



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	偏光解消法による膜タンパク質分子運動の測定
Author(s)	荒磯, 恒久; 菊川, 峰志
Citation	電子科学研究, 3, 72-74
Issue Date	1996-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24351">https://hdl.handle.net/2115/24351</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_P72-74.pdf



# 偏光解消法による膜タンパク質分子運動の測定

細胞機能素子研究分野 荒 磯 恒 久, 菊 川 峰 志

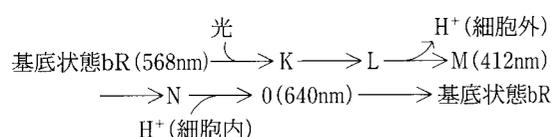
膜タンパク質として、光エネルギー変換タンパク質であるバクテリオロドプシンを取り上げ、レーザーフォトリシスと吸収偏光解消法により膜内でのタンパク質の回転運動を測定した。これにより光励起状態におけるコンフォメーション変化がタンパク質間の相互作用を変化させることが見い出された。

## 1. はじめに

細胞機能の発現においてその中心的役割を演じる生体膜は、直接機能を発揮するタンパク質と機能発現の場を作る脂質二重層膜を主な構成成分としている。タンパク質は機能を発現する上でコンフォメーションを変化させ、また脂質二重層膜は流動的性質を持ってそれを支えている<sup>[1]</sup>。したがって生体膜の機能発現のメカニズムを理解する上で、このようなタンパク質及び脂質類の分子運動の特徴を知ることは重要な意味を持つ。我々は主としてナノ秒 (ns) 領域で運動する膜脂質分子運動を蛍光偏光解消法で測定する方法を確立してきたが、さらにマイクロ秒 ( $\mu$ s) からミリ秒 (ms) で起こる膜タンパク質の回転運動を吸収偏光解消法により測定する方法を検討した。この方法によりバクテリオロドプシンの膜内での回転運動を測定し、タンパク質相互作用が光励起により誘起される現象を見い出した。

## 2. バクテリオロドプシン

バクテリオロドプシン (bR) は、高度好塩菌の体表に存在する紫色の膜領域—紫膜—に含まれる膜タンパク質であり、光エネルギーを用いてプロトン ( $H^+$ ) を一定の方向へ (細胞の内から外へ) 輸送する機能を持つ。bR タンパク質の内部には紫膜の膜面にほぼ平行に配置された光を捕獲する分子—レチナル—が存在する。bR のプロトン輸送機構には、レチナルの光異性化をはじめとする分子のコンフォメーション変化により、次のようなフォトサイクルが存在する<sup>[2]</sup>。



ここで、K, L, M, N および O は反応中間体であり吸収スペクトルにより区別できる。今回の実験条件では、基底状態 bR, M, および O 中間体の 3 種が観測される。レチナルは棒状の分子であり、分子軸に沿って振動する光波を選択的に吸収する。このため、偏光フラッシュ光を励起光とすれば、励起光の偏光方向にほぼ平行に長軸が配向しているレチナル分子が選択的に励起され、そのレチナルを含む bR タンパク質がフォトサイクルに入る。この状態で吸収偏光の時間変化を測定することにより bR タンパク質の回転運動を知ることができる。

## 3. 測定

測定系の概念図を図 1 に示す。励起光には Nd-YAG レーザー (Quanta-Ray, DCR-2) の第二高調波 (532 nm) を縦偏光で用い、モニター光には Xe ランプを用い試料の前後にモノクロメーターと偏光子を配置し波長と偏光方向を制御した。試料を透過した光の偏光吸光度の変化を  $A_V(t)$  及び  $A_H(t)$  とすると、吸収異方性  $r_A(t)$  は

$$r_A(t) = [A_V(t) - A_H(t)] / [A_V(t) + 2A_H(t)]$$

として定義され、この時間変化を解析することにより分子運動の情報を得ることができる。

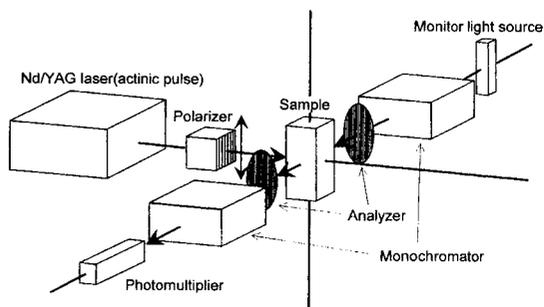


図1 フラッシュフォトリソ-吸収偏光測定装置の概念図

#### 4. 結果・考察

縦偏光の励起パルス光により約10%のbRタンパク質を励起し、紫膜懸濁液の吸収異方性の時間変化を410 nm (主としてM中間体を測定), 570 nm (主として基底状態bRを測定) 680 nm (主としてO中間体を測定) の3波長で測定した。通常の懸濁液では異方性の時間変化に対する測定波長による相違はみられず、すべての波長で膜片の回転によるものと思われる緩やかな減少が測定された。しかし懸濁液にエタノール(〜1

