

論文内容の要旨

論文題目 コントラスト変調による膜蛋白質結晶中の脂質二重膜の可視化
(Visualization of lipid bilayers in membrane protein crystals by contrast modulation)

氏名 乗松 良行

磷脂質は多くの場合に膜蛋白質のフォールディングや機能の発現に必須である。しかし、構造の柔軟性の為に、蛋白質と直接相互作用している脂質分子が可視化された例は少ない。また、15 Å よりも高分解能の領域のデータしか用いない通常の結晶解析では運動性の高い脂質は見えてこない。これ迄、結晶中の溶媒部分や膜蛋白質結晶中における界面活性剤のミセルの可視化のためには、中性子散乱によるコントラスト変調が用いられてきた。コントラスト変調法とは、結晶中の溶媒に高濃度の試薬を加え、回折強度に対する溶媒部分の寄与を変化させることにより、溶媒等の乱れた構造を決定する方法である。しかし、中性子線の強度はX線に比べてはるかに弱いため、得られている分解能は12 Å より悪く、蛋白質と脂質との相互作用を可視化するのは困難である。一方、X線でも重原子試薬を用いたコントラスト変調が試みられては来たが、蛋白質の概形を求めることに成功しているに過ぎない。

本研究では、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 結晶中の脂質二重膜を高分解能(3.2 Å ~)で可視化するために、X線コントラスト変調法の新しい解析手法を開発した。 Ca^{2+} -ATPase の結晶化に当たっては磷脂質の添加が必要であった。そのため結晶中では脂質二重膜が形成され、二次元結晶が多数重なった形の結晶が出来ていると考えられる。従って、 Ca^{2+} -ATPase の三次元結晶は、X線結晶解析によって蛋白質と脂質二重膜の関係を詳細に検討できる非常にユニークな機会を与えている。さらに、 Ca^{2+} -ATPase は反応の途中で非常に大きな構造変化を起こし、幾つかの膜貫通ヘリックスの運動は脂質二重膜に垂直な成分をも持つ。それに従って、脂質はどのように動くのかを可視化したい。

(1) 結晶化と回折データの収集

この目的のために、 Ca^{2+} -ATPase の反応サイクル中の4つの基本中間状態、すなわち $\text{E1}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ (Ca^{2+} 結合状態)、 $\text{E1}\cdot\text{P}\cdot\text{ADP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ (閉塞状態)、 $\text{E2}\cdot\text{P}$ (Ca^{2+} 放出後リン酸結合状態)、 E2 (Ca^{2+} 非結合状態)に相当する結晶に対しコントラスト変調法を試みた。溶媒の電子密度を上げる試薬としては、金グルコース、Nycodenz、蔗糖を試した。そのうち Nycodenz が、結晶に対するダメージが最も小さく、濃度を最高 80%(w/v)まで上げることが可能であった。これは $0.351 \text{ e}/\text{\AA}^3$ から $0.455 \text{ e}/\text{\AA}^3$ までの溶媒の電子密度の変化に対応する (蛋白質の平均電子密度は $0.420 \text{ e}/\text{\AA}^3$ である)。分解能 $200 \text{ \AA} \sim 3.2 \text{ \AA}$ までのすべての回折点の強度を測定し、スケールリングを行った。

(2) 1次元単純モデルの導入

コントラスト変調による回折振幅の変化から、図1の青字の部分、蛋白質+脂質二重膜の振幅 $|F_{\text{protein+lipid}}|$ 、溶媒の振幅 $|F_{\text{solvent}}|$ と $F_{\text{protein+lipid}}$ と F_{solvent} の位相差 $\Delta\theta_{\text{iso}}$ は求まるが (図1の青色の部分)、観測値と直接比較できる F_{total} の位相は求まらない。そのため、初期位相をモデルから作る必要がある。

通常の X 線結晶解析では、蛋白質以外の領域はすべて一様な電子密度で満たされているとするフラットモデルが用いられる。しかし膜蛋白質結晶の場合、このモデルは明らかに不適當であり、実験データの振幅とモデルの構造因子の振幅との不一致を示す R は低分解能領域で著しく大きくなる。そこで、脂質二重膜に垂直な方向のみ電子密度が変化するモデル (1次元単純モデル、図2) を作成した。このモデルを用いて F_{total} を計算したところ低角の R は著しく改善された。

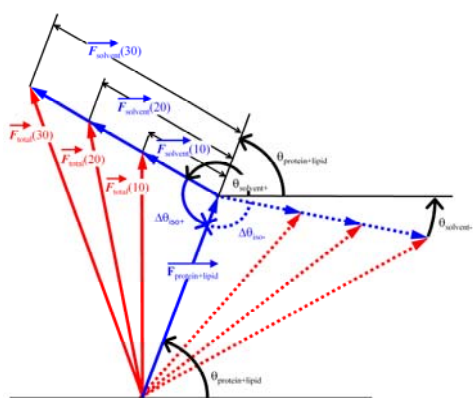


図1 コントラスト変調の概略

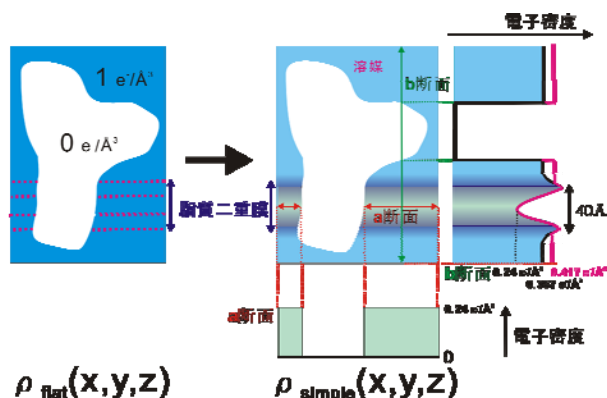


図2 フラットモデル(左)と1次元単純モデル(右)。

(3) 溶媒置換率の導入

結晶中の電子密度 $\rho_{\text{total}}(x,y,z;\xi)$ (ξ は Nycodenz 濃度) は、図3に示すように各点の溶媒置換率 $P_{\text{ex}}(x,y,z)$ に応じて溶媒の平均電子密度 $\langle\rho_{\text{solvent}}\rangle(\xi)$ に対して直線的に変化すると考えられる。そのため $\rho_{\text{total}}(x,y,z;\xi)$ は、 $P_{\text{ex}}(x,y,z)$ を用いて式(1)の様に表すことが出来る。

$$\rho_{\text{total}}(x,y,z;\xi) = \rho_{\text{protein+lipid}}(x,y,z) + \langle \rho_{\text{solvent}} \rangle(\xi) P_{\text{ex}}(x,y,z) \quad \text{---(1)}$$

各 Nycodenz 濃度における電子密度分布 $\rho_{\text{total}}(x,y,z;\xi)$ を溶媒の平均電子密度 $\langle \rho_{\text{solvent}} \rangle(\xi)$ をパラメータとする連立方程式(式 1)を最小二乗法で解き $P_{\text{ex}}(x,y,z)$ を求めた。次に蛋白質領域では $P_{\text{ex}}(x,y,z)=0$ 、溶媒領域では $P_{\text{ex}}(x,y,z)=1$ とする修正(平滑化)を行った。

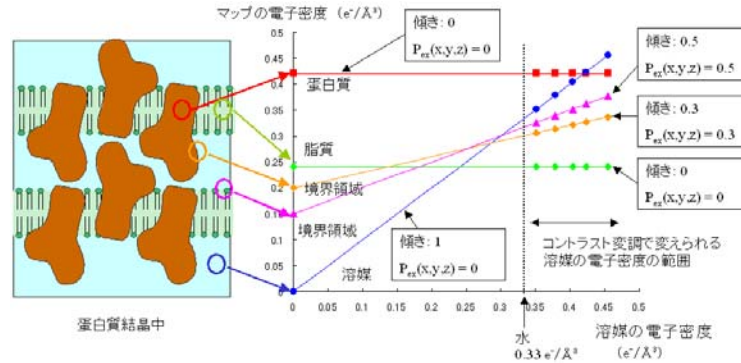


図 3 蛋白質結晶中における溶媒置換率の分布

(4) 脂質二重膜の電子密度 $\rho_{\text{lipid}}(x,y,z)$ を得る手順

(3)で得た $P_{\text{ex}}(x,y,z)$ を用い、脂質二重膜+蛋白質のモデル $\rho_{\text{protein+lipid}}(x,y,z)$ を、Nycodenz 0% のマップ $\rho_{\text{total}}(x,y,z;0)$ から、溶媒の電子密度分布 $\langle \rho_{\text{solvent}} \rangle(0) P_{\text{ex}}(x,y,z)$ を引き算することにより得た(図 4 上)。また、脂質二重膜の電子密度 $\rho_{\text{lipid}}(x,y,z)$ は、 $\rho_{\text{protein+lipid}}(x,y,z)$ から蛋白質の電子密度分布 $\rho_{\text{protein}}(x,y,z)$ を引き算することにより得た(図 4 下)。 $\rho_{\text{protein+lipid}}(x,y,z)$ の蛋白質のファンデルワールス半径内の電子密度分布を蛋白質の原子モデルから得られる電子密度分布に置換を行った。(3)で得られた溶媒のモデル $\langle \rho_{\text{solvent}} \rangle(\xi) P_{\text{ex}}(x,y,z)$ と脂質二重膜+蛋白質のモデル $\rho_{\text{protein+lipid}}(x,y,z)$ を用いて再度 $\rho_{\text{total}}(x,y,z;\xi)$ を計算し(3)にもどる反復を行い、 $P_{\text{ex}}(x,y,z)$ の精密化を行った。

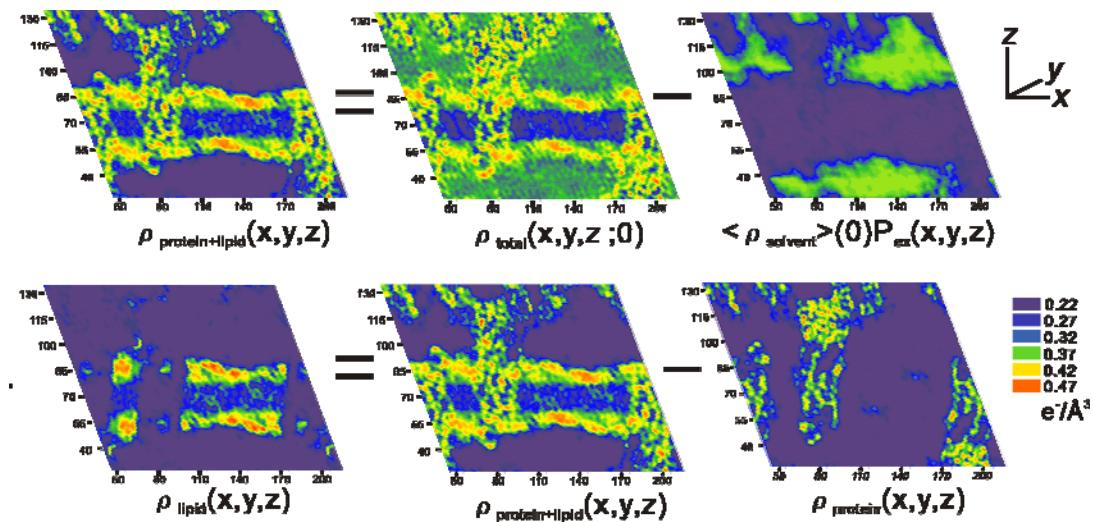


図 4 溶媒置換率 $P_{\text{ex}}(x,y,z)$ を用いて、脂質二重膜の電子密度 $\rho_{\text{lipid}}(x,y,z)$ を得る手順。E2·AlF₄⁻(E2~P 相当)結晶構造の一断面の電子密度分布。横軸、縦軸の単位 Å。

(5) 結果

得られた溶媒と脂質二重膜のモデルを検証するために R と R_{cullis} を計算した。 R_{cullis} は、実験データとモデルから計算される異常分散効果の不一致度を示し、位相の確からしさの指標となり、 R とは独立した量である。両値とも精密化の循環数が増えるにつれて顕著に改善しており、得られた構造は確からしいことが分かった。その結果、図6に示すように脂質二重膜は、蛋白質の動きと共に構造が変化することが明らかになった。さらに、溶媒置換率のマップ(図7)から、Nycodenz 分子は $E1 \cdot 2Ca^{2+}$ 結晶では膜貫通領域に結合した Ca^{2+} のごく近傍まで接近できるが、 $E2$ 結晶では、細胞質側と内腔側どちらからも膜貫通領域に入り込めないことが明らかになった。

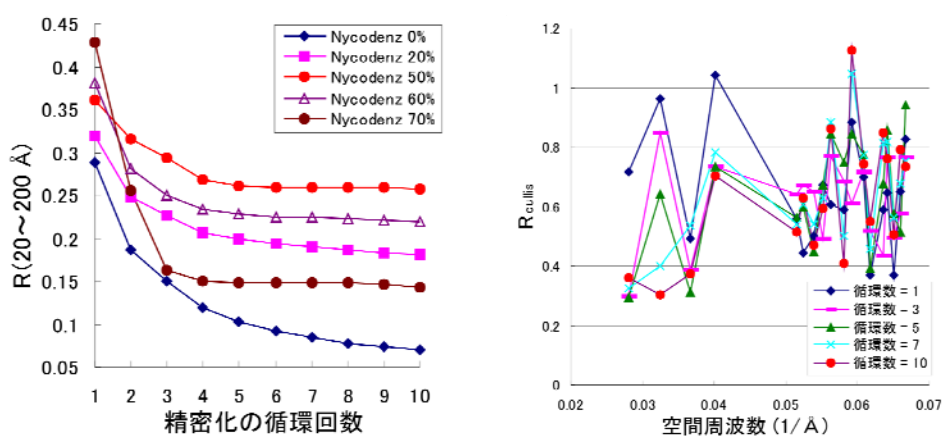


図5 溶媒と脂質二重膜の精密化過程における R (左)と Nycodenz 70%の回折振幅を用いて求められた R_{cullis} (右)の変遷($E2 \cdot AlF_4$)。

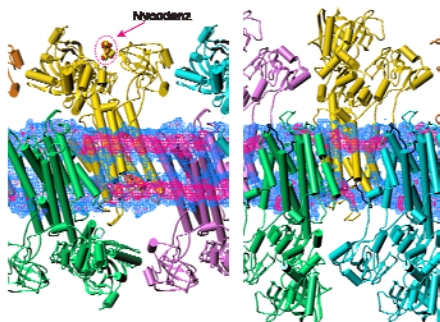


図6 $E1 \cdot 2Ca^{2+}$ (左)と $E2$ (右) の脂質二重膜の電子密度マップ
青 1.7 \AA 赤 2.2 \AA

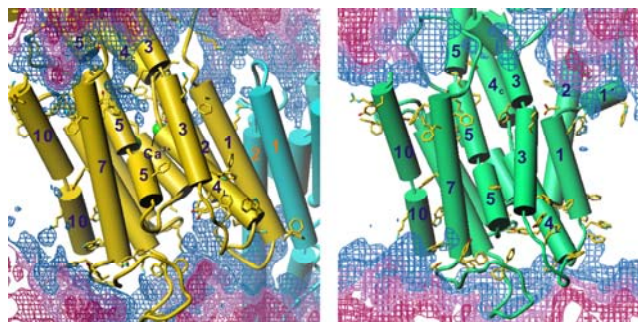


図7 $E1 \cdot 2Ca^{2+}$ (左) と $E2$ (右)の溶媒置換率のマップ
— 30% — 60% — 90%

(6) まとめ

コントラスト変調法に溶媒置換率という概念を導入し、制限を課すことによって膜蛋白質結晶中の脂質二重膜の可視化に成功した。脂質二重膜は、蛋白質と連動して動く動的なものであることも明らかになった。また、この方法は、solvent accessibility の直接的な測定手法を提供するので、膜蛋白質の構造研究に大いに役立つと考えられる。