

生物物理特集

放射光でみる  
F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素  $\alpha_3\beta_3$  複合体の  
散逸構造  
時分割X線小角散乱法による解析

佐藤 衛

大阪大学 蛋白質研究所

**A Dissipative Structure of F<sub>1</sub>-ATP Synthase  $\alpha_3\beta_3$  Complex****Analysis by Time-resolved Small-angle X-ray Scattering  
Using Synchrotron Radiation****Mamoru SATO**

Institute for Protein Research, Osaka University

An excited  $\alpha_3\beta_3$  hexamer of F<sub>1</sub>-ATP synthase that hydrolyses ATP to ADP and P<sub>i</sub> has been observed by time-resolved small-angle X-ray scattering experiments using synchrotron radiation and stopped-flow mixing chamber. Observations reveal for the first time, that a steady state of the excited hexamer is maintained during the course of ATP hydrolysis until all the ATP added are converted to ADP when the hexamer complex was mixed with ATP. In contrast, when the  $\alpha_3\beta_3$  hexamer is mixed with ADP, the hexamer dissociates into three  $\alpha_3\beta_3$  dimers following a simple dissociation reaction kinetics. Moreover, these hetero-dimer re-associate to reconstitute the hexamer upon their further mixing with ATP. These results are successfully analyzed by a non-linear chemical dynamics with the presence of a dissipative structure as a model for the excited  $\alpha_3\beta_3$  hexamer.

## 1. はじめに

ATP合成酵素は、動植物の呼吸を司るミトコンドリアの内膜や光合成を行なう葉緑体のチラコイド膜あるいは細菌の形質膜内に普遍的に存在する膜蛋白質である。これらの膜にはいずれも生体の主要な酸化還元系である電子伝達系が含まれているため、酸化還元エネルギーが何らかの形でATPの合成に使われる酵素系が存在することが示唆されていた。Mitchellはこの点に注目し、酸化還元エネルギーが膜の内外に $H^+$ を移動させて $H^+$ の電気化学ポテンシャルに変換されると考え、このエネルギーを使ってATPを合成するATP合成酵素が膜中に存在すると予言した<sup>1)</sup>。この酵素は、ミトコンドリア内膜から香川らによって始めて可溶化され<sup>2)</sup>、再構成小胞膜に再構成するとMitchellが予言したように $H^+$ の輸送とATPの合成・分解反応が生じることが実証された<sup>3)</sup>。

ATP合成酵素の基本構造は、 $F_1$ 部分と $F_0$ 部分に大別される。 $F_0$ 部分は、膜内に存在して主として $H^+$ の輸送( $H^+$ チャネル)に携わる膜固有蛋白質部分である。一方、ATPの合成や分解反応を触媒する活性部位は $F_1$ 部分に存在する。 $F_1$ は $F_0$ 部分と疎水結合して膜外に突出した可溶性の部分で、電子顕微鏡で容易に観察される。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ の5種類のサブユニットで構成され、それらが $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ の形で集合した複合体を形成している。これらのサブユニットは、遺伝子工学的手法を使ってそれぞれのサブユニットをコードしてい

る遺伝子がクローニングされ、一次構造も明らかにされている(表1)<sup>4)</sup>。ATP合成酵素は、膜内外の電気化学ポテンシャルを利用してATP合成反応を触媒するため、膜系が閉じられた小胞構造を持たないとATPは合成されずに逆反応であるATPの分解が進行してエネルギーが放出される。このエネルギー放出を伴うATPの分解反応は、ATP合成酵素の $F_1$ 部分、特にその中でも $\alpha_3\beta_3$ 複合体部分で触媒され、また、表1からも明らかのように、 $F_1$ の大部分が $\alpha_3\beta_3$ 複合体で構成されているので、ATP合成酵素( $F_1F_0$ )の機能は $\alpha_3\beta_3$ 複合体に集約される。

一方、X線小角散乱法は、試料溶液にX線を照射し入射X線近傍に散乱されるX線の角度分布から溶質分子の構造に関する情報を得る方法で<sup>5)</sup>、構造研究の手段としては古典的な方法である。対象を蛋白質に代表される溶液中の生体高分子に限れば、分子形態、慣性半径、水和体積、分子量といった生体高分子の形態的な構造情報が得られ、X線結晶解析法や分光学的な手法に比べ低分解能の分子構造情報が比較的容易に得られるのが特徴である。X線結晶解析法から得られる原子レベルの詳細な構造情報と比べると得られる構造情報は少ないものの、溶液状態にある試料を取り扱うためにin vivoの系をin vitroで容易に再現できる。さらに、近年、放射光に代表される強力なX線源が実用化され、時間軸を変数とした測定(時分割測定)が現実化されたことはX線小角散乱法の有用性を飛躍的に高める結果となった。生体高分子は、機能発現時の動的構造がその機能に深く関与しているので、時分割X線小角散乱測定から得られる動的な構造情報は、生体高分子の構造と機能の理解をより一層深めるものと大いに期待される。特に、ATP合成酵素の $\alpha_3\beta_3$ 複合体は、クローニングされた各サブユニットの遺伝子がそれぞれ単独に大腸菌等で発現され、しかも、上記の化学量論比で混合することにより $\alpha_3\beta_3$ 複合体を容易に再構成できるために<sup>6)</sup>、X線小角散乱法によ

Table 1 Subunits of  $F_1$ -ATP Synthase from Thermophilic Bacterium PS3

Subunit	Mol / $F_1$	Molecular weight	Amino acid residues
$\alpha$	3	54589.89	502
$\beta$	3	51937.58	473
$\gamma$	1	31706.30	286
$\delta$	1	19657.31	179
$\epsilon$	1	14333.46	132

