

博士論文

再構成膜系を用いたバクテリオロドプシンの

二次元結晶化および構造安定性に関する研究

Studies of two-dimensional crystallization and structural
stability of bacteriorhodopsin using reconstituted membranes

名古屋大学大学院工学研究科

マテリアル理工学専攻 応用物理学分野

根岸 瑠美

Lumi NEGISHI

概要

多くの膜タンパク質は複合体を形成しており、その構造と機能は密接にかかわっている。従って、膜タンパク質複合体形成のメカニズムおよび生物学的意味を理解することは物理的にも生物的にも非常に重要である。バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌 *Halobacterium Salinarum* の細胞膜に発現する光駆動型プロトンポンプタンパク質で、細胞膜で三量体をユニットとした二次元結晶 (紫膜) を自発的に形成する。紫膜に含まれる唯一のタンパク質である bR は、自発的な二次元結晶形成という興味深い性質に加え、アミノ酸配列、三次元構造、光サイクルと bR 分子の構造変化といった基本的な情報がすでに得られていることなどから、膜タンパク質複合体形成のメカニズムを調べるための非常によいモデルとなっている。この bR の二次元結晶を膜タンパク質複合体のモデルとみなし、二次元結晶の形成・融解とこれに伴う bR の構造安定性変化を調べることで、膜タンパク質の複合体形成のメカニズムおよび生物学的意味を調べることができる。

そこで本研究では、bR の持つ以下の 3 つの性質を利用した。まず第 1 に bR は内部に発色団レチナールを含むため、bR 特有の二次元結晶を形成した際、可視領域に独特な円二色性スペクトルを示す。この性質を利用することで、円二色性測定により bR の複合体形成をモニターすることができた。第 2 に bR は *Halobacterium Salinarum* の細胞膜では自発的に二次元結晶を形成するが、人工脂質膜に再構成すると、脂質膜のゲル - 液晶相転移と相関して、二次元結晶形成・融解が起こることが知られている。そこで、人工脂質膜に再構成した bR を用い、複合体形成に関して詳細に調べた。第 3 に先行研究により二次元結晶が融解することで、bR は光照射による不可逆な変性 (光退色) を示すことが知られている。また光退色現象の速度論解析を行うと、可溶化 bR では 1 成分、紫膜 bR では 2 成分の退色成分が観察される。そこで二次元結晶融解条件下での光退色現象について詳細に調べた。

本研究では bR はどのようにして二次元結晶を形成しているか？そして二次元結晶の形成は bR が機能するのにどのような意味を持つのか？を調べることを目

的とした。まず二次元結晶形成機構について（１）脂質膜ゲル相における相分離の効果を調べるために相転移温度の異なる脂質膜に bR を再構成し、また（２）水-膜界面にはたらく静電相互作用の影響を調べるために溶媒塩濃度を変えて、人工脂質膜中の bR 二次元結晶の形成と融解の挙動を調べた。次に bR の機能におけるタンパク質間相互作用の重要性を調べるために（３）人工脂質膜に再構成した bR の二次元結晶融解に伴う光照射下での熱安定性変化を調べた。

（１）再構成 bR の構造安定性における脂質膜相転移の効果（原著論文 1）

再構成 bR の二次元結晶形成・融解が脂質膜相転移と相関をもって起こることを確かめるため、相転移温度の異なる三種の中性リン脂質、ジミリスチルフォスファチジルコリン (DMPC)、ジパルミチルフォスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC) のそれぞれについて、bR を再構成した。ゲル-液晶相転移温度は DMPC : 24°C、DPPC : 41°C、DSPC : 55°C である。各サンプルについて再構成膜の相転移 (DSC 測定) と二次元結晶融解 (CD 測定) をモニターしたところ、その温度依存性がよく一致した。また脂質の種類によらず、ゲル相で二次元結晶形成が確認されたことから、再構成 bR は脂質膜ゲル相中の相分離の作用によって集積することがわかった。また、光照射下での bR の構造安定性におけるタンパク質間相互作用の重要性を調べるため、二次元結晶融解と bR 分子の熱安定性 (光照射下) の関係を調べた。DMPC、DPPC、DSPC すべての再構成膜中の bR において光照射下の退色温度と二次元結晶融解温度がよく一致し、一方、暗中での熱退色温度は再構成脂質の種類 (二次元結晶融解温度) によらず約 60°C であった。この結果から、光照射下における bR の熱安定性、つまり機能中の構造安定性における二次元結晶の重要性が示された。

（２）バクテリオロドプシン二次元結晶形成に与える静電相互作用の影響 (原著論文 2)

バクテリオロドプシンの二次元結晶形成機構を調べるにあたり、紫膜中には負電荷を持った脂質が特異的に存在することから、私は膜界面での分子間静電相互作用に着目した。そこで溶媒塩濃度上昇による静電遮蔽効果を利用し、DMPC 膜に再構成した bR の二次元結晶形成・融解をモニターすることで静電相互作用の重要性を調べた。二次元結晶形成と Debye 定数 (κ) の間には強い相関があり、これより再構成膜中の bR 間には静電斥力が作用していることが明らかになった。さらに先行研究における構造解析の結果を踏まえると、この静電斥力は細胞質側膜界面に集中している bR の負電荷残基に起因するものであること、また紫膜中では bR 間の斥力を負電荷脂質が静電的に中和することで二次元結晶の高い安定性を維持していることが示唆された。

(3) バクテリオロドプシンの動的構造（機能）におけるタンパク質間相互作用の重要性（原著論文 3）

光照射下で起こる退色現象（光退色）を調べるために、光退色が起こる温度領域の長い DMPC 再構成膜中の bR について光退色の反応速度解析を行った。この結果、異なる反応速度を持つ 2 種類の退色成分の存在が明らかになった。一方、bR は暗中で光サイクルの基底状態にあり 560 nm 付近に吸収を持つことが知られている。二次元結晶融解条件下の DMPC 再構成 bR の吸収スペクトルを光照射下と暗中で比較すると、光照射下でのみ 560 nm の現象に伴う 400 nm 付近の顕著な吸収増大が確認された。またこの 400 nm に吸収を持つ bR は、光照射を中止し、4°C、暗中で 12 時間静置することで一部が 560 nm に戻ることがわかった。バクテリオロドプシンの光中間体である M 中間体は最大吸収波長が 410 nm であることから、私たちはこの 400 nm に吸収を持つ可逆な bR を新たに M-like 中間体と定義した。さらに、この bR の異なる 2 種類の安定性を取り得ることを意味する。一方、Shibata らは光照射下での高速原子間力顕微鏡観察を行い、反応周期の異なる bR が混在することと、三量体の外での bR-bR 間相互作用の存在を示している。こうした報告も合わせると、bR は二次元結晶による機能維持だけでなく、

二次元結晶よりも局所的な構造単位で機能活性を維持している可能性が示唆された。

本研究の最後に、再構成 bR の実験により得られた結果に基づき、膜タンパク質の複合体形成のメカニズムおよび生物学的意味について考察した。本研究から bR-bR 間の静電相互作用は斥力が支配的であることが示された。bR の細胞質側ループ領域には負電荷残基が多く存在するため、二次元結晶を形成することで膜表面の負電荷密度が高くなり、結果的に膜の細胞質側表面で低 pH 条件となる。これによって bR の二次元結晶領域では膜表面でプロトン濃度が高くなり、bR のプロトンポンプ機能が上昇する。また二次元結晶融解条件下で光退色速度論解析を行った結果、bR のオリゴマー形成が示唆された。そして bR のオリゴマーは非対称で、機能を維持するものと、その動的構造の安定化に貢献するものが共存している可能性が示された。二次元結晶を形成する全ての bR 分子が光駆動プロトンポンプに参加できるため、bR は二次元結晶を形成することでプロトンポンプ効率を向上させていると考えられる。

[関連論文]

1: Yokoyama, Y., Negishi, L., Kitoh, T., Sonoyama, M., Asami, Y. and Mitaku, S. (2010)

Effect of lipid phase transition on molecular assembly and structural stability of bacteriorhodopsin reconstituted into phosphatidylcholine liposomes with different acyl-chain lengths. *J. Phys. Chem. B* 114, 15706-15711.

2: Negishi, L. and Mitaku, S. (2011)

Electrostatic effects influence the formation of two-dimensional crystals of bacteriorhodopsin reconstituted into dimyristoylphosphatidylcholine membranes. *J. Biochem.* 150(1), 113-119.

3: Negishi, L., Yokoyama, Y. and Mitaku, S.

Heterogeneous stability of bacteriorhodopsin reconstituted into dimyristoylphosphatidylcholine membranes under melting condition of two-dimensional crystals. *J. Biochem.* (2011 submitted)

再構成膜系を用いたバクテリオロドプシンの二次元結晶化および 構造安定性に関する研究

Studies of two-dimensional crystallization and structural stability of bacteriorhodopsin using reconstituted membranes

目次

第1章 序

1.1 背景	9
1.1.1 バクテリオロドプシンの吸収スペクトルと円二色性スペクトル ...	11
1.1.2 バクテリオロドプシンの人工脂質膜への再構成	14
1.1.3 バクテリオロドプシンの光退色現象	14
1.2 第3章への問題提起： 再構成膜相転移が再構成 bR の構造安定性に及ぼす影響	15
1.3 第4章への問題提起： bR 二次元結晶形成における静電相互作用の重要性	17
1.4 第5章への問題提起： bR の動的構造（機能）における分子間相互作用の重要性	19

第2章 試料と実験方法

2.1 試料の調整	21
-----------------	----

2.1.1 紫膜（バクテリオロドプシン）の精製	21
2.1.2 バクテリオロドプシンの人工脂質膜小胞への再構成	23
2.2 測定方法	24
2.2.1 紫外・可視吸収測定法	24
2.2.2 円偏光二色性スペクトル	25
2.2.3 紫外・可視吸収測定による bR の構造安定性評価	28

第3章 アシル鎖長の違うホスファチジルコリンベシクルに再構成した

バクテリオロドプシンの分子集合に与える脂質膜相転移の影響

3.1 背景	30
3.2 結果	32
3.3 考察	40
3.4 第3章の総論	44

第4章 DMPC 膜に再構成したバクテリオロドプシンの二次元結晶化に与える

静電相互作用の影響

4.1 背景	45
4.2 結果	50
4.3 考察	57
4.4 第4章の総論	62

第5章 DMPC 膜に再構成したバクテリオロドプシンの二次元結晶融解条件下での不均一な構造安定性

5.1 背景	63
5.2 結果	64
5.3 考察	77
5.4 第 5 章の総論	84

第6章 総論	85
--------------	----

第7章 参考文献	87
----------------	----

業績リスト	97
-------------	----

謝辞	101
----------	-----

第 1 章 序

1.1 背景

多くの膜タンパク質は複合体を形成しており、その構造と機能は密接にかかわっている [1]。従って、膜タンパク質の複合体形成を理解することは物理学的にも生物学的にも非常に重要である。本論文で扱ったバクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌である *Halobacterium salinarum* の細胞膜から単離・精製される膜タンパク質で、光駆動プロトンポンプの機能を持つことが知られており [2, 3]、また、最もよく研究されている膜タンパク質の一つである。

図 1-1A に bR の立体構造をリボンモデルで示した。この図からもわかるように、bR は 7 本の膜貫通 α ヘリックスがほぼ平行に配置した構造であり、内部に発色団レチナールを持つ。発色団レチナールは Lys216 とシッフ塩基結合 ($C=N^-$) を形成し、そのシッフ塩基はプロトン化 ($C=NH^+$) している。またプロトンチャネルはヘリックスまた bR は、「紫膜」(図 1-1 ; 原子間力顕微鏡画像) [4] として知られる二次元結晶を自発的に形成する [5, 6]。bR は紫膜に含まれる唯一のタンパク質であり自発的に二次元結晶を形成することに加え、アミノ酸配列 [7, 8]、三次元構造 [6, 9-11]、光サイクルと bR 分子の構造変化 [3, 12] といった基本的な情報がすでに得られていることなどから、膜タンパク質複合体形成のメカニズムを調べるための非常によいモデルである [13-15]。

そこで本研究では bR の複合体形成の機構および複合体形成の生物学的意味を調べるために、bR の持つ以下の 3 つの性質を利用した。まず第 1 に bR は内部に発色団レチナールを含むため、bR 特有の二次元結晶を形成した際、可視領域に独特な円二色性スペクトルを示す [16-19]。この性質を利用し、bR の複合体形成の過程を円二色性測定によりモニターした。第 2 に bR は *Halobacterium Salinarum* の細胞膜では自発的に二次元結晶を形成するが、人工脂質膜に再構成すると、脂質膜のゲル - 液晶相転移と相関して、二次元結晶形成・融解が起こることが知られている [20-29]。そこで、人工脂質膜に再構成した bR を用い、bR の構造安定

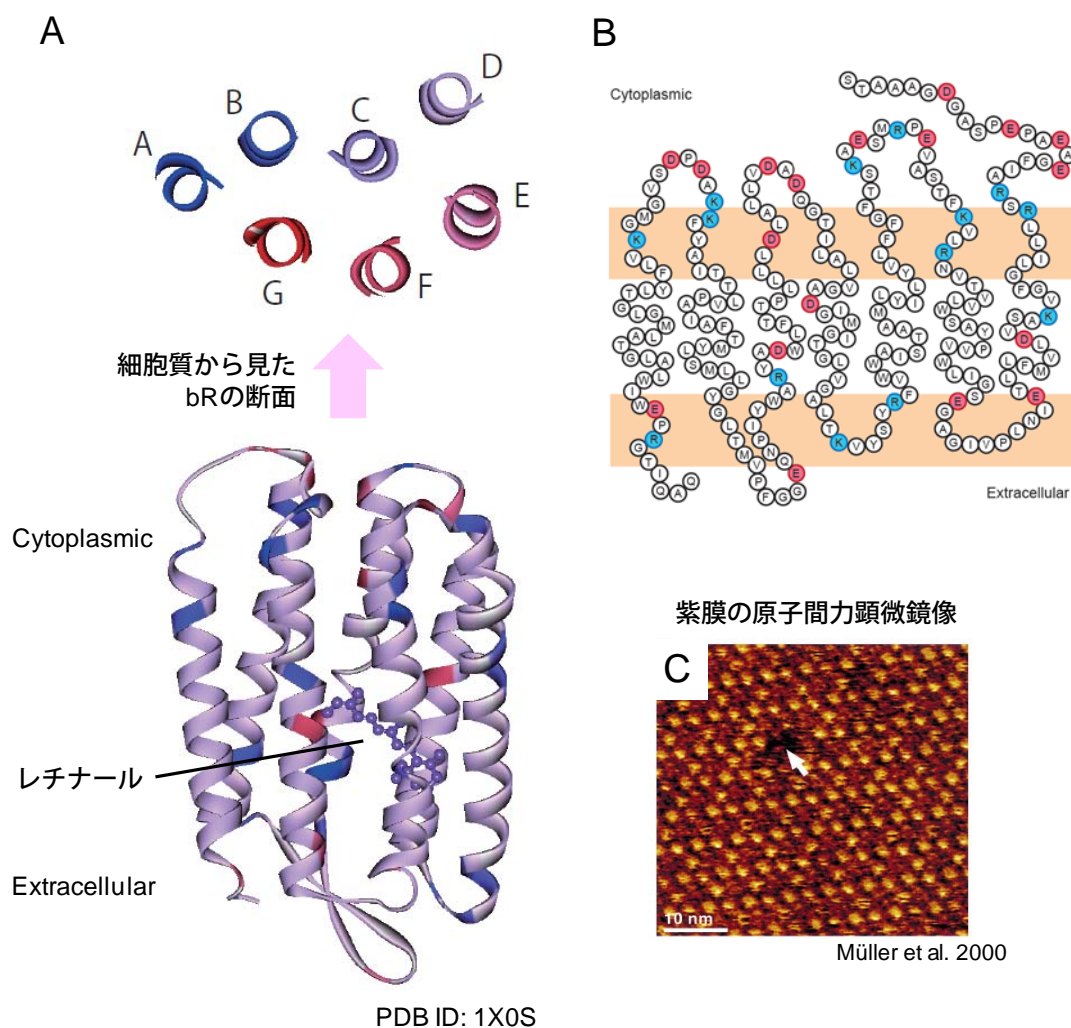


図 1-1：バクテリオロドプシンの構造

(A) bRの立体構造（13-cisレチナールを含む）を示す。上図：細胞質側から見た α ヘリックスの配置。AからGの7本のヘリックスを持つ。下図：レチナールを含んだbRのX線結晶構造。青色に塩基性（正電荷）残基、赤色に酸性（負電荷）残基を示す。

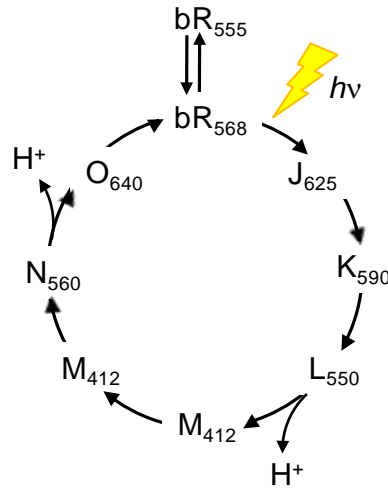
(B) bRのアミノ酸配列を膜面に対して配置した図。各アミノ酸配置はい文字表記で示した。

(C) 紫膜bRの二次元結晶の原子間力顕微鏡（AFM）画像。図中の矢印はAFMプローブを用いた一本釣り実験による欠陥。

性における複合体形成の効果を調べた。第 3 に先行研究により、bR は二次元結晶の融解に伴い光照射による不可逆な変性（光退色）を起こすことが知られている [30, 31]。また光退色現象の速度論的解析を行うと、可溶化 bR では 1 成分 [32, 33]、紫膜 bR では 2 成分の時間変化が観察される。そこで二次元結晶融解条件下での光退色現象について詳細に調べた。これらの現象に関する先行研究について、以下に記述する。

1.1.1 バクテリオロドプシンの吸収スペクトルと円二色性スペクトル

A bRの光サイクル



B 各光中間体の吸収スペクトル

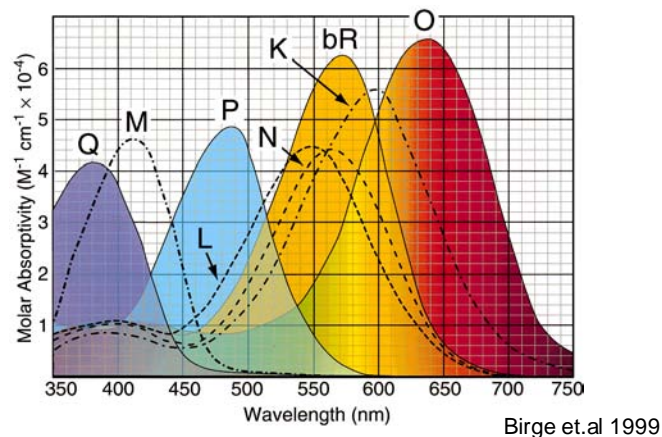


図 1-2 : bRの光サイクルと吸収スペクトル

(A) bRは構造の異なる光中間体を経由して基底状態に戻る「光サイクル」によってプロトン輸送を担っている。bR中のオールトランス型レチナールは568nmに吸収極大を示し、これが光励起されると中性pH・室温で10ミリ秒オーダーのサイクリックな光反応が起きる。この間にプロトンが1個、細胞膜の内側から外側へ輸送される。
(B) 光サイクルにおけるbRの構造変化はその吸収スペクトルの違いによって定義されており、いくつかの中間体はその結晶構造も決定されている。

図 1-2 [34] に示したように bR は異なる吸収スペクトルを持つ光中間体 (J、K、L、M、N、O) を経て基底状態に戻る光サイクルとして機能し [35]、この反応は bR 内部にシッフ塩基結合した発色団レチナールの可視光吸収による異性化が引き金となって起こる [2, 3]。光中間体と基底状態の分子構造の比較から、M

中間体およびN 中間体における細胞質側チャネルの開放がプロトン輸送に必須である（図 1-3）ことが報告されている [11, 36, 37]。

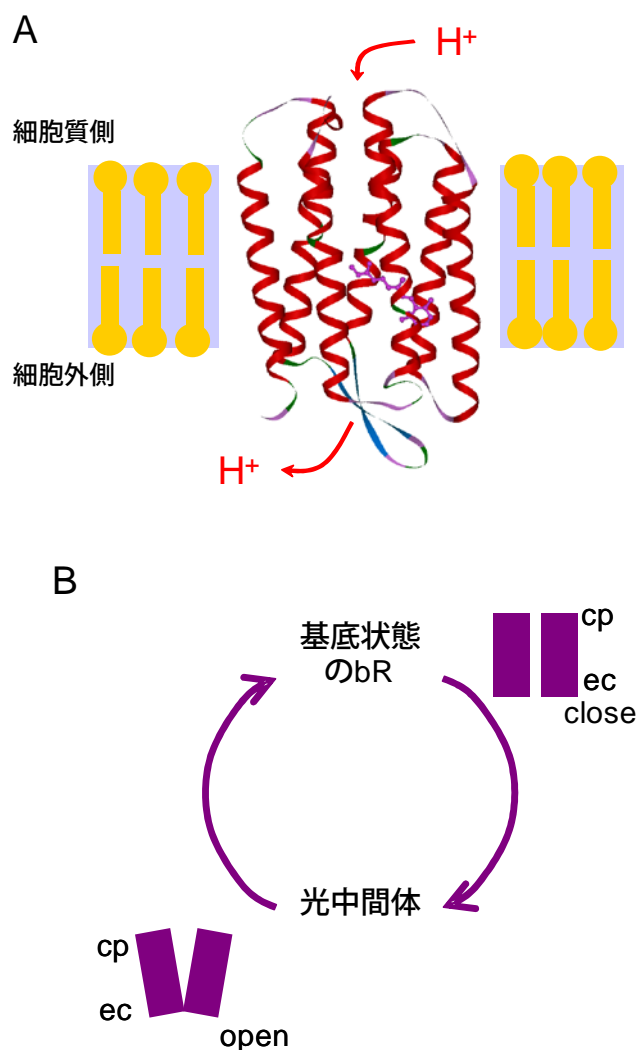


図 1-3 : bRのプロトンポンプ機能

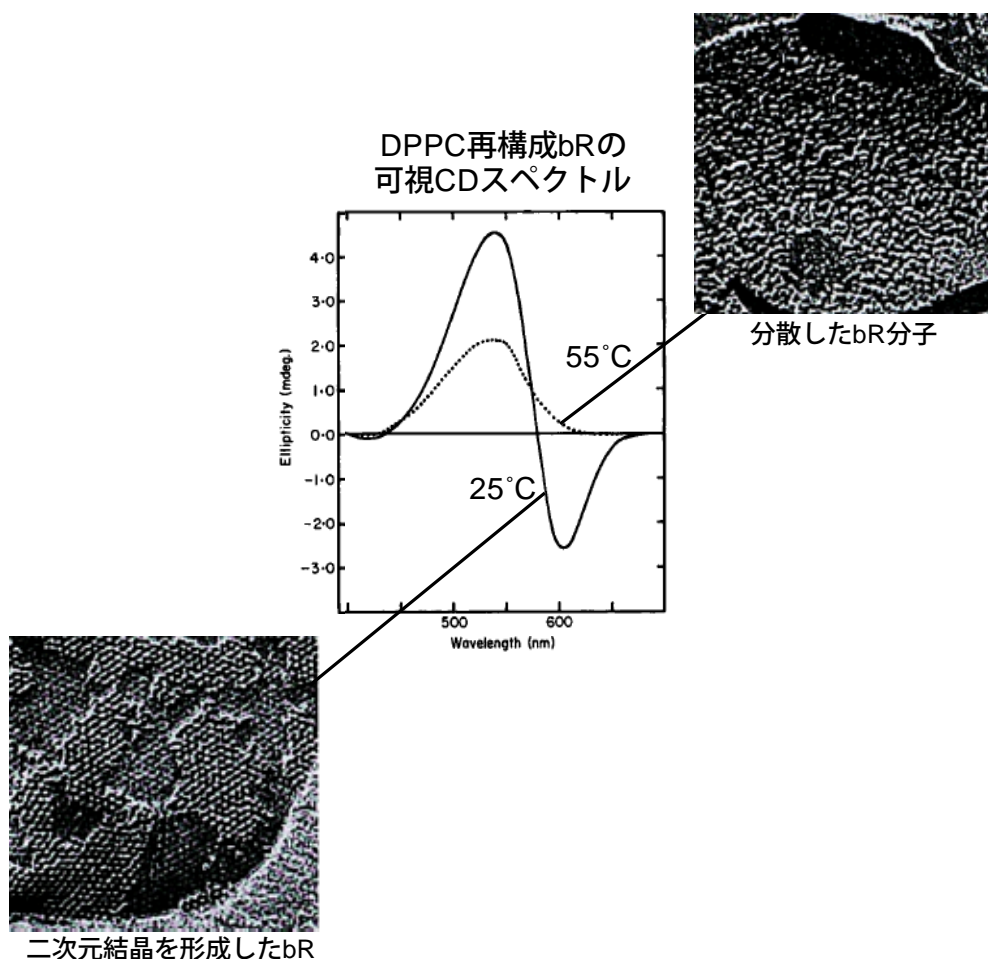
光駆動型プロトンポンプであるbRは、その構造変化についてもよく研究されている。光照射によって起こるタンパク質内に結合しているレチナールの異性化をきっかけに一連の構造変化が起こり、ポンプ機能を果たす。

(A) bRプロトンポンプの模式図

(B) プロトンポンプにおける細胞質側チャネルの開閉の模式図

同様に、bR は可視領域での円二色性測定においてレチナールに起因する独特の光学活性を示す。図 1 - 4 [21] に示したように、二次元結晶構造中での隣り合うレチナールの励起子相互作用により [16-19]、560 nm を中心とした二極型のスペクトルが観察される。この可視領域での bR の円二色性スペクトルは、脂質膜中

で分散させたり可溶化することで 560 nm に極大を持つ単極型になり、三次構造を維持したままレチナールを除去した際にはシグナル自体が消失する [38]。



R.J.Cherry et al. 1978

図 1-4：人工脂質膜への再構成によるbR二次元結晶形成の制御
人工脂質であるDPPC膜に再構成したbRの25°Cおよび55°Cでの可視領域円二色性 (CD) スペクトルと凍結切断電子顕微鏡画像を示す。bRの可視領域CD測定では、bRが二次元結晶を形成しているときに二極型、二次元結晶が融解しているときに単極型のスペクトルが観察される。

1.1.2 バクテリオロドプシンの人工脂質膜への再構成

前述の通り、bR を中性リン脂質二重膜小胞に再構成した実験系は、脂質二重層のゲル - 液晶相転移によって bR の二次元結晶を融解させ脱会合を引き起こすことが知られていることから [20-28]、人工脂質膜への再構成系は bR の二次元結晶形成の機構・生物学的意味を調べるのに非常に適した系と言える (図 1-5)。

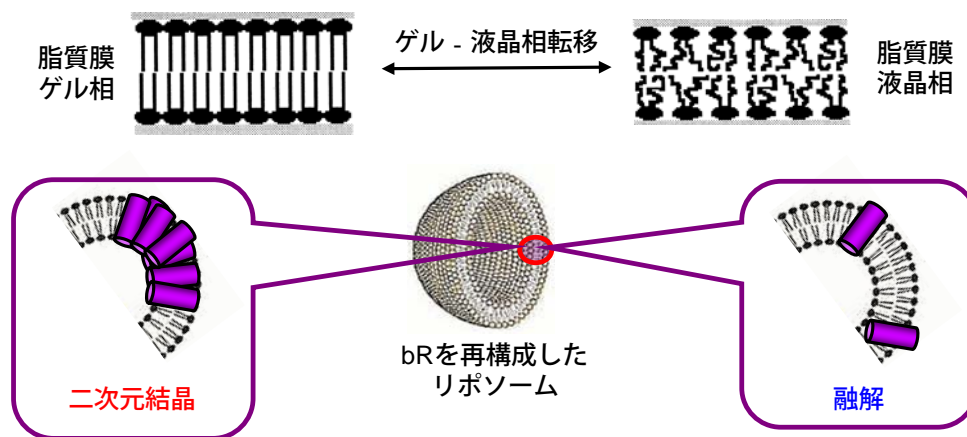


図 1-5：再構成脂質膜とbRの二次元結晶形成・融解の関係

人工脂質膜に再構成したbRではゲル - 液晶相転移温度以下で二次元結晶を形成し、相転移温度以上で二次元結晶が融解していることが知られている。この性質を利用しbRの二次元結晶形成・融解を制御することで、bRの二次元結晶形成の生物学的意味を調べることができる。

1.1.3 バクテリオロドプシンの光退色現象

近年、ヒドロキシルアミンなどの加水分解試薬を加えなくても、bR への可視光連続照射によって起こる不可逆な光退色現象が報告されている [30-33, 39]。この光退色現象は光強度に依存性すること [39]、また bR のポリペプチド鎖の不可逆な構造変化によって起こること [40] から、この不可逆な光退色現象は bR の光反応に起因する一種の変性であることがわかっている (図 1-6)。この紫膜 bR の不可逆な光退色現象は高温もしくは高 pH 条件下で見られ [30,31, 39-41]、さらに非イオン性界面活性剤であるオクチルグルコシド、Triton X-100 に可溶化した bR では室温においても光退色が起こる [32, 33]。こうした変性実験の結果は