M) を添加することで測定波長により異なった吸収異方性の変化が見い出された。ここで測定に用いられた波長での光吸収には、基底状態bR、M中間体およびO中間体が寄与しているので、各々のbR種の運動を見積もるためには、単独のbR種に対する吸収異方性を求める必要がある。基底状態及び各中間体の吸収スペクトルを基にし、計算により求めた各bR種に対する吸収異方性の時間変化を図2に示す。これは、エタノール添加による特徴的な吸収異方性の変化は基底状態bRで起こり、吸収異方性の値は光励起直後に正の値をとり、その後減少して負の値をとることを示している。このような現象は光励起によってフォトサイクルに入ったbRの膜内回転運動が、フォトサイクルに入らなかったbRの膜内回転運動よりも遅いとして説明される。さらにMおよびO中間体の吸収異方性比の減少速度から、光励起中間体は膜内で回転していないと結論された。bRタンパク質は膜中で通常は3量体を形成する。エタノール添加により膜流動性が上昇して3量体構造がくずれ、bRタンパク質1個の回転が生じるものと考えられる。しかし光励起中間体は膜内での回転が抑制される。これは、光励起によるコンフォ

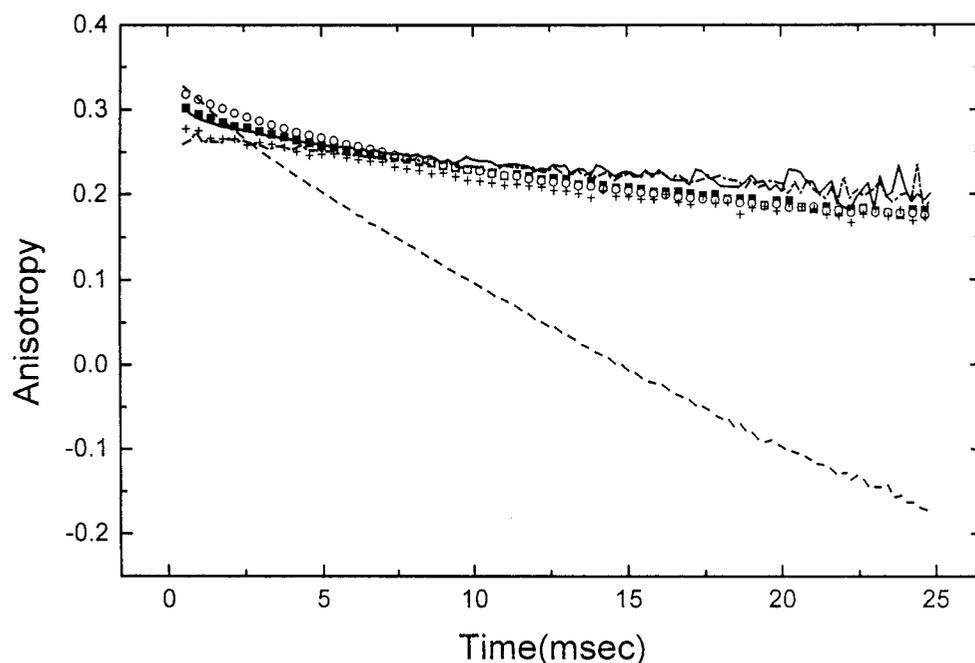


図2 光励起後の各bR種の吸収異方性の時間変化。エタノール非添加：基底状態bR (○), M中間体 (■) およびO中間体 (+)。1Mエタノール存在下：基底状態bR (---), M中間体 (—) およびO中間体 (-.-)。

メーション変化が、タンパク質間の相互作用を誘起していることを意味する。このような性質は、膜の流動性の上昇によって顕在化した、BR が本来有している性質であると考えられる。

(吸収偏光測定装置作製に当たりご協力を頂いた北海道大学電子科学研究所田村守教授，西村吾朗博士，ならびに井上久遠教授，山中明夫博士に感謝致します。)

---

#### 【参考文献】

[1] 荒磯恒久，膜 (Membrane)，**19**, 3 (1994)

Biophys. J. **15**, 955 (1975)

[2] Lozier, R. H., Bogomolni, R. A. and Stoerkenius, W.,