る構造解析に適した測定系であると言えよう。

このような観点から、本稿では、ATP合成酵素のサブユニット複合体 $\alpha_3\beta_3$ に焦点をあて、時分割X線小角散乱法の紹介を交えながら、ATP分解に伴う $\alpha_3\beta_3$ 複合体の動的構造について簡単に述べてみたい。

## 2. 時分割X線小角散乱法

### 2.1 理論

時分割X線小角散乱法は、それぞれの時間における溶質分子の構造情報を得るために、散乱強度データを時間軸を変数にして収集していく方法である。X線小角散乱法の詳細はすぐれた成書があるので<sup>7, 8)</sup>それを参照していただきたくとして、ここでは、通常の時分割X線小角散乱法による構造解析に必要な部分のみを述べることにする。

X線は物質を構成する電子と相互作用して散乱する。試料を溶液に限定すると、溶液中の溶質分子(生体高分子)は溶媒と水和して存在しているために、溶質分子からのX線散乱は溶質と溶媒の電子密度差( $\Delta\rho(r, \rho_s)$ ,  $\rho_s$ は溶媒の電子密度)に基づく。いま、溶質分子間で散乱X線が互いに干渉しない均一な希薄溶液系を考えると、このような系では一つの溶質分子からの散乱のみを考慮すればよく、入射X線に対して散乱角 $2\theta$ 方向に散乱されるX線の散乱強度は、次式で与えられる。

$$I(q) = \int 4\pi^2 \gamma(r, \rho_s) \cdot \sin(r, q) / (r \cdot q) dr \dots \dots \quad (1)$$

ここで、 $q = 4\pi \sin\theta / \lambda$  ( $\lambda$ : X線の波長),  $\gamma(r, \rho_s)$  は、 $\Delta\rho(r, \rho_s)$ の自己相関関数である。ここで、低角領域( $q$ が小)に散乱されるX線のみを考えると、(1)式は、以下のように簡略化されて、溶質分子の重要な構造パラメータである分子の慣性半径 $R_g$ や水和体積 $V$ が求まる。

$$I(q) \doteq V^2 (\rho - \rho_s)^2 \cdot \exp[-R_g^2 \cdot q^2 / 3] \quad (2)$$

$$V^2 = I(0) \cdot (\rho - \rho_s)^{-2}$$

$\rho$ は、溶質分子の平均電子密度、 $I(0)$ は、 $q = 0.0$ (散乱角 $0.0^\circ$ )での散乱強度である。通常、 $R_g$ と $V$ は、(1)式の両辺の対数を取り、 $q^2$ に対してプロット(ギニエプロット)してその直線の傾きと切片から算出される。また、溶質分子内で電子密度の揺らぎが小さく無視できる場合は、(1)式は(3)式で表され、溶質分子の形態(形状)に関する情報が得られる。

$$I(q) = k \cdot (\rho - \rho_s)^2 I_V(q) \quad (3)$$

$k$ は定数で、入射X線強度や溶質濃度などに依存する。 $I_V(q)$ は溶質分子の形状関数で、種々の形状(分子形態)の $I_V(q)$ を理論的に計算して実測の $I(q)$ に一致させる(後述3.1および図3, 図4参照)。

時分割X線小角散乱法は、このような構造情報を時分割的に収集し、溶質分子の動的な構造変化を解析していく方法で、放射光利用が可能になって始めて現実化されたといっても過言ではない。特に、(2)式が成立する低角領域の散乱強度は強いために、 $R_g$ と $V$ は短時間の測定で比較的精度よく求まり、高速な生体内反応を追跡するのに格好な構造パラメータとなる。

### 2.2 測定装置

一般に、溶液中の生体高分子は、①他の分子やイオン種、②pH、③イオン強度、④温度といった化学的および物理的な環境変化に応答してさまざまな挙動を示す。特に、分子構造変化はX線小角散乱法にとって格好の測定挙動で、機能発現時の動的挙動の解明は、そのまま機能解明に通じる。実験的にこのような環境変化を再現させる装置として、時分割X線小角散乱法では、ストップフロー法による二液混合装置やフロー熱交換法によ