二次元結晶中の bR 分子間にはたらく分子間相互作用が、光励起状態・光中間体から基底状態への復元力の、少なくとも一部を担っていることを示唆している。

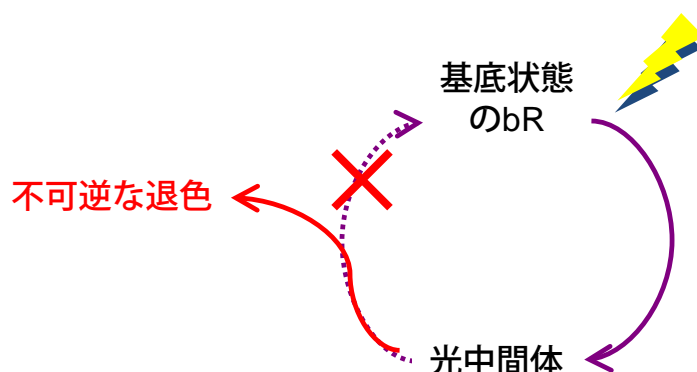


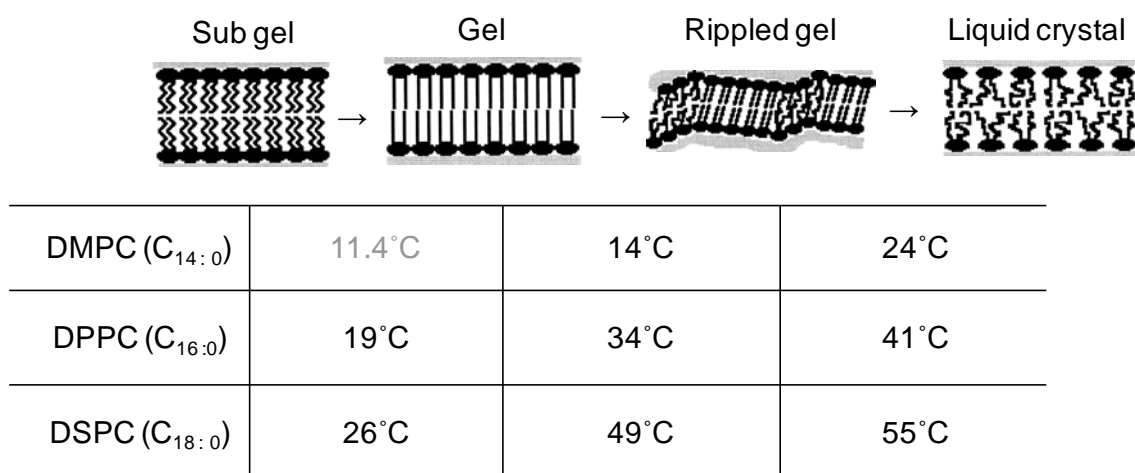
図 1-6 : bRの光退色現象

bRはある温度領域において、暗の中では安定だが光照射下でのみ不可逆な退色を起こす。

そこで本研究では、膜タンパク質の複合体形成の機構および生物学的意味を調べるために、再構成系を用いて bR の二次元結晶形成機構を調べることに、および bR の動的構造（機能中の構造）安定性における二次元結晶形成の役割を調べることを目的とした。

1.2 第3章への問題提起：再構成膜相転移が再構成 bR の構造安定性に及ぼす影響

人工脂質膜二重層はたびたび生体膜のモデルとして用いられており [42]、bR を人工脂質膜へ再構成する方法は既に確立されている [43]。生体膜のモデルとして用いられることの多い三種類の人工脂質（飽和脂肪酸）、ジミリスチルホスファチジルコリン（DMPC）、ジパルミチルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）について、相転移温度を図 1-7 [44] に示す。



R. Koynova et.al 1998

図 1-7：脂質二重層の状態変化と相転移温度

本研究では再構成する脂質に飽和脂肪酸かつ中性リン脂質である、DMPC、DPPC、DSPCを用いた。純粋な脂質からなる脂質二重層では、図に示すように低温からサブゲル相、ゲル相、リップル相、液晶相の4種類の状態間を可逆的に行き来することができる。各脂質の相転移温度を表に示す。

ここで挙げた三種類の飽和脂肪酸は炭化水素鎖長が異なり、DMPC で 14、DPPC で 16、DSPC では 18 である。各脂質につき三種類の相転移温度を記載したが、低温のものから副転移、前転移、主転移と呼ばれている [44, 45]。この図から、炭化水素鎖長が長いほど相転移温度が高くなることがわかる。これらの相転移と bR の二次元結晶融解がどのような関係になっているかは興味深い問題である。図 1-7 で示したとおり、飽和脂肪酸二重膜の相転移温度は脂質のアシル鎖長に依存するため、異なるアシル鎖長のジアシルホスファチジルコリンにそれぞれ bR を再構成することで、分子間相互作用と分子構造および構造変化の関係を温度変化の実験から調べることができる。第 3 章では、アシル鎖長の異なる三種類のホスファチジルコリンを用いた再構成 bR の性質を調べた。可視領域における円二色性 (CD) 測定および DSC 測定で bR の二次元結晶形成・融解および人工脂質二重層の相転移をモニターした。また、暗中および可視光連続照射下での吸収スペクトル測定により再構成膜中の bR の構造安定性とその温度依存性を調べ、二次元結晶融解との関係を考察した。

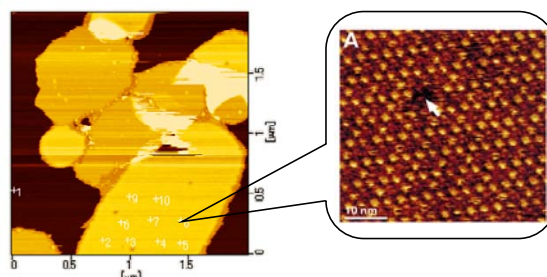
1.3 第4章への問題提起：bR 二次元結晶形成における静電相互作用の重要性

これまで述べてきたように、bR の再構成実験はその二次元結晶化のメカニズムを調べるために非常に有用である [21-29]。再構成膜中の bR 二次元結晶化に関する過去の報告は主に以下の2つに分類できる。

- (i) 再構成 bR の自己会合における脂質二重層の相転移の効果に着目したもの
- (ii) 再構成 bR の自己会合におけるハロ脂質の電荷の効果に着目したもの

前者では可視 CD 測定 [21, 22]、X 線回折 [21]、電子顕微鏡 [21, 22, 26]、回転拡散測定 [22, 23] など、さまざまな手法を用いられているが、いずれも再構成膜中の bR 分子は脂質二重層がゲル相のときに二次元結晶を形成し、脂質膜が液晶相のときに二次元結晶が融解していることを示した。しかし脂質二重層の相転移が観察できなくなるほどタンパク質濃度が極端に高い場合は、高温でも bR の二次元結晶形成が観察されている [28, 29]。一方、紫膜中には負に帯電したハロ脂質が特異的に発現しており [46-48]、紫膜中での bR と脂質分子間にはたらく特異的な相互作用について Krebs と Isenbarger によって議論されている (図 1-8) [49]。実際に再構成 bR を用いた研究では、紫膜由来のハロ脂質層のゲル液晶相転移温度以下でも二次元結晶を形成しないこと [26-28] や、脱脂質処理した bR を各ハロ脂質と共に再構成した場合、負電荷極性頭部を持つ脂質を加えることで bR 二次元結晶形成が起こること [27] から、bR 二次元結晶形成における負電荷極性頭部を持つ脂質分子が重要な役割を担っていることが示唆されている。こうした先行研究の結果を踏まえると、bR の二次元結晶形成には分子間の静電相互作用が重要なのではないか？という疑問が浮かぶ。また、再構成によって bR の膜環境を中性脂質リッチにすることで、bR-bR 間の静電相互作用の効果が見えると予想されるため、脂質/タンパク質比、再構成条件をそろえた上で、タンパク質-脂質間の静電相互作用に着目した実験を行う必要があった。そこで第4章では、中性リン脂質に再構成した bR を用い、脂質膜がゲル相である低温領域での可視領域 CD 測定によって、塩化ナトリウム (NaCl) 濃度の異なる溶液中で DMPC 再

A 紫膜（左）とbRの二次元結晶（右）



Polar Lipids

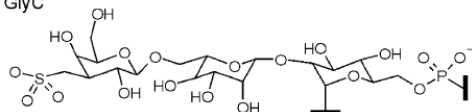
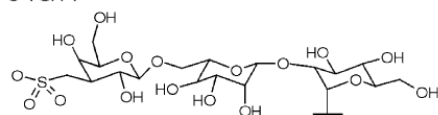
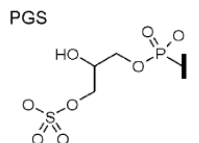
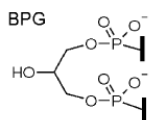
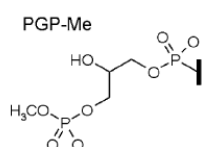
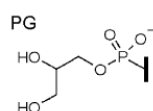
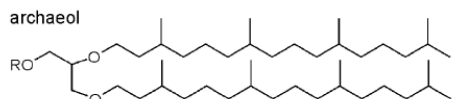
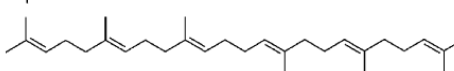
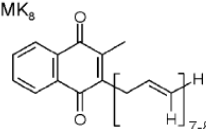
vitamin MK₈

図 1-8：紫膜中に特異的に発現している脂質

(B) 紫膜中の脂質は主にアーキオールと呼ばれる脂質骨格を持ち、その極性頭部の種類は多様である。特にPGP-Meの発現量が多い。bR1分子に対して、リン脂質が6-7分子、硫酸糖脂質が2-3分子、スクワランが1分子で、負電荷脂質の割合が高いことが知られている。

1.4 第 5 章への問題提起：

bR の動的構造（機能中の構造）安定性における分子間相互作用の重要性

第 3 章で行った光退色実験の結果から、bR の動的構造安定性におけるタンパク質 - タンパク質間相互作用の重要性が示唆された。Dencher らの行った DMPC 再構成 bR の実験では、二次元結晶融解条件下での bR のプロトンポンプ活性 [50] および紫膜と同様の中間体を經由する光サイクルが確認されている [51] が、光照射によって異性化した 13-cis レチナールを含む bR の割合は紫膜に比べて約半分に減少したことから、再構成 bR は二次元結晶融解条件下で機能活性は持つが効率は劣る [51] と考えられている。このとき、Dencher らは二次元結晶融解条件下で再構成 bR は単量体であるとして議論しているが、Gulik-Krzywicki らの報告 (DMPC 再構成 bR 表面における粒子径分布) によると、Dencher らの行った脂質/タンパク質比=94 および 106 という条件では、その粒子径分布は 4.5 nm と 7.5 nm に 2 つのピークを持つことがわかっている [25]。一方、紫膜 bR の光退色現象について反応速度論解析を行うと、そこには速度定数が 2 桁ほど異なる二つの退色成分が含まれる [52]。前述の通り、bR は紫膜中の唯一のタンパク質であり、二次元結晶融解条件下では局所的に複合体形成でもしていない限り bR をとりまく環境は均一であるため、この紫膜 bR の安定性における不均一性を説明するのは難しい。条件を変えて bR の光退色現象の退色速度論解析を行った結果から、可溶化 bR (pH 7.0、室温以上) [32, 33]、pH 10.0 以上のアルカリ条件下 [40, 41] では、2 成分ではなく 1 成分での光退色現象が報告されており、2 成分で起こる光退色現象と bR-bR 間相互作用との間の関連が示唆される。上記の先行研究から以下のような疑問が発生する。まず Dencher らの出した結論に対して、bR の二次元結晶形成は融解条件に比べてどのような利点を持つのか？という疑問が残る。次に、Gulik-Krzywicki らの出した結論および光退色速度論解析の結果から、二次元結晶融解条件下での再構成 bR が本当に単量体なのか？光退色現象が 2 成分で起こる原因は二次元結晶融解条件下での bR-bR 間相互作用ではないか？という疑問が残る。いずれも二次元結晶融解条件下での bR-bR 間相互作用に関する疑問であるため、第 5 章では DMPC 膜に再構成した bR の二次元結晶融解

条件下における光退色の反応速度論解析を行った。

第2章 試料と方法

本研究においてバクテリオロドプシンの立体構造安定化因子を探るために、合成リポソームに再構成を行うことで存在環境を変化させ、多量体形成を調整し安定性を評価した。

今回、安定性の評価は分光測定にて行った。本章では、実験方法、および分光器による測定方法について述べる。

2.1 試料の調整

2.1.1 紫膜（バクテリオロドプシン）の精製

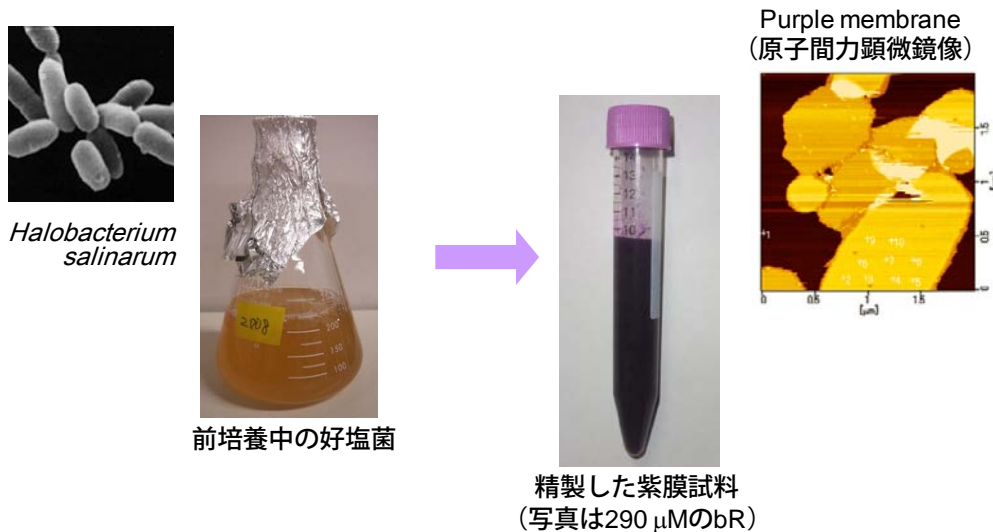


図 2-1：紫膜の精製方法

培養した高度好塩菌 *Halobacterium Salinarum* を回収した後、透析・ショ糖密度勾配遠心分離により紫膜懸濁液（紫膜bR）を得る。

バクテリオロドプシンの精製方法は Oesterhelt、Stoeckenius らによって示されたものを参考にした [53]。高度好塩菌 *Halobacterium Salinarum* R1 M1 株の単

一コロニーを 200 ml の液体好塩ペプトン培地に殖菌し、37℃、130 rpm、光照射下で 3 日間振とう培養した。前培養菌液を 3000 ml の液体好塩ペプトン培地に注ぎ、さらに 37℃、130 rpm、光照射下で 7～10 日間振とう培養した。大量培養液を 4℃、8000 rpm、30 分間の遠心分離（SCR20B、HITACHI）により *Halobacterium Salinarum* R1 M1 を集菌した。遠心分離後の上清を除去したあと、ペレットを 100 ml の Basal Salt に再懸濁した。この溶液に DNase (Dnase I、SIGMA) を 0.5 % となるように添加し、4℃、12 時間攪拌した。DNase を加えたことで DNA を切断して、菌の増殖を止めることができる。

その後、セルロース系透析膜 (UNION CARBIDE CORP) を用い、0.1 M NaCl (NaCl、和光純薬) 溶液中で 4℃、24 時間の透析を行った。この透析により菌は破裂し、細胞質成分が流出すると共に、形質膜は断片化する。透析後、4℃、35000 rpm、30 分間の超遠心分離（L-60、BECKMAN）と 0.1 M の NaCl 溶液による洗浄を 4 回、純水による洗浄を 6 回、繰り返し行った。

遠心管中で 60 % ショ糖溶液 (Sucrose、和光純薬) の上に 50～30 % ショ糖溶液の連続勾配を作成し、洗浄後の懸濁液のショ糖密度勾配による超遠心を 4℃、35000 rpm、17 時間で行った。紫膜はバクテリオロドプシンが六方格子状に密に配置しているため、他の形質膜部分と密度が大きく異なり、ショ糖密度勾配遠心法により純度よく精製される。この処理でバクテリオルベリンと呼ばれるカロチノイド系色素を含む赤膜も分離することができる。遠心後、35 % ショ糖溶液付近に現れた紫膜成分を回収し、4℃、40000 rpm、30 分間の超遠心分離と純水による洗浄を 4 回繰り返し行った。紫膜を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に再懸濁し、バス型ソニケータを用いて 30 分間のソニケーションを行った。これを紫膜試料とし、4℃ で保存した。

2.1.2 バクテリオロドプシンの人工脂質膜小胞への再構成

以下に DMPC 膜への bR 再構成方法を記述する。室温に戻した人工脂質を電子天秤（高精度直視天秤）でアルミホイル上に秤量し、クロロホルムで溶解しながらナス型フラスコに流し込む。これを 40℃ の湯浴で温めながらロータリーエバ

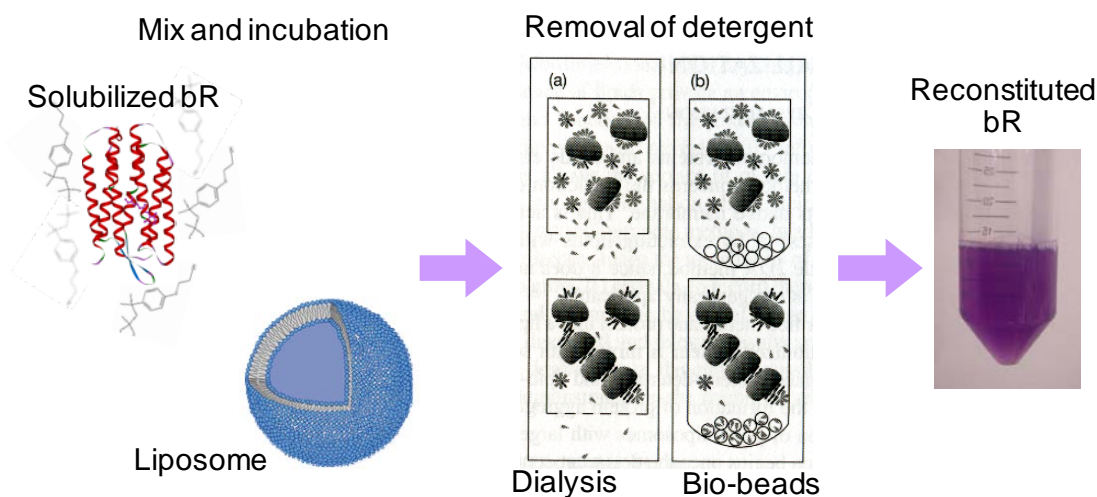


図 2-2：bR の人工脂質膜への再構成手法

先述の方法で得られた紫膜bRは界面活性剤で可溶化し、別に調整した人工脂質小胞（リポソーム）と混合。bR・界面活性剤・脂質の混合懸濁液はインキュベーションの後、透析・バイオビーズにより界面活性剤を除去することで再構成bRサンプルを得た。

ポレーター（Rotary Vacuum Evaporator、東京理化機械）を用いて回転数 3 で、脂質を二重層に成膜した。このとき、0.05～0.10 MPa の窒素ガスを装置内に流して、さらに、大気圧より 200 mHg 低い窒素雰囲気を保つよう真空ポンプ（Circulating Aspirator WJ-20、SIBATA）で調節しながら還流した。クロロホルムが蒸発したのを確認し、真空で 1 時間以上乾燥させた。こうして DMPC が成膜されたナス型フラスコに、数個のガラスビーズとバッファーを 10 mg/ml になるように加え、タッチミキサーで懸濁。この作業により、脂質分子は多重層リポソームを形成する。

Triton X-100 の最終濃度が 25 mM、バクテリオロドプシンの最終濃度が 25 μ M となるように、100 mMリン酸バッファーに混合し、軽く振とう攪拌してから

30℃、180 分間、暗中共にてバクテリオロドプシンの可溶化を行った。その後、4℃、30000 rpm、60 分の超遠心分離を行い可溶化 bR を含む上清部分のみを回収した。Triton X-100 での可溶化 bR は 50℃ 以上での光照射による退色が報告されているので、この後の手順では遮光して行うこととする。

DMPC 懸濁液と可溶化 bR 溶液は、DMPC と bR のモル比が 150：1 となるように 30℃ で混合し、30～35℃、暗中で 180 分間振とう培養をした。可溶化 bR、DMPC リポソームの混合懸濁液は界面活性剤である Triton X-100 の除去のため、29℃ の純水 3 リットルで 4 時間、透析を行った。この間、1 時間ごとに純水を交換した。さらに、室温で 12 時間、4℃ で 7 日間透析を続けた。低温での透析中も適宜、純水の交換を行った。サンプル中に残存する Triton X-100 を完全に除去するため、透析を完了した混合懸濁液にバイオビーズ (SM2、BIORAD) を加え、遮光条件でゆっくりとスターラーを回転させる (1 時間)。最後に、紫色の溶液だけをパスツールピペットで丁寧に回収し、再構成 bR 試料とした。

2.2 測定方法

2.2.1 紫外・可視吸収測定法

物質による紫外・可視の吸収は、基底状態にある分子が光エネルギー ($E=h\nu$) を吸収して励起状態に遷移 (電子遷移) することによって起こる。その吸収の強さは波長によって異なり、吸収スペクトルは物質特有のものである。可視光吸収スペクトルの試料は色がついているものに限られる。一般に呈色した有機化合物は共役二重結合系を持つ。このような、物質に色を与える構造単位は発色団と呼ばれ、典型的な例として $C=C$ 、 $C=O$ 、 $N=N$ を含む。

紫外光は波長が 200～380 nm にある (厳密には 200～380 nm は近紫外、100～200 nm を遠紫外と呼ぶ。) ので、肉眼で確認することはできない。可視・紫外の吸収は原子もしくは分子の基底電子状態から励起状態への遷移を促す。原子に

比べて分子のエネルギー準位では、電子状態に分子固有の振動、回転準位が重なって複雑になる。このため分子の吸収スペクトルは原子に比べてバンド幅が広い。

バクテリオロドプシンにおいては補欠分子団であるレチナールとシッフ塩基結合しており、発色団となっている。このレチナールの紫外・可視部の光を吸収して見られる吸収スペクトルはレチナール周囲のアミノ酸によって決まる。ネイティブな状態のバクテリオロドプシンは紫色を呈し、560 nm 付近に吸収を持っている。これは構造の変化に伴い、さらに変性すると紫色から黄色へと変化し、レチナール自体の特定吸収である 380 nm 付近に吸収が現れる。この吸収スペクトルの変化を利用して、バクテリオロドプシンからのレチナールの遊離を評価した。

ちなみに、均一な吸収層を単色光が通過するとき Lambert-Beer の法則が成立し、その吸光度は溶液層の厚さ l (cm) に比例し、溶液の濃度 c (M) にも比例する。

$$A = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A : 吸光度 I_0 : 入射光強度 I : 透過光強度 ε : モル吸光係数 ($M^{-1}cm^{-1}$)

l : 光路長 (cm) c : モル濃度 (M)

ここで、モル吸光係数は、1 mol/l の溶液 1 cm を透過するときの吸光度をあらわし、各分子に固有の定数である。バクテリオロドプシンでは全トランスレチナールを持つ明順応型で、570 nm におけるモル吸光係数は

$$\varepsilon = (62700 \pm 700) M^{-1}cm^{-1}$$

とわかっている。

2.2.2 円偏光二色性スペクトル

前項で述べたように、発色団を含んだタンパク質では紫外・可視吸収測定で研究が進んでいるが、これと同じ波長領域で用いられる円偏光二色性スペクトルは光学活性化合物の立体構造を研究する上で非常に有効な測定法として用いられて

いる。円二色性スペクトル法によって、絶対構造、立体配座、反応機構などについての情報が得られる。

測定は通常、溶液状態で行われ、このスペクトルは光の電磁場と単独の分子との相互作用を反映すると考えられ、よって近傍に存在する分子の影響は無視することができる。たとえば、モル吸光係数 $\varepsilon = 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の化合物の吸収測定に用いられる条件である 10^{-4} mol/dm^3 程度の濃度の試料の場合、近隣の分子間距離は平均 100 Å 以上になる。つまり、通常の分子の大きさよりも十分に大きいので、溶質 - 溶質間の相互作用は無視することが可能である。また、溶液中において分子は回転し、ランダムに配向しているので双極子 - 双極子相互作用に起因するような影響も無視することができる。

これに対し、発色団 - 発色団相互作用が大きな影響を与えている今回のような系（二量体、三量体、オリゴマー、ポリマー、分子結晶が光と相互作用する場合）では励起子相互作用の影響を無視できない。例として2個の等価な発色団(i と j) がσ結合によって、ある方向に結合しているような分子を考えてみる。光の電磁場の中でそれぞれの発色団は等しい確率で励起状態へ持ち上げられる。このとき、i が励起された状態の確率は j が励起された状態の確率と等しいため、系全体の励起状態はこれら2つの励起状態の組み合わせによって、つまり、発色団の励起状態は2個の発色団 (i と j) にわたって非局在化する。この非局在化した励起状態を「励起子」と呼ぶ。また、各発色団は近接した発色団と励起エネルギーを共有することで相互作用しており、これが「励起子相互作用」である。

光学活性物質を平面偏光が通過するとき、その偏光面が回転する性質を「旋光性」、その回転角度を「旋光度」という。平面偏光は振幅の等しい左右の円偏光が重なり合うことで成立している。そのため、光学活性物質中ではこの左右円偏光の屈折率が異なり、通過中に位相差を生じて偏光面の回転が起こる。直行するそれぞれの平面偏光を 1/4 波長ずらして重ね合わせて得られた円偏光を試料溶液に通じ、それぞれの吸収率の差を測定したものが円二色性である。左右の円偏光に対するモル吸光係数を ε_L 、 ε_R とすると、円二色性は

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

であらわせる。

実際の吸光度をAL、AR とすると、モル吸光係数との関係は以下のように書ける。

$$AL - AR = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l$$

A：吸光度 ε ：吸光係数 l：光路長 (cm) c：濃度 (M)

円二色性測定の結果はモル橢円率[θ]であらわされる。

$$[\theta] = 3300 \Delta \varepsilon = H \cdot S / 1000 / c \quad (\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1})$$

H：波長 λ (nm) におけるピークの高さ (cm) S：sensitivity (mdeg)

タンパク質の光学活性については3つの機構が考えられる。

- 1： 二次構造 (α ヘリックス、 β シートなど) に起因する円二色性
- 2： 吸収を持つ芳香族アミノ酸の特定配置による円二色性
- 3： タンパク質に共有結合、非共有結合した補欠分子の配置に起因する円二色性

タンパク質はこのように質の異なる光学活性を持つため、円二色性測定によりその構造に関する情報を得ることができる。天然型のバクテリオロドプシンでは、二次構造 (α ヘリックス) を示す 222 nm に負の極大、トリプトファン側鎖の特定配置を示す 290 nm に正の極大、レチナールの吸収を示す 260 nm に正、315 nm に負の極大と 560 nm を中心とした励起子型の波形が観測されることがわかっている。

2.2.3 紫外・可視吸収測定による bR の構造安定性評価

紫外・可視吸収測定のプロトコルを図 2-3 に示す。

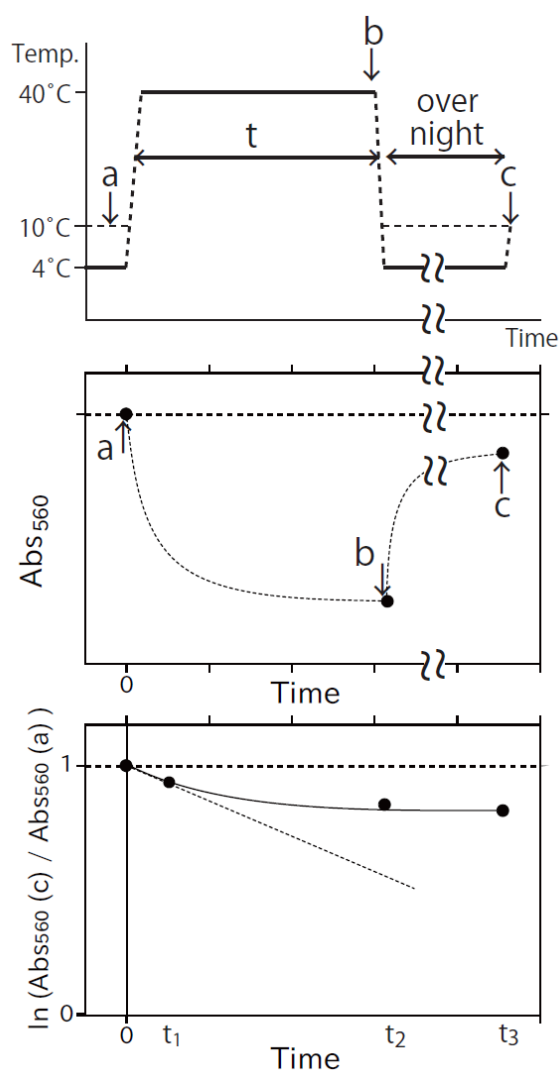


図 2-3：光退色実験および退色速度論解析のための吸収スペクトル測定方法

（上図）ある温度、ある時間でのbRの可逆性評価方法を示す。光退色現象を調べる場合は温度ジャンプ直後からb点までの間、可視光を連続照射する。温度ジャンプからb点までの間以外は常に遮光して実験を行った。逆に熱安定性を調べる暗中での退色実験の際は、温度ジャンプからb点までの間だけでなく、全ての工程を遮光して行った。

