

。 関西学院大学理学部物理学教室

1. 蛋白質の立体構造と、揺らぎの関係

—分子内架橋，基質分子結合，変性剤の水素交換反応速度への影響— 久 米 克 也

2. 葉緑体光合成系 II の ESR と ENDOR

佐 藤 純 一

3. NaCl 型単結晶の光弾性効果の波長分散 (第 1 部)

マイクロ光弾性法とその画像処理 (第 2 部)

船 吉 俊 充

4. ウルトラ磷酸結晶の作成

村 井 博 之

1. 蛋白質の立体構造と、揺らぎの関係

—分子内架橋，基質分子結合，変性剤
の水素交換反応速度への影響—

久 米 克 也

初めに、蛋白質構造は、水素結合や Van der Waals' force などの弱い相互作用エネルギーにより安定化されている。従って、その構造はよく揺らぐ。周りの環境が生理的条件から外れると、蛋白質構造は大きく揺らぐようになる。そしてついには、その揺らぎに耐え切れなくなつて、ポリペプチドのランダムコイル状態に構造転移する。しかし、周りの環境が生理的条件に戻れば、蛋白質は自発的に巻き戻る。そして再び酵素活性を持つ秩序構造を形成する。この可逆的構造転移過程は、遺伝的情報を必要としない、自由エネルギー最小の方向に進む熱力学過程である。(図 1)

この構造転移機構を明らかにするには、構造転移経路を詳しく追跡すれば良い。しかし現在のところ構造転移経路を調べる有効な手段は存在しない。そこで我々は、構造転移機構を明らかにするために、構造転移過程で通過する秩序構造の揺らぎの限界状態に注目し研究を行なっている。我々は、この揺らぎの限界状態を遷移状態と呼んでいる。

遷移状態は次のような二つの側面を持つ。一つは、遷移状態が構造転移過程における自由エネルギー極大の活性化状態であるということである。秩序構造と遷移状態の自由エネルギー差は、構造転移の動的測定より得られる。二つには、遷移状態が秩序構造の揺らぎの限界の状態

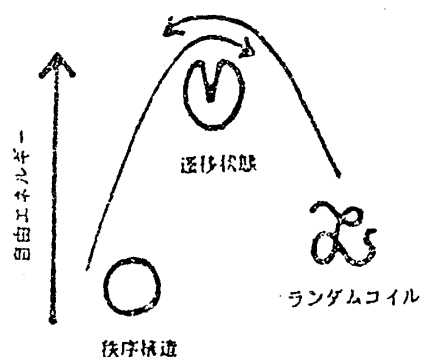


図1：蛋白質の構造転移

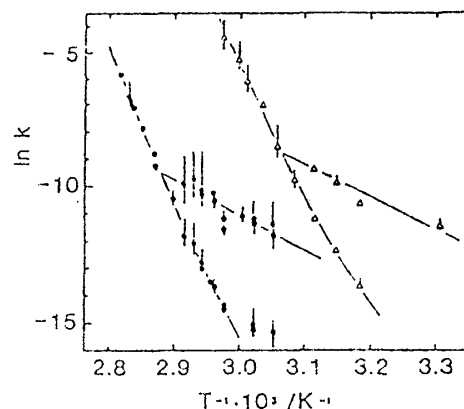


図2：水素交換反応速度の Arrhenius Plot

△：天然リゾチーム
●：変性リゾチーム
pH 6.4

Table I

The factors in increasing or decreasing the rate constant due to the addition of reagent and intrachain crosslinking

crosslink		2-PrOH		(NAG) ₃	
		1.3M	2.6M	3mM	12mM
k_{uf}	1/10	k_{uf}	3.3	k_{uf}^a	1/11
k_f	500	k_f	1/3.8	k_f^a	1
K	1/5000	K	12.5	K^a	1/11

crosslink : 4.5M LiBr, pH3.7

2-PrOH : 45°C, pH2.0

k_{uf} : unfolding rate

k_f : folding rate

K : equilibrium constant

(NAG)₃ : 2mM lysozyme, 55°C, pH3.7

k_{uf}^a : apparent unfolding rate

k_f^a : apparent folding rate

K^a : apparent equilibrium constant

であるということである。従って遷移状態に対する静的情報は、秩序構造の揺らぎを調べることにより得られる。

遷移状態に対する動的、及び静的性質を比較検討することにより、遷移状態についての理解が一層深まると考えられる。

構造転移における動的研究は、segawa らにより温度ジャンプ法を用いて行なわれた。そして構造転移速度が明らかにされ、秩序構造の安定性が決定された。表1に segawa らが明らかにした構造転移速度を示す。

そこで我々は、秩序構造の揺らぎを調べることにより、遷移状態に対する静的情報を得ようと試みた。

秩序構造の揺らぎを測定する手段には、秩序構造からの水素交換反応速度を測定する方法がある。蛋白質内部の水素は、その立体構造により水素交換が妨げられている。しかし秩序構造が揺らぎ、その立体構造に歪みを生じると、内部の水素は交換可能となる。従って秩序構造の揺らぎは、水素交換反応速度に反映される。我々は、主鎖ペプチド水素の重水素交換反応速度

を測定することにより、秩序構造の揺らぎを調べた。

本研究に用いた球状蛋白質は、ニワトリ卵白リゾチーム（分子量 14307：129 残基）である。

リゾチーム分子の 126 個の主鎖ペプチド水素の内、分子内水素結合を持つ約 42 個の水素は、遅く交換される。これらの 42 個の水素はさらに二つのグループに分かれる。 半分の 21 個はリゾチーム分子の比較的柔らかい部分に属し、残りの 21 個はリゾチーム分子の固い部分に属している。図 2 に交換反応速度の Arrhenius プロットを示す。活性化エンタルピーの小さな部分の交換反応が、秩序構造の揺らぎによる交換反応を表わしている。また活性化エンタルピーの大きな交換反応は、リゾチームがランダムコイル状態に構造転移して生じる交換を表わしている。この部分の交換反応速度は、ランダムコイル状態の存在確率と化学交換反応速度の積になる。

高温では、固い部分も柔らかい部分も共にランダムコイル状態から交換する。従って交換反応は、一相として観測される。しかし低温になると、柔らかい部分は秩序構造の揺らぎにより交換し始める。しかし固い部分は、依然としてランダムコイル状態からのみ交換される。従って交換反応は、二相に分かれる。

我々は、この柔らかい部分の交換反応速度に注目し、分子内架橋、基質分子結合、変性剤が秩序構造の揺らぎに及ぼす影響を調べた。そして次のような結果を得た。

1) 分子内架橋の影響 (図 2)

★ 分子内架橋はランダムコイルからの交換反応速度を非常に減少させるが (約 $1/20000$)、秩序構造の揺らぎによる交換反応速度は、ほとんど減少させない (約 $1/20$)。 このことから次の様なことが分かる。分子内架橋はランダムコイル状態のエントロピーを下げ、熱的安定性を大きく増大させている。しかし分子内架橋は秩序構造の安定性をほとんど増加させていない。また秩序構造の揺らぎもほとんど抑制していない。

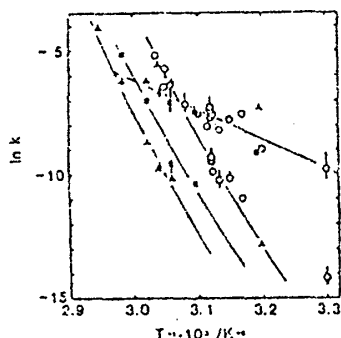


図3：基質分子結合の重水素交換反応速度に及ぼす影響

Lysozyme 2mM
 ▲: (NAG) 1.2mM
 ■: (NAG) 3mM
 ○: (NAG) 0mM
 pH 7.2

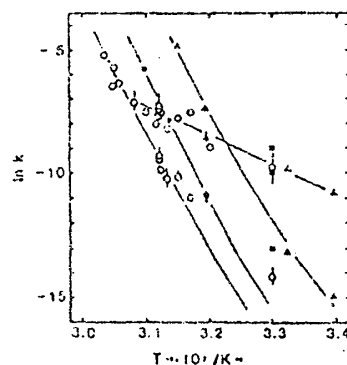


図4：変性剤の重水素交換反応速度に及ぼす影響

○: 2-PrOD 0M
 ■: 2-PrOD 1.3M
 ▲: 2-PrOD 2.6M
 pH 7.2

★ 天然リゾチームの熱変性温度領域（約 72℃）においても、架橋リゾチーム内部の水素は、秩序構造の揺らぎでは交換されていない。従って秩序構造の揺らぎは、この温度領域においても限られていることが分かる。このことは、架橋リゾチームが巻き戻りさえしていれば、十分コンパクトな構造を持つことを示している。

★ Wuthrich は、蛋白質の水素交換反応速度は、蛋白質の熱的安定性に依存すると報告している。

しかし我々の実験では、柔らかい部分の交換反応速度は、分子内架橋による熱的安定性の増加にもかかわらず、ほとんど減少しなかった。これは、Wuthrich の結果と非常に異なる結果である。

2) 基質分子結合の影響（図 3）

★ （NAG）の結合は、リゾチームの秩序構造を非常に安定にする。しかし秩序構造の揺らぎは全く変化しない。これは秩序構造の揺らぎが、秩序構造の安定性に依存していないことを表わしている。

3) 変性剤の影響（図 4）

★ 変性剤は、リゾチームを非常に壊れやすくする。しかし秩序構造の揺らぎは、全く変化しない。このことから秩序構造は、2-PrOH によって影響を受けないことが分かる。

2-PrOD は遷移状態に作用して、その自由エネルギーを下げていると考えられる。

以上のことから次のことが分かる。

☆ 蛋白質は、巻き戻りの中間体を持たない、all-or-none 的完全二状態性を示す。

☆ 遷移状態は、重水素交換で観測される秩序構造の揺らぎよりも、もっと全体的で協同的な揺らぎの状態であると考えられる。

2. 葉緑体光合成系 II の ESR と ENDOR

佐藤 純 一

高等植物の光合成系初期過程は、700 nm の光に反応する光合成系 I と、680 nm の光に反応する光合成系 II とに分けられる。このうち、私は酸素発生系を含む系 II に注目し、系 II に特有な ESR シグナルである Signal II を ESR と ENDOR を使って調べた。その結果、