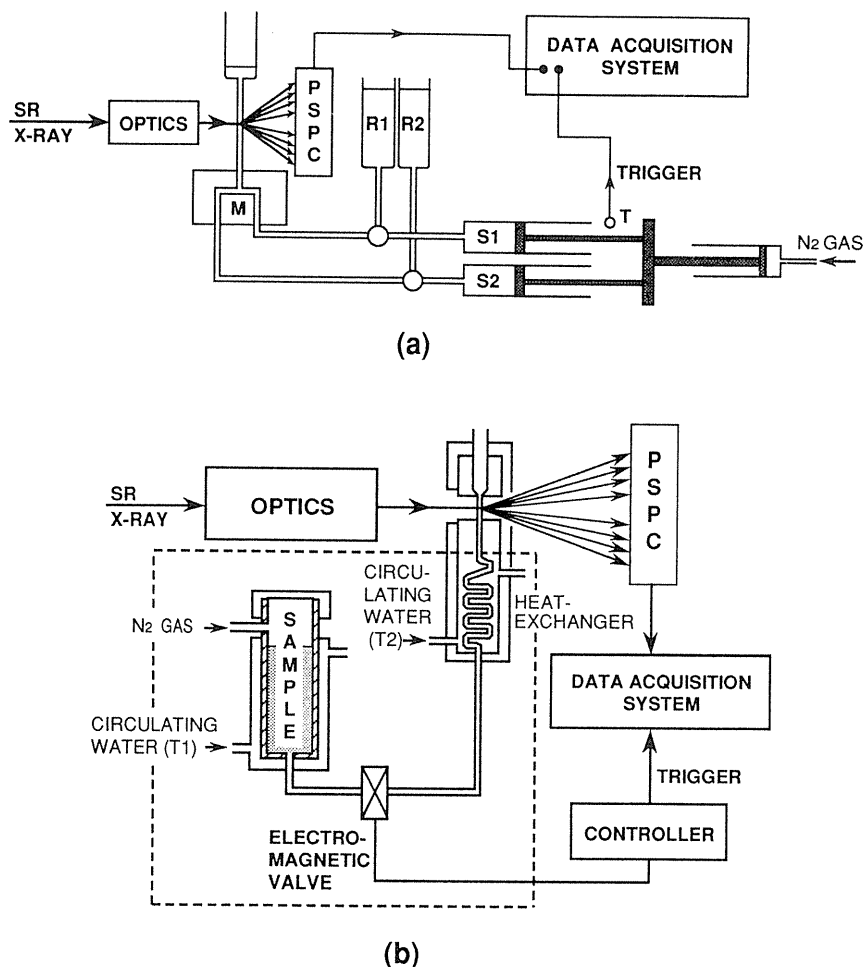


Fig.1 Outline of (a) the stopped-flow mixing apparatus and (b) the temperature-jump apparatus installed in the Photon Factory, National Laboratory for High Energy Physics, Tsukuba.

る温度ジャンプ装置が使われる。前者は、①～③の主として化学的な環境の変化に、また、後者の装置は、④の物理的な環境変化に対する応答実験に適し、それぞれ、容易にX線小角散乱測定装置に組み込まれるようコンパクトに設計されている(図1)。高エネルギー物理学研究所放射光実験施設(PF)では、ビームライン10Cに設置されている酵素回折計やビームライン15Aの筋肉回折計に組み込まれ、広く生体内諸反応の時分割測定に利用されている<sup>9)</sup>。

ストップフロー装置では(図1-(a))<sup>10)</sup>、R1とR2の溶液は、窒素圧を利用してシリンダー(S1, S2)を作動させそれぞれミキサー部(M)で均一に混合されて測定部に送られる。混合され

たときが反応の開始点である。実際には混合液が測定部に送られるのに一定時間を要するので、dead timeが生じる(本装置の場合約10ミリ秒)<sup>11)</sup>。測定では、R1に試料溶液を入れ、R2に①～③を挙げた環境変化を引き起こす溶液を入れて反応を開始させる。一方、図1-(b)は温度ジャンプ装置の一例を示している<sup>12)</sup>。一定温度(T1)に保たれた試料溶液を、熱交換器を通して瞬時に目的の温度(T2)にジャンプさせ測定部に転送して測定を始める。Dead timeは、T1とT2に依存するので、熱交換器の性能が温度ジャンプ装置の性能を大きく左右する。溶液の温度をいかに短時間で直線的に目的の温度(T2)にするかがポイントである。実験では、温度ジャンプ装置を使って、T1か

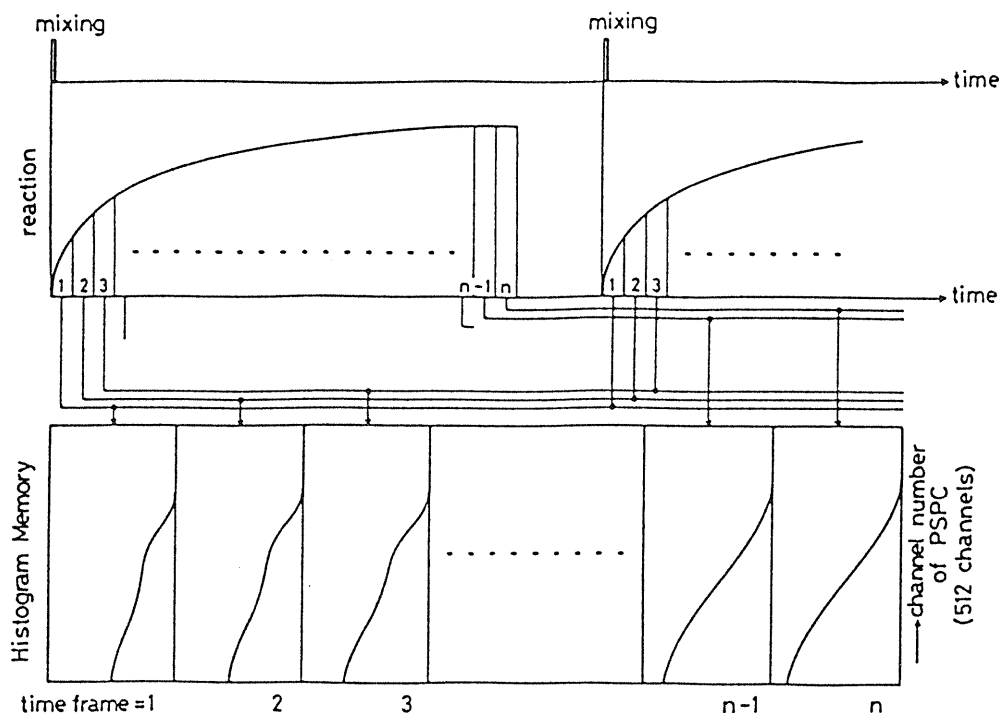


Fig.2 A data-acquisition scheme for time-resolved small-angle X-ray scattering. The small-angle scattering intensities are recorded in 512 channels of histogram memories according to the reaction time. A total of 96 time frames can be recorded in a single experiment.

