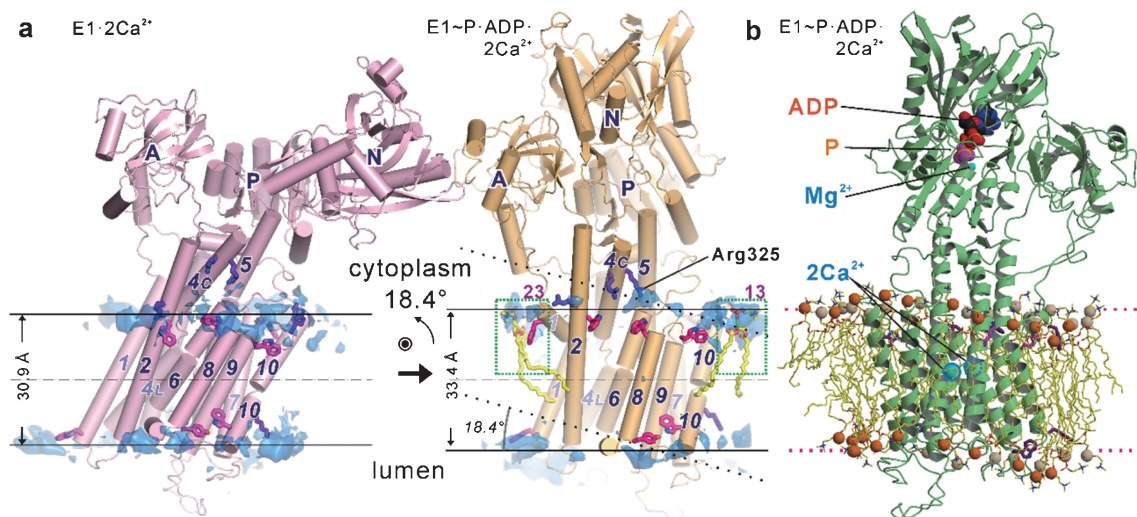


**Fig. 3** (Color online) Electron density maps of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pump in the  $\text{E1} \sim \text{P} \cdot \text{ADP} \cdot 2\text{Ca}^{2+}$  state, viewed parallel to the bilayer, showing the effects of the lowest resolution structure factors. Contoured at  $0.7 \sigma$ . **a**, Using phases obtained by solvent contrast modulation; **b** and **c**, using phases derived from a protein atomic model alone. Short white bars in **a** indicate the positions of the phospholipid head groups.

重膜を可視化することができた<sup>7)</sup>。これまでの結晶解析では蛋白質の隙間に挟まれた脂質1, 2分子しか解像できなかったが,  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプを取り巻く個々の磷脂質をすべて(蛋白質一分子あたり約45個)解像することに成功し, 磷脂質頭部の原子モデルを置くことができた。さらに, 低角の位相はコントラスト変調から, 高角の位相は原子モデルからとなるように位相を結合することで, 3.2 Å分解能での通常の結晶学的精密化にも成功し (Fig. 4a), 得られた原子モデルを分子動力学シミュレーションにより確認することもできた (Fig. 5b)。この結果, ポンプ蛋白質と磷脂質の相互作用の詳細が明らかになり, これまで磷脂質を同じように固定すると考えられてきた Lys/Arg と Trp/Tyr が明確に異なった役割を持ち協働していることなど, まったく新しい知見が得られた。つまり, 脂質二重膜は膜蛋白質を浮かべている単なる海のようなものではなく, 機能発現に能動的に係わっていること, そのため, 磷脂質をも含む系全体の原子モデルからメカニズムを考える必要があることが明確になった。今や, 蛋白質を構成するアミノ酸残基に通し番号がつけられているように,  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプに関しては, 磷脂質にも通し番号をつけて議論できるようになったのである (Fig. 4)。この成果<sup>8)</sup>は Nature 誌 (2017年5月11日号) の表紙にもなり, News & Views<sup>9)</sup>でも単独紹介された。膜蛋白質の構造生物学における本質的な進展といえよう。