（中図）上図のa、b、c点におけるAbs₅₆₀の変化

（下図）インキュベーション時間（t）を変化させて得られた可逆性の値を時間に対してプロットすることで退色曲線を得た。

熱退色および光退色を評価するにあたり、私たちは実際に退色した成分の割合を調べるために以下の 3 つの吸収スペクトル測定を行った。まず、再構成 bR サンプルの暗中・10℃での吸収スペクトルを測定した（図 2-3、a）。その後、温度を上げて暗中もしくは光照射下でインキュベーションする（暗中；熱退色、光照射下；光退色）。光照射下での実験の場合は、温度ジャンプと同時に可視光の連続照射を開始する。特定時間（t）インキュベーションしたサンプルは吸収スペクトル測定（図 2-3、b）の後、氷上（4℃）で急冷する。次にこのサンプルを 4℃ 暗中におき、約 12 時間後に暗中・10℃で再度吸収スペクトルを測定する（図 2-3、c）。

bR の熱安定性(暗中・光照射下)はここで得られた 560 nm の値から評価した。

$$\text{Reversibility} = \text{Abs}_{560} (\text{スペクトル a}) / \text{Abs}_{560} (\text{スペクトル c})$$

スペクトル c における Abs_{560} をスペクトル a の Abs_{560} で規格化することで退色しなかった bR の割合が求まる。これを「可逆性 (Reversibility)」と定義した。この bR の Reversibility 評価を 10～70℃ の温度領域について、暗中・光照射下の 2 条件でそれぞれ同様に行った。

また、異なる実験条件から得られた Reversibility の値をインキュベーション時間に対してプロットしたものを退色曲線とし、退色速度論解析を行った。得られた退色曲線は最小二乗法によりフィッティングを行った。

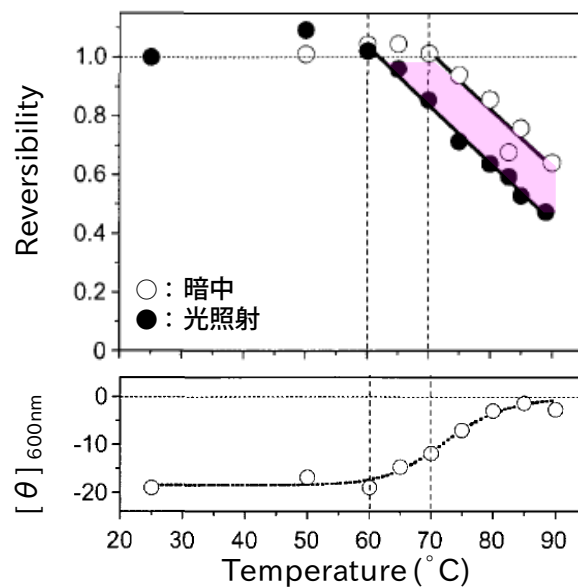
第3章

アシル鎖長の違うホスファチジルコリンベシクルに再構成した バクテリオロドプシンの分子集合に与える脂質膜相転移の影響

3.1 背景

[1.2 第3章への問題提起] で述べたように、人工脂質二重層は生体膜のモデルとして用いられることがあり [42]、bR においてもその二次元結晶形成機構を調べるために人工脂質膜に再構成したサンプルが使用されている。bR の場合、経験的に再構成膜のゲル-液晶相転移温度付近で二次元結晶融解が起こることが多いため、脂質膜相転移によって bR 二次元結晶形成・融解が誘発されると考えられている反面、 $C_{10:0}$ や $C_{24:0}$ といった炭素鎖長が極端に異なる脂質にそれぞれ再構成した bR では相転移温度以上でも自己会合（二次元結晶形成）することから「再構成膜 bR の二次元結晶形成は脂質膜の相転移に誘発されるものではない」と結論づけているグループもある [29]。再構成膜の相転移と bR の二次元結晶融解がどのような関係になっているかは興味深い問題であり、上記のような矛盾を解決するため、異なるゲル - 液晶相転移温度を持つ三種のジアシルホスファチジルコリン小胞に bR を再構成し、脂質/タンパク質比、再構成方法、バッファー条件をそろえた上で、再構成膜の相転移温度と二次元結晶形成・融解温度の関係を調べた。

また、紫膜 bR の二次元結晶と光退色現象に関する Etoh、Yokoyama らの報告から、bR 間相互作用が弱まることで光退色が起こることが示唆されている（図 3-1） [30, 31]。そこで、異なるゲル - 液晶相転移温度を持つ三種のジアシルホスファチジルコリン小胞に再構成した bR サンプルを用いて、二次元結晶融解温度と光退色開始温度の関係を調べた。



Y.Yokoyama et al. 2002

図 3-1：紫膜bRの光退色現象と二次元結晶融解の関係

上図：紫膜bRの暗・光照射下での熱安定性。暗・光照射下で1時間の退色実験を行い、Abs560からbRの退色度合いを評価した（○；暗、●光照射下）。60°Cから70°Cの温度領域では暗下では退色せず安定だが、光照射下ではある割合のbRは退色してしまう（図中のピンク色領域）。この現象を光退色現象と呼ぶ。

下図：紫膜bRの暗下での二次元結晶融解を可視領域CDスペクトル測定によって調べた。二極型スペクトルの負の極大である600 nmのモル楕円率変化を温度に対してプロットすることで二次元結晶の融解曲線を得た。この結果から60°C以上で二次元結晶融解が開始することがわかる。

3.2 結果

まず DMPC、DPPC、DSPC 二重膜に再構成した bR サンプルの DSC 測定結果を図 3-2 に示す。

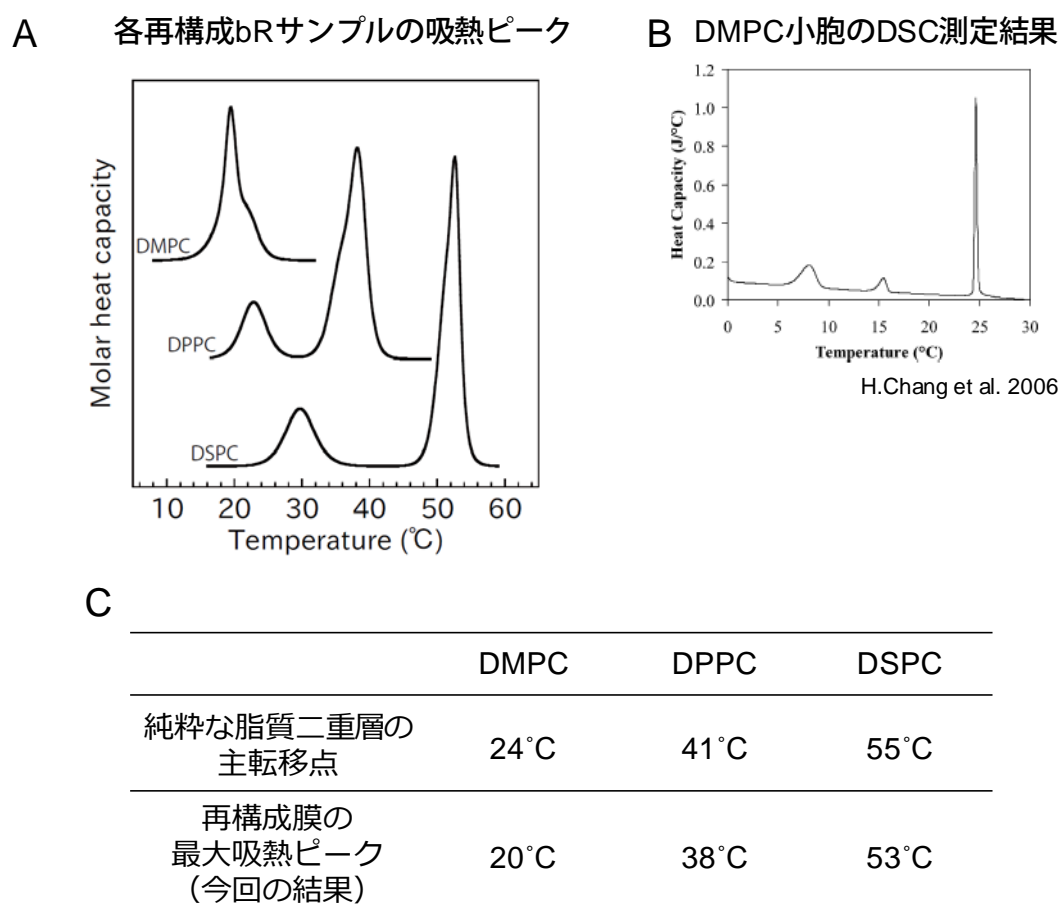


図 3-2：各再構成bRサンプルのDSC測定結果

(A) DMPC、DPPC、DSPC 小胞にそれぞれ脂質/タンパク質比 = 150 で bR を再構成したサンプルの DSC 測定を行った。

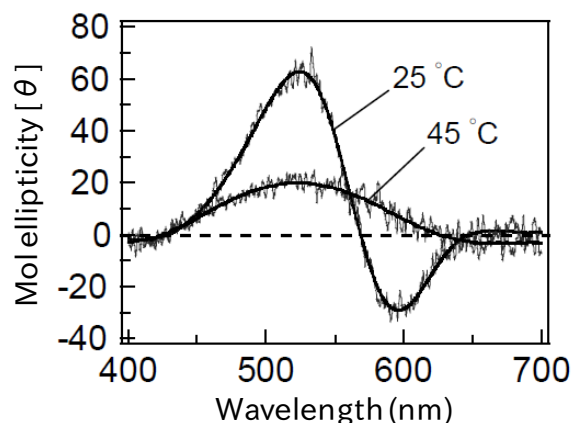
(B) 純粋な DMPC 二重層の DSC 測定結果。

(C) 各脂質の主転移点と、本研究で得られた再構成膜の最大吸熱ピーク温度の関係。すべてのサンプルにおいて、純粋な脂質二重層の主転移温度に比べて再構成膜の最大吸熱ピークの方が低温へシフトしていた。このことから、bR が混在することで脂質膜二重層の融解点が低下したことがわかる。

bR を再構成した DMPC 膜、DPPC 膜、DSPC 膜の主転移のピークはそれぞれ、20°C、38°C、53°C で観察された。図中の表に示したように各脂質の純粋な二重層から得られた主転移温度と対応させると、全てのサンプルにおいて、bR を再構成した

ことで脂質膜の主転移温度が低温側にシフトし、ピークもブロード化していた。この原因としては脂質 - タンパク質間相互作用によって脂質の物性が不均一になっている可能性 [23] などが考えられる。

A DPPC膜に再構成したbRの可視領域CDスペクトル



B 600 nmにおけるモル橢円率変化の温度依存性

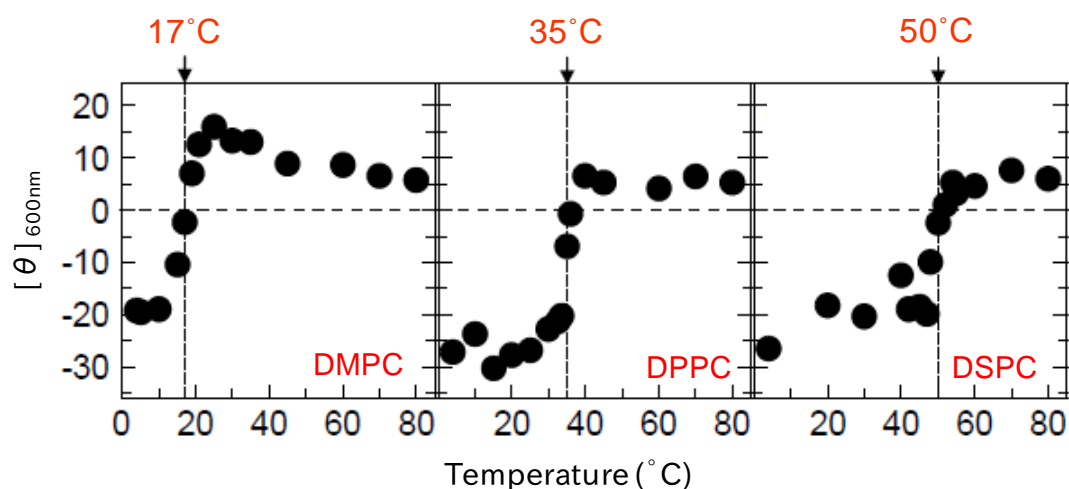


図 3-3：各再構成bRサンプルの二次元結晶融解

(A) 脂質膜相転移温度におけるDPPC再構成bRの可視領域CDスペクトル変化。図 3-2より、bRを再構成したDPPC膜の相転移（主転移）は38°C付近で起こることがわかった。そこで25°Cと45°CでCDスペクトル測定を行い、脂質膜相転移がおよぼす二次元結晶構造への影響を調べた。25°Cで測定したスペクトルでは明らかな二極型が観察され、再構成bRが二次元結晶を形成していることがわかった。一方、45°Cで測定したCDスペクトルでは二極型が消滅していることから二次元結晶が融解していることがわかった。

(B) 各再構成bRサンプルにおける600 nm（二極型CDスペクトルの負の極大）でのモル橢円率の温度変化を示す。図中の点線は、各サンプルにおいてモル橢円率が変化する温度領域の中心温度を表し、その温度を赤字で示した。

次に、再構成脂質膜のゲル - 液晶相転移を含む広い温度領域で可視領域 CD スペクトル測定を行った。図 3-3A に DPPC 膜に再構成した bR の可視領域 CD スペクトルを示す (DPPC 二重層のゲル - 液晶相転移点は 42°C)。以前の報告と同様 [20-22]、DPPC 膜がゲル相の際の可視領域 CD スペクトルは 560 nm を中心とした非対称の二極型を示し、液晶相の際は単極型を示した。液晶相への脂質相転移温度における、この CD スペクトル変化は bR 分子の脱会合および単量体化を意味する [16-20] ことは既に記述した。また、DPPC 再構成 bR と同様の可視領域 CD スペクトル変化が DMPC および DSPC 膜中の bR でも観察された。また、二極型から単極型への転移の温度依存性を調べるため、二極型スペクトルの負の極大にあたる 600 nm でのモル楕円率の値を温度に対してプロットした (図 3-3B)。この図からわかるように、可視領域 CD 変化の中心にあたる温度は DMPC 膜中の bR で 17°C 、DPPC 膜中の bR で 35°C 、DSPC 膜中の bR で 50°C であった。

得られた結果をもとに、再構成膜の相転移温度と再構成 bR 二次元結晶形成・融解温度の関係を調べた。

再構成膜の吸熱ピークと再構成bRの二次元結晶融解の関係

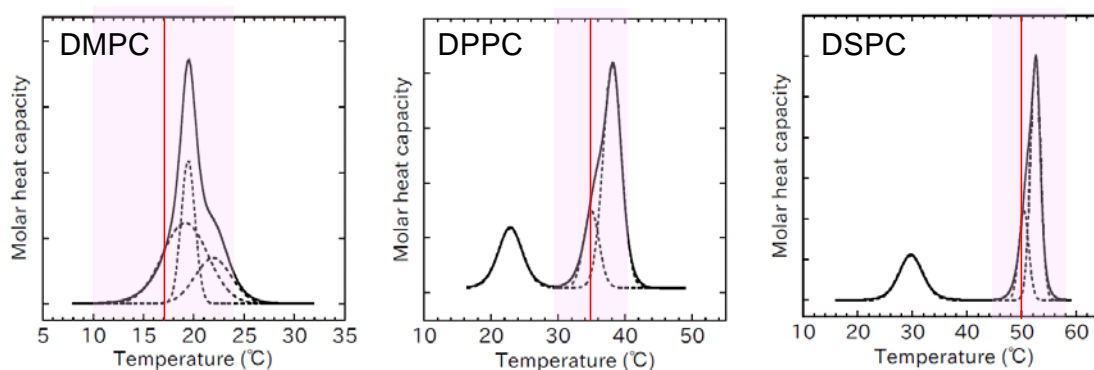


図 3-4：再構成膜の吸熱ピークとbR二次元結晶融解の温度依存性

図中の実線はDSC測定から得られた吸熱ピークで、それぞれを正規分布の和になるようにピークを分割したものが図中の点線である。また、二次元結晶融解の温度領域をピンク色の帯で、その中心温度 (17 、 35 、 50°C) を赤色直線で示した。

いずれも再構成膜相転移の大きなピークとbR二次元結晶融解の温度領域はよく対応していた。特に、DPPC、DSPC膜に再構成したbRでは二次元結晶融解開始温度と再構成膜の二番目の吸熱ピークの立ち上がりが一致した。DPPC、DSPCの正規分布で分割した吸熱ピークと純粋な脂質二重層の吸熱ピークの形状はよく似ているため、仮に分割した再構成膜脂質の吸熱ピークを低温側から副転移、前転移、主転移と帰属できたとすると、bR二次元結晶融解は再構成膜の前転移と同時に起こったとも考えられる。

図 3-4 に、得られた DSC プロファイルのピークを正規分布でフィッティングした結果（点線）と CD 測定結果からわかった bR の二次元結晶融解温度（ピンク色）を示した。この結果が示すように、各サンプルで再構成膜の相転移と bR 二次元結晶融解はよく対応しており、特に DPPC、DSPC を用いたサンプルでは特に前転移の開始と二次元結晶融解開始温度がよく一致した。

次に脂質のゲル - 液晶相転移によって誘発された bR 二次元結晶融解の影響を調べるために、暗中で吸収スペクトル測定を行った。一般に bR の吸収スペクトルはレチナールのコンフォメーションおよびレチナールポケットの構造を反映するものと考えられている [54]。図 3-5 A に異なる温度（10℃～60℃）で測定した DPPC 膜に再構成した bR の紫外・可視吸収スペクトル（上図）および各温度における 10℃ との差スペクトル（下図）を示した。温度ジャンプ後 5 分でサンプル温度が上昇して均一になることを確認しており、退色の影響を小さくできる。この結果が示すように、最大吸収波長が 20℃ での 560 nm から 60℃ では 530 nm まで短波長シフトしており、さらにこの吸収極大の変化に伴ってその吸収の値も減少した。差スペクトルは温度上昇に伴う 570 nm の吸収の減少を示しており、同時に 460 nm が増加していることを示した。同様の吸収スペクトル変化は、DMPC、DPPC、DSPC 再構成 bR の全てに共通して観察された現象であり、さらに紫膜中の bR の 60℃ 以上でも同様の吸収スペクトル変化が確認されている [32]。図 3-5 B には DMPC、DPPC、DSPC 再構成 bR の 460 nm および 570 nm における吸収変化の温度依存性を示した。三種類すべての再構成 bR サンプルにおいて、先述の可視 CD スペクトル変化の臨界温度付近から、460 nm および 570 nm における吸光度の変化が加速した。この結果から、脂質相転移に誘発された bR 二次元結晶融解によって、人工脂質膜に再構成した bR の分子構造（特にレチナール周辺の構造）が変化したことを強く示唆した。ただし、DPPC、DSPC 膜に再構成した bR の場合は、その主転移温度以下でも小さな変化が確認された。

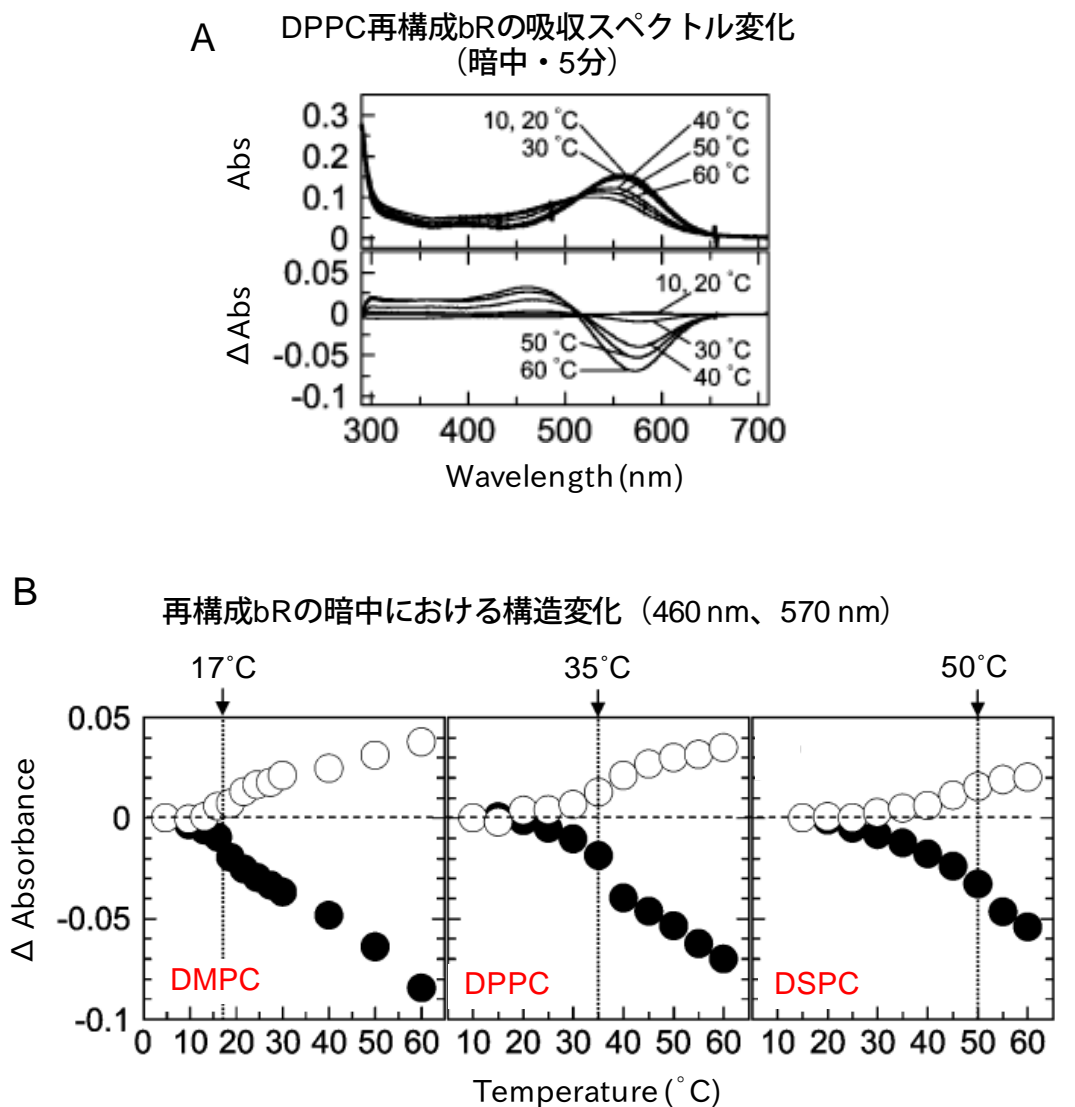


図 3-5：再構成bRの暗中での構造変化における二次元結晶融解の影響

(A) 上図は暗中・各温度・温度ジャンプ後5分で測定したDPPC再構成bRの吸収スペクトルで、下図に10°Cのスペクトルとの差スペクトルを示した。温度ジャンプから5分経過することでセル内の温度が一定になるため、この条件では熱変性の影響を最小に抑えて構造変化を評価できると考えられる。570 nmの吸収減少に伴い、460 nmの吸収が増加した。

(B) 各再構成bRサンプルについて (A) と同様に10°Cとの差スペクトルを作成し、得られた460 nmおよび570 nmの吸収変化を温度に対してプロットした。図中点線はCD測定により得られたbR二次元結晶融解温度領域の midpoint。

同様に、二次元結晶融解が bR の機能中の構造におよぼす影響を調べるために、光照射下での再構成 bR の吸収スペクトル変化を調べた。光照射・温度ジャンプ後 5 分で測定した DMPC 再構成 bR の吸収スペクトルを図 3-6A に示す。光照射下では 20°C で特に 410 nm の吸収が顕著であり、30°C 以上でも 400 nm 付近に小さなピークが確認できる。この 400 nm 付近の吸収は光照射を中止することで

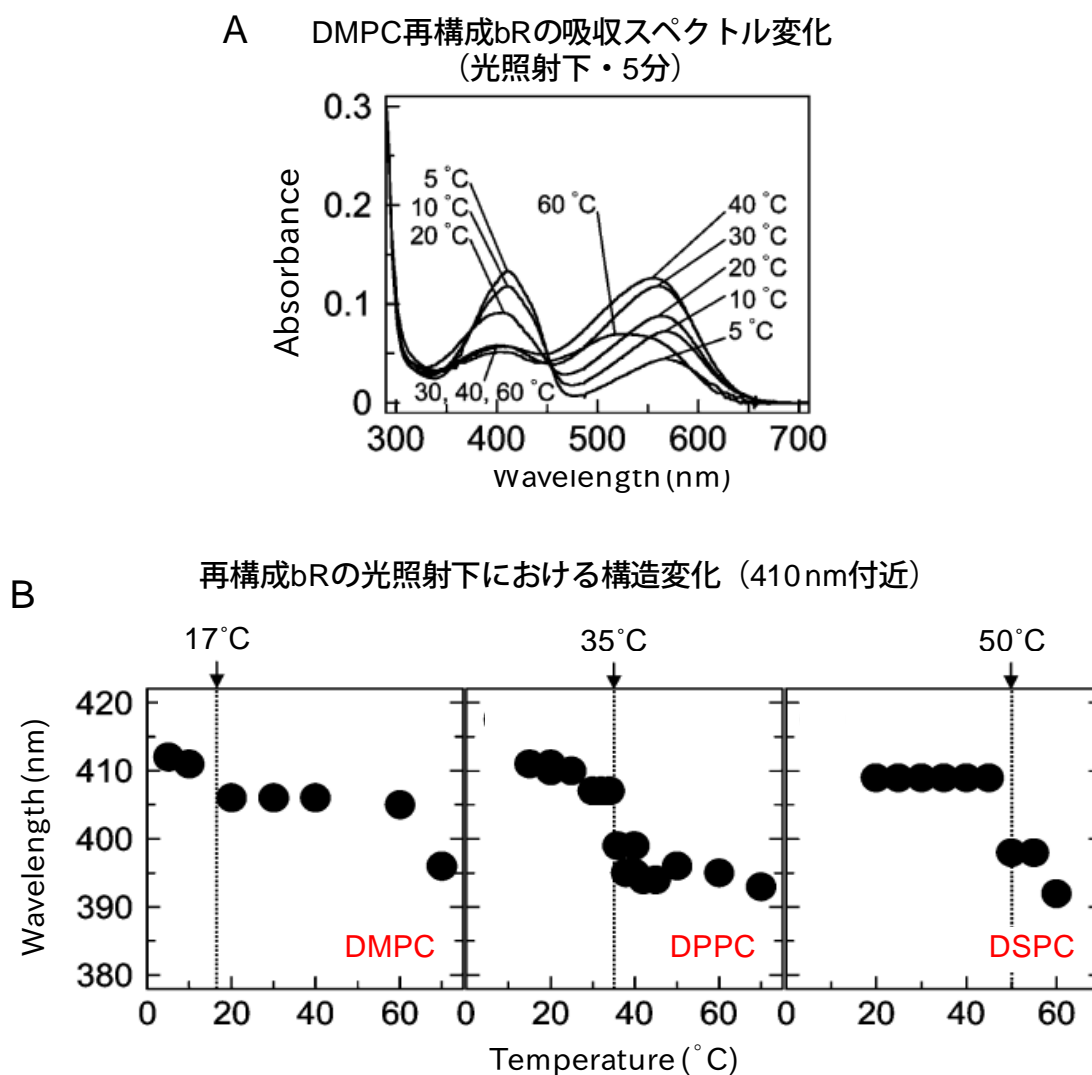


図 3-6：再構成bRの機能中（光照射下）の構造変化における二次元結晶融解の影響

(A) 光照射下・各温度で測定したDMPC再構成bRの吸収スペクトル。暗中の吸収スペクトル変化（図 3-5）と異なり、20°C以下の温度領域で410 nm付近に顕著な吸収ピークが確認された。

(B) 各再構成bRサンプルの光照射下・温度ジャンプ後5分での410 nm付近における最大吸収波長変化の温度依存性。図中の点線はCD測定により得られた二次元結晶融解温度の中点。

消失する。DMPC 再構成 bR ではゲル相・液晶相に関わらず光中間体である M 中間体の寿命が顕著に長くなることが報告されている [51]。また、私たちが測定に用いている光ダイオードアレイ吸光光度計の時間分解能は 0.1 秒であることも合わせて考慮すると、今回光照射下で確認された 400 nm 周辺の吸収は光サイクルの M 中間体の蓄積である可能性が高い。図 3-6B に光照射によって 400 nm 付近に蓄積した吸収ピークの最大吸収波長の温度依存性を示した。この M 中間体と見られる吸収は、各サンプルの二次元結晶融解温度以上で短波長側へシフトした。DMPC 再構成 bR の時間分解分光測定の結果では、液晶相で M 中間体の吸収の短波長シフトが報告されている [55]。M 中間体は bR のプロトンポンプ機能に重要な役割を果たしている（プロトン放出からプロトン取り込みのスイッチングを担っている）と考えられている [36]。今回得られた結果は、bR の二次元結晶融解によって bR 間相互作用が弱まったことで、暗中之での bR の構造だけでなく、光照射下における機能中の構造（コンフォメーション変化のスイッチング）の安定性にも強く影響していることを示唆した。