ら T2 に温度が変化する過程で生じる生体高分子の挙動を時分割測定する。

### 2.3 測定原理

図 2 に、時分割小角散乱データを収集する基本的な流れを示す<sup>10)</sup>。図では、上半分に反応を進行状況を、下半分に対応する小角散乱データのメモリアドレスを示している。また、上下を結ぶ実線は、反応開始(mixing)直後からある一定時間ごとに測定される小角散乱強度とメモリーに登録されるアドレスとを関係づけている。時間分解能を高めると散乱強度の S/N が悪くなるので、通常、同様の測定を複数回繰り返し散乱強度を加算して S/N を向上させる。したがって、時分割小角散乱測定に使用するストップフロー装置や温度ジャンプ装置は、繰り返し測定を考慮して充分量の溶液が保存できるように設計されている。

### 3. $F_1$ -ATP合成酵素 $\alpha_3\beta_3$ 複合体の構造研究

#### 3.1 $F_1$ -ATP合成酵素 $\alpha_3\beta_3$ および $\alpha_3\beta_3$ 複合体の静的な構造

前述のように、 $F_1$ -ATP合成酵素  $\alpha_3\beta_3$  複合体の  $\alpha$ -および  $\beta$ -サブユニットの遺伝子は、それぞれ大腸菌にクローニングされ発現系も確立している。また、好熱菌由来の  $F_1$ -ATP合成酵素では、各サブユニットを等モル混合すると  $\alpha_3\beta_3$  複合体を再構成でき、X線小角散乱実験に適した要素を兼ね備えている。実験に用いた試料は、このようにして調製したものを使用したが、予備的な X線小角散乱実験を実験室系の X線源を使って<sup>13)</sup>行なってみると、再構成は当初それほど容易なものではなかった。 $\alpha_3\beta_3$  複合体は  $F_1$ -ATP合成酵素と異なり  $\gamma$ -サブユニットが欠如しているために、 $\alpha$ -サブユニットと  $\beta$ -サブユニットを等モル混合しても完全に再構成されず、 $\alpha_3\beta_3 \rightleftharpoons 3\alpha\beta$  の平衡の

もと溶液が二成分系を呈することが判明した。この平衡は、種々の溶媒系を検討した結果、 $\text{SO}_4^{2-}$ イオンを溶液に0.1M程度加えることにより $\text{SO}_4^{2-}$ イオンのアンチカオトロピック効果を利用して回避され、完全な形で $\alpha_3\beta_3$ 複合体を再構成することに成功した<sup>5)</sup>。

本実験は、0.1M  $\text{SO}_4^{2-}$ イオン存在下、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体および基質ATP、生成物ADP、 $\text{P}_i$ の存在・非存在下の種々の条件のもとで行なった。その結果、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体は、ATPやADPが存在すると $\alpha_1\beta_1$ の二量体( $R_g = 34.7 \pm 0.2 \text{ \AA}$ )に解離し、その

他の条件では、 $\alpha_3\beta_3$ ( $R_g = 45.4 \pm 0.2 \text{ \AA}$ )の六量体のまま存在することがわかった。次に、(3)式により、種々のモデルの $I_V(q)$ を理論的に計算し、実測の $I(q)$ と比較して $\alpha_3\beta_3$ および $\alpha_1\beta_1$ 複合体の構造モデルを構築した<sup>14)</sup>。その一例を図3と図4に示す。図中の $\alpha$ および $\beta$ -サブユニットを表す楕円体モデルは、 $\alpha$ および $\beta$ -サブユニットについてそれぞれ単独にX線小角散乱測定を行い、複合体同様(3)式を使ってシミュレーションして得られた構造モデルである<sup>14)</sup>。図3および図4に示した結果は、 $\alpha$ -および $\beta$ -サブユニットが互いに結合