**Fig. 4** (Color online) First layer phospholipids that surround the transmembrane region of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pump. Atomic models of phospholipids (from the head group to the carbonyl group of phosphatidylcholine; sticks with orange spheres for phosphorous atoms) are based on electron density maps derived from X-ray solvent contrast modulation. Blue and grey nets in a represent  $2|F_o|-|F_c|$  electron density maps calculated at 3.2 Å resolution with combined phases and contoured at  $0.7\sigma$  (grey) and  $1.0\sigma$  (blue). Cylinders represent  $\alpha$ -helices. Small numbers in purple identify phospholipids, and those in italics transmembrane helices (M1-M10). K stands for lysine; R, arginine; Q, glutamine; W, tryptophan. Purple broken lines represent likely hydrogen bonds. The ruler in the margin of a shows the distance from the bilayer centre.



**Fig. 5** (Color online) **a**, A change in orientation of the entire  $\text{Ca}^{2+}$ -pump molecule ( $18.4^\circ$ ) caused by the binding of ATP and transfer of the phosphate to the pump protein. Placed so that the planes approximating the positions of the phosphorous atoms (horizontal solid lines) become horizontal in each crystal form. Inclined dotted lines show the corresponding planes in the conventional alignment with the M7-M10 helices, which do not undergo a rearrangement in the reaction cycle. Cyan surfaces show contrast modulation electron density maps for bilayers calculated at 4.5 Å resolution and contoured at  $0.44\text{ e}^-/\text{\AA}^3$ . Atomic models for a phospholipid molecule (PL23) around M1', an amphipathic helix, and that (PL13) near M10 in the cytoplasmic leaflet are shown in sticks (also boxed) in  $\text{E1}\sim\text{P}\cdot\text{ADP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ . **b**, A full atomic model of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pump and the first layer phospholipids after a 100 ns molecular dynamics simulation, viewed from the opposite direction to that in **a**. Orange spheres represent phosphorous atoms in the phospholipid head groups. The side chains of Arg/Lys and Trp/Tyr appear as dark blue and magenta sticks, respectively.

以下に主な結果をまとめる。

- 膜は決して平らではなく (Fig. 4a), 厚さ (磷脂質頭部の磷酸基間の距離) も (30.9~33.4 Å; Fig. 5a), 蛋白質を取り囲む磷脂質の数 (44~48) も反応サイクル中で変化する。それに伴って最適の位置に戻そうとする力が働くはずで, その力は構造変化の駆動力として使われている可能性がある。

- 膜貫通ヘリックスの運動に伴い, 膜内から側鎖を伸ばしている Lys・Arg と結合している脂質 (Fig. 1, 4a) は一緒に動く。特に, ヘリックスの垂直な運動に追従し局所的な歪を生み出す。それは, ヘリックスを元の位置に戻す力として働くだろう。

- 一方, 膜外 (細胞質側) から磷脂質と結合する Arg は相手となる磷脂質を変え, その磷脂質をコンフォメーション変化の際の「錨」として使っている (Fig. 1 右上, 4b の R324)。

- 膜に対する蛋白質の向きを決めるのは主として Trp である (Fig. 5)。Trp は溶媒と脂質の界面に存在し<sup>10)</sup>「浮き」の役割を持つ。これまでに想定されていたように磷脂質のカルボニル基と水素結合を作る (Fig. 1 右下) わけではなく広い範囲をカバーするので, 膜面に沿ったヘリックスの大きな動き (>20 Å) にも適している

- 膜貫通ヘリックスの運動に伴って, ヘリックスの疎水性部分が溶媒に露出しないように, また親水性部分が脂質二重膜の疎水性部分に露出しないように, 蛋白質側は複雑な構造変化を起こす。特に注目すべきは, 分子全体の傾きが20°近く変化することである (Fig. 5a)。このときには, 4つの Trp 残基のベルトが形成され, いつも膜面と平行になっていた。Trp が脂質二重膜の両方の層にあるのは M10 付近に限られ, そこが分子全体の傾斜の際の軸となっていると考えられる。膜に垂直な方向へ大きく動くのは分子のほぼ反対側にある M2 であるから, これは, 小さな傾きの変化で大きな運動を許すためのメカニズムなのであろう。

