

バクテリオロドプシンの光反応初期過程での構造変化の観測 Structural transition of bacteriorhodopsin in initial process of photoreaction

岡俊彦*, 神戸敦史

静岡大学大学院理学研究科, 〒422-8529 静岡市駿河区大谷 836

Toshihiko Oka* and Atsushi Kanbe

Graduate School of Science, Shizuoka University, 836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Japan

1 はじめに

バクテリオロドプシンは高度好塩菌の細胞膜に存在するタンパク質で、光を吸収することにより細胞内から細胞外へプロトンを送る。この過程で、K、L、M、N、Oなどの光反応中間体を経ることが明らかになっている。この光反応過程は、可視分光測定、IR測定などにより詳しく調べられており、反応に関わる残基などが特定されている。またこれまでに結晶構造解析により、複数の研究グループが各反応中間体の構造を明らかにしている。しかしこれらの反応中間体は低温にすることにより光反応の進行を阻害して蓄積しているためか、研究グループごとで光反応中間体の構造に差異がみられる。特にL中間体においてはその差が最も顕著となっており、ヘリックスレベルでの大きな構造変化においても差が見られる[1]。この差の原因に関しては未解明であるが、結晶構造解析以外の手法で測定を試みる必要がある。

申請者はこれまでに、高度好塩菌の細胞膜上で生成される紫膜とよばれるバクテリオロドプシンの2次元結晶を用いて、時間分割X線回折測定により調べてきた[2]。紫膜は1 μ m未満の2次元結晶であるが、これを集めてX線を照射することにより粉末様の回折を得ることができる。この方法では得られる情報は膜面方向に投影されたものとなり、分解能は7Å程度とヘリックスレベルになる。申請者はM中間体からN中間体で起こるヘリックスレベルで起こる構造変化などを明らかにしてきた。とくにM中間体が構造変化の少ないM1中間体と構造変化の大きいM2中間体の2つに分かれることを明らかにしてきた。しかしこれらの実験は6 μ sの時間分解能で、さらに回折の弱い試料を用いた測定であったため、100ns程度から蓄積するL中間体を観測するには不十分なものであった。

このため本申請では特にL中間体のヘリックスレベルでの構造変化を明らかにすることを目的として、PF-ARのNW14Aでpump & probe測定を行った。

2 実験

試料は文献[2]と同様にアルミ箔上に作成し、湿度を一定に保った容器内に密閉し、測定を行った。PF-ARのNW14Aではpump & probe測定を行った

[3]。YAGレーザーの倍波でバクテリオロドプシンの光反応を開始させ、遅延ののちX線パルス照射した。これを積算し、また遅延を変えて測定していくことにより、バクテリオロドプシンの光反応過程での構造変化によるX線回折変化を測定した。試料はフィルム状、つまり平板状であるが、X線は角度が0度に近い斜入射とした。またレーザーは平板に対して垂直に、X線方向に広げて照射した。また実験は室温で行った。

3 結果

この実験では試料にレーザーとX線パルスを繰返し照射するため、試料の損傷の検討を行った。この検討の後、X線のパルス幅を10 μ s(10パルス分)として測定を行った。図1はその回折強度の時間変化を示している。レーザー照射によりバクテリオロドプシンの7本ヘリックスの相対配置が変化したため、回折強度が変化し、回折強度の差として現れている。このデータで1.5日分程度のデータを積算したものである。このデータはすでに報告されているものと同様な変化を示している[2]。

次にX線を1パルスとして、実験を行った。X線強度が1/10となるため、回折強度も1/10程度となり、回折がとれているか、レーザー照射により強度が変化しているかのチェックに極端に時間がかかるようになった。またこのチェックの結果も明瞭には判断しがたいため、データ蓄積の後に不十分と判明することがあった。この部分を実験を行っている期間内に修正することができず、実験の目標としていた時間領域で有意な測定データを得ることができなかった。

謝辞

NW-14Aでの実験に協力いただいた、足立伸一氏、野澤俊介氏、佐藤篤志氏、富田文菜氏に感謝します。

参考文献

[1] J. Lanyi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1658**, 14 (2004); Anderson *et al.*, *Structure.* **17** 1265 (2009)

[2] T. Oka *et al.*, *Biophys. J.* **88**, 436 (2005).

[3] S. Nozawa *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* **14**, 319 (2006)

* stoka@ipc.shizuoka.ac.jp

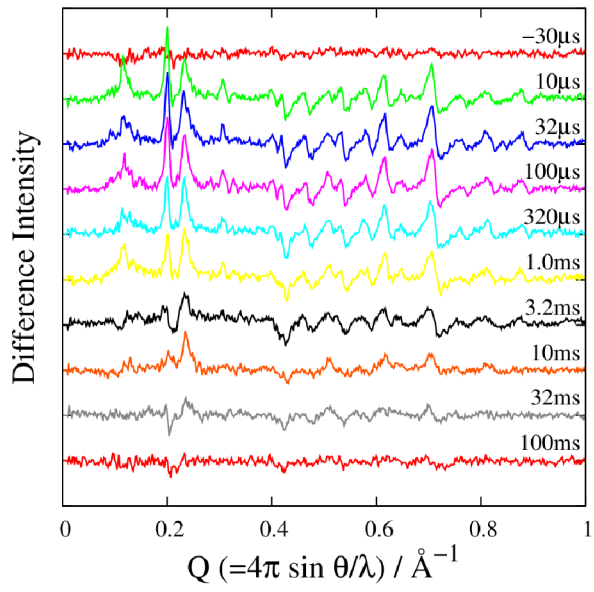


図1 X線パルスの幅が10 μs の時の回折強度の時間変化