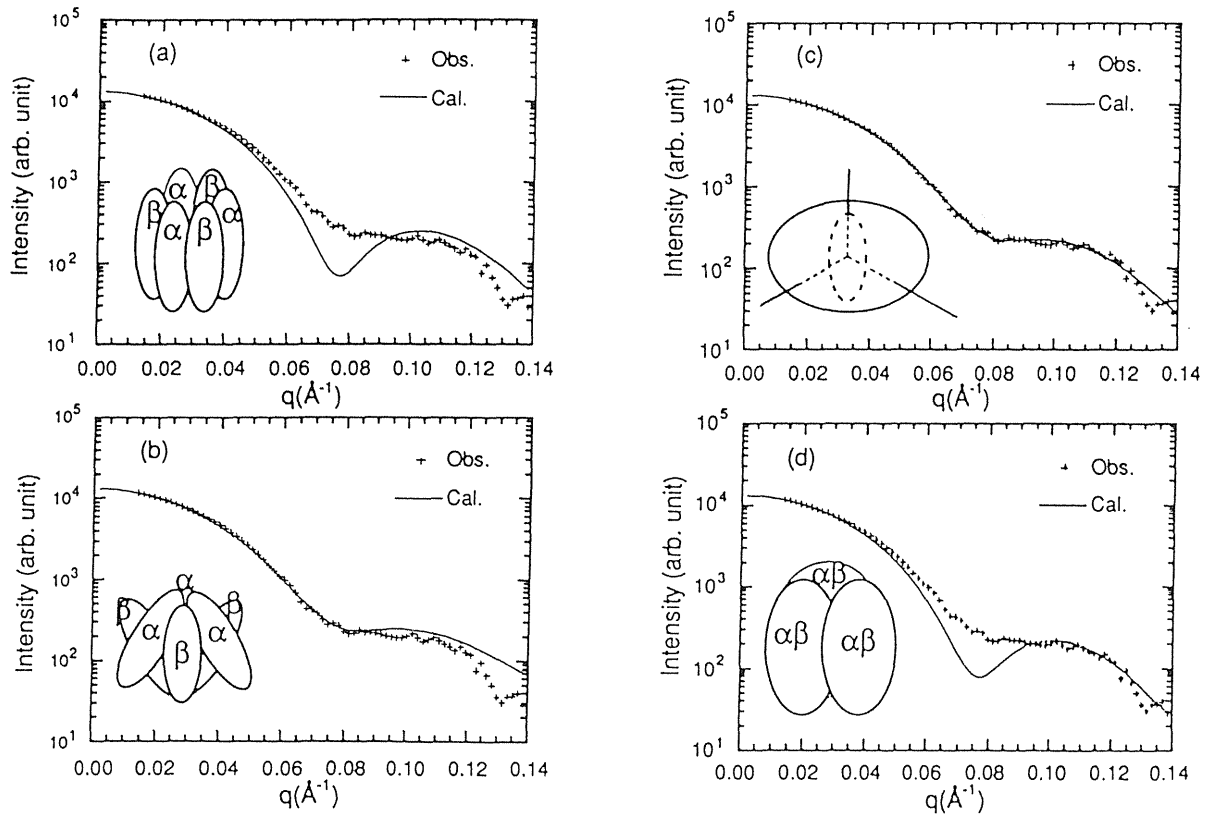


Fig.3 Comparison between the observed  $\alpha_3\beta_3$  complex and the calculated profiles from the following models. (a) subunit centers of mass were hexagonally arranged by  $\alpha$  and  $\beta$  ellipsoids with their symmetry axis parallel. (b) subunit centers of mass were hexagonally arranged by  $\alpha$  and  $\beta$  ellipsoids having a common tilt orientation angle of  $30^\circ$  with respect to the complex's symmetrical axis with the tilt orientation alternating between  $\alpha$  and  $\beta$ . (c) a model consists of one ellipsoid of revolution with an elliptical hollow cavity. (d) a model consists of three equal triaxial ellipsoids trigonally arranged with their c axis parallel, each ellipsoid representing an  $\alpha_1\beta_1$  dimer. The triaxial ellipsoid has an a axis of  $105.2 \text{ \AA}$ , b axis of  $39.4 \text{ \AA}$ , and c axis of  $108.2 \text{ \AA}$ . The  $\alpha$  subunit ellipsoid has a minor axis of  $40.8 \text{ \AA}$  and a major axis of  $106.0 \text{ \AA}$ ; the  $\beta$  subunit has a minor axis of  $40.0 \text{ \AA}$  and a major axis of  $112.0 \text{ \AA}$ .

して $\alpha_1\beta_1$ 二量体や $\alpha_3\beta_3$ 六量体を形成する際、各サブユニットに構造変化が生じることを示唆している。

### 3.2 $F_1$ -ATP合成酵素 $\alpha_3\beta_3$ 複合体の動的構造の追跡

前項の静的な構造解析から、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体がATPおよびADP存在下で $\alpha_1\beta_1$ に解離することが明らかにされたが、はたして両者の解離過程に有意な違いがあるだろうか？。ATP存在下では、ADP存在下と異なりATPの加水分解が起こりエネルギーが放出されるので、両者の解離過程に何らか

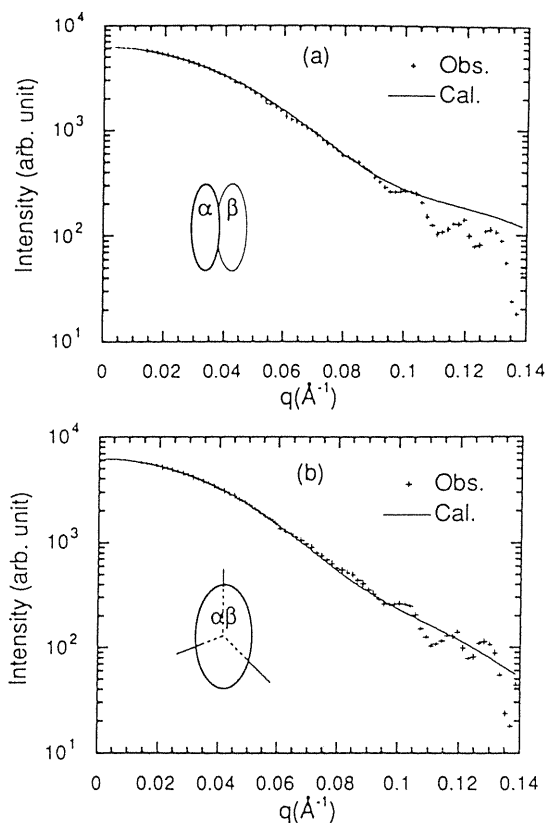


Fig.4 Comparison between the observed profile of the  $\alpha_1\beta_1$  complex and the calculated profiles from the following models. (a) two different ellipsoids of revolution representing the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits are aligned in parallel. The ellipsoid for the  $\alpha$  subunit has a minor axis of 40.8 Å and a major axis of 106.0 Å; for the  $\beta$  subunit a minor axis of 40.0 Å and a major axis of 112.0 Å, with a 40.4-Å distance between the subunits. (b) triaxial ellipsoid with axes of 105.2 Å, 39.4 Å, and 108.2 Å.