### 3. 溶媒コントラスト変調法

さて, 以下では脂質二重膜の可視化のための方法論を少し議論しておきたい。ここでの具体的課題は, 第一に,  $1/10 \text{ \AA}^{-1}$  より低角の反射に対し正しい位相を実験的に与えることである。この目的のためには二つの方策が考えられ, 一つは標準的な(i)多重同型置換法 (multiple isomorphous replacement; MIR) であり, もう一つは(ii)溶媒コントラスト変調法 (solvent contrast modulation) である。(i)の多重同型置換法では, 重原子を含む溶液に蛋白質結晶を浸漬し, 異なる位置に結合した重原子による反射強度の変化から位相を決定する。X線結晶解析における位相決定のための標準的方法であるが, 極低角での位相決定には幾つかの問題点がある。元来, 分子量10万を越える蛋

白質による回折振幅を分子量100程度の重原子が変化できる割合はごく小さい。特に, 本課題の場合, 脂質二重膜からの寄与は蛋白質からの寄与の2倍程度あり, 重原子による寄与は更に小さくなる。より深刻かもしれない問題は, 重原子が非特異的に或いは小さい占有率で多数の場所に結合することであり, それがどの程度反射強度に影響を与えるかは見積もれない。実際, 重原子が特定の場所に結合していてもいなくても, 溶媒の電子密度は変化し散乱強度は溶媒の電子密度の二次関数として変化する (Fig. 6b)。また, 通常の結晶化条件下では二次関数が極小になる密度から大きくずれているため, 散乱強度は溶媒の電子密度の変化に非常に敏感である (コントラスト効果)。

溶媒コントラスト変調法は, 蛋白質の概形の決定手段として開発されたが, 中性子回折により膜蛋白質結晶中の界面活性剤ミセルを可視化するための標準的な方法となった<sup>11)</sup>。溶媒の散乱能 (X線であれば電子密度) を変えれば, 対象とするものの見え方は大きく変わる。もし蛋白質を取り囲む溶媒の密度を蛋白質の密度と一致させれば, 蛋白質と溶媒は区別がつかなくなり, 密度が異なる他の部分 (界面活性剤のミセルや脂質二重膜など) だけが見えるため, モデリング可能になる。しかし, 精密化の方法は無く, 情報量はごく少なかった。一方, このような変化は, 回折強度の変化として反映されるだろうから (Fig. 6a), その変化分を差し引くことができれば, 固定部分 (つまり蛋白質+脂質二重膜) の密度情報が得られると期待できる。だが, 溶媒密度変化による回折強度変化から出てくる位相 ( $\Delta\theta_{\text{iso}}$ ) は, 必要としている, 試料全体或いは固定部分の位相と直接的には結びついていない (Fig. 6a)。従って, コントラスト変調から出てくる位相は, 答えが正し