続いて、bR 二次元結晶融解が bR の構造安定性に与える影響を調べるために、各再構成 bR サンプルで光退色実験を行った。図 3-7A に異なる温度(10°C~70°C)で測定した DPPC 膜に再構成した bR の紫外・可視吸収スペクトル（上図：暗、下図：光照射下）を示す。高温では試料の吸収極大が 560 nm 付近から短波長側へシフトするが、サンプル温度を下げ、暗中で一晩インキュベーションすることで試料の吸収極大は 560 nm に戻る。ここでの吸収は退色しなかった bR の量を示す。図 3-7B は各再構成 bR サンプルの暗中小および光照射下における退色の温度依存性を示した。暗中で退色実験を行った再構成 bR サンプルは 60°C 以下では Abs_{560} はほぼ完全に回復したが、光照射下での結果では二次元結晶融解の温度（図中の点線）領域付近から回復できる成分の減少が開始した。これらの結果から、脂質の相転移によって二次元結晶融解が誘発されたときに、人工脂質二重層に再構成した bR が光退色現象を起こすことを示唆している。しかし、DPPC、DSPC 二重層の再構成 bR に関しては、光退色の開始温度が脂質の主転移温度よりも少し低い温度から開始していた。

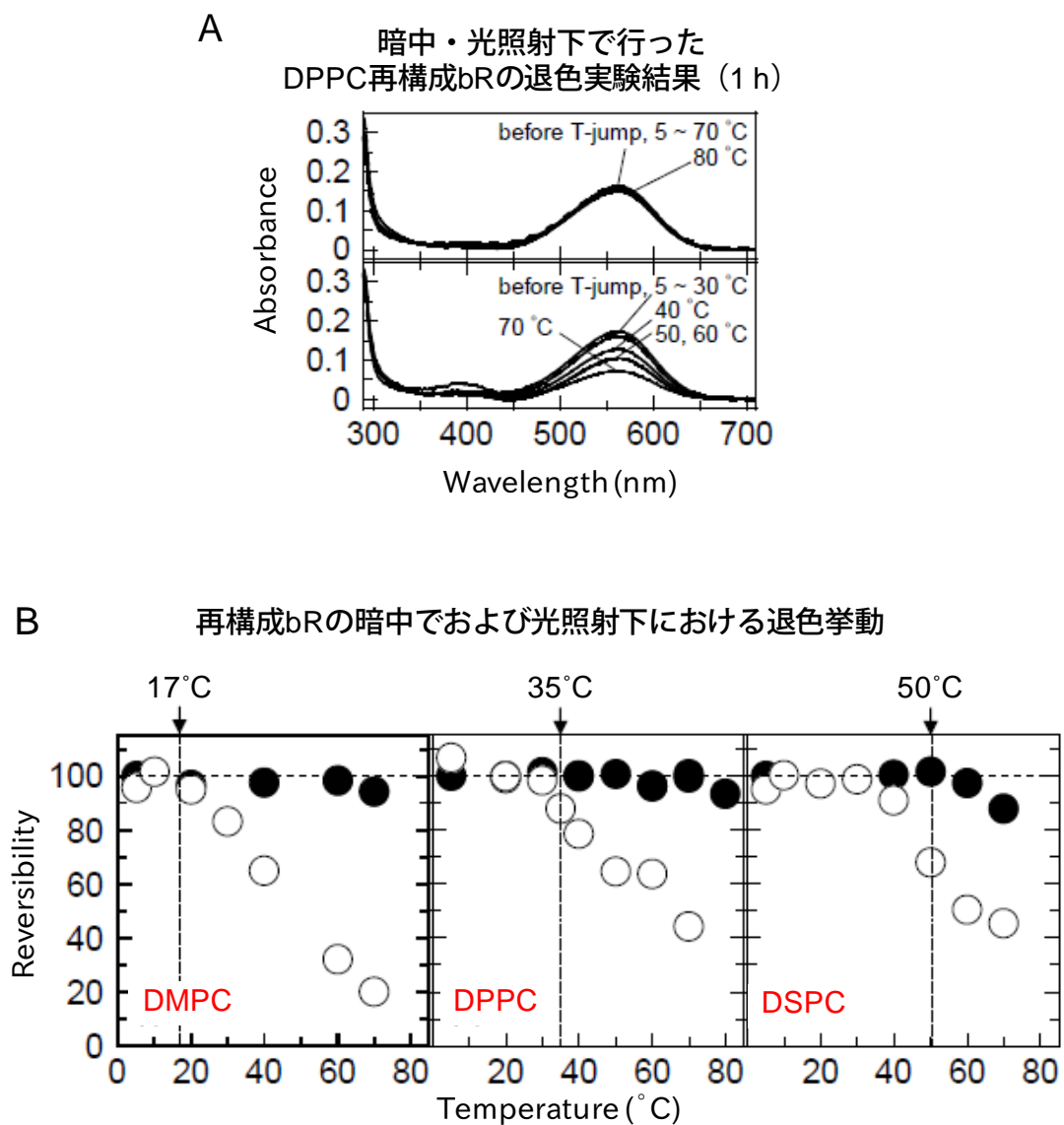


図 3-7：二次元結晶融解によるbR構造安定性（暗中・光照射下）への影響

(A) 5～70℃の温度領域でDPPC再構成bRの退色実験を行った。上図には暗中での、下図には光照射下での吸収スペクトルを示す。ある温度領域では光照射下でのみbRの退色が起こっていた。

(B) 各再構成bRサンプルの暗中（●）・および光照射下（○）における退色の温度依存性を示す。図中の点線はCD測定により得られた二次元結晶融解温度の中点。

3.3 考察

本研究では異なる相転移温度を持つ三種類の脂質に bR を再構成し、相転移、二次元結晶融解、光退色の温度を調べた。まず最初に、再構成脂質の相転移が、bR の二次元結晶構造および bR 分子構造の安定性とどのような関係になっているかを考察する。再構成膜がゲル相のとき、bR 分子は自己会合し紫膜 bR と同様の二次元結晶を形成していた。また暗中で再構成 bR の吸収測定を行った結果、ゲル相では紫膜 bR と同様の吸収スペクトルを示したが、再構成膜のゲル-液晶相転移に誘発された二次元結晶融解に伴って短波長シフトした。光照射下で再構成 bR の吸収スペクトル測定を行った結果、M 中間体と考えられる化学種が蓄積した。また全ての再構成 bR サンプルで、二次元結晶融解に伴う光退色現象が観察された。これらの結果から、再構成膜のゲル-液晶相転移によって bR の二次元結晶融解が誘発され、さらに二次元結晶融解によって bR - bR 間相互作用が弱まり、その結果、再構成 bR の分子構造だけでなく機能中の構造安定性（光照射下）が顕著に低下する、という関係が考察された。

次に再構成 bR の再構成膜相転移と二次元結晶構造の関係について考察する。再構成 bR の二次元結晶融解は、脂質膜のゲル-液晶相転移に誘発されることがわかった。脂質二重層の相転移およびゲル相（脂質分子の炭化水素鎖が非常に強くパッキングしている状態）では、炭化水素鎖間の van der Waals 引力によって脂質以外の分子が排斥されて自己会合することはよく知られている [56-59]。脂質二重層がゲル相のときに bR が二次元結晶を形成したことから、再構成 bR の自発的な二次元結晶形成は、van der Waals 相互作用に起因する脂質分子同士の引力的なはたらき（脂質二重層の相分離）によるものと考察される。一方、全てのサンプルにおいて、bR を再構成した脂質二重層の相転移温度が、各脂質のみからなる純粋な脂質二重層の相転移温度に比べて低かった。この理由を説明するために、私たちは溶液系で見られる凝固点降下をもとに図 3-8 のモデルを考察した。

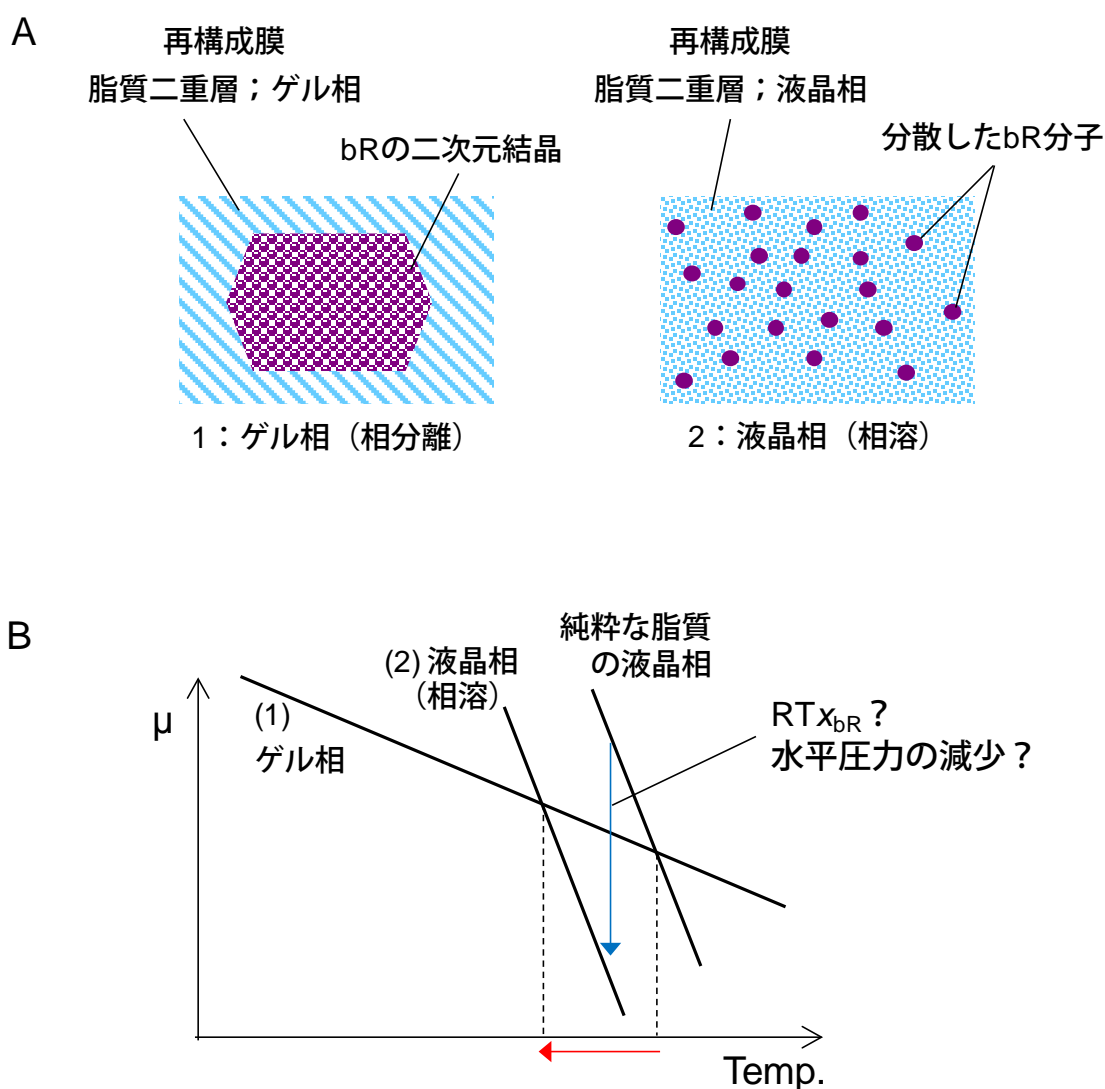


図 3-8：再構成膜の相転移とbR二次元結晶融解の関係（モデル）

（A）再構成膜bRの脂質膜相転移に伴う会合状態の変化。相転移温度の異なる三種類の脂質二重層にbRを再構成したことで、再構成膜のゲル-液晶相転移によってbRの二次元結晶融解が誘発されることがわかった。

（B）純粋な脂質二重層の相転移温度との比較により、bRを再構成することで脂質膜の相転移温度が低下することがわかった。（A）のモデルから考察される、再構成膜におけるゲル相（相分離）・液晶相（相溶）の状態変化を示す。再構成膜では純粋な脂質二重層に比べて液晶相（相溶）の化学ポテンシャルが低下したために、相転移温度が低温側にシフトしたと考察できる。

脂質膜相転移での化学ポテンシャル変化を考えると

$$\mu(\text{gel}) = \mu(\text{lq})$$

$\mu(\text{gel})$ ：ゲル相での化学ポテンシャル $\mu(\text{lq})$ ：液晶相での化学ポテンシャル

を満たすとき相転移が起こるが、bR が混在することで相転移は

$$\mu(\text{gel}) = \mu(\text{liq})^\circ - RT x_{\text{bR}}$$

$\mu(\text{liq})^\circ$: 標準状態での液晶相化学ポテンシャル x_{bR} : bR のモル分率

となり、 $RT x_{\text{bR}}$ の効果によって転移温度が低下したと考えられる。しかし、この化学ポテンシャル低下の原因は溶液系で言うところの分圧の低下のほかに、bR 混在による脂質分子間にはたらく水平圧力低下の効果 [60] の可能性も考えられる。

続いて、再構成 bR の二次元結晶融解と bR 構造安定性の関係について考察する。暗中で再構成 bR の吸収スペクトル測定を行った結果、温度を上げることで 570 nm の吸収減少と 460 nm の吸収増大が確認された。この再構成 bR の暗中で吸収スペクトル変化と似た挙動が、紫膜 bR でも観察されている [31]。紫膜 bR では二次元結晶融解時に、 α_{H} から α_{I} ヘリックスへの変化、13-cis レチナールの増加、シッフ塩基への水分子の接触性の増加が起こる [61, 62] ことから、bR-bR 間相互作用の弱まっている二次元結晶融解条件下では、紫膜中に比べて bR 分子が緩んだようなコンフォメーションを取っていると推測される。また本研究の結果として、光照射下で、二次元結晶融解に伴う蓄積した M 中間体の短波長シフト (DMPC: 410 nm → 405 nm、DPPC: 410 nm → 395 nm、DSPC: 410 nm → 390 nm) が確認された。DMPC 再構成 bR の時間分解分光測定や、Triton X-100 に可溶化した bR でも、二次元結晶融解条件下での M 中間体の短波長シフトが報告されている [63]。従って、二次元結晶融解に伴う bR の光照射下での構造安定性低下は、この M 中間体の構造のゆらぎに起因すると考えるのが妥当であろう。bR の M 中間体はプロトンの取り込み・排出の切り替えを担っており [35]、プロトンポンプ機能において重要な中間体であると考えられる。この機能に重要な中間体における構造ゆらぎが基底状態への復元を妨げ、不可逆な光退色の原因となっていると考えられる。この光退色現象と二次元結晶融解の関係については、第 5 章で詳しく議論する。

最後に、DPPC および DSPC に再構成した bR において、再構成膜の主転移より低温であるにも関わらず、暗中での吸収スペクトル変化および光退色が観察されたことについて考察する。DPPC および DSPC 再構成 bR の DSC 測定結果(図 3-2)では、それぞれ約 25°C と約 30°C に小さなピークが観察された。本研究では、このピークの起源を厳密に帰属することはできないが、ゲル相からリップル相への前転移を反映するものと推測できる。この推測に基づくと、純粋な DPPC もしくは DSPC 二重層の前転移温度に比べて再構成膜の前転移温度の方が低いと言える。これは先述の bR 混在による主転移温度の低下の原因と同様な説明が可能である。一方、固体 NMR や電子スピン共鳴 (ESR) の結果から、DPPC のリップル相のスペクトルはゲル相および液晶相のスペクトルの足し合わせとして表せることが報告されている [64, 65]。ステアリン酸スピンプローブの ESR 測定の結果はリップル相中のアシル鎖の約 20 %が液晶相と同様の状態 (ディスオーダー) をとることを示しているため、リップル相ではゲル相と液晶相の両方の構造を併せ持つ可能性が強く示唆されている (図 1-7) [65]。さらに、人工脂質二重膜の超音波速度測定では前転移が起こると、膜が軟化することを示している [66]。こうした人工脂質膜二重層に関する実験的事実は、DPPC および DSPC 再構成 bR においては、bR の部分的な構造変化と光退色現象が再構成膜の物性が変化する 30°C 付近で起きた、という可能性を示唆している。

3.1 第3章の総論

本章では、アシル鎖長の異なる三種類のホスファチジルコリン、DMPC、DPPC、DSPC に再構成した bR を用い、再構成膜の相転移温度、bR の二次元結晶形成・融解温度、bR の光退色開始温度の関係を調べた。再構成膜の相転移は DSC 測定、bR の二次元結晶形成・融解は可視領域における円二色性 (CD) 測定によりモニターした。また暗中および可視光連続照射下での吸収スペクトル測定により再構成膜中の bR の光退色挙動を調べ、二次元結晶融解との関係を考察した。DSC 測定の結果から、すべてのサンプルにおいて再構成膜の相転移は bR を再構成していない純粋な脂質二重層の相転移に比べてピークがブロードになっており、主転移に対応すると考えられるピークの温度 (DMPC ; 20°C、DPPC ; 38°C、DSPC ; 53°C) が数度低下していた。bR の二次元結晶融解を意味する可視領域 CD スペクトルの二極型 - 単極型への転移は DMPC で 17°C、DPPC で 35°C、DSPC で 50°C 周辺で起こった。DSC の結果と CD の結果を合わせると、再構成膜の相転移温度と bR の二次元結晶融解温度はよく対応しており、この結果は脂質膜の相転移によって bR 分子の脱会合が引き起こされたことを強く示唆している。さらにそれぞれの光退色現象も同様の温度領域以上で起こった。先行研究の結果も合わせると、二次元結晶の融解によって bR の光退色現象が誘発されることが決定づけられた。

第4章

DMPC 膜に再構成したバクテリオロドプシンの二次元結晶化に 与える静電相互作用の影響

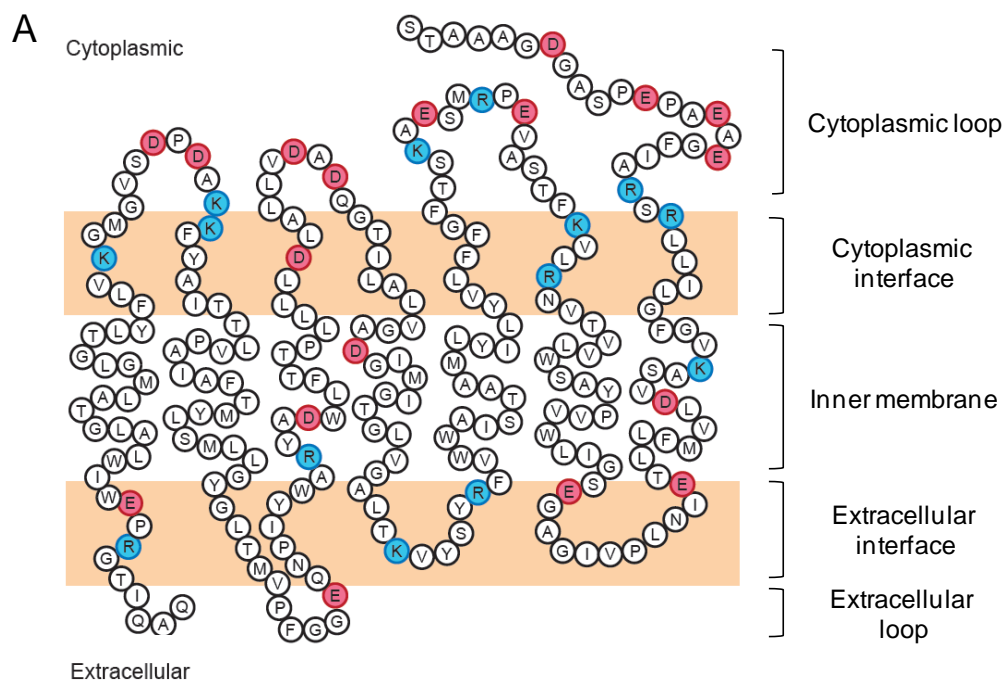
4.1 背景

第3章の結果から、人工中性リン脂質二重層中での bR 自己会合（二次元結晶形成）が、少なくとも部分的には脂質二重層の相分離の効果によって誘発されることが示唆された。しかし、この考察では再構成膜中での bR 自己会合は説明できるが、紫膜 bR の二次元結晶形成機構を説明することはできない。[1.3 第4章への問題提起] で述べたように、先行研究 [26-28] によって示唆されている紫膜 bR の二次元結晶形成における脂質極性頭部の負電荷の効果から、bR の二次元結晶形成における分子間の静電相互作用の重要性が示唆される。実際にアミノ酸配列情報から bR 分子における荷電アミノ酸残基の分布を調べたところ、その電荷分布には偏りがあり、特に細胞質側に荷電残基が多いことがわかった（図 4-1）。このことから、やはり bR-脂質間および bR-bR 間の静電相互作用の重要性が示唆される。

静電相互作用の影響は溶液の塩濃度を変えることで、Debye の遮蔽効果によって制御することができる（図 4-2）。誘電率の大きな液体中に分散した粒子の表面は、通常、表面基のイオン化・解離や、もともと帯電していない表面への溶液からのイオン吸着によって帯電している。しかしこうした帯電機構に依らず、最終的に表面電荷はカウンターイオンの雰囲気とつりあう。このとき、帯電表面近傍におけるカウンターイオンの雰囲気は拡散電気二重層と呼ばれ、これは表面電荷と大きさが等しく符号が逆の領域である。表面電荷密度と表面電位の関係は Grahame の式で表される。電荷密度 σ の孤立表面における全イオン濃度は

$$\sum_i \rho_{oi} = \sum_i \rho_{\infty i} + \sigma^2 / 2\epsilon\epsilon_0 kT$$

ρ_{xi} ；任意の点 x におけるイオン i の濃度、 σ ；表面電荷密度



B

	Acidic amino acid	Basic amino acid	Net charge
Cytoplasmic loop	10	3	- 7
Citoplasmic interface	1	6	+ 5
Inner membrane	3	2	- 1
Extracellular interface	3	3	0
Extracellular loop	1	0	- 1
Total	18	14	- 4

図 4-1：bR電荷分布

(A) bRのアミノ酸配列および立体構造情報からアミノ酸（一文字表記）を膜面に対して配置した図。塩基性（正電荷）残基を青色、酸性（負電荷）残基を赤色で示した。またオレンジ色の領域は膜-水界面領域を意味する。

(B) 各領域における塩基性・酸性残基の数。この表から、bRの持つ荷電残基は特に細胞質側に集中しており、電荷分布に偏りがあることがわかる。

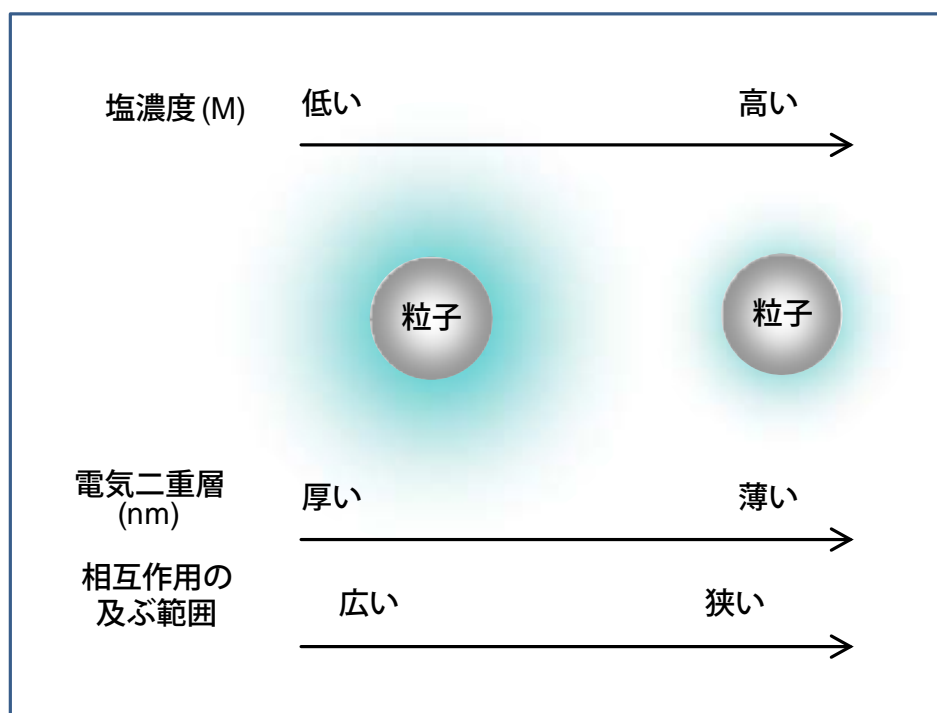
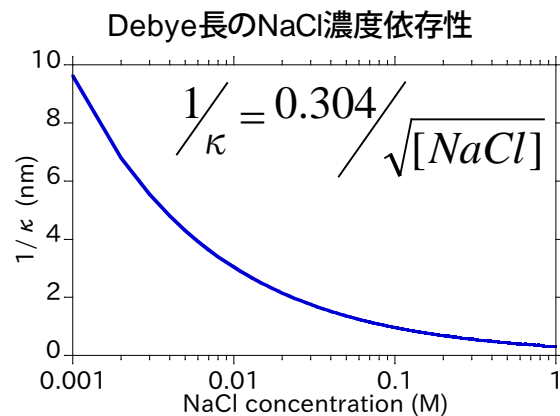


図 4-2：溶媒NaCl濃度と電気二重層の厚さ（Debye長）との関係

拡散電気二重層の厚さをDebye長と呼び、 $1/\kappa$ で表される。表面電荷密度一定の場合、バルクの電解質濃度上昇に伴い表面電荷が減少することはGrahameの式によって示される。

と書ける。

当然、帯電表面に存在するイオンは主にカウンターイオン（負に帯電した表面の場合は正電荷イオン）となる。この Grahame の式より、帯電表面付近のイオン濃

度はバルク濃度に比べて高くなることがわかる。さらにこの式から表面電荷密度と表面電位の関係は

$$\sigma^2 = 2\varepsilon\varepsilon_0 kT(\sum \rho_{0i} - \sum \rho_{\infty i})$$

と表せる。

この関係式から、表面電荷密度が一定ならば、バルク電解質濃度上昇に伴い表面電位が次第に減少することがわかる。

Grahame の式を簡略化するために、

$$\kappa = \sqrt{\frac{\sum_i \rho_{\infty i} e^2 z_i^2}{\varepsilon\varepsilon_0 kT}} \text{ m}^{-1}$$

とおくと、表面電荷密度 σ と表面電位 ψ の関係は

$$\sigma = \varepsilon\varepsilon_0 \kappa \psi_0$$

と書け、電位が表面電荷密度に依存することがわかる。この式は極板間距離 $1/\kappa$ 、電荷密度 σ 、電位差 ψ_0 のコンデンサの式と同じである。上述の「拡散電気二重層」という呼び方はこの帯電コンデンサと類推から生まれたもので、この拡散電気二重層の厚さはデバイ長 $= 1/\kappa$ で表される。 κ の定義から、電解質の種類、濃度（バルク）、温度、誘電率が決まると κ および $1/\kappa$ は決まる。ちなみに 25℃ における Debye 長 ($1/\kappa$) は、

$$1:1 \text{ 電解質溶液 (NaCl など)}; \quad = 0.304 / \sqrt{[\text{NaCl}]} \text{ nm}$$

$$2:1 \text{ および } 1:2 \text{ 電解質溶液 (CaCl}_2\text{、Na}_2\text{SO}_4\text{)}; \quad = 0.176 / \sqrt{[\text{CaCl}_2]} \text{ nm}$$

$$2:2 \text{ 電解質溶液 (MgSO}_4\text{)}; \quad = 0.176 / \sqrt{[\text{CaCl}_2]} \text{ nm}$$

である。この関係式から、溶媒中の電解質濃度が高くなると Debye 長が短くなる、つまり拡散電気二重層の厚さが薄くなることが定性的にも理解できるであろう。

そこで本章では、DMPC 再構成 bR を用い、脂質膜がゲル相である低温領域での可視領域 CD 測定によって、塩化ナトリウム (NaCl) 濃度の異なる溶液中での二次元結晶形成の過程をモニターした。

4.2 結果

中性脂質 (DMPC) 膜に再構成した bR の二次元結晶化に与える静電相互作用の寄与を調べるため、私たちは異なる三種類の実験を行った。

(i) 吸収スペクトル測定：塩濃度変化によって bR が変性しないことを確認

(ii) 可視領域 CD スペクトル測定：bR の二次元結晶形成をモニター

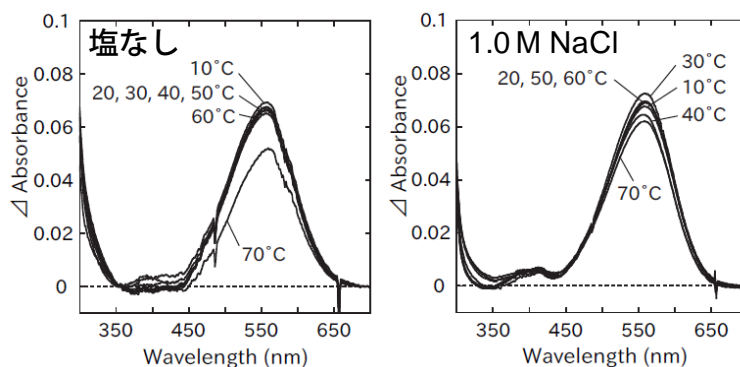
(iii) 脂質二重層ゲル相における CD スペクトル変化の塩濃度依存性評価：

bR 二次元結晶化における静電相互作用の寄与を調べる

まず、NaCl を含まないバッファーおよび NaCl 1.0 M を含むバッファー中で再構成 bR の吸収スペクトル測定を行い、その熱安定性を吸収スペクトル変化の温度依存性から評価した (図 4-3A)。また、図 4-3B には DMPC 再構成 bR の熱安定性 (10~70°C・60 分間・暗中) における NaCl の影響を示した。この結果から、60°C 以上において DMPC 再構成 bR の暗中での熱安定性が低下するが、これは溶媒中の塩濃度には依存しないことがわかった。