の違いが認められる可能性が示唆される。このようなことから、ATPおよびADP存在下での $\alpha_3\beta_3$ 複合体の解離過程を時分割X線小角散乱法で追跡してみた<sup>15)</sup>。測定は、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設に設置されている筋肉回折計(ビームライン15A)にストップフロー混合装置<sup>11)</sup>をセットして行なった。実験では、ストップフロー装置のR1に再構成されたATP合成酵素 $\alpha_3\beta_3$ 複合体溶液を満たしR2にATPまたはADP溶液を入れて、温度13°Cで反応を開始させた。その後、一秒おきに小角散乱強度を測定し、96秒間にわたって複合体酵素の挙動を追跡した。

図5および図6は、(2)式を使って複合体分子の慣性半径 $R_g$ および $I(0)$ を計算し、その時間変化をプロットしたものである。この図をみると、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体酵素とATPの反応では(図5)、両パラメーターともに反応直後に有意な変化が認められない時間帯(プラトーな時間帯)が現われ、その後、反応の進行とともに両パラメーターが減少する傾向が観測されている。ところが、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体酵素とADPの反応では(図6)、ATPとの反応でみられたプラトーな時間帯は観測されず、反応直後からただちに両パラメーターが減少する傾向が現われている。ATPとの反応で観測されたプラトーな時間帯は、ATP濃度に比例してその持続時間が長くなるので、さらに $\alpha_3\beta_3$ 複合体酵素とATPの反応系を再現しATP消費量を生化学的に分析したところ(図7)、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体酵素とATPの反応系で現われたプラトーな時間帯では、酵素が $\alpha_3\beta_3$ の六量体を保持しながらATPを分解してエネルギーを放出していることが示された。

### 3.3 $F_1$ -ATP合成酵素 $\alpha_3\beta_3$ 複合体の動的構造の解析—散逸構造モデル

$F_1$ -ATP合成酵素 $\alpha_3\beta_3$ 複合体とATPの反応を時分割X線小角散乱法で追跡した結果、 $\alpha_3\beta_3$ 複合体酵素が $\alpha_3\beta_3$ の六量体を保持しながらATPを分解する過程を捉えることができた。本項では、この





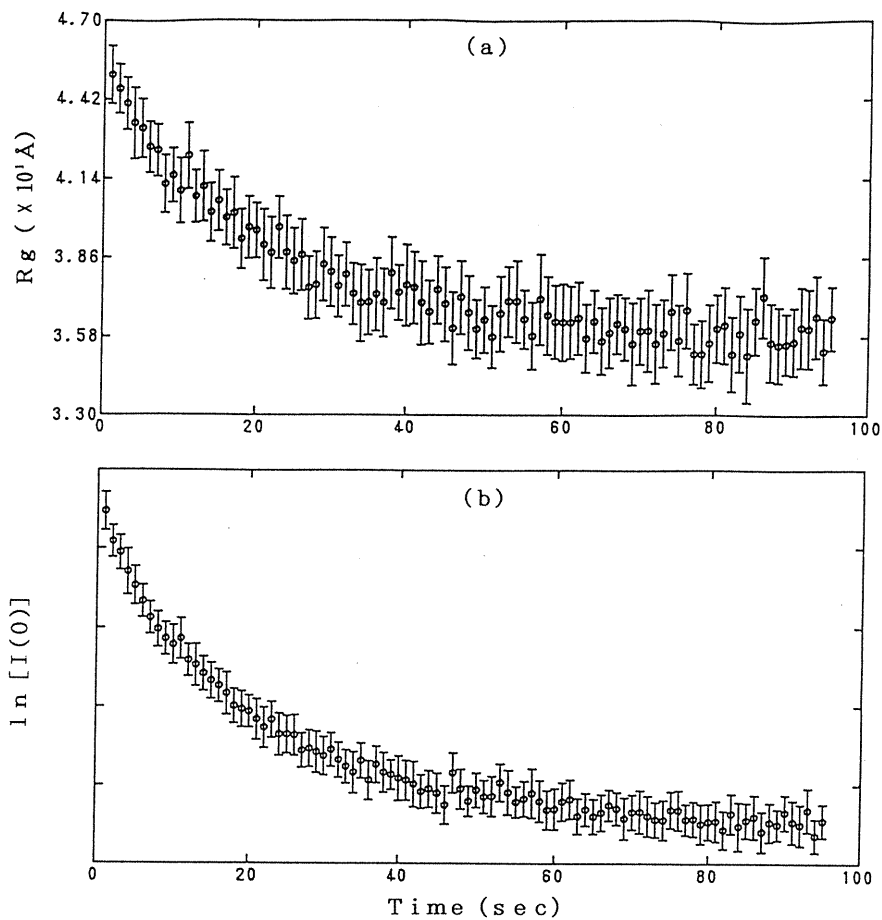


Fig.6 Time courses of (a) radius of gyration  $R_g$  and (b) zero-angle scattering intensity  $I(0)$  for the reaction of  $\alpha_3\beta_3$  complex (0.03 mM) with ADP (1 mM). Error bar is drawn by  $3\sigma$ , where the  $\sigma$  is the standard deviation estimated from the least-squares method.