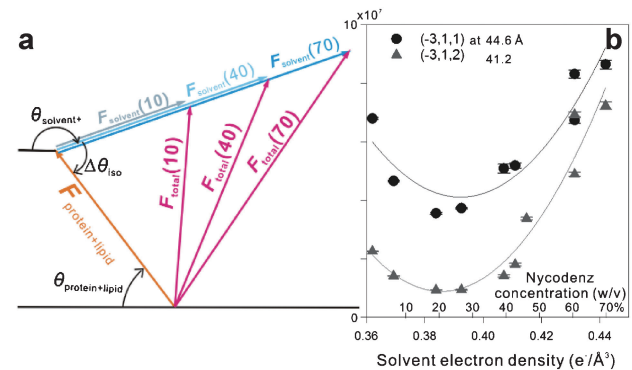


Fig. 6 (Color online) a. A diagram showing the relationship between the observed diffraction intensity and the structure factor from protein plus bilayer and that of solvent. The intensity of each reflection should vary as a quadratic function of solvent electron density  $\langle \rho_{\text{solvent}} \rangle (\xi)$ , in which  $\xi$  is the concentration of the contrast modulation medium, as in b. The diagram shows three different concentrations ( $\xi = 10, 40, 70\%$ ).  $\theta_{\text{solvent}}$  represents the phase part of  $F_{\text{solvent}}$ , etc. b. Squares of structure factors of acentric reflections,  $|F(-3, 1, l)|^2$ , plotted against solvent electron density. Curves are least squares fits to the experimental data.

いかどうかの検証には使えるにしても、それ以外には使いにくい。そのため、初期位相(つまり、脂質二重膜のモデル)がどうしても必要となるが、それを用いて初期電子密度図を計算できれば、蛋白質部分と溶媒部分の flattening を使って、位相改良ができそうに思える。

ここで極めて有効であったのが、溶媒置換率 ( $P_{ex}$  と表記する) という概念を導入したことである (Fig. 7)<sup>8)</sup>。試料中のすべての点の電子密度は溶媒の電子密度に依存せず一定であるか、溶媒電子密度の一次関数として直線的に変化すべきであると考えられる。その傾きを  $P_{ex}$  とする。蛋白質や脂質二重膜の内部では  $P_{ex}$  は 0 であり、溶媒部分は 1、境界領域では 0 と 1 の間の値をとるとするものである。初期的には蛋白質部分の電子密度は原子モデルから計算される値にし、溶媒部分の平均電子密度は溶媒の密度を測定して得られた値に設定する。脂質二重膜に関しては膜に垂直な方向のみに電子密度が変化する一次元単純モデルからスタートする。 $P_{ex}$  のマップを計算し、蛋白質部分は 0 に、溶媒部分は 1 に値を制限するとともに、平滑化することによって雑音を減らすことができる。これによって、データセット間の整合をとることができるようになり、データの冗長性を位相改良にうまく結びつけることができた。

コントラスト変調剤としては幾つかの可能性が考えられる。脂質二重膜の可視化を目指す以上、燐脂質頭部の燐酸基と結合する物質は避けた。従って、正の荷電を持ったイオン性物質は最初の試みから除外すべきであろう。Fourme らは電子顕微鏡法である程度の実績のある, aurothioglucose を提案していた<sup>12)</sup>。我々も試したが、この化合物は照射損傷が激しく、溶解度も高くない上に、結晶格子を破壊することが判明した。分子量の小さい物質は

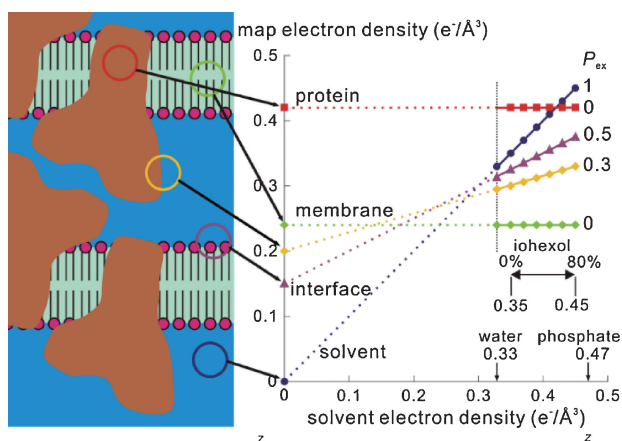


Fig. 7 (Color online) Solvent exchange probability. Electron density  $\rho$  at point  $(x, y, z)$  in the structure should change linearly (or should be constant) as a function of solvent electron density, depending on the “solvent exchange probability”  $P_{ex}$  at that point. The range of electron density that can be modified by 0–80% iohexol (*i.e.*  $0.1 e^-/\text{\AA}^3$ ) is indicated.

分解能の点からはよさそうなのだが、分子間の隙間に深く入りこむ結果、結晶格子を破壊する傾向が強いように思う。従って、抗凍結剤としては glucose よりも sucrose の方が一般に優れている。実際、非常に有用であることが判明したのは、iohexol である (Fig. 8; Histodenz としてシグマから売られている)<sup>13)</sup>。この物質は X 線造影剤として開発されたものであり、密度勾配速心などにも使える。溶解度は極めて高く、80% (w/v) を越える。実際、iohexol 濃度を 0–80% (w/v) の範囲で可変できる場合もあった (しかし、これだけ変化できても、溶媒の電子密度の変化は  $0.1 e^-/\text{\AA}^3$  にとどまる (Fig. 7))。問題はこの分子の大きさであり、実効的な分解能は 5 Å 程度にとどまると考えられる<sup>8)</sup>。溶媒置換率の flattening をかけてよいのは蛋白表面からどれくらいかは実験的に決定すべきパラメータであるが、表面から 5.2 Å 離れば溶媒置換率を 1 としてよいことが判明した。このことは、iohexol のサイズと整合している。

このように X 線コントラスト変調ではコントラストの可変範囲が狭く、Fig. 7 のように、極狭い範囲のデータから直線の傾きと y 切片を求めることになっている。従って、高精度の回折強度データの測定が要求される。幸運であったことは、 $Ca^{2+}$  ポンプの結晶化に必要であった polyethylene glycol の濃度は低く、溶媒コントラスト変調の可変範囲が広がったことである。また、上述のようにコントラスト変調剤の大きさから来る制限もある。しかし、逆に、この大きさの制限から、5 Å より高分解能の回折強度は溶媒密度に依存しないと期待され、原子モデルを用いた絶対スケールが可能のはずである。実際、既に高分解能で構造決定した  $Ca^{2+}$  ポンプ蛋白質の原子モデルを用い、初期的な温度因子の補正、同型性の評価も可能であった。これは、X 線を用いることの非常に大きな利点である。

一方で、マスクの問題は深刻である。現状の精密化プログラムでは原子モデルの外側を一定の電子密度で埋めることしかできない。従って、蛋白質+脂質二重膜領域の中は原子モデルで埋まらない限り、真空である。且つ原子モデルで乱れた構造 (「一様な密度」と言ってもよいが) を表

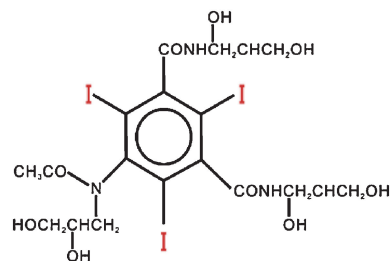


Fig. 8 (Color online) Chemical structure of iohexol<sup>13)</sup>. This compound can be dissolved in water to >80% (w/v) and can increase the electron density of the solvent by  $0.10 e^-/\text{\AA}^3$ .

現するのは極めて困難である。そのために、部分的な脂質二重膜の原子モデルでは、通常の精密化プログラムを用いた場合、極低角まで含めると  $R$  因子はかえって悪くなる。そのため、電子密度図 (Fig. 4a) の計算には極低角はコントラスト変調による位相、高角は原子モデルによる位相を用いるように phase combine した構造因子を使う必要がある。

#### 4. データ収集に関して

最初期 (2002年頃) の予備的実験は SPring-8 の BL40B2 を用いて行なったが、有用なデータが得られるようになったのは、清水伸隆博士、酒井久伸博士の協力を得て BL41XU で He パスを設置し、カメラ長 600 mm で大面積イメージングプレート X線検出器 R-Axis V を用いることによって、すべての反射強度の収集が行なえるようになってからである (2004年, Fig. 9)。原子モデルを用いたスケールリングを可能にするよう 3~4 Å 分解能の反射点も含め、検出器を飽和させること無く極低角の反射強度を測定しようとする、20 bit でも不足であり、露光を 1/10 程度にして再露光する必要があった。そのために、CCD が検出器として使えるようになって R-Axis V を使う必要があり、異様に時間のかかる実験であった (結晶系が C2 であったため、180フレーム×2分=6時間)。現在は2次元フォトンカウンティング検出器 PILATUS が導入されたおかげで測定時間そのものは大幅に (10分以下) 短縮されたが、flux を減らして数え落としがないようにしても、部分的には 2~3 条件での測定が必要なフレームが

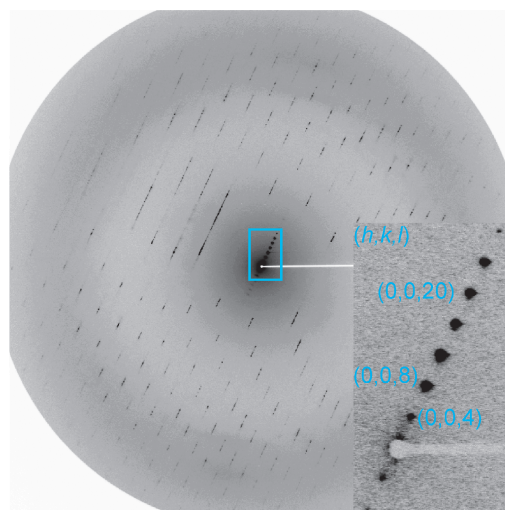


Fig. 9 X-ray diffraction pattern of a  $\text{Ca}^{2+}$ -pump crystal soaked in a buffer containing 60% (w/v) iohexol. Recorded to 3.0 Å resolution with an R-Axis V imaging plate detector at BL41XU, SPring-8. The crystal has a  $P4_12_12$  symmetry with the unit cell parameters of  $a=b=71.56$  and  $c=586.14$  Å. Inset shows a magnified view of the boxed area of the corresponding frame with a reduced exposure.

あり、SPring-8 の長期課題がなければ実行不可能な研究であった。

理論的にはすべての反射点の回折強度は溶媒電子密度の二次関数として変化するので<sup>12)</sup>、1つの状態の構造決定には最低3つ (実際には10点程度) の溶媒密度での測定が必要である (Fig. 6b)。結晶はすべて微量透析法で得られたものであり、再現性も非常に良好であった。一つの成分だけの变化は容易であり、且つ、厳密な制御が可能であったことも大きかった。結晶を拾うときの乾燥の問題も低温室 (10°C) で行なうことで解決できた。但し、高濃度の iohexol 存在下で結晶を拾うことは、溶媒が相当に粘稠になり、且つコントラストマッチングのために結晶が見えなくなることもあるので熟練を要する。顕微鏡下で余分の溶媒をこよりで吸い取ると、バックグラウンドは下がり、マウントした後の視認性も向上する。

#### 5. おわりに

本研究で用いた X線溶媒コントラスト変調法は、大きな揺らぎを持った構造を可視化するために有用な方法であるが、X線溶媒コントラスト変調法は万能ではない。初期位相を必要とするし、高濃度の polyethylene glycol を沈殿剤として結晶化している場合には、溶媒コントラスト変調の余地はない。さらに、コントラスト変調剤の大きさによる分解能の問題があり、溶媒の電子密度の可変範囲が狭いことによる精度の問題もある。本来、そのような問題のない  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  によるコントラスト変調が可能な中性子回折に発展されるべきものであるが、ビーム強度の問題はまだ深刻であり、巨大結晶が必要である。そこで、多重同型置換法のデータ収集を工夫して低角の位相情報を得る手段を確立することも考えている。いずれにせよ、低角の位相決定の問題を克服し、脂質二重膜からプロトンまでを含む真の構造生物学を展開したい。

#### 謝辞

本研究は科学研究費・特別推進研究 (19002013, 23000014) を得て SPring-8 の長期課題 (2009B0025, 2012B1486, 2013A0049) の一部としてなされたものである。データ収集に当たっては SPring-8, BL41XU の歴代の担当者、特に、清水伸隆博士、酒井久伸博士、長谷川和也博士、奥村英夫博士には、絶大なご支援をいただいた。ここに記して御礼申し上げたい。また、結晶を作製してくれた杖田淳子さん、平田絢美さん、岩澤志穂さん、データ収集を手伝ってくれた研究室のメンバーにも感謝したい。

#### 参考文献

- 1) F. M. Goñi: Biochim. Biophys. Acta 1838, 1467 (2014).

- 2) J. A. Killian and G. von Heijne: Trends Biochem. Sci. **25**, 429 (2000).
- 3) S. J. Singer and G. L. Nicolson: Science **175**, 720 (1972).
- 4) Y. Sonntag, M. Musgaard, C. Olesen, B. Schiott, J. V. Møller, P. Nissen and L. Thogersen: Nature Comm. **2**, 304 (2011).
- 5) N. D. Drachmann, C. Olesen, J. V. Møller, Z. Guo, P. Nissen and M. Bublitz: FEBS J. **281**, 4249 (2014).
- 6) C. Toyoshima: Arch. Biochem. Biophys. **476**, 3 (2008).
- 7) C. Toyoshima: Biochim. Biophys. Acta **1793**, 941 (2009).
- 8) Y. Norimatsu, K. Hasegawa, N. Shimizu and C. Toyoshima: Nature **545**, 193 (2017).
- 9) K. J. Sweadner: Nature **545**, 162 (2017).
- 10) W. M. Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch and S. H. White: Biochemistry **37**, 14713 (1998).
- 11) E. Pebay-Peyroula, R. M. Garavito, J. P. Rosenbusch, M. Zulauf and P. A. Timmins: Structure **3**, 1051 (1995).
- 12) W. Shepard, R. Kahn, M. Ramin and R. Fourme: Acta Crystallogr. D **56**, 1288 (2000).
- 13) D. Rickwood, T. Ford and J. Graham: Anal. Biochem. **123**, 23 (1982).

## 著者紹介

### 豊島 近

東京大学 定量生命科学研究所 教授

E-mail: ct@iam.u-tokyo.ac.jp

専門：構造生物学

#### 【略歴】

1983年3月 東京大学大学院理学系研究科物理学専攻博士課程修了。理学博士。東京大学理学部助手（物理学教室）、英国MRC分子生物学研究所研究員、理化学研究所・国際フロンティア研究員、東京工業大学理学部（生命理工学部）助教授を経て1994年5月より分子細胞生物学研究所（現：定量生命科学研究所）教授、現在に至る。

### 乗松良行

株式会社タダノ 技術研究所

専門：X線結晶構造解析

#### 【略歴】

2010年、東京大学理学系研究科物理学専攻 博士後期課程修了。博士（理学）。富士通株式会社での勤務を経て、2014年から東京大学分子細胞生物学研究所特任研究員。2017年から株式会社タダノに勤務。

# Dynamics of interactions between a membrane protein and phospholipids as revealed by X-ray solvent contrast modulation

**Chikashi TOYOSHIMA**

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo  
(Current: Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo)  
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

**Yoshiyuki NORIMATSU**

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo  
(Current: Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo)  
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

**Abstract** Our knowledge on the protein-phospholipid interaction was very limited because conventional X-ray crystallography can resolve only one or two phospholipids per membrane protein. By developing X-ray solvent contrast modulation, we have succeeded in visualising the entire first layer phospholipids (ca. 45 molecules) that surround the transmembrane region of the Ca<sup>2+</sup>-pump crystallised in four different states. The electron density maps clearly show that the pump protein possesses amino acid residues that work as anchors of phospholipids and those work as membrane float. We now see tight interplay between those residues and phospholipids and that the lipid bilayer actively plays an important role in the mechanism of ion pumping.