次に私たちは DMPC 再構成 bR の可視領域 CD スペクトル測定を DMPC のゲル液晶相転移温度 24°C [44] を含む 10~30°C・暗中で行った。NaCl なし、NaCl 濃度 0.1 M、0.5 M、1.0 M における DMPC 再構成 bR の可視領域 CD スペクトルを図 4-4A に示す。可視領域 CD スペクトルにおいて二極性のパターンは紫膜中の bR 測定時に観察され、これは bR の二次元結晶構造を反映している。一方、560 nm を中心とした単極のパターンは界面活性剤に可溶化した bR で観察され、これは bR の二次元結晶が融解していることを意味することが知られている [16-20]。図 4-4A に示したように、0.0 ~ 1.0 M の範囲では 30°C での DMPC 再構成 bR の可視領域 CD スペクトルは全て単極型を示し、さらにその極大である 560 nm でのモル楕円率に塩濃度の影響がほとんどない。この結果は、塩濃度に依らず 30°C 以上で DMPC 再構成 bR の二次元結晶は融解していることを意味し、この bR の二次元結晶融解は再構成膜のゲル液晶相転移によって引き起こされたことを強く示唆した。一方、10°C での可視領域 CD スペクトルはいずれも二極性パタ

A DMPC再構成bRの吸収スペクトルに対するNaClの影響



B

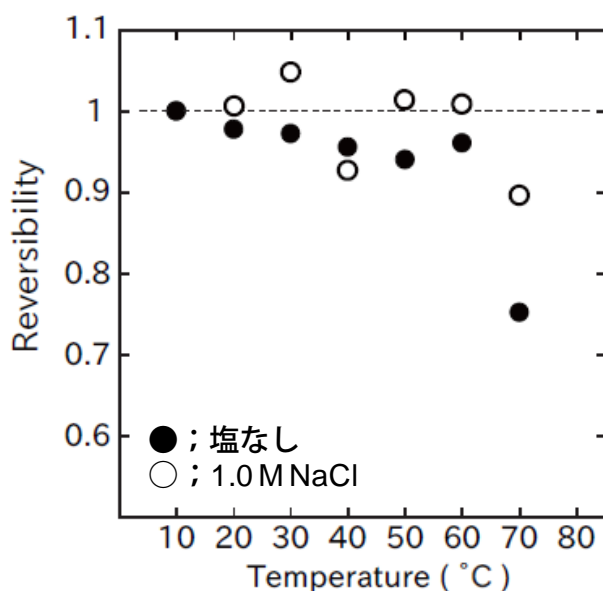


図 4-3：再構成bRの構造安定性に対するNaClの影響

(A) 暗中・1時間行ったDMPC再構成bRの退色実験結果。NaClを含まないバッファーおよび1.0 M NaClを含むバッファを用い、DMPC再構成bRの熱安定性を比較した。

(B) 暗中・各温度におけるAbs₅₆₀の可逆性の温度依存性を示す (●; NaClを含まないバッファー、○; 1.0 M NaClを含むバッファー)。いずれも暗中の熱変性は60°C以上で起こり、この結果から、バッファー中のNaCl濃度を1.0 Mまで上げて、bRの構造安定性には顕著な影響を与えないことがわかった。

ーンを示し、塩濃度を上げることで二極性パターン NaCl を含まない (0.0 M) 場合の CD スペクトルは二極型と単極型を組み合わせたような形状であった。そこで、この二極型の振幅を評価するために、全てのスペクトルに対して、各塩濃度における 30°C でのスペクトルとの差スペクトルを作成した (図 4-4B)。この後

の解析にはすべて図 4-4B のデータを用いることとする。

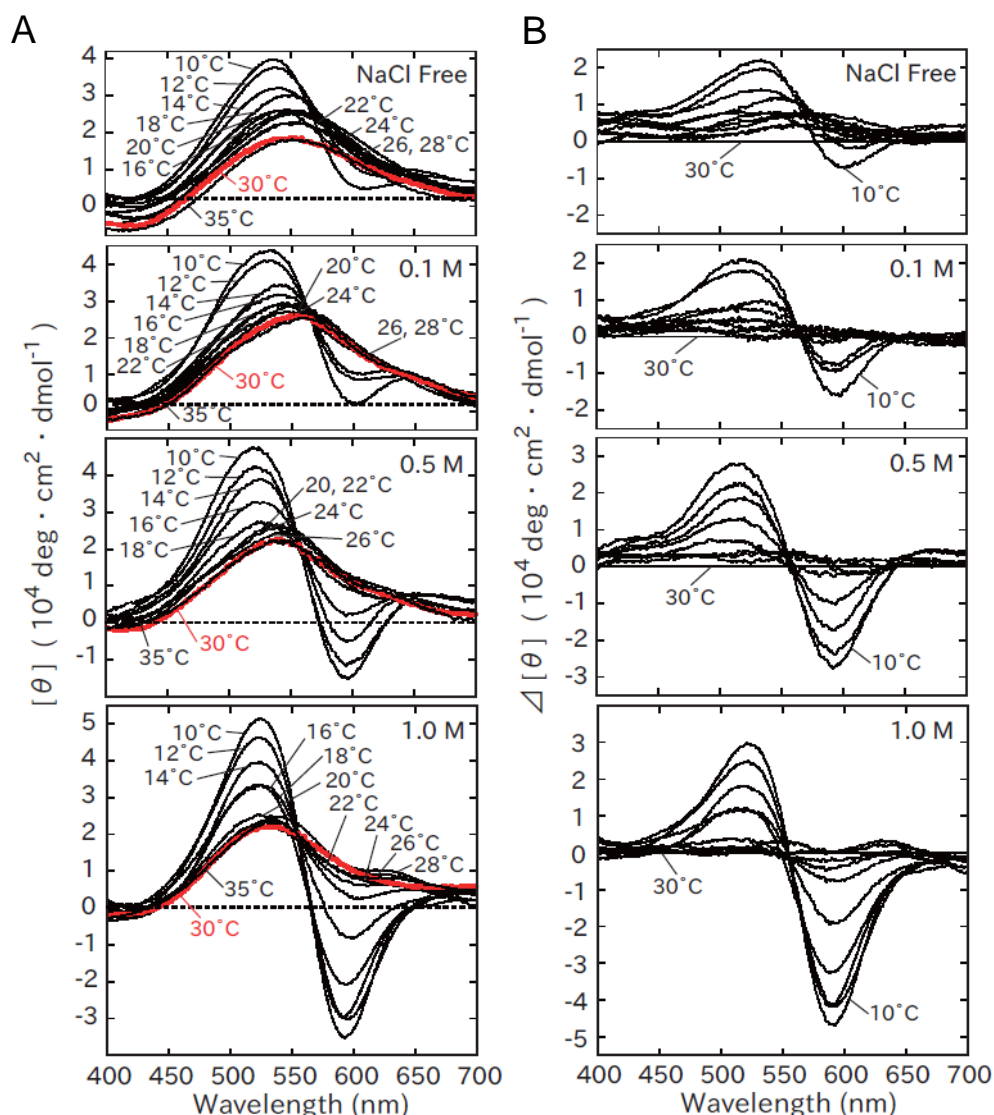


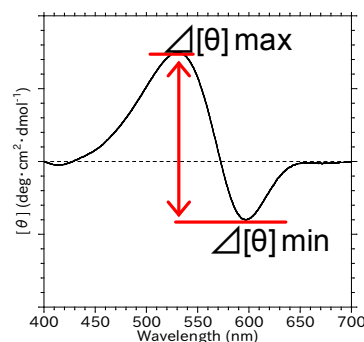
図 4-4：異なる塩濃度条件下のDMPC再構成bRの可視領域CDスペクトル（10-35°C）

(A) DMPC再構成bRが二次元結晶を形成する温度領域（10～35°C）で可視領域CDスペクトル測定を行い、その塩濃度依存性を調べた。上図からバッファーにNaClを含まないサンプル、0.1 M、0.5 M、1.0 MのNaClを含んだバッファー中のサンプル。特に低温で塩濃度増加に伴い二極性の増大が確認された。一方、30°C以上では塩濃度に関わらず560 nm付近に正の極大を持つ単極型であり、二次元結晶構造を形成していないと考えられる。

(B) 得られたCDスペクトルの二極性の変化を抽出するため、(A) で得られた全スペクトルに対して各塩濃度での30°C（A、赤色線）との差スペクトルを作成した。

可視領域 CD スペクトルの二極性は、得られた差スペクトルにおけるモル橢円率（400～700 nm）の極大値と極小値の差で評価した。ここで算出された二極性を温度に対してプロットしたものが図 4-5 である。DMPC のゲル液晶相転移温度である 24℃ から温度が下がるにつれ二極性が上昇する。

A 可視CDスペクトル二極性の評価方法



B 各塩濃度における二極性変化の温度依存性

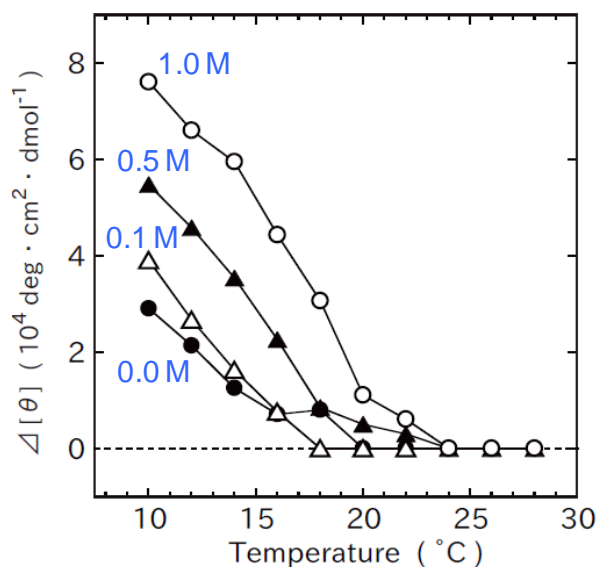


図 4-5：可視CDスペクトルにおける二極性強度変化の温度依存性

(A) bRの可視領域CDスペクトルの二極性は正負の極大におけるモル橢円率の差と定義した（図中、赤色矢印）。

(B) 得られた二極性強度を温度に対してプロットすることで二次元結晶融解曲線とした（図中、青色文字は塩濃度）。塩濃度増加に伴い、二極性強度が0になる温度も高温側へシフトしており、さらに低温側では高塩濃度で二極性強度が高くなる。

また、bR の二次元結晶融解温度から 10℃ に下がるまで、CD の二極性は着実に上がり続けていた。こうした温度依存性は塩濃度に依らず同様の挙動を示したにも関わらず、二極性の変化開始温度や、10℃ での二極性の値は NaCl 濃度上昇に伴って増大した。NaCl 濃度 1.0 M・10℃ での DMPC 再構成 bR の二極性の値は紫膜 bR での値とおよそ同じであった [31]。

溶媒中のイオン強度が二極性パターンにどれだけ影響を与えるかを調べるために、図 4-5 の結果より、全ての NaCl 濃度において CD スペクトルの二極型が確認された温度領域（10、12、14、16℃）について、二極性の値を Debye 定数に対してプロットした（図 4-6）。

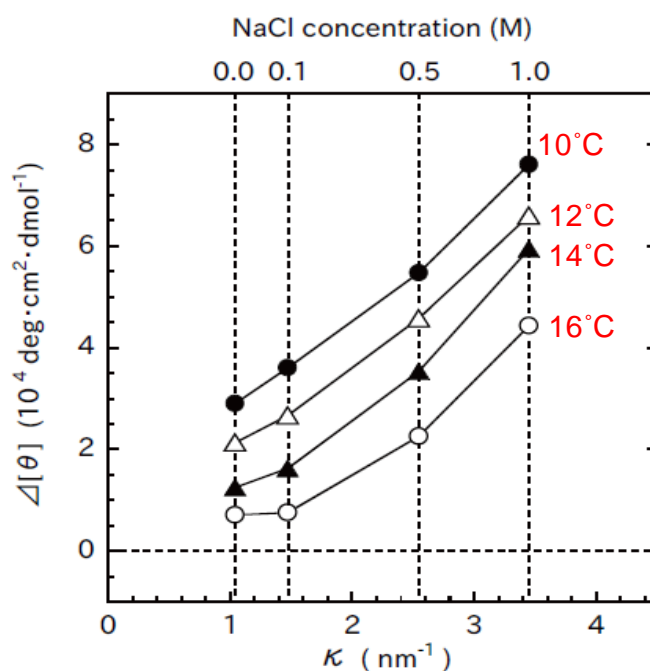


図 4-6：可視CD二極性強度のDebye定数依存性（10-16℃）

すべての塩濃度条件において二極性が観察された温度領域（10 - 16℃）について、得られた二極性強度をDebye定数に対してプロットした。二極性強度とDebye定数との間の強い相関から、静電相互作用の遮蔽によってbR二次元結晶形成が促進されたことがわかった。

本研究では DMPC 再構成 bR サンプルは 100 mM の Tris-HCl バッファー (pH 7.0) に懸濁してあるため、各 NaCl 濃度に 0.1 M を加えた値を使い、Debye 定数を計算した。

$$\kappa = \sqrt{C_{NaCl} + C_{buffer}} / 0.304$$

ここで、 C_{NaCl} 、 C_{buffer} はそれぞれ NaCl 濃度、Buffer 濃度を意味する。図 4-6 では、各 Debye 定数に対応する NaCl 濃度を上側の横軸に示した。Debye 定数は Debye 長の逆数であり、Debye 長は粒子の表面電位 ψ_0 が $1/e$ になる距離である。図 4-6 からわかるように 10～16°C の温度領域において、二極性の値と Debye 定数の間に高い正の相関が見られた。最も顕著な二極性が見られる 10°C において、簡単のために一次関数でフィッティングすると y 切片（Debye 定数が 0 のときの二極性の値）は約 $10000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ であり、1.0 M での値および紫膜 bR での二極性に比べて一桁小さかった。この結果は、DMPC 二重膜に再構成した bR の二次元結晶形成に Debye の静電遮蔽効果が必要であることを示唆しており、この静電相互作用による斥力的効果は、膜脂質での相分離による引力的効果と正反対の役割を持つ。

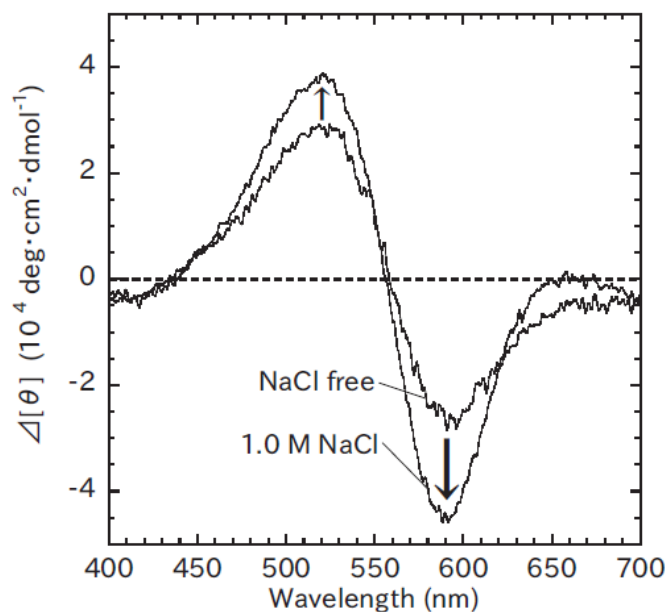


図 4-7：塩濃度ジャンプでの可視CDスペクトル変化（10°C）

NaClを含まないバッファーに懸濁したDMPC再構成bRを10°Cで測定した後に、高塩濃度バッファー添加によりバッファー塩濃度を1.0 Mへジャンプさせて再測定した。図はいずれも30°Cとの差スペクトル（縦軸はモル楕円率）。この結果からも、塩濃度上昇による二極性強度の増大が確認された。

私たちはさらに、NaCl を含まない再構成 bR サンプルに高い NaCl 濃度のバッファーを加え、NaCl 濃度上昇時の CD スペクトル変化を測定した。NaCl 濃度が 0.0 から 1.0 M に上昇すると可視領域 CD スペクトルの二極型がより顕著になった (図 4-7)。この結果からも DMPC 再構成 bR の二次元結晶形成における静電遮蔽効果の重要性が確認された。

4.3 考察

本研究の結果をもとに、bR の二次元結晶化に関して以下の点について考察を行った。

- (i) DMPC 膜に再構成した bR の分子間相互作用を決定する構造基盤
- (ii) 紫膜中の bR 二次元結晶化における分子間相互作用のバランス

脂質膜のゲル - 液晶相転移温度と bR 二次元結晶融解温度との相関 [関連論文 1] は、脂質の炭化水素鎖に起因する相分離がもたらす bR 間の引力的効果によって再構成 bR の二次元結晶化が起こることを強く示唆している。脂質二重層の相転移およびゲル相（脂質分子の炭化水素鎖が非常に強くパッキングしている状態）では、炭化水素鎖間の van der Waals 引力によって脂質以外の分子が排斥されて自己会合することはよく知られている [56-59]。しかし Sternberg らは Halobacteria 特有の膜脂質を完全に除去することで人工脂質再構成膜中で bR の二次元結晶形成が観察されなくなることを報告している [27]。このように本研究との間に差異がある原因として、Sternberg らに報告された実験では溶媒に含まれる塩濃度が低いという点が挙げられる。本研究との違いの原因は静電遮蔽効果の違いにあると言える。実際、Sternberg らは他に、Halobacteria 特有の脂質を含んだ再構成 bR が溶媒塩濃度 4 M の条件下で、二次元結晶を形成することも報告している [28]。図 4-4 に示したように、溶媒塩濃度が低いとき、再構成膜がゲル相での二次元結晶形成の度合いも小さい。私たちは二次元結晶形成の系統的な変化を調べており、そのため静電遮蔽効果の影響のみを議論することができる。従って、低塩濃度条件下での実験により得られた結果だけから、弱い二次元結晶形成の原因が脂質の種類によるものであると結論づけるのは正確性に欠く [27, 28]。

本研究での結果は NaCl 濃度（つまり電解質イオン濃度）の変化が bR の二次元結晶化に強く影響することを示した。膜中での bR 二次元結晶形成の度合いを示す可視領域 CD スペクトルの二極型は、脂質膜のゲル液晶相転移温度以下で、NaCl 濃度上昇に伴い明らかに顕著になった。CD スペクトルの二極性の度合いと Debye 定数の間の非常に強い線形の相関は、中性リン脂質膜に bR 分子を再構成した系

において静電相互作用が非常に重要な役割を果たしていることを意味している。さらに、bR の二次元結晶化の度合いは静電遮蔽効果によって増幅されたことから、DMPC 再構成膜中で bR 間にはたらく静電相互作用は斥力である。この静電斥力と脂質の相分離に起因する引力とのバランスによって、bR 二次元結晶形成における溶媒 NaCl 濃度依存性を説明できる。

最後に、紫膜中 bR における二次元結晶の強い安定性について考察する。本研究では再構成脂質に中性リン脂質である DMPC を用いているが、実際に紫膜に特異的に発現している Halobacteria 特有の脂質は極性頭部が負に帯電した負電荷脂質がほとんどである。このことから、bR 分子中の正電荷アミノ酸が Halobacteria 脂質の負電荷頭部と塩橋を形成している可能性がある。紫膜における bR のアミノ酸の位置を図 4-8A に模式的に示した。この模式図は Mitsuoka らの報告したモデル [67] および Swiss-Prot に記載されたアミノ酸配列 (P02945 BACR_HALSA) をもとに作成した。また、図中の灰色部分は膜の疎水性領域と水の界面領域を表し、この領域は Mitsuoka らのモデルに描かれている Halobacteria 脂質の極性頭部の位置をもとに、内外に三残基ずつ増やすことで決定した。図 4-8A から、特に bR 分子の細胞質側界面に荷電アミノ酸が多く存在することがわかった。さらに電荷分布には偏りがあり、細胞質領域に負電荷脂質が多く、細胞質側界面に正電荷脂質が多いということもわかった。この細胞質側界面およびループ領域における荷電残基の数は、今回用いた Mitsuoka らのモデルとは異なる構造モデルを用いてもほぼ同じであった [68]。従って、細胞質側の界面領域に存在する正電荷アミノ酸が脂質の負電荷頭部のカウンターパートの役割を果たしていると考えられる。実際に bR の立体構造解析により正電荷アミノ酸残基と脂質との特異的な結合が観察されたとの報告もいくつかある [69, 70]。Grigorieff らは脂質分子の役割を調べた電子線回折の結果から、二次元結晶中の bR 三量体の配向および三量体間距離が長距離静電相互作用の影響を強く受けることを示唆している [71]。図 4-8B に、図 4-8A で決定した bR の細胞質側界面領域の分子構造を示す (PDB ID: 1MOL) [72]。細胞質側界面領域に正電荷アミノ酸残基が集中していることは、この図からも明らかである。DMPC 分子の正味の電荷は中性なので、脂質二重層

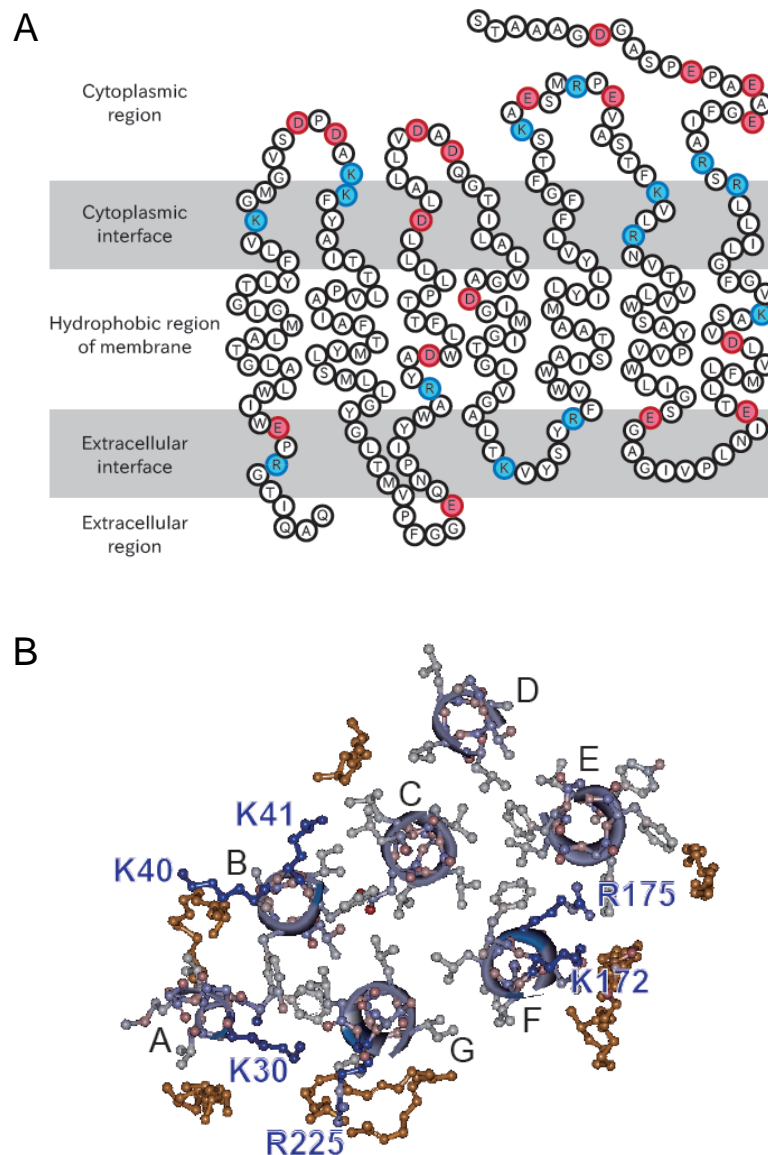


図 4-8：bRの電荷分布と細胞質側界面における荷電側鎖の配置

(A) bRのアミノ酸が膜にどのように配置しているかを、立体構造情報をもとに配置した。各アミノ酸を一文字表記で示しており、青色は塩基性（正電荷）残基、赤色は酸性（負電荷）残基を表す。

(B) bRのX線結晶構造（PDB ID；1M0L）をもとに、細胞質側から見た（A）の「Cytoplasmic interface」領域におけるアミノ酸残基、側鎖、および脂質分子を描画した。青色は塩基性（正電荷）残基を、また黄色は脂質分子を表す。

の物性は溶媒塩濃度とはほぼ独立であり [44, 73, 74]、溶媒中の塩が再構成膜におよぼす影響はここでは無視できる。従って今回得られた結果から、bR の正電荷アミノ酸残基間にはたらく静電斥力によって二次元結晶形成が阻害されたと結論づけられる。さらに紫膜 bR については、負電荷頭部を持つ Halobacteria 脂質が

bR の細胞質側界面に存在する正電荷アミノ酸残基と相互作用していると考察される。従って、紫膜 bR の二次元結晶の高い安定性は静電相互作用による引力によって説明できる。

上記のことを踏まえて、再構成膜中での bR 二次元結晶形成のモデルを検討した。まず、溶媒塩濃度を高くすることで二次元結晶融解点が上昇したことから、静電遮蔽によってゲル相での自由エネルギーが低下したと考えられる。脂質がゲル相の際の再構成膜の自由エネルギーは、

$$N_{AA} \mu_{AA} + N_{BB} \mu_{BB} \quad (A; bR \quad B; \text{脂質})$$

N_{AA} ; 分離した結晶に含まれる bR 分子の数 μ_{AA} ; 結晶中の bR のポテンシャルエネルギー

N_{BB} ; 脂質相に含まれる脂質分子の数 μ_{BB} ; 脂質相中の脂質分子のポテンシャルエネルギー

と表せる。また、二次元結晶が融解しているとき、

$$N_{AA} \mu_{AA} + N_{BB} \mu_{BB} > N_{AB} \mu_{AB}$$

N_{AB} ; bR および脂質の全分子数 μ_{AB} ; 相溶状態のポテンシャルエネルギー

が成立する。bR 間にはたらく静電相互作用は斥力であるため、静電遮蔽によって μ_{AA} は小さくなり、二次元結晶融解が起こりにくくなったと考えられる。次に二次元結晶形成とデバイ定数の関係について図 4-9 のようなモデルを考えた。N 個の負電荷を持つ直径 d の会合体を考える。ここで d は 2 つの会合体が近付くことのできる最小距離でもある。2 つの会合体が接触する際のポテンシャルエネルギーは以下のように書ける。

$$U = \frac{N^2 e^2}{\epsilon d} \frac{1}{1 + \kappa d}$$

静電遮蔽の効果は κ で表され、N は $\Delta[\theta]$ と正の相関を持つと考えられる。2 つの

会合体が接触した際の距離 d はほぼ一定であるとする、会合体間にはたらく斥力のポテンシャルエネルギーは N と κ の関数であると近似できる。 $(d$ が十分大きければ斥力は無視できる。) 今回得られた結果はこのモデルでよく説明できる。なお、ここではほぼ同じ N を持つ会合体同士の斥力を考えたが、大きな会合体に小さな粒子が接触する場合 ($N_1 \gg N_2$) では図 4-9 における斥力ポテンシャルエネルギーの N^2 が N^1 となり、影響の大きさは変わるが κ に対する傾向はほぼ変わらないため、どちらのモデルがより妥当かについては、本研究の結果からは決定することができない。

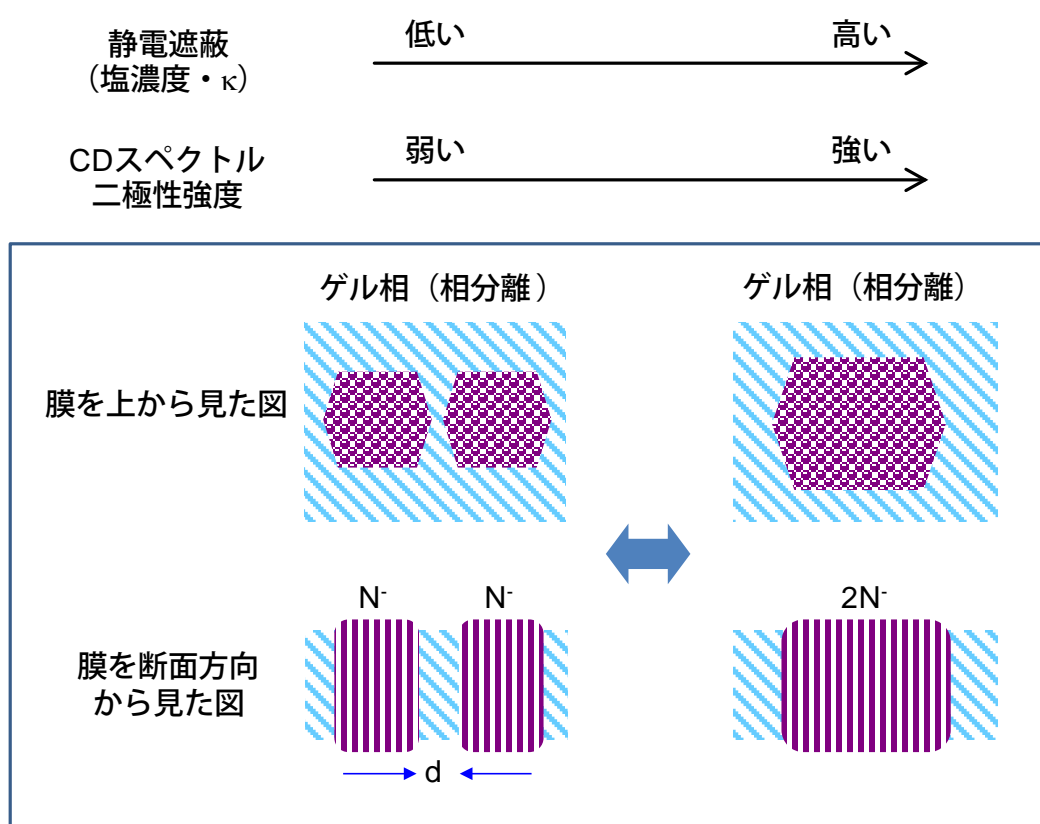


図 4-9：二次元結晶形成とデバイ定数の関係のモデル

本研究の結果から静電遮蔽効果によって二次元結晶形成が促進されることがわかった。この結果から bR の二次元結晶形成に関するモデルを考察した。

- ・塩濃度 (κ) が上がるとポテンシャルエネルギーが下がる $\rightarrow N$ が大きくなる。
- ・ N が大きくなるとポテンシャルエネルギーが上がる \rightarrow 会合体同士が接近できなくなる。
 \rightarrow 二次元結晶の大きさには限界がある。