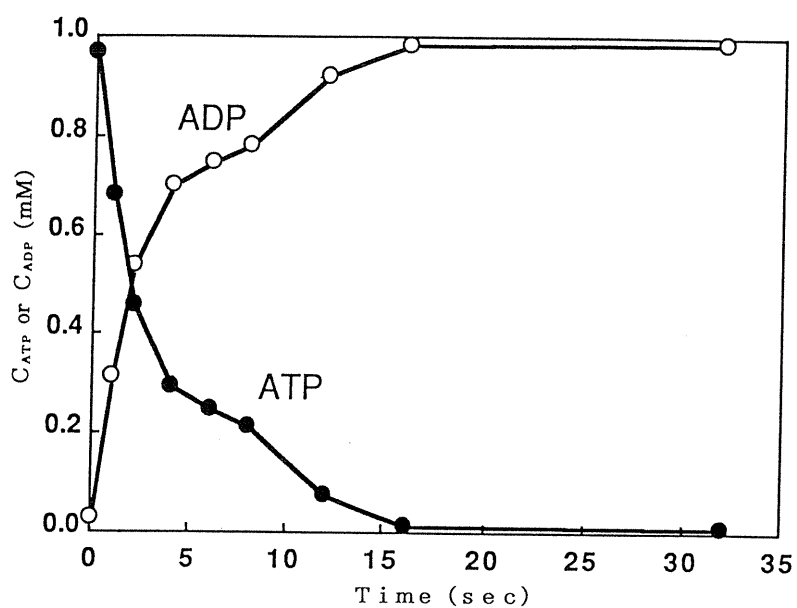


Fig.7 Time courses of ATP concentration  $C_{ATP}$  and ADP concentration  $C_{ADP}$  for the reaction of  $\alpha_3\beta_3$  complex (0.03 mM) with ATP (1 mM).

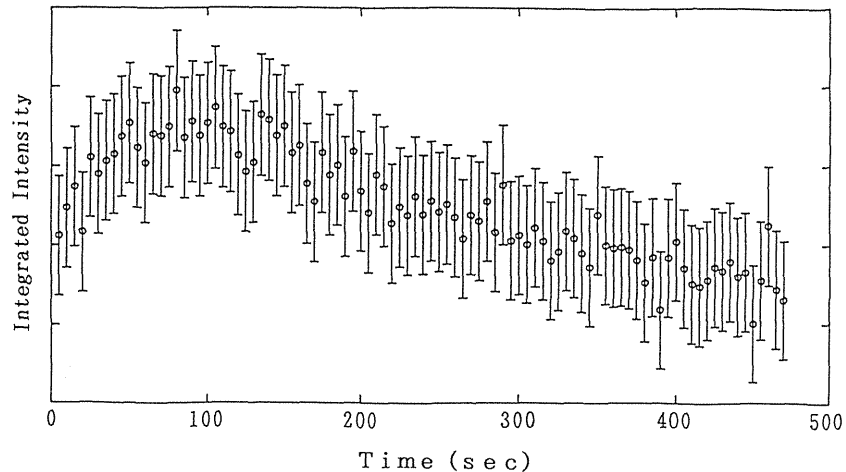


Fig.8 Time course of background-subtracted intensities, integrated over 512 channels of histogram memories in a position-sensitive proportional counter, for the reaction of  $\alpha_1\beta_1$  complex (0.09 mM) in the presence of ADP (1 mM) with ATP (1 mM). Error bar is drawn by  $3\sigma$ , where the  $\sigma$  is the standard deviation estimated from counting statistics.

いるのか、次式で表されるモデルシミュレーションで検討してみる。

$$dC_H/dt = -k_1 C_H C_{ADP} + k_2 C_D^3 C_{ADP} + k_3 C_H C_{ATP} + k_4 C_D^3 C_{ATP} \quad (6)$$

$$dC_{ATP}/dt = -k' C_H C_{ATP} \quad (7)$$

上式の  $C_H$ ,  $C_D$ ,  $C_{ATP}$ ,  $C_{ADP}$  は、それぞれ  $\alpha_3\beta_3$  複合体,  $\alpha_1\beta_1$  複合体, ATP, ADP の濃度である。(6)式の右辺の第一項および第二項は、(4)式の解離平衡を表わしている。第三項は、 $\alpha_3\beta_3$  複合体を保持する項で、 $\alpha_3\beta_3$ -ATP アナログ (AMP-PNP) 複合体の構造解析結果に基づいて導入された<sup>14)</sup>。第四項は、 $\alpha_3\beta_3$  複合体から解離した  $\alpha_1\beta_1$  複合体が ATP 存在下で再び  $\alpha_3\beta_3$  複合体に再会合する項で、図8に示すように、解離反応が終了した時点で系中に ATP を再添加して反応を追跡すると  $\alpha_1\beta_1$  複合体が  $\alpha_3\beta_3$  複合体に再会合する時分割測定結果に基づいている。 $C_H$ ,  $C_D$  を  $I(0)$  値から見積もり、(6)(7)式をそれぞれ図5、図7の実測データ

に対してシミュレートした結果が図9である。このように、ATP合成酵素のサブユニット複合体  $\alpha_3\beta_3$  は、系中に ATP が充分量存在する間は、主として(6)式の第四項により  $\alpha_3\beta_3$  複合体が六量体の散逸状態として保持されるが、加水分解が進行して系中の ADP 濃度が増加していくと  $\alpha_1\beta_1$  複合体に解離する。今後、ATP分解に伴う  $\alpha_3\beta_3$  複合体の動的な散逸構造の存在をさらに検証するために、中性子小角散乱実験を計画している。

#### 4. おわりに

以上、多少概略的ではあるが、時分割 X 線小角散乱の測定結果を通して、ATP分解に伴う ATP合成酵素  $\alpha_3\beta_3$  複合体の動的な散逸構造の存在を議論してきたが、上で述べたプラトーな時間帯をさらに長時間持続させることができれば、散逸状態にある複合体の構造を静的な解析と同様な方法で解析できるものと期待される。プラトーな時間帯は、系中の ATP 濃度に比例して持続時間が長くなるので、今後、ATP をリサイクルするシステムあるいは ATP を系中にたえず供給できるシステムを構築する必要がある。もちろん、さらに強力な X

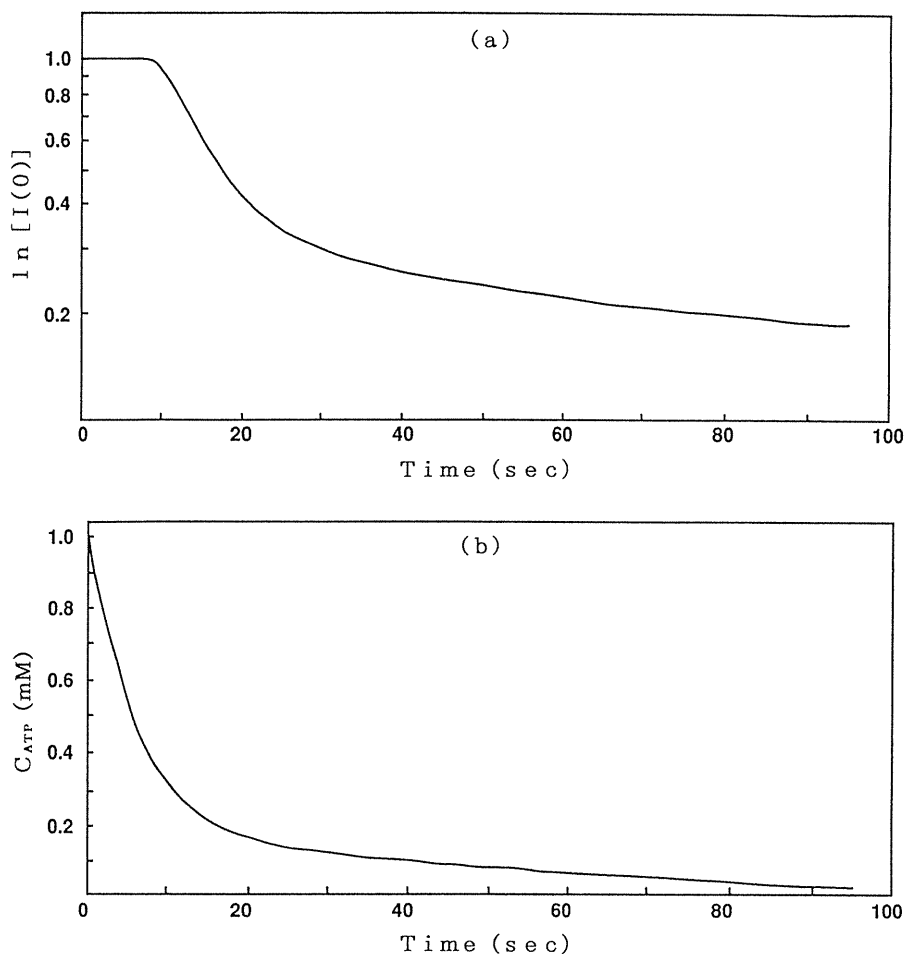


Fig.9 Time courses of (a) zero-angle scattering intensity  $I(0)$  and (b) ATP concentration  $C_{ATP}$  obtained from a non-linear chemical dynamics with the presence of a dissipative structure as a model for an excited  $\alpha_3\beta_3$  hexamer. The parameters for the best fitting in equations (6) and (7) are  $k_1=0.16 \text{ (mM}\cdot\text{sec)}^{-1}$ ,  $k_2=1.17 \text{ ((mM)}^3\cdot\text{sec)}^{-1}$ ,  $k_3=0.10 \text{ (mM}\cdot\text{sec)}^{-1}$ ,  $k_4=16.7 \text{ ((mM)}^3\cdot\text{sec)}^{-1}$ , and  $k'=3.03 \text{ (mM}\cdot\text{sec)}^{-1}$ .

線源が利用できれば問題は一挙に解決する。幸いなことに、次世代の大型放射光施設 (SPring-8) の建設も決まりその完成も間近と伝えられ、生体高分子の動的挙動の理解は時分割 X 線小角散乱測定を通して今後とも益々深まるものと期待される。入射 X 線強度の増大は、時間分解能の向上や実験に使用する生体試料の微量化にもつながり、大型放射光施設の早期実現が強く望まれる。一方、X 線結晶解析の分野においても、放射光の強力な白色光を利用してラウエ法により結晶中の蛋白質分子の動的挙動を解析する試みが放射光を利用して行なわれようとしている。しかしながら、昨年夏

に開催された BSR-92 では、ラウエ法による動的構造解析の問題点<sup>16)</sup>、例えば、①低分解能の回折強度が測定できないために電子密度が孤立化する、②基質と反応させると蛋白質結晶のモザイシティが増加し、ラウエパターンにストリークが生じて積分強度を正確に見積もれない、③反応の進行に伴い結晶中に反応物や生成物あるいは中間体が混在して平均構造しか得られず、真の動的構造変化を解析するにはこの平均構造をデコンボリュートして各構成成分に分離する方法を開発する必要があることなど、ラウエ法を用いて動的構造変化を解析する系に大きな制限があることが指摘

されