

氏 名	はた 中 みのる 畑 中 稔
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1847 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	バクテリオロドプシンのプロトン放出ドメインにおける水素結合構造

論文調査委員	(主 査) 教 授 前 田 章 夫	教 授 藤 吉 好 則	教 授 高 橋 敏
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

高度好塩菌 *Halobacterium salinarium* に存在するバクテリオロドプシンは、七本の α ヘリックスから形成され細胞膜の脂質二重層に埋め込まれている。その働きは内部に構成されるプロトンチャンネルを通じて細胞質側から細胞外側へプロトンを輸送することで、ATP 合成に必要なエネルギーをプロトン濃度の勾配として与えることである。その中心には光を吸収し反応をトリガーするレチナールが結合しシッフ塩基を形成している。バクテリオロドプシンは分子量約 26kDa と比較的小さく単純な構造をしていることからプロトンポンプのモデル系として、実験及び理論の両方面から詳細な研究が行われてきた。しかし、これまでにプロトンポンプ機構に関わるアミノ酸残基の性質を調べる研究は精力的に行われてきたが、プロトンチャンネル内に形成される水分子を含めた水素結合構造を調べたものは少ない。そこで本論文ではバクテリオロドプシン内の水素結合構造とプロトンポンプ機能の相関を調べる実験を行い、以下の結論を得た。

1. 細胞外側ドメインにある Arg82 は、プロトン放出と活性中心で起こるプロトン移動を、静電的な相互作用で制御すると考えられている。しかし本研究で行った82位の性質を変えた変異蛋白質と wild type の実験からは、アミノ酸の静電的性質と機能発現の関係に系統立った傾向は見られなかった。すなわち、M 中間体の生成過程には wild type と R82Q, R82A にそれぞれ同様の挙動が見られ明らかに静電的な性質には依存していないことが分かる。また、FT-IR 分光法の結果にも同様な傾向が見られ、特に活性中心に存在すると考えられている水分子の O-H 伸縮振動のバンドに顕著に現れた。このことから、この傾向はアミノ酸側鎖の構造に由来するものであり Arg82 の水素結合能を持った ϵ 位の N-H 基が正常なプロトンポンプ機能発現に寄与していると考えた。

2. Trp86 は活性中心の近傍にあり、もう一つの Trp 残基と共にレチナールポリエン鎖を挟み込む構造になっている。この水素結合能を持ち、かつ側鎖の大きな Trp を Phe に置換した W86F では wild type では起こらない反応が見られた。すなわち、light adaptation をしたとき通常は起こらない all-trans 型か

ら 13-*cis*, 15-*syn* 型レチナールへの逆戻り反応が観測された。しかもその中にはポリエン鎖に関するモードの coupling の程度が異なる 13-*cis*, 15-*syn* 型レチナールが含まれていることがレチナール異性体の分析及び重水置換, ^{13}C でラベルしたレチナールで再生した W86F の FT-IR スペクトルの測定により明らかになった。このことから Trp86 は all-*trans* 型から 13-*cis*, 15-*syn* 型レチナールへの逆戻り反応を抑制するアミノ酸残基の一つであることを明らかにした。また、活性中心に存在する水分子とインドール基の N-H が弱い水素結合を作っていることも示した。

3. 活性中心のシッフ塩基と Asp85 に配位する水分子は、プロトンポンプ活性に欠くことのできないものであると考えられている。しかし水分子は等方的な球状分子ではなく特有の水素結合能を持つため、蛋白質内のような拘束の多い環境内での役割を詳細に理解するには配向状態も知る必要がある。本研究では、この Trp86 に関する結果を受けて、この水分子がプロトン化シッフ塩基, Trp86, Asp85, Asp212 に配位している描像を得た。さらに偏光 FT-IR 分光法により水分子の O-H 基の紫膜の法線方向に対する角度を求め、活性中心内では水分子が氷状の水素結合構造からは歪んだ構造をとって活性中心内に配位していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、蛋白質内で起こる能動的プロトン移動を、その機能を持つ代表的な蛋白質であるバクテリオロドプシンを用い、蛋白質の機能発現を水素結合構造変化の観点から解明することを試みている。これまでにバクテリオロドプシンの機能発現は、内部のプロトン輸送チャンネルに存在するアミノ酸残基を置換した変異蛋白質を使い、個々のアミノ酸残基の役割が調べられてきた。その方法は主に活性の有無や、プロトン輸送に関わるアミノ酸残基の pKa 等を調べることであり、巨視的な情報からの考察にとどまることが多かった。しかし本研究では FT-IR 分光法が、他の分光法では観測することが困難な水分子を含む蛋白質の構造変化を追跡可能である点に着目し、水素結合変化に及ぶ微視的な構造変化の情報を得ることで、機能発現の機構を新たな観点から考察している。

具体的には、申請者が行った Arg82 変異蛋白質の研究は、水素結合が機能発現を理解する上で欠くことのできない要素であることを強調している。そこでは、プロトンポンプ機能で重要な役割を果たすと考えられている Arg を、電荷及び水素結合能の異なるアミノ酸に置換したとき、M 中間体の生成挙動の傾向が電荷ではなく水素結合能の有無に依存していることから、申請者は従来アミノ酸残基の静電的性質のみから議論されてきたプロトン輸送機能の解釈に、水素結合構造の変化を考慮する必要性を指摘している。

また、水分子を含む水素結合構造を調べることが重要であることは、プロトンチャンネル内で解離性アミノ酸残基と共に、水分子が水素結合ネットワークを形成していることから明らかである。特に、活性中心に存在し、シッフ塩基, Asp85, Asp212 に配位していると考えられている水分子はプロトンポンプ活性を保つ上で不可欠であり、申請者は Trp86 変異蛋白質の研究から新たに、この水分子が Trp86 とも弱く配位していることを明らかにした。この結果を受け、更に偏光 FT-IR 分光法による観測を行い、その水分子が先に述べた 4 点を頂点とした氷状の水素結合を形成し、特異的な配向状態で活性中心に存在していることを明らかにしている。この配位状態がこれまでに得られてきた実験結果をうまく説明できるこ

とは興味深い。

以上のことから、バクテリオロドプシンのプロトンポンプ機能発現の理解には、静電的な相互作用も重要であることは疑うべくもないことであるが、水素結合構造の状態が極めて重要な要素であることを本研究は示した。また、バクテリオロドプシンはアミノ酸残基や水分子が水素結合で有機的に結び付き、水素結合ネットワークを形成することで、一方向へのプロトン移動を実現していると考えられているが、機能発現の理解のためには水分子の配位状態の情報までも知ることが重要であることを本論文は提示している。この考えは蛋白質機能発現を理論的に構築する上で新たな見解を与えるであろう。更に、バクテリオロドプシンのプロトン輸送チャンネルのような、秩序だった構造からなる経路を伝達するプロトンの移動の機構を解明することは、プロトン移動の物理化学的一般原理にも新たな知見を与えられられる。

よって主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。