再構成膜がゲル相であっても、静電遮蔽によってその bR の二次元結晶の度合いが変化することから、二次元結晶形成は膜中の bR 会合体間のポテンシャルエネルギー（イオン半径）に依存すると考察される。

4.4 第 4 章の総論

本章では溶媒中の塩化ナトリウム濃度を変化させ、DMPC 再構成膜における bR 二次元結晶形成への静電遮蔽の影響を調べた。DMPC 膜がゲル相のときに形成される bR の二次元結晶形成は可視領域の円二色性測定 (560 nm 付近) の二極性パターンによって評価できる。本研究結果において、二極性パターンの振幅は塩化ナトリウム濃度の増加に伴い系統的に増幅された。この可視 CD スペクトル振幅の増加と Debye 定数の強い相関から、静電遮蔽によって静電斥力が弱まることで DMPC 再構成 bR の二次元結晶の度合いが抑制されることが示された。bR のアミノ酸配列と立体構造に基づき、私たちは DMPC 再構成膜中では脂質相分離に起因する引力と bR 分子間の静電斥力との相互作用バランスによって二次元結晶を形成しているというモデルを提案した。また、分子間の静電相互作用に着目した実験を行い、中性脂質膜中では bR 分子間にはたらく静電相互作用は斥力支配的で、紫膜中では負に帯電した脂質を介して静電的に中和し bR の自己会合に寄与している可能性を示した。

第 5 章

DMPC 膜に再構成したバクテリオロドプシンの二次元結晶融解条件下での不均一な構造安定性

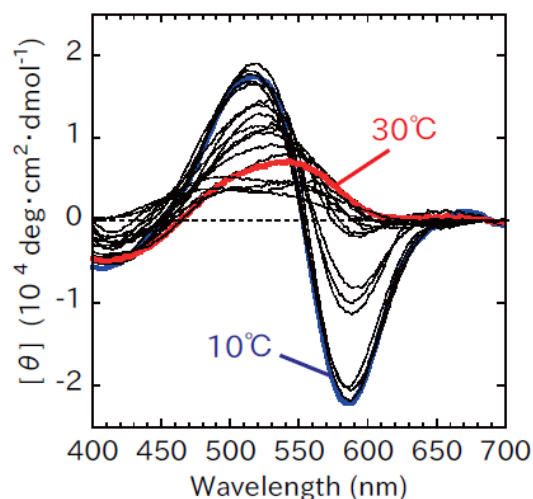
5.1 背景

[1.4 第 5 章への問題提起] で述べたように、二次元結晶融解条件下でも bR はプロトンポンプ活性を持つ [50] が、その活性効率は紫膜 bR の半分以下になっている [51] ことが知られている。では二次元結晶形成は bR の光照射下の構造安定性に、どのような効果を与えているのだろうか？第 3 章の結果として二次元結晶が融解することで bR の光退色現象が誘発されたことから、bR-bR 間相互作用による構造安定化が示唆された。光退色現象について詳しく調べると、紫膜中の bR (pH 7.0) では速度定数の異なる 2 つの退色成分を持つ [52] が、可溶化 bR (pH 7.0) [32, 33]、アルカリ条件下の bR (pH 10.0 以上) [40, 41] では 1 成分で起こることが報告されており、これらの結果から光退色現象における 2 種類の速度定数と bR-bR 間相互作用との関連が示唆されている。しかし二次元結晶融解条件下で、どのような bR-bR 間相互作用の効果があるのだろうか？一般に bR は二次元結晶融解条件下では均一に分散していると考えられているが、それが正しいとすると、光照射下での不均一な bR 構造安定性を説明するのは難しい。そこで第 5 章では DMPC 再構成 bR の二次元結晶融解条件下での光退色の反応速度論解析を行い、構造安定性の側面から bR-bR 間相互作用について考察した。

5.2 結果

まず最初に本章で用いた DMPC 再構成 bR の二次元結晶融解温度を調べるために、200 から 700 nm で CD スペクトル測定を行った (図 5-1A)。

A DMPC再構成bRの可視領域CDスペクトル
(10-70℃・100 mM リン酸バッファー・NaClなし)



B 二次元結晶の融解 (CD at 580 nm)

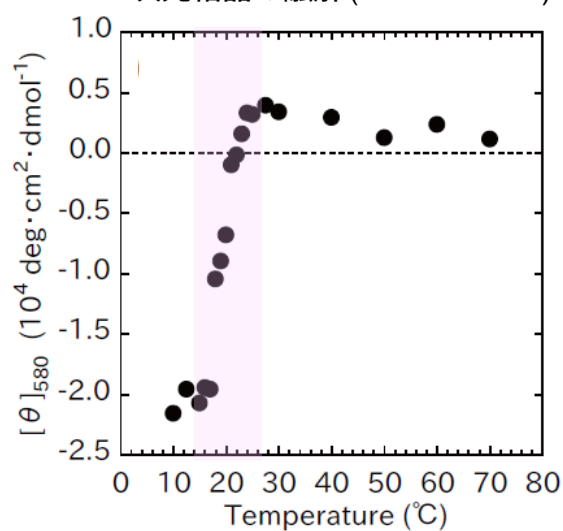


図 5-1：DMPC再構成bRの二次元結晶融解

(A) DMPCのゲル-液晶相転移温度を含む10-70℃の温度領域で測定したDMPC再構成bRのCDスペクトル (暗中)。

(B) 580 nmにおけるモル楕円率の温度変化。この図から、DMPCの主転移温度付近 (15-27.5℃) の温度領域で二次元結晶が融解したことがわかる。

第 3 章の結果と同様、10°C での CD スペクトルは 560 nm を中心とした顕著な二極型を示したが、DMPC の相転移温度付近から温度上昇に伴いその二極型は消失した。二次元結晶の融解曲線を作成するために可視 CD スペクトル二極型における負の極大である 580 nm でのモル橢円率を温度（10-70°C）に対してプロットしたのが図 5-1B である。この結果から本研究に用いた DMPC 再構成 bR サンプルの二次元結晶融解は 15-27°C 以上で起こることがわかった。しかし注目すべき点は、30°C から 60°C という暗中での熱退色がほとんど観察されない温度領域において、580 nm でのモル橢円率が少しずつ現象しているように見える点である。この 30°C 以上での変化については後に議論する。

次に熱退色および光退色における bR の熱安定性を調べるため、私たちは暗中および光照射下での 1 時間における退色の温度依存性（10~70°C）を調べた。bR の吸収スペクトルにおいて、Lambert-Beer の法則より（[第 2 章] 参照） Abs_{560} は bR の濃度と吸光係数の積である。従って、退色実験後（図 2-3A、スペクトル c）の Abs_{560} を実験前のスペクトル（図 2-3A、スペクトル a）の Abs_{560} で規格化することで、実験によって退色しなかった bR の割合が得られる。これを可逆性と定義する（[2.2.3 紫外・可視吸収測定による bR の構造安定性評価] 参照）。DMPC/bR 比 = 150 で再構成した bR を 100 mM リン酸バッファ（NaCl を含まない）に懸濁したサンプルの熱退色および光退色の結果（吸収スペクトル）を図 5-2A に示す。この図は光照射下の bR は暗中の bR よりも退色しやすいことを意味しているため、光サイクルの励起状態にある bR の構造安定性が基底状態の bR よりも低いことがわかった。図 5-2B に、異なる DMPC/bR 比（150 および 285）で作成した再構成 bR の熱退色・光退色挙動を示した（100 mM リン酸バッファ・pH 7.0）。熱退色実験（暗中）では、DMPC 再構成 bR は 60°C 以下では不可逆な退色を起こさず（安定）、一方光退色実験（可視光照射下）では 30°C 以上で不可逆な退色が起こった。つまり、DMPC 再構成 bR では 30~60°C という広い温度領域において光退色現象が観察された。また再構成膜中の脂質/タンパク質は暗中・光照射下に関わらず、bR の構造安定性にほとんど影響しなかったことから、bR の熱退色・光退色開始温度は bR と DMPC 脂質二重層の性質によって決まるこ

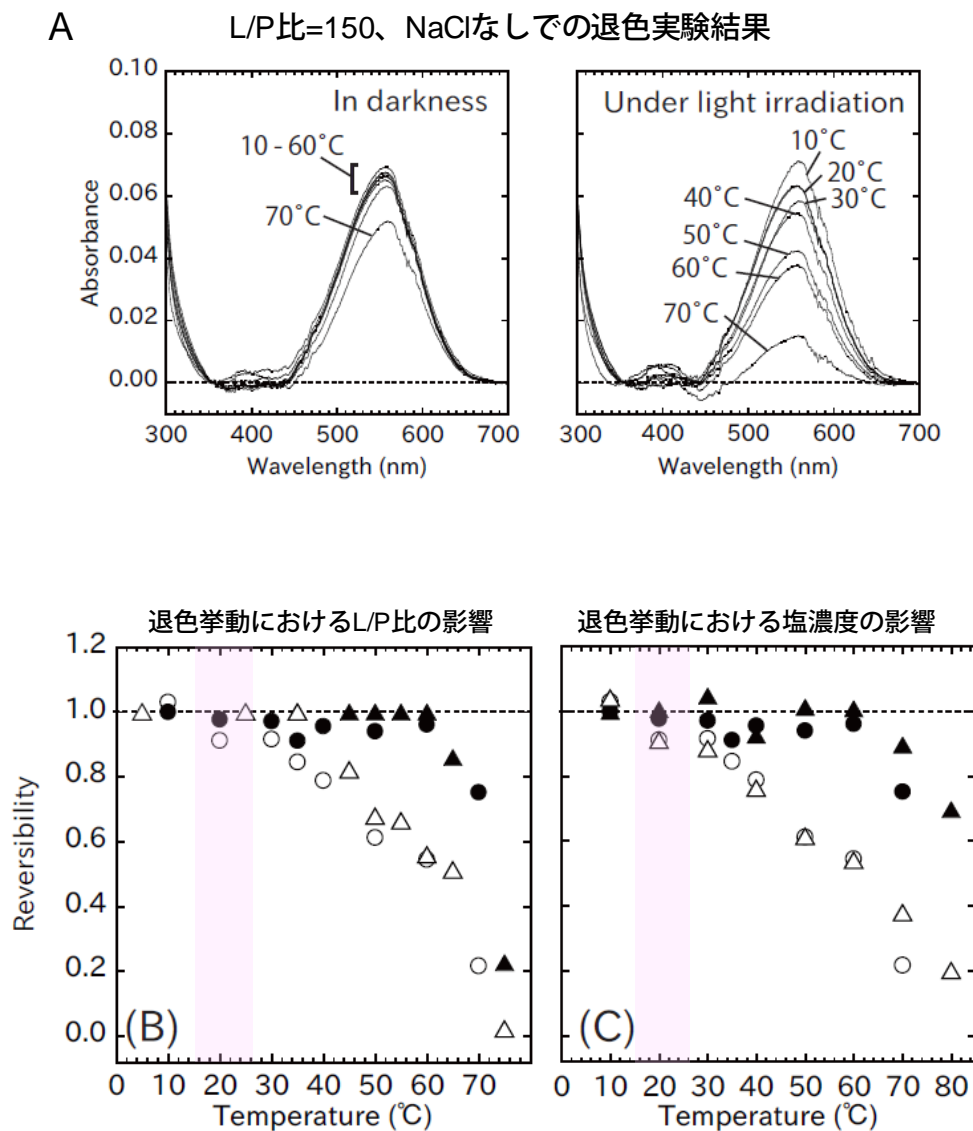


図5-2：DMPC再構成bRの暗中・光照射下で行った退色実験結果

(A) L/P比=150、NaClを含まないバッファー中のDMPC再構成bRの退色実験より得られた吸収スペクトル変化を示す（インキュベーション時間60分、急冷・暗中インキュベーションの後10°C・暗中にて再測定）。

(B) 熱安定性におけるDMPC/bR比の影響を調べた。図中ピンク色の帯は図5-1より得られた二次元結晶融解温度領域。（●；L/P=150・暗中、○；L/P=150・光照射下、▲；L/P=285・暗中、△；L/P=285・光照射下）

(C) 熱安定性における塩濃度の影響を調べた。図中ピンク色の帯は図5-1より得られた二次元結晶融解温度領域。（●；NaClなし・暗中、○；NaClなし・光照射下、▲；NaCl 1.0 M・暗中、△；NaCl 1.0 M・光照射下）

とがわかった。同様の方法で、バッファー中の塩濃度（NaCl なし、NaCl 1.0 M）の影響を調べた（DMPC/bR 比 = 150、100 mM リン酸バッファー・pH 7.0）結果を図 5-2C に示す。ゲル相の再構成膜中における bR の二次元結晶形成におけるバッファー塩濃度の影響について第 4 章に記述した [関連論文 2] が、これとは対称的に熱退色および光退色挙動への高塩濃度の影響は確認されなかった。

次に、インキュベーション時間を変えた際の可逆性（Reversibility）の変化（5 分～16 時間）を各温度で調べ、不可逆な退色の速度解析を行った。一例として 30°C・光照射下における相対的 Abs₅₆₀ のインキュベーション時間依存性を図 5-3 に示す。

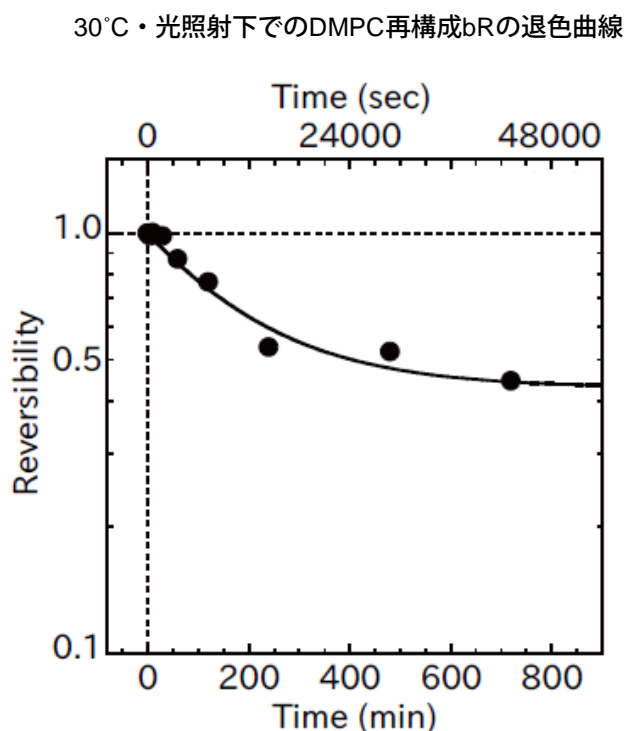


図 5-3：DMPC再構成bRの退色曲線（30°C・光照射下）

インキュベーション時間を変えて光退色実験を行い、各実験より得られた可逆性の値をインキュベーション時間に対してプロットした（5分-16時間）。X軸はインキュベーション時間（上軸：秒、下軸：分）、Y軸は可逆性を対数で表示した。

得られた退色曲線は最小二乗法（本文参照）によりフィッティングし、反応速度論解析を行った。

退色曲線は最小二乗法を用いて double-exponential での減衰としてフィッティングした。フィッティング式は以下の通り。

$$Reversibility = a_1 \times e^{(-k_1 t)} + a_2 \times e^{(-k_2 t)}$$

このとき、 a_1 、 a_2 は各退色成分の割合を意味し、 k_1 、 k_2 は各退色成分の退色速度定数を意味する。退色曲線が single-exponential で表される場合、その反応は $A \rightarrow B$ という二状態間の遷移反応であることを意味し、一方 double-exponential で表される場合はいくつかの反応（退色）経路が考えられる。紫膜 bR の光退色現象は double-exponential での退色であることが Yokoyama らによって既に示されている [22, 23] が、図 5-3 に示したように DMPC 再構成 bR の光退色の時間変化（退色曲線）も double-exponential の関数で表すことができた。今回得られた DMPC 再構成 bR の退色速度論解析の詳細は後述（[5.3 考察] 参照）する。

異なるインキュベーション時間で測定した DMPC 再構成 bR の可逆性から各温度、暗中・光照射下での退色曲線を作成した（図 5-4）。また、この速度論解析から得られた各パラメータを表 5-1 に示す。この退色速度論解析で用いた全てのデータポイントは各条件における DMPC 再構成 bR の可逆性（完全に基底状態に戻った際の Abs_{560} の値から算出した、退色（変性）していない bR の割合）を意味するため、光照射や高温インキュベーションに起因する遷移状態の影響は無視できる。また、速度論解析に用いたデータ数は多くないが、各データポイントはすべて独立の測定によって得られることから、各データポイントの信頼性は十分高い。本研究では 16 時間という長時間の実験を行っているため、表 5-1 に示したように 60°C 以下・暗中でもゆっくりとした single-exponential の退色が観察されており、また 70°C 以上では暗中でも速い退色成分が観察されることがわかった。Double-exponential decay で起こる退色現象は膜中の bR 特有の現象 [40, 41] であり、非イオン性界面活性剤であるオクチルグルコシド、Triton X-100 に可溶化した bR の光退色は single-exponential の減衰で起こることが既に報告されている [32, 33]。

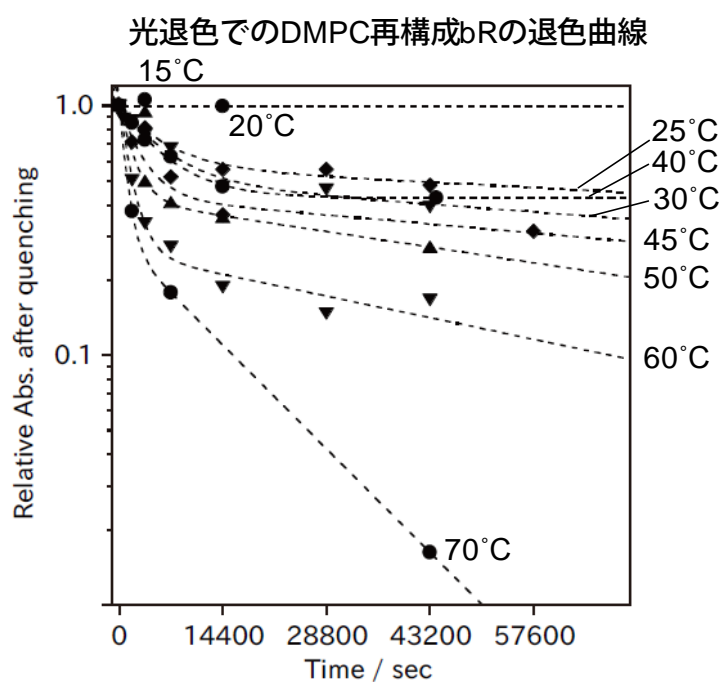
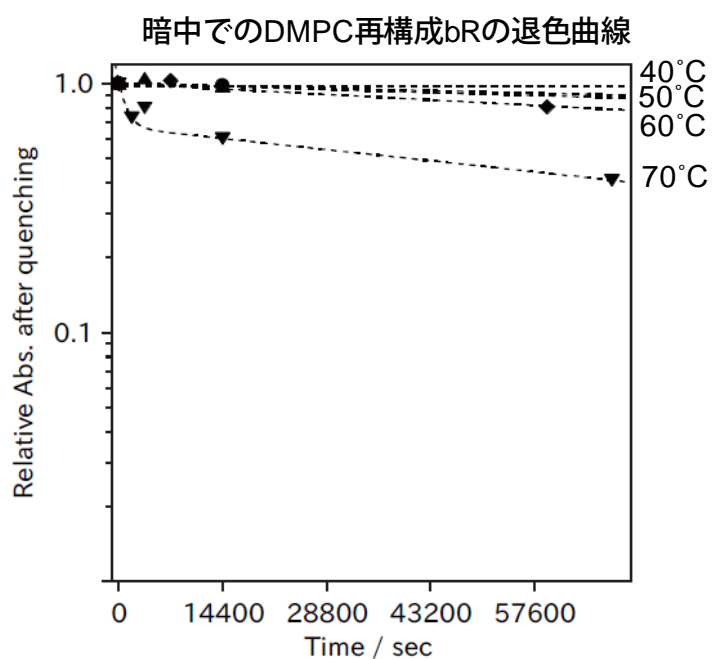


図 5-4：各温度（暗中・光照射下）の退色曲線

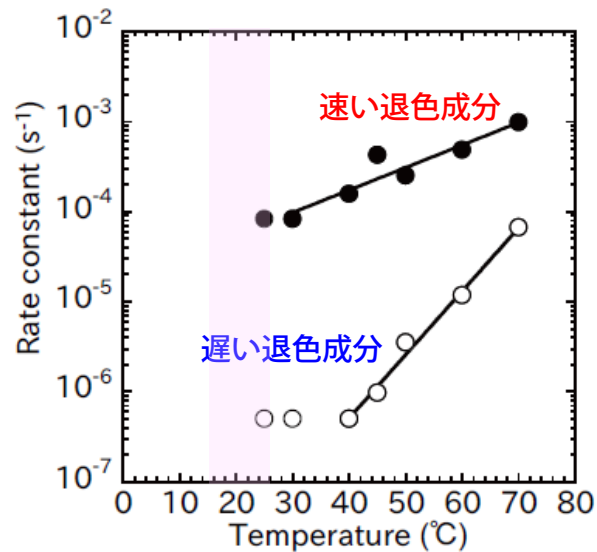
DMPC再構成bRの退色速度論解析を暗中・光照射下、15-20°Cで行った。各条件での退色曲線を図に示す（上図；暗中・各温度、下図；光照射下・各温度）。

表5-1：暗中および光照射下での退色実験から得られた減衰曲線の解析結果

Temperature (°C)	a ₁	k ₁ (s ⁻¹)	a ₂	k ₂ (s ⁻¹)
Photobleaching				
25	0.406	8.23×10 ⁻⁵	0.594	5.00×10 ⁻⁷
30	0.567	8.30×10 ⁻⁵	0.433	5.00×10 ⁻⁷
40	0.561	1.57×10 ⁻⁴	0.439	5.00×10 ⁻⁷
45	0.533	4.27×10 ⁻⁴	0.467	9.70×10 ⁻⁷
50	0.618	2.51×10 ⁻⁴	0.381	3.51×10 ⁻⁶
60	0.727	4.84×10 ⁻⁴	0.273	1.18×10 ⁻⁵
70	0.714	9.75×10 ⁻⁴	0.286	6.65×10 ⁻⁵
Thermal bleaching				
50			1	1.90×10 ⁻⁶
60			1	3.48×10 ⁻⁶
70	0.333	8.56×10 ⁻⁴	0.667	7.12×10 ⁻⁶

暗中および光照射下での退色速度論解析により得られた DMPC 再構成 bR の光退色の 2 つの速度定数の温度依存性を図 5-5A に、熱退色および光退色の速い速度成分の割合を図 5-5B に示す。いずれもピンク色領域は図 5-1 より得られた bR 二次元結晶融解の温度領域を表す。表 5-1 および図 5-5A からわかるように、DMPC 再構成 bR の光退色における速い退色成分の速度は遅い退色成分の速度に比べて約 2 桁以上速かった。一方、速い退色成分の割合は 30°C での 0.5 から 60°C で 0.7 へ段階的に増加しており、2 つの速度成分の割合が温度依存的に変化していることがわかった。先述の通り、この温度領域では bR の二次元結晶が融解していることは既に確認した（図 5-1 および図 5-5・ピンク色領域）。これらの結果から DMPC 再構成 bR の光退色現象は、二次元結晶が完全に融解しているにも関わらず、2 成分の退色成分からなることがわかった。膜中で bR の二次元結晶が融解していることから、bR 分子の存在する環境が基本的に均一であると考えられる。従って、本研究結果で確認された二次元結晶融解条件下での「2 種類の退色成分」は、構造安定性の異なる 2 種類の bR が混在することを強く示唆している。

A DMPC再構成bRの退色成分の速度定数



B DMPC再構成bRの速い退色成分の割合

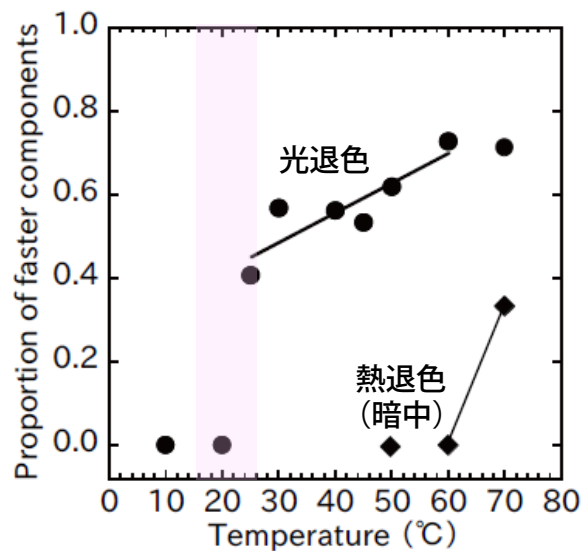


図 5-5：DMPC再構成bRの退色速度論解析より得られたパラメータ

(A) 光退色における速い退色成分および遅い退色成分の速度定数を温度に対してプロットした。

(B) 暗中・光照射下で調べた退色曲線より得られた、速い退色成分の割合を温度に対してプロットした。

DMPC再構成bRの光退色でも、紫膜と同様、明らかに二成分での退色が起こることがわかった。また、速い退色成分の速度定数上昇と割合が増加する温度領域がほぼ一致した。

この bR の構造安定性における不均一性の原因を調べるために、高温・光照射下での bR の構造変化に着目した。

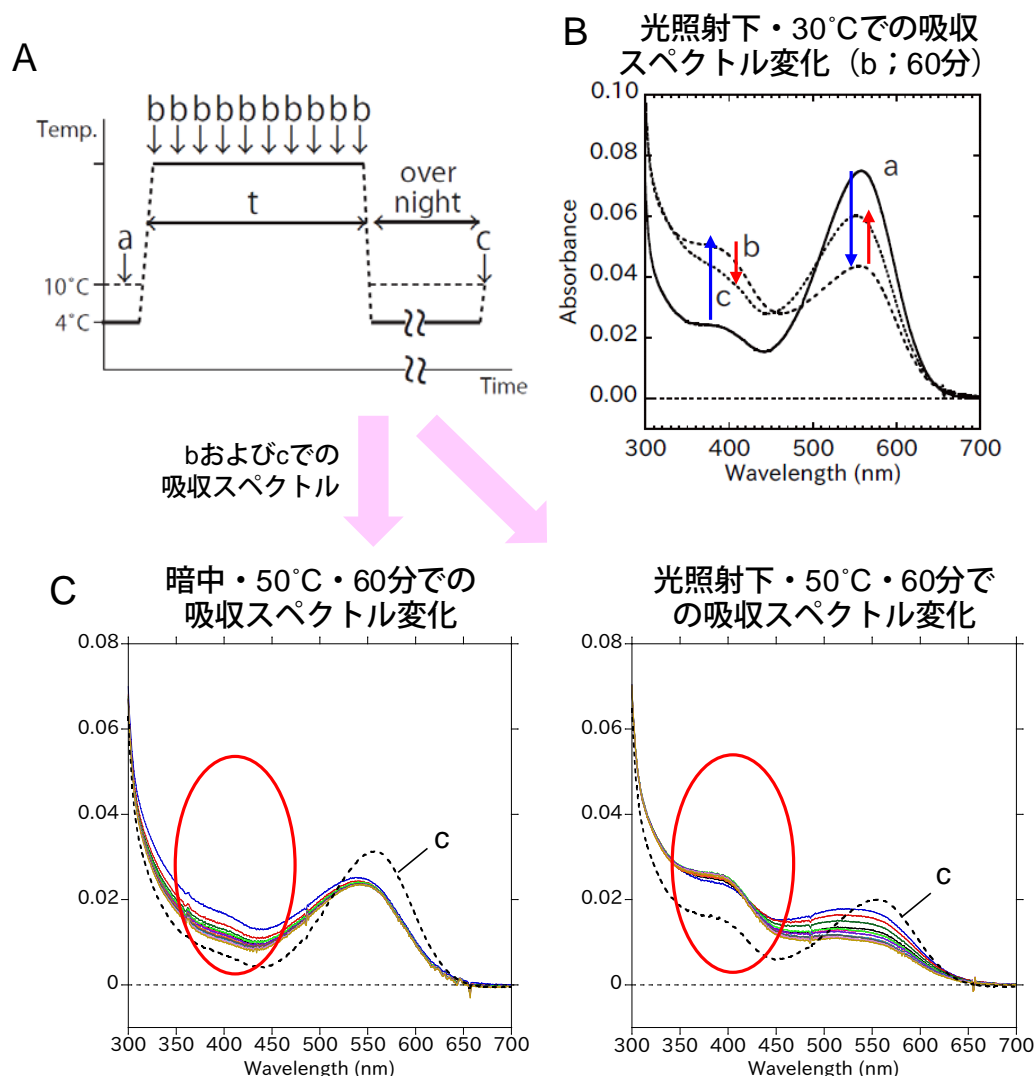


図 5-6：DMPC再構成bRの光退色実験における吸収スペクトル変化

(A) 吸収スペクトルの測定方法。「暗中」では測定中・インキュベーション中に関わらず常にサンプルを暗中におき、「光照射下」では高温インキュベーション中の時間tの間(図中b)のみサンプルを光照射下におく(〔2.2.3 紫外・可視吸収測定によるbRの構造安定性評価〕参照)。

(B) 光退色実験時のスペクトル変化を示す。aは実験前のスペクトル(10°C・暗中)、bは光を連続照射1時間後に測定したスペクトル(30°C・光照射)、cは光照射中止と同時に急冷したサンプルを暗順応に戻した後に測定したスペクトル(10°C・暗中)。560 nmの吸収が光照射により減少し、これに対応して400 nm付近の吸収が増大することから、光照射によって、基底状態とは異なる状態が蓄積していることがわかる。しかしこの400 nmの吸収は、bRを暗順応状態に戻すことで消失し、基底状態(560 nm)に戻った。

(C) 暗中(左図)・光照射下(右図)における50°C・60分での吸収スペクトル変化。カラーのスペクトルは図(A)におけるb点で測定したもの、点線のスペクトルは図(A)のc点で測定したスペクトルである。400 nm付近のピークの出現は光照射下で特異的に観察された。

図 5-6A および B に示すように、bR の暗中・光照射下での退色を評価する指標である「可逆性」は、図 5-6B におけるスペクトル a とスペクトル c の Abs_{560} から算出した。これは 10°C・暗順応状態で比較することで、bR の状態変化によって Abs_{560} が減少する影響を排除するためである。実際に、図 5-6B のスペクトル b からわかるように、高温インキュベーション中には bR の状態変化によって Abs_{560} が減少し 400 nm 付近に吸収極大が現れた。この 400 nm に吸収を持つ bR への変化は可逆で、暗中・4°C インキュベーションによって 560 nm に戻った(図 5-6、スペクトル c)。この結果から、高温インキュベーションに対して比較的安定な bR の存在が示された。ここで、私たちはこの 400 nm に吸収極大を持つ化学種を(光サイクルの中間体 M が 410 nm に吸収極大を持つことから [34-36])「M-like 中間体」と呼ぶことにする。図 5-6C に暗中・光照射下での、50°C・60 分での吸収スペクトル変化 (b) と 10°C・暗順応で再測定したスペクトル (c) を示す。図中の赤色囲み領域からわかるように、この M-like 中間体は光照射下でのみ確認できた。

そこで光照射下での 560 nm および 400 nm における吸収変化を調べた。特に本研究では、遊離したレチナールに起因する 370 nm の吸収増加の影響を排除するために、400 nm の吸収の出現・消失を図 5-6 におけるスペクトル b とスペクトル c を比較を行うこととした。光照射・高温インキュベーション中から 10°C・暗順応状態に戻した際の 560 nm および 400 nm の吸収変化 (スペクトル c - b) を図 5-7 に示す。吸収スペクトル測定では、一般的に短波長ほど光散乱による誤差の影響が大きくなるが、再構成膜の分光測定では波長依存性だけでなく、高温でも光散乱が大きくなる。このため、 Abs_{400} については(特に高温で) S/N 比が低くなり、その結果、図 5-7 の 30°C 以上に見られるように高温でのデータはばらつきが大きくなる。400 nm での吸収変化に対して、一方、560 nm では全ての測定条件において散乱の影響が十分小さいため、信頼性の高いデータを得ることができた。DMPC 二重層がゲル相であり、なおかつ bR が二次元結晶を形成している 20°C 以下では光退色は起こらないことがわかっているが [関連論文 1]、この温度領域での Abs_{560} の変化は比較的大きかった (0.035~0.030)。そして DMPC

二重層の相転移温度付近では、 Abs_{560} は 0.015 付近まで回復しており、20℃ 以下の場合に比べて約半分にまで減少した。一方、光退色現象の起こる 30℃～60℃ の温度領域では Abs_{560} の変化値はほぼ一定であった。図 5-7 において特に興味深いのは、 Abs_{560} と Abs_{400} の変化の温度依存性が対称的な点であり、M-like 中間体の出現と 10℃・暗順応による bR 基底状態への回復度合いがカップルしていることがわかった。M-like 中間体は光照射・高温条件で一時的に蓄積するが、不可逆な退色に対しては比較的安定で 10℃・暗順応に戻すことで bR 基底状態 (Abs_{560}) に戻ったと考えられる。今回示された比較的安定な M-like 中間体の存在から、光退色の際に見られる構造安定性の異なる二種類の bR は、速い退色速度定数を持つすぐに退色する bR と、遅い退色速度定数を持つ M-like 中間体を経由して退色する bR の二種類に起因する可能性が示唆された。

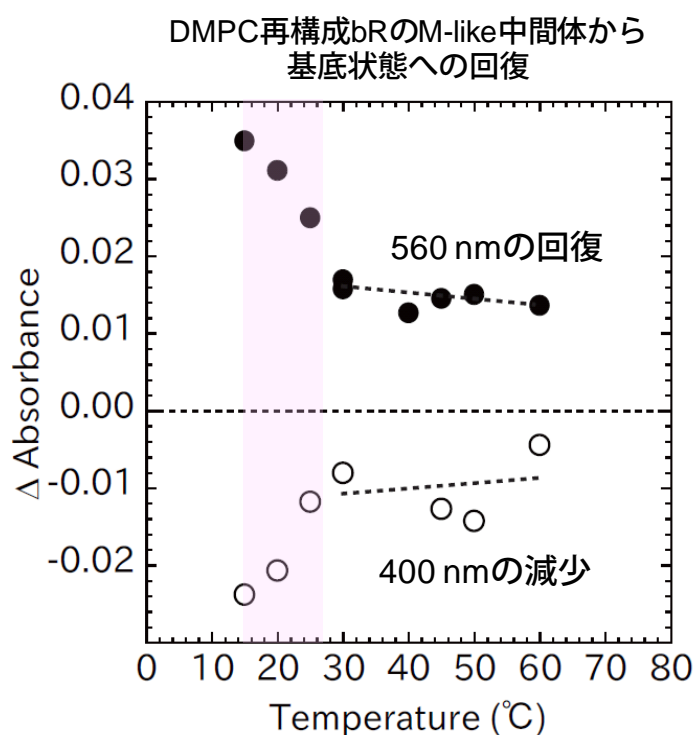


図 5-7：DMPC再構成bRのM-like中間体から基底状態への回復の温度依存性
光照射下から暗順応へ戻した際の Abs_{560} と Abs_{400} の変化を示した。 Abs_{560} と Abs_{400} の変化の温度に対する挙動は対照的であることから、 Abs_{560} の回復と Abs_{400} の減少はカップルしていることがわかる。

図 5-6C に示したように、暗中には光照射下のような顕著な吸収ピークの出現は観察されないが、高温インキュベーションによって明らかにスペクトルが変化した。そこで DMPC 再構成 bR の暗・各温度における吸収スペクトル変化の温度依存性を調べた（図 5-8A）。

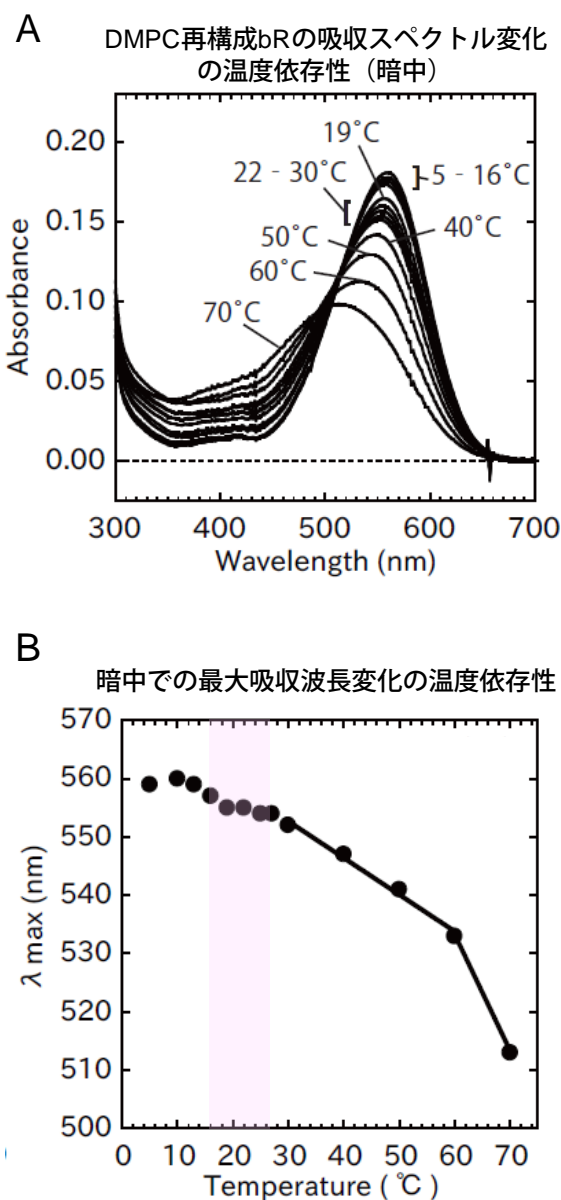


図 5-8：DMPC再構成bRの暗・温度ジャンプ後5分における吸収スペクトル変化

(A) 暗・各温度・温度ジャンプ後5分で測定したDMPC再構成bRの吸収スペクトルを示す。温度ジャンプから5分経過することでセル内の温度が一定になるため、この条件では熱変性の影響を最小に抑えて構造変化を評価できると考えられる。

(B) 各スペクトルから得られた最大吸収波長変化の温度依存性。10°Cでは560 nmにあった吸収極大が、温度上昇に伴い短波長側にシフトしていることがわかった。図5-2より暗・60°C以下ではDMPC再構成bRは退色しないことがわかっており、60°C以下で観察された吸収波長変化はbRが基底状態以外の状態が出現していることを意味する。

図 5-8A には暗中・温度ジャンプ後 5 分 (サンプル温度が均一になるための時間) で測定した吸収スペクトルを示した。温度上昇に伴い、 Abs_{560} の減少と、これに伴う極大の短波長シフトが観察された。先述の DMPC 再構成 bR の暗中における可逆性評価 (図 5-2) および退色速度論解析 (表 5-1) により、本実験で用いた DMPC 再構成 bR は暗中では 60°C 以下では不可逆な退色を起こさないことが既に確認されている。従って、60°C 以下の温度領域で観察される吸収変化は遊離レチナールには起因しない。このことから、DMPC 再構成 bR は高温条件下では暗中であるにも関わらず基底状態とは異なる構造をとっていることがわかった。さらに、各スペクトルがブロード化していることから、構造の異なるいくつかの bR が混在している可能性も示唆された。そこでこの吸収スペクトル変化の温度依存性を調べるために、図 5-8A の各吸収スペクトルの極大吸収波長 (λ_{max}) を温度に対してプロットした (図 5-8B)。DMPC 再構成 bR が二次元結晶を形成している 10°C 付近での λ_{max} は 560 nm で、これは紫膜中の bR の暗順応状態とよく一致した。二次元結晶の融解温度領域である 15°C から 20°C にかけて λ_{max} は少しずつ短波長シフトし、27°C では 555 nm であった。そして 27°C から 60°C にかけて、 λ_{max} は 554 nm から 533 nm まで短波長シフトした。

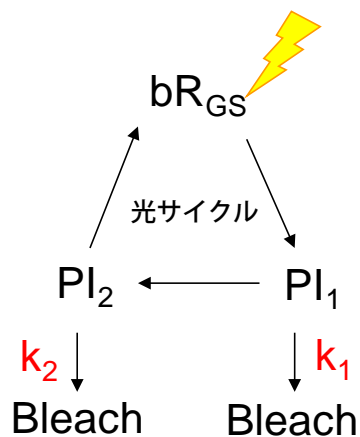
5.3 考察

本研究では DMPC 膜に再構成した bR の特性を調べ、二次元結晶が融解している 30°C から 60°C における bR の構造安定性に着目した。30°C から 60°C という温度領域では、DMPC 再構成 bR は暗中では退色せず安定だが、可視光連続照射下では退色してしまう [関連論文 1]。本研究ではこの温度領域において、いくつかの興味深い現象を発見した。

DMPC 再構成 bR の光退色速度論解析の結果、速度定数が約 100 倍以上異なる 2 種類の退色成分が確認された。また 30°C から 60°C の温度領域で、この速い退色成分の割合は温度上昇に伴い 0.5 から 0.7 へ増加した。従って、この 2 種類の bR は潜在的に分類されているのではなく、いずれも基底状態から何らかのプロセスを経て派生した状態であると考えられる。一方、光照射下での吸収スペクトルから M-like 中間体の存在が明らかになった。この M-like 中間体は低温 (4-10°C) ・暗順応状態に戻すことで基底状態の bR に戻ることから、光照射・高温インキュベーションによる退色に対して比較的安定であることがわかった。速い退色成分の割合の増加 (すなわち遅い退色成分の割合の減少) に伴い、M-like 中間体から基底状態へ復元する割合が減少した。このことから、遅い退色成分は M-like 中間体に起因することが示唆された。上記の考察に基づき、本研究では bR の光退色現象における 2 種類の退色成分は、すぐに退色する bR (速い退色速度定数) と、M-like 中間体を経由して退色する bR (遅い退色速度定数) に起因する、というモデルを作成した。

次にこの M-like 中間体について、光退色の速度論解析結果をもとに考察したい。上述のように、すぐ退色する bR も M-like 中間体を経由して退色 bR も、どちらも基底状態から派生する状態であった。また、M-like 中間体は光照射下でのみ出現することから、光反応によって生成される状態であると考えられる。この場合光退色現象が Double-exponential で表されるような反応プロセスには二通りの可能性が考えられる (図 5-9)。

A 安定性の異なる光中間体（光サイクル）に起因する場合



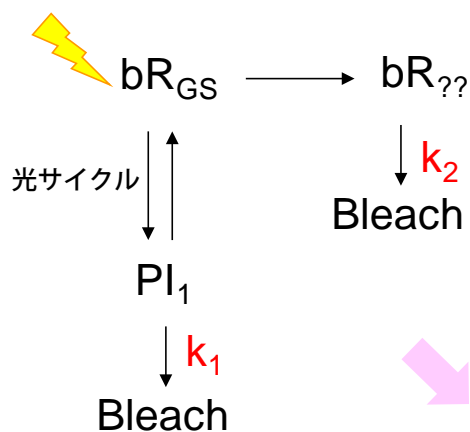
※ $k_1 \gg k_2$ の場合、光退色現象は以下に表される k_3 を持つ single-exponential での減衰として表される。

$$k_3 = R_1 \times k_1 + R_2 \times k_2$$

R は光サイクルにおける素反応の速度定数および k_1 、 k_2 のバランスによって決定する重み。

退色成分は**一成分**になる。

B 光中間体と、光サイクルに属さない状態に起因する場合



退色成分は**二成分**になる。

図5-9：Double-exponentialの減衰で表される光退色現象のモデル

bR_{GS}；基底状態のbR
PI；光サイクルに属する光中間体
bR_{??}；光サイクルに属さない状態
BLEACH；退色したbR
k；速度定数

本研究における光退色の速度論解析から、 k_1 は k_2 より 100 倍速いという結果が得られているため、図 5-9A の「安定性の異なる光中間体に起因する場合」の退色プロセスが正しいとすると、その退色曲線は Single-exponential になる可能性が高く、本研究の結果と矛盾する。従って、DMPC 再構成 bR の光退色現象のモ

デルとして図 5-9B に示した「光中間体と、光サイクルに属さない状態に起因する場合」がより妥当である。光サイクルに参加している bR は速い速度定数 k_1 で不可逆に退色し、光サイクルとは独立の状態である M-like 中間体（図 5-9B 中の「bR₇₇」に対応）は遅い速度定数 k_2 で退色する。二次元結晶融解温度以下でインキュベーション時の温度が低いほど Abs₅₆₀ の減少幅および Abs₄₀₀ の増加幅が大きかった。この結果から、基底状態の bR から M-like 中間体を生成する反応は光照射によって進行し、逆に、M-like 中間体から基底状態の bR へ戻る反応は温度によって進行することが考察される。このモデルは、Abs₄₁₀ の減衰速度が温度上昇に伴って速くなるという Dencher らの結果とも矛盾しない [51]。一方、退色速度定数 k_1 から速く退色する bR の寿命を算出できる。DMPC 再構成 bR の光退色において、速く退色する bR の寿命は 60°C で約 30 分、30°C で 3.5 時間であり、これは bR の光サイクルに含まれるどの素反応よりも遥かに長い [63, 75-77]。従って、サンプルを光照射下から暗中・4°C に移すことで、光サイクルに参加していたすべての bR は瞬時に基底状態へ戻ることができる。Dencher らは pH 5.0 での DMPC 再構成 bR (L/P 比 = 106) の暗順応の速度論解析結果に基づき、30°C では $k = 7.9 \times 10^{-4}$ 、5°C では $k = 9.1 \times 10^{-5}$ であること、さらに温度を下げた場合や酸性にした場合だけでなく、二次元結晶を形成することでも暗順応の速度が遅くなることも示している [51]。Dencher らの報告している結果と本研究の結果は実験条件が異なるため (pH 5.0 と pH7.0、L/P 比 = 106 と 150) 厳密に比較することはできないが、仮に pH が 7.0 から 5.0 に下がることで速度定数が約 1.6 倍になり [51]、L/P 比の影響がほぼ無視できるとする (図 5-2B) と、30°C では遅い退色反応の速度定数が 5.0×10^{-7} (表 1) で暗順応の速度定数は 2.4×10^{-4} と概算できる [51]。同様に、Dencher らのアレニウスプロットを参考に再構成 bR の暗順応の速度定数を 50°C まで概算することができ、その結果、30°C から 50°C までの温度領域では光退色の k_2 よりも暗順応の速度定数の方が 10^3 から 10^4 倍速いことがわかった。従って、サンプルに照射していた可視光を遮断することで、光サイクルに参加していた bR だけでなく、M-like 中間体についても優先的に基底状態へ戻ることができることがわかった。以上の考察から、本研究で提唱したモデル (図 5-9B) は、光退色、光サイクル、暗順応における各速度定数から見て

も矛盾しないことが示された。

上述の通り、M-like 中間体は光サイクルとは独立の状態であり、かつ、基底状態から光反応によって生成し、熱反応によって基底状態に戻る bR であることが示唆された。続いて、この M-like 中間体と二次元結晶の関係について考察する。光退色の速度論解析によって得られる退色曲線が 2 種類の退色成分で表されるのは既に報告されている紫膜中の bR (pH 7.0) [40, 52] と本研究で調べた DMPC 再構成 bR (pH 7.0) である。紫膜 bR の光退色現象では、速い退色成分割合の増加と二次元結晶融解度合いは対応しており、80℃ で速い退色成分・遅い退色成分の割合は約半分ずつとなる [52]。この結果は本実験で得られた DMPC 再構成 bR の二次元結晶融解および速い退色成分の増加の温度依存性とも一致した。この結果から、M-like 中間体は bR の二次元結晶融解によって生成される種類であることが示唆された。M-like 中間体は光照射・二次元結晶融解の両方の条件がそろった場合にのみ生成することがわかったが、次に暗中・二次元結晶融解条件下の bR の状態に着目したい。図 5-8B に示したように、二次元結晶融解条件下の DMPC 再構成 bR は暗中であるにも関わらず基底状態とは異なる構造をとることが示唆された。この原因として熱揺動による基底状態の構造のゆらぎが考えられる。図 5-1B で見られた 30℃ 以上でのモル楕円率の低下は、この bR の構造揺らぎによる吸収極大の変化に起因すると考えられる。しかし、30℃ 以上では吸収極大の短波長シフトだけでなくスペクトルのブロードニングも起こっていたため、構造の異なるいくつかの bR が混在していることが示唆された。この構造の異なる bR の混在が M-like 中間体出現の原因である可能性も考えられる。つまり、二次元結晶融解・高温という条件下で既に複数の構造を持つ bR が混在しており、ここに光が照射されることで、ある bR は光サイクルに参加し、またある bR は M-like 中間体になる、といった構造変化の可能性も考えられる。

続いて二次元結晶融解条件下で、どのようにして M-like 中間体が生成されるかについて考察したい。光退色現象において M-like 中間体の寄与がない、すなわち 1 成分の減衰曲線を描く場合として、可溶化 bR (pH 7.0) [32, 33] および紫膜中の bR (pH 10.0 以上) [41] が挙げられる。M-like 中間体は二次元結晶が融解

しているだけでなく、bR が膜に存在し、かつ、溶媒 pH が中性のときに出現する種類であると考えられる。この 3 つの条件から、M-like 中間体が出現するためには膜界面領域および水溶性ドメインの電荷が重要であることがわかった。

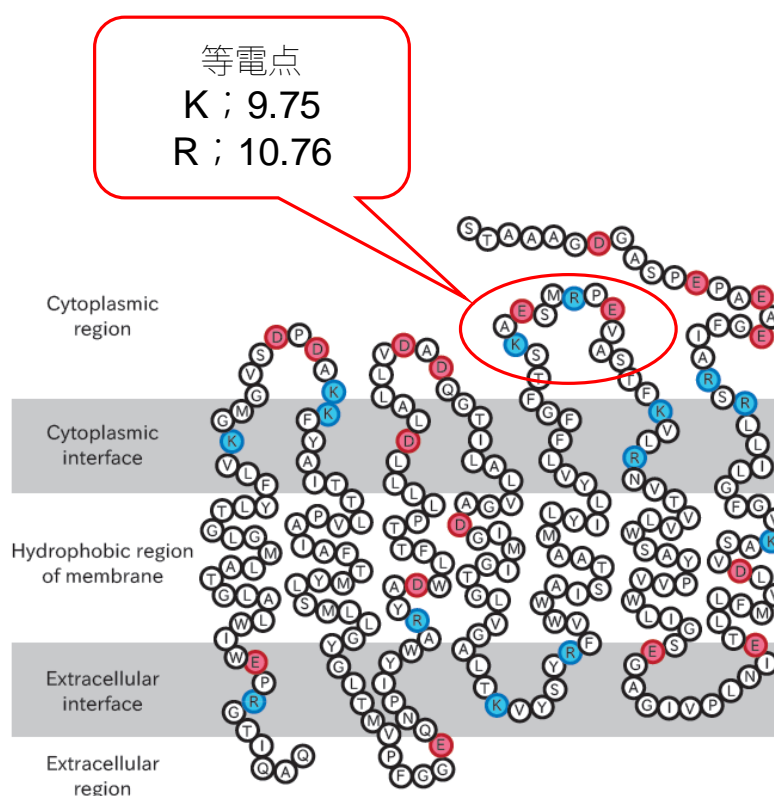


図5-10：bRの電荷分布

M-like中間体が出現するためには、bRが膜に貫通する際の方向（配向）と溶媒pHが中性であることが重要であった。紫膜bRにおいてpH 10.0以上の溶媒中での光退色実験では、退色曲線がSingle-exponentialで表される（M-like中間体が出現しない）ことがわかっている。このことから塩基性残基であるリジン、アルギニン（図中・赤色領域）の存在の重要性が示唆された。

pH 10.0 以上で光退色の減衰曲線が 1 成分になった [41] ことから、M-like 中間体の出現に塩基性アミノ酸が重要な役割を果たしていることがわかった。図 5-10 に示したように、bR の細胞質側ループに塩基性残基であるリジンとアルギニンが存在する。このループは一般に「EF ループ」と呼ばれる領域である。C 末端のループ領域をパパイン処理によって切除した紫膜 bR を用いて光退色実験を行った場合、光退色の減衰曲線は 2 成分で表されること、さらに bR の光退色挙動には

とんど影響を与えないことが、Yokoyama らによって既に報告されている [52] が、EF ループの重要性を示す直接的な報告はまだない。しかし、EF ループはプロトンポンプの際に、隣の三量体中の bR と相互作用することが Shibata らによって報告されている [78]。第 3 章で記述したように、膜界面および水溶性ドメインにおける bR-bR 間静電相互作用が bR の自己会合に寄与していること [関連論文 2] を踏まえると、おそらくこの EF ループを介した bR-bR 間相互作用は荷電アミノ酸による静電相互作用であろう。こうした事実を踏まえると、M-like 中間体が出現する条件として、EF ループを介した bR-bR 間の静電相互作用が重要であると言えるかもしれない。ここで、本章の背景で示した疑問「二次元結晶融解条件下で、どのような bR-bR 間相互作用の効果があるのだろうか？」を検証したい。本研究で用いた DMPC 再構成 bR 試料には、タンパク質成分は bR しか含まれていない。背景にも記述したように、一般に bR は二次元結晶融解条件下では均一に分散していると考えられている。しかし、EF ループを介した静電相互作用によって M-like 中間体が出現しているとする、二次元結晶融解条件下における bR の複合体形成を考慮する必要がある。

最後に、二次元結晶融解条件下での bR の複合体形成の可能性を検証したい。まず Gulik-Krzywicki らは DMPC 再構成 bR の電子顕微鏡観察を行い、脂質/タンパク質比（モル比）が約 120 から 800 という条件では、二次元結晶融解条件下でその粒子径分布は 4.5 nm と 7.5 nm に 2 つのピークを持つと報告している [25]。彼らはこの 4.5 nm 径の粒子は bR の単量体であり、7.5 nm 径の粒子については正確には判断できないとした上で 4 分子以下の bR に起因するものであると結論づけている。また Yokoyama らの報告によると、光退色した紫膜 bR において分子間 β シート構造がフーリエ変換赤外分光測定で観察され、この β シート構造は bR の水溶性ドメインにあるループ間で形成されていることが示唆されている [40]。さらに、このような機能の異なる単量体からなる複合体形成は、bR のアナログである G タンパク質共役受容体 (GPCR) においても報告されている。GPCR における非対称な複合体形成に関する研究から、GPCR が二量体を形成してコンフォメーション変化を起こすことで、一方の GPCR のリガンド結合活性を変えるシステ

ムが明らかになっている [78]。こうした機能的に非対称な複合体形成は bR や GPCR のような膜タンパク質では一般的なシステムなのかもしれない。

5.4 第 5 章の総論

本章では DMPC 膜に再構成した bR の二次元結晶融解下における光退色の反応速度論解析を行った。二次元結晶融解条件下での DMPC 再構成 bR の光退色速度論解析を行った結果、30°C から 60°C という温度領域で 2 種類の速度定数で表せる光退色現象が観察された。この結果は二次元結晶が融解している広い温度領域において、光退色に対する構造安定性の観点から複数種類の bR が混在していることを示した。次に高温インキュベーション中の bR の吸収スペクトル変化から、光照射下でのみ 560 nm における bR の吸収の減少に伴って 400 nm に吸収ピークが出現・増大することがわかった。この 400 nm に現われたピークは光照射により一時的に蓄積するが、4 °C・暗順応状態で再測定を行うと、400 nm から 560 nm に戻った。本研究ではこの 400 nm に吸収極大を持つ化学種を「M-like 中間体」と呼ぶこととした。基底状態（560 nm）および M-like 中間体（400 nm）の増減の温度依存性を調べた結果、基底状態へ回復する M-like 中間体の減少と光退色における遅い退色成分の増加が対応していた。また、DMPC 再構成 bR の M-like 中間体は、暗中での高温インキュベーションでは観察されなかったため、光反応で生成する種類であることが示された。これらの結果から、二次元結晶融解条件下で顕著に観察された 2 種類の光退色成分は、光サイクルを経由して退色する bR（速い速度定数を持つ）と、光サイクルとは独立の状態「M-like 中間体」を経由して退色する bR（遅い速度定数を持つ）の 2 種類に起因することが示唆された。さらに、1 種類および 2 種類の退色速度定数を持つ光退色現象の比較から、M-like 中間体の出現には、二次元結晶融解・光照射・bR が膜に存在すること・表面電荷が維持されること、の 4 つの条件が重要であることがわかった。これらの条件は、bR が膜上で平面拡散した上で、お互いに相互作用（静電相互作用）するための条件であると推測できる。この推測に基づくと、二次元結晶融解条件下での、bR-bR 間相互作用による複合体形成の可能性が示唆された。

第6章 総論

本博士論文では、膜タンパク質複合体形成に重要な物理化学的相互作用の解明、およびそのタンパク質の動的構造安定性（機能中の構造変化）における分子間相互作用の重要性を調べるために、バクテリオロドプシン（bR）を人工脂質膜に再構成した系を用い、bR の二次元結晶形成機構および bR の複合体形成の持つ生理学的意味について議論した。この結果、以下の結論を得ることができた。

（1）再構成 bR の二次元結晶融解は再構成膜の相転移に誘発された。また、bR の光退色現象は二次元結晶融解によって誘発された。

（2）再構成 bR の二次元結晶形成は相分離と静電斥力のバランスによるものであった。また、紫膜中の bR の二次元結晶形成には、脂質－bR 間にはたらく静電相互作用が重要であることが示唆された。

（3）二次元結晶融解条件下でも、光退色現象は 2 種類の退色成分によって起こった。また、2 種類の退色成分はすぐに退色する bR（速い）と M-like 中間体 bR（遅い）であることが示唆された。

今回得られた結論から bR の二次元結晶形成およびタンパク質間相互作用の生物学的意味について考察する。

まず第 4 章より、再構成膜中では bR 膜界面領域における静電斥力の効果によって bR の二次元結晶形成が阻害されることがわかった。このモデルは紫膜 bR における二次元結晶形成の生物学的意味も示唆している（図 6-1）。bR の細胞質側膜界面領域の正電荷アミノ酸残基が負電荷を持つ脂質極性頭部によって中性化されていると、bR の細胞質側ループ領域には負電荷残基が多く存在するため、bR 二次元結晶の細胞質側表面における負電荷密度が高くなり、結果的に膜の細胞質側表面で低 pH 条件が実現する。つまり bR の二次元結晶領域では膜表面でプロトン濃度が高くなると予想できる。従って、bR が二次元結晶を形成していることでプロトンポンプ機能をより高めることになり、二次元結晶形成は高度好塩菌にとっ

て大きな利点をもたらしていると考えられる。

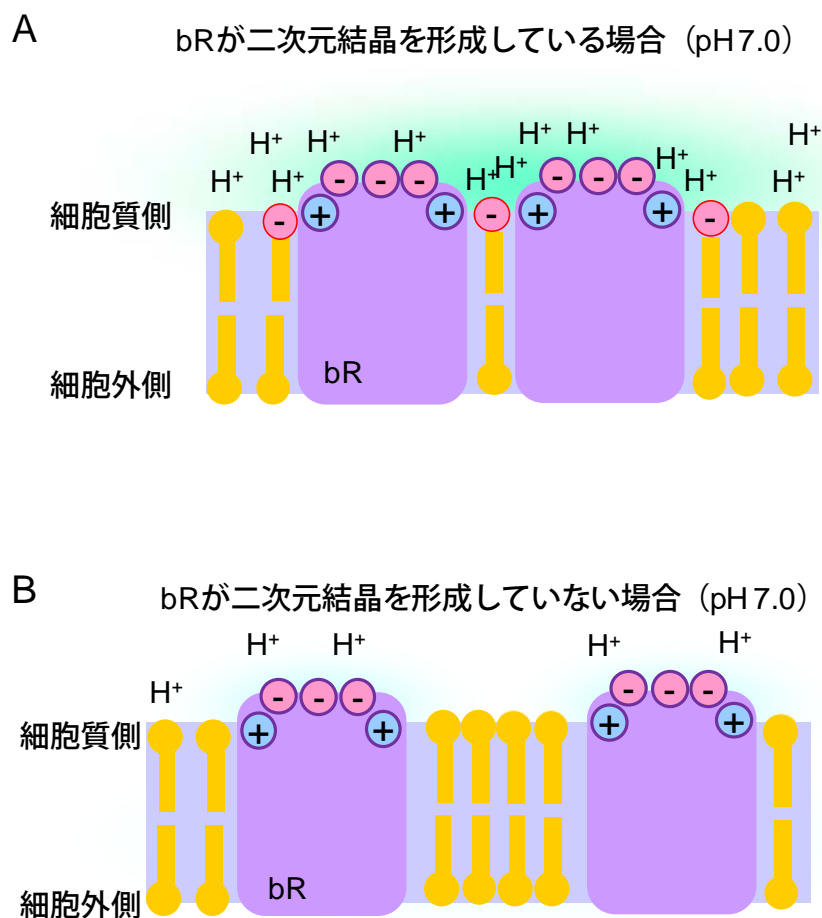


図 6-1：bRが二次元結晶を形成することの生物学的意味 1

(A) bRが二次元結晶を形成しているときの、膜表面のイオン雰囲気の様式図を示す。
 (B) bRが二次元結晶を形成していないときの、膜表面のイオン雰囲気の様式図を示す。
 帯電表面におけるカウンターイオン濃度は表面電荷密度と正の相関がある。bRの膜表面（水溶性領域）には負電荷残基が多く存在するため、会合によって表面電荷密度が上がる。これにより紫膜表面にはカウンターイオンであるプロトンが集まりやすくなり、結果的にプロトンポンプ活性を促進できるシステムであることが考察される。

第5章では二次元結晶融解条件下のbR 動的構造安定化における bR-bR 間相互作用の可能性が示唆された。bR は二次元結晶を形成することで全ての bR 分子が機能に参加できるが、二次元結晶融解条件下では bR が複合体を形成し、機能を維持する種と、その動的構造の安定化に貢献する種が混在するというシステムが考察される。従って、bR は二次元結晶形成によって、より多くの bR 分子の動的

構造安定性を確保していると言えるであろう。

本博士論文では膜タンパク質のモデルとしてbRを人工脂質膜へ再構成することにより、その複合体形成機構および複合体形成の生物学的意味について考察した。

第 7 章 参考文献

1. Gennis, R.B. (1988) Biomembrane: molecular structure and function, Springer-Verlag, New York
2. Lozier R.H., Bogomolni R.A. and Stoeckenius W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium Halobium*. *Biophys J.* 15(9), 955-962.
3. Lanyi, J.K. (1993) Proton translocation mechanism and energetics in the light-driven pump bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 1183, 241-261.
4. Müller, D.J., Heymann, J.B., Oesterhelt, F., Möller, C., Gaub, H., Büldt, G. and Engel, A. (2000) Atomic force microscopy of native purple membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1460, 27-38.
5. Henderson, R. (1977) The purple membrane from *Halobacterium halobium*. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6, 87-109.
6. Henderson, R. and Unwin, P.N.T. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257, 28-32.
7. Khorana, H.G., Gerber, G.E., Herlihy, W.C., Gray, C.P., Anderegg, R.J., Nihei, K. and Biemann, K. (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(10), 5046-5050.
8. Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S.H., Rajbhandary, U.L. and Khorana, H.G. (1981) The bacteriorhodopsin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(11), 6744-6748.
9. Grigorieff, N., Ceska, T.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M. and Henderson, R. (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 259(3), 393-421.

10. Kimura, Y., Vassilyev, D.G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T. and Fujiyoshi, Y. (1997) Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* 389(6647), 206-211.
11. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P. and Lanyi, J.K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 291(4), 899-911.
12. Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta.* 1460, 133-156
13. Casadio R. and Stoeckenius W. (1980) Effect of protein-protein interaction on light adaptation of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 19(14), 3374-3381.
14. Popot, J.L. and Engelman, D.M. (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* 29(17), 4031-4037.
15. Curran, A.R., Templer, R.H. and Booth, P.J. (1999) Modulation of folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin by intermolecular forces within the lipid bilayer. *Biochemistry* 38(29), 9328-9336.
16. Bauer, P.J., Dencher, N.A. and Heyn, M.P. (1976) Evidence for chromophore-chromophore interactions in the purple membrane from reconstitution experiments of the chromophore-free membrane. *Biophys. Struct. Mech.* 2(1), 79-92.
17. Muccio, D.D. and Cassim, J.Y. (1979) Interpretation of the absorption and circular dichroic spectra of oriented purple membrane films. *Biophys. J.* 26(3), 427-440.
18. Wu, S. and El-Sayed, M.A. (1991) CD spectrum of bacteriorhodopsin: Best evidence against exciton model. *Biophys J.* 60(1), 190-197.
19. Cassim, J.Y. (1992) Unique biphasic band shape of the visible circular dichroism of bacteriorhodopsin in purple membrane: Excitons, multiple transitions or protein heterogeneity? *Biophys J.* 63(5), 1432-1442.

20. Cherry, R.J., Müller, U., Henderson, R. and Heyn, M.P. (1978) Temperature-dependent aggregation of bacteriorhodopsin in dipalmitoyl- and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Bio.* 121(2), 283-298.
21. Cherry, R.J., Müller, U., Holenstein, C. and Heyn, M.P. (1980) Lateral segregation of proteins induced by cholesterol in bacteriorhodopsin-phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 596(1), 145-151.
22. Heyn, M.P., Cherry, R.J. and Dencher, N.A. (1981) Lipid-protein interactions in bacteriorhodopsin-dimyristoylphosphatidylecholine vesicles. *Biochemistry* 20, 840-849.
23. Heyn, M.P., Blume, A., Rehorek, M. and Dencher, N.A. (1981) Calorimetric and fluorescence depolarization studies on the lipid phase transition of bacteriorhodopsin-dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 20, 7109-7115.
24. Lewis, B.A. and Engelman, D.M. (1983) Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses. *J. Mol. Biol.* 166(2), 203-210.
25. Gulik-Krzywicki, T., Seigneuret, M. and Rigaud, J.L. (1987) Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. A freeze-fracture electron microscope study. *J. Biol. Chem.* 262(32), 15580-15588.
26. Sternberg, B., Gale, P. and Watts, A. (1989) The effect of temperature and protein content on the dispersive properties of bacteriorhodopsin from *H. halobium* in reconstituted DMPC complexes free of endogenous purple membrane lipids: A freeze-fracture electron microscopy study. *Biochim. Biophys. Acta.* 980 117-126.
27. Sternberg, B., L'Hostis, C., Whiteway, C.A. and Watts, A. (1992) The essential role of specific *Halobacterium halobium* polar lipids in 2D-array formation of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1108(1), 21-30.

28. Sternberg, B., Watts, A. and Cejka, Z. (1993) Lipid-induced modulation of the protein packing in two-dimensional crystals of bacteriorhodopsin. *J. Struct. Biol.* 110, 196-204.
29. Piknová, B., Pérochon, E. and Tocanne, J.F. (1993) Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin / phosphatidylcholine vesicles. *Eur. J. Biochem.* 218(2), 385-396.
30. Etoh, A., Itoh, H. and Mitaku, S. (1997) Light-induced denaturation of bacteriorhodopsin just above melting point of two-dimensional crystal. *J. Phys. Soc. JPN.* 66(4), 975-978.
31. Yokoyama, Y., Sonoyama, M. and Mitaku, S. (2002) Irreversible photobleaching of bacteriorhodopsin in a high-temperature intermediate state. *J. Biochem.* 131(6), 785-790.
32. Mukai, Y., Kamo, N. and Mitaku, S. (1999) Light-induced denaturation of bacteriorhodopsin solubilized by octyl- β -glucoside. *Protein Eng.* 12, 755-759.
33. Sasaki, T., Sonoyama, M., Demura, M. and Mitaku, S. (2005) Photobleaching of bacteriorhodopsin solubilized with Triton X-100. *Photochem. Photobiol.* 81, 1131-1136.
34. Birge, R.R., Gillespie, N.B., Izaguirre, E.W., Kusnetzow, A., Lawrence, A.F., Singh, D., Wang, S.Q., Schmidt, E., Stuart, J.A., Seetharaman, S. and Wise, K.J. (1999) Biomolecular Electronics: Protein-Based Associative Processors and Volumetric Memories. *J. Phys. Chem. B* 103, 10746-10766.
35. Mak-Jurkauskas, M.L., Bajaj, V.S., Hornstein, M.K., Belenky, M., Griffin, R.G. and Herzfeld, J. (2008) Energy transformations early in the bacteriorhodopsin photocycle revealed by DNP-enhanced solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(3), 883-888.
36. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E. and Downing, K.H.

- (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213, 899-929.
37. Lanyi, J.K. and Schobert, B. (2003) Mechanism of proton transport in bacteriorhodopsin from crystallographic structures of the K, L, M1, M2, and M2' intermediates of the photocycle. *J. Mol. Biol.* 328, 439-450.
 38. Mitaku, S., Suzuki, K., Odashima, S., Ikuta, K., Suwa, M., Kukita, F., Ishikawa, M. and Itoh, H. (1995) Interaction stabilizing tertiary structure of bacteriorhodopsin studied by denaturation experiments. *Proteins.* 22(4), 350-362.
 39. Dancsházy, Z., Tokaji, Z. and Dér, A. (1999) Bleaching of bacteriorhodopsin by continuous light. *FEBS Lett.* 450, 154-157.
 40. Yokoyama Y, Sonoyama M, and Mitaku S. (2010) Structural changes in bacteriorhodopsin in purple membranes induced by irreversible photobleaching with heterogeneous and homogeneous stability. *Photochem. Photobiol.* 86(2), 297-301.
 41. Yokoyama, Y., Sonoyama, M., Nakano, T. and Mitaku, S. (2007) Structural change of bacteriorhodopsin in the purple membrane above pH 10 decreases heterogeneity of the irreversible photobleaching components. *J Biochem.* 142(3), 325-333.
 42. McElhaney, R.N. (1986) Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 864(3-4), 361-421.
 43. Heyn, M.P. and Dencher, N.A. (1982) Reconstitution of monomeric bacteriorhodopsin into phospholipid vesicles. *Methods Enzymol.* 88, 31-35.
 44. Koynova, R. and Caffrey, M. (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376(1), 91-145.
 45. Shimshick, E.J. and McConnell, H.M. (1973) Lateral phase separation in phospholipid membranes. *Biochemistry* 12(12), 2351-2360.
 46. Kushwaha, S.C., Kates, M. and Martin, W.G. (1975) Characterization and composition

- of the purple and red membrane from *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Biochem.* 53(3):284-292.
47. Kates, M., Kushwaha, S.C. and Sprott, G.D. (1982) Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria. *Methods Enzymol* 88, 98-111.
 48. Joshi, M.K., Dracheva, S., Mukhopadhyay, A.K., Bose, S. and Hendler, R.W. (1998) Importance of specific native lipids in controlling the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 37, 14463-14470.
 49. Krebs, M.P. and Isenbarger, T.A. (2000) Structural determinants of purple membrane assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* 1460(1), 15-26.
 50. Dencher N.A. and Heyn M.P. (1979) Bacteriorhodopsin monomers pump protons. *FEBS Lett.* 108(2), 307-310.
 51. Dencher N.A., Kohl K.D. and Heyn M.P. (1983) Photochemical cycle and light-dark adaptation of monomeric and aggregated bacteriorhodopsin in various lipid environments. *Biochemistry.* 22(6), 1323-1334.
 52. Yokoyama Y., Sonoyama M. and Mitaku S. (2004) Inhomogeneous stability of bacteriorhodopsin in purple membrane against photobleaching at high temperature. *Proteins.* 54(3), 442-454.
 53. Oesterhelt, D. and Stoeckenius, W. (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.* 31(Pt A), 667-678.
 54. Hayashi, S., Tajkhorshid, E., Pebay-Peyroula, E., Royant, A., Landau, E. M., Navarro, J. and Schulten, K. (2001) Structural Determinants of Spectral Tuning in Retinal Proteins Bacteriorhodopsin vs Sensory Rhodopsin II. *J. Phys. Chem. B* 105 (41), 10124-10131.
 55. Sonoyama, M., Kikukawa, T., Yokoyama, Y., Demura, M., Kamo, N. and Mitaku, S.

- (2009) Effect of molecular assembly on photocycle of reconstituted bacteriorhodopsin: Significant blue shift of the late M photointermediate in the liquid crystalline phase. *Chem. Lett.* 38 (12), 1134-1135.
56. Höchli, M. and Hackenbrock, C.R. (1976) Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73(5), 1636-1640.
 57. Kleemann, W. and McConnell, H.M. (1976) Interactions of proteins and cholesterol with lipids in bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 419(2), 206-222.
 58. Benga, G. and Holmes, R.P. (1984) Interactions between components in biological membranes and their implications for membrane function. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 43, 195-257.
 59. Quinn, P.J. (1985) A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiol.* 22(2), 128-146.
 60. Mitaku, S. (1981) Ultrasonic Studies of Lipid Bilayer Phase Transition. *Mol. Cry. Liq. Cry.* 70(1), 21-28.
 61. Wang, J. and El-Sayed, M.A. (2000) The effect of protein conformation change from α II to α I on the bacteriorhodopsin photocycle. *Biophys. J.* 78(4), 2031-2036.
 62. Sonoyama, M. and Mitaku, S. (2004) High-Temperature Intermediate State of Bacteriorhodopsin Prior to the Premelting Transition of Purple Membrane Revealed by Reactivity with Hydrolysis Reagent Hydroxylamine. *J. Phys. Chem. B* 108(50), 19496-19500.
 63. Váró, G. and Lanyi, J.K. (1991) Effects of the crystalline structure of purple membrane on the kinetics and energetics of the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochemistry* 30(29), 7165-7171.
 64. Wittebort, R.J., Schumidt, C.F. and Griffin, R.G. (1981) Solid-state carbon-13 nuclear

- magnetic resonance of the lecithin gel to liquid-crystalline phase transition. *Biochemistry* 20(14), 4223-4228.
65. Tsuchida, K. and Hatta, I. (1988) ESR studies on the ripple phase in multilamellar phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 945(1), 73-80.
 66. Aruga, S., Kataoka, R. and Mitaku, S. (1985) Interaction between Ca^{2+} and dipalmitoylphosphatidylcholine membranes: I. Transition anomalies of ultrasonic properties. *Biophys. Chem.* 21(3-4), 265-275.
 67. Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Miyazawa, A., Kidera, A., Kimura, Y. and Fujiyoshi, Y. (1999) The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J. Mol. Biol.* 286(3), 861-882.
 68. Saitô, H., Tsuchida, T., Ogawa, K., Arakawa, T., Yamaguchi, S., and Tuzi, S. (2002) Residue-specific millisecond to microsecond fluctuations in bacteriorhodopsin induced by disrupted or disorganized two-dimensional crystalline lattice, through modified lipid-helix and helix-helix interactions, as revealed by ^{13}C NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 97-106.
 69. Essen, L., Siebert, R., Lehmann, W.D. and Oesterhelt, D. (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11673-11678.
 70. Sato, H., Takeda, K., Tani, K., Hino, T., Okada, T., Nakasako, M., Kamiya, N. and Kouyama, T. (1999) Specific lipid-protein interactions in a novel honeycomb lattice structure of bacteriorhodopsin. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55(Pt 7), 1251-1256.
 71. Grigorieff, N., Beckmann, E., and Zemlin, F. (1995) Lipid location in deoxycholate-treated purple membrane at 2.6 Å. *J. Mol. Biol.* 254, 404-415.
 72. Schobert, B., Cupp-Vickery, J., Hornak, V., Smith, S. and Lanyi, J. (2002) Crystallographic structure of the K intermediate of bacteriorhodopsin: conservation of

- free energy after photoisomerization of the retinal. *J. Mol. Biol.* 321(4), 715-726.
73. Träuble, H. and Eibl, H. (1974) Electrostatic effects on lipid phase transitions: membrane structure and ionic environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 214-219.
74. Cevc, G. (1991) Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1062(1), 59-69.
75. Sherman, W.V. and Caplan, S.R. (1975) Arrhenius parameters of phototransients in *Halobacterium halobium* in physiological conditions. *Nature* 258(5537), 766-768.
76. Groma, G.I. and Dancsházy, Z. (1986) How Many M Forms are there in the Bacteriorhodopsin Photocycle? *Biophys. J.* 50(2), 357-366.
77. Shibasaki, C., Kikuchi, O. and Ohtani, H. (2010) The third M intermediate is formed under stationary light irradiation in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Lett.* 488(3), 77-80.
78. Shibata, M., Yamashita, H., Uchihashi, T., Kandori, H. and Ando, T. (2011) High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nat. Nanotech.* 5(3), 208-212.
79. Maurice P., Kamal M. and Jockers R. (2011) Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 32(9), 514-520

業績リスト

<学術雑誌に発表した論文>

1. Yokoyama, Y., Negishi L., Kitoh T., Sonoyama M., Asami Y. and Mitaku S. (2010)

Effect of lipid phase transition on molecular assembly and structural stability of bacteriorhodopsin reconstituted into phosphatidylcholine liposomes with different acyl-chain lengths.

J. Phys. Chem. B 114(47), 15706-15711.

2. Negishi L. and Mitaku S. (2011)

Electrostatic Effects Influence the Formation of Two-Dimensional Crystals of Bacteriorhodopsin Reconstituted into Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes.

J. Biochemistry 150(1), 113-119.

3. Negishi L., Yokoyama Y. and Mitaku S.

Heterogeneous stability of bacteriorhodopsin in reconstituted membrane with dimyristoylphosphatidylcholine under melting condition of two-dimensional crystals.

J. Biochemistry (submitted)

<国際会議発表>

1. Rumi Negishi, Masashi Sonoyama, Shigeki Mitaku (口頭、ポスター) 査読あり
“Thermal Stability of Bacteriorhodopsin Reconstituted in Synthetic Lipid Vesicles”
12th International Conference on Retinal Proteins. Awaji Yumebutai International Conference Center (Japan), 2006 年 6 月
2. Rumi Negishi, Masashi Sonoyama, Shigeki Mitaku (ポスター) 査読あり
“Inter- and Intra-molecular Interaction Involved in Photobleaching of Bacteriorhodopsin Reconstituted in DMPC Liposome”
Meeting Program of EABS & BSJ 2006. Okinawa Convention Center (Japan), 2006 年 11 月
3. Rumi Negishi and Shigeki Mitaku (ポスター) 査読あり
“Multiple States in Photobleaching of Reconstituted Bacteriorhodopsin”
13th International Conference on Retinal Proteins. Casa Convalecencia, Hospital de Sant Pau (Spain), 2008 年 6 月

<国内学会発表>

1. 根岸瑠美、園山正史、美宅成樹
“合成脂質リポソームに再構成したバクテリオロドプシンの構造安定性”
分子研研究会 ロドプシンの仲間・G 蛋白質共役型レセプターの機能と構造、
岡崎コンファレンスセンター (岡崎)、2005 年 6 月
2. ○根岸瑠美、園山正史、美宅成樹
“合成 DMPC リポソームに再構成したバクテリオロドプシンの熱安定性”
日本生物物理学会第 43 回年会、札幌コンベンションセンター (札幌)、
2005 年 11 月
3. ○根岸瑠美、園山正史、美宅成樹 (口頭発表)
“合成リポソームに再構成したバクテリオロドプシンにおける熱安定性の評価”
生物物理学会中部支部討論会、名古屋大学 (名古屋)、2006 年 3 月
4. ○根岸瑠美、園山正史、美宅成樹 (ポスター)
“DMPC リポソームに再構成したバクテリオロドプシンの光退色現象に関与する分子間、および分子内相互作用の研究”

日本分子生物学会フォーラム「分子生物学の未来」、名古屋国際会議場
(名古屋)、2006 年 12 月

5. ○根岸瑠美、美宅成樹 (口頭発表)
“再構成バクテリオロドプシンの変性実験によるタンパク質安定性とタンパク質間結合のカップリングの研究”
第 34 回 生体分子科学討論会、東北大学 (仙台)、2007 年 6 月
6. ○根岸瑠美、美宅成樹 (口頭発表)
“バクテリオロドプシン変性実験によるタンパク質構造安定性に寄与する相互作用の研究”
第 1 回 分子科学討論会、東北大学 (仙台)、2007 年 9 月
7. ○根岸瑠美、美宅成樹 (口頭、ポスター)
“バクテリオロドプシン再構成法から見た脂質相転移と膜タンパク質構造安定性の相関”
第 1 回サポーターッドメンブランワークショップ、蒲郡温泉「天の丸」(愛知)、2007 年 11 月
8. ○根岸瑠美、美宅成樹 (口頭、ポスター)
“再構成バクテリオロドプシンの変性実験から見た膜タンパク質安定性に与えるタンパク質間結合の影響”
“Effect of inter-molecular interaction for stabilizing membrane proteins -Denaturation experiments of reconstituted bacteriorhodopsin-”
生物物理学会第 45 回年会、パシフィコ横浜 (横浜)、2007 年 12 月
9. ○根岸瑠美、美宅成樹 (ポスター)
“不均一な膜タンパク質安定性 -再構成バクテリオロドプシンの変性挙動に対する DMPC 膜相転移の効果-”
“Heterogeneous stability of membrane proteins -Denaturation behaviors of reconstituted bR around phase transition of DMPC-”
生物物理学会第 46 回年会、福岡国際会議場 (福岡)、2008 年 12 月
10. ○鬼頭琢、根岸瑠美、横山泰範、園山正史、美宅成樹 (ポスター)
“脂質二層膜に再構成されたバクテリオロドプシンの脂質膜相転移への影響”
“Effect of reconstituted bR on phase transition of lipid bilayer”
第 9 回日本蛋白質科学会年会、熊本全日空ホテルニュースカイ (熊本)、2009 年 5 月

11. ○根岸瑠美、鬼頭琢、美宅成樹 （口頭）
“バクテリオロドプシンの二次元結晶化に影響する脂質-タンパク質間相互作用”
第 36 回生体分子科学討論会、北海道大学（札幌）、2009 年 6 月
12. ○根岸瑠美、鬼頭琢、美宅成樹 （口頭）
“再構成バクテリオロドプシンの二次元結晶化に関する研究”
第 3 回分子科学討論会、名古屋大学（名古屋）、2009 年 9 月
13. ○根岸瑠美、美宅成樹 （口頭、ポスター）
“DMPC 二重層に再構成したバクテリオロドプシンのイオン濃度に依存した可視 CD スペクトル変化”
“Ion concentration dependence of CD spectra in the visible region of bacteriorhodopsin reconstituted in DMPC bilayer ”
生物物理学会第 47 回年会、アスティ徳島（徳島）、2009 年 11 月
14. 鬼頭琢、○横山泰範、根岸瑠美、園山正史、浅見安雄、美宅成樹（ポスター）
“アシル鎖長の異なる 3 種類の脂質膜リポソームに再構成されたバクテリオロドプシンの分子集合状態の変化が引き起こす分子構造・構造安定性への影響”
“Effect of molecular assembly upon structure and structural stability of bacteriorhodopsin reconstituted into phospholipid liposomes”
生物物理学会第 48 回年会、東北大学（仙台）、2010 年 9 月
15. ○Lumi Negishi and Shigeki Mitaku （ポスター）
“Balance of physical interactions affecting two-dimensional crystallization of reconstituted bacteriorhodopsin in DMPC membrane”
第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会（合同大会）、神戸ポートアイランド（神戸）、2010 年 12 月
16. ○根岸瑠美、細谷悟史、遠藤毅、戸田収、Thanai Paxton、林宣宏（ポスター）
“膜マイクロドメインにおける構成因子の組成および構成因子間の相互作用の変化による膜タンパク質の活性制御機構の解明”
第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜）、2011 年 12 月

<受賞歴>

第 50 回生物物理若手・夏の学校、優秀ポスター賞 2010 年 9 月

謝辞

本論文は著者が名古屋大学 大学院工学研究科 マテリアル理工学専攻 応用物理学分野 博士課程に在学中の研究成果をまとめたものです。

指導教官である美宅成樹教授には私が名古屋大学の修士課程に入学した際から、約 8 年に渡りお世話になってまいりました。特に、博士課程は 6 年という長期戦となってしまったにも関わらず、大変辛抱強く見守ってくださり、そのおかげで納得のいく論文を作成することができました。長かった修士課程・博士課程で得たもの、学んだものはそれだけ多く、非常に有意義な 8 年間だったと思います。私が東工大へ異動してからの 2 年間は、休日であるにも関わらず、私との議論に多くのお時間を割いていただきました。毎週のように行っていたドトールコーヒーやルノアールでの打ち合わせですが、もう通うこともなくなるんだな、と思うと少し淋しい気もします。本当にありがとうございました。

現勤務先である東工大・生命理工の林宣宏准教授には、英語論文の書き方をご指導いただくことや、研究内容・考察について鋭いご指摘をいただくことが何度もありました。何よりも、諦めかけていた時期に研究に参加できる場を与えていただき、大変に感謝しております。林先生のおかげで、改めて研究の魅力に気付くことができました。ありがとうございました。

美宅研・助教の横山泰範さんにはバクテリオロドプシンの光退色現象や実験手法などに関して、多くのご助言をいただきました。横山さんから教えていただいたことのおかげで、何とか博士課程を修了できました。ありがとうございました。研究室セミナーのたびに迷走する私に厳しいご意見をくださったことや、私が光退色実験を始めたばかりの頃、吸収スペクトルの散乱補正方法を深夜まで教えていただいたことは、非常によい思い出であります。

美宅研・博士課程 5 年の山田達矢くんとは、私が美宅研で過ごした 8 年間を常に共に過ごしてきたと言っても過言ではありません。物理化学の基礎の基礎から、何度も何度も教えてもらいました。それだけではなく、ものごとの考え方や他人

とのコミュニケーション方法など、山田くんとは本当にたくさんのことを議論してきました。この博士論文を完成させることができたのは、何と言っても山田くんのおかげです。本当にありがとう。

東工大・生命理工の大谷弘之准教授には、関連論文3ならびに本博士論文の作成にあたり多くのご助言をいただきました。特に、バクテリオロドプシンの光サイクル・光中間体のこと、分光測定のこと、データ解析に関することなどを、細かい点までしっかりとご指導いただきました。ありがとうございました。

明治大学・講師の佐々木貴規さん、東工大・情報理工の内古閑伸之さんには、公私ともに大変お世話になりました。佐々木さんには、関連論文2、3の作成にあたりバクテリオロドプシンおよびハロロドプシンの複合体形成に関して多くのご助言をいただきました。また、内古閑伸之さん（東工大・情報理工）には研究に行き詰まったときや、方向性を見失いかけたときに、何度も相談に乗っていただきました。研究内容だけでなく研究生活に関することまで、親身にアドバイスをくださったお二人に、心から感謝いたします。

美宅研メンバーのみなさん、林研メンバーのみなさん、生物物理若手の会のみなさん、そのほかたくさんの方々からアドバイスや励ましのお言葉をいただきました。長らくご心配をおかけしておりましたが、こうして博士論文という形で成果を残すことができました。順風満帆ではありませんでしたが、諦めずに何とかここまで仕上げることができたのは、みなさんとのふれあいがあったからこそです。本当にありがとうございました。

最後に、私が研究にたずさわっていくことを寛容な目で見守ってくれている家族に、深く感謝の意を表します。

2012年2月28日 根岸 瑠美

名古屋大学大学院工学研究科

マテリアル理工学専攻 応用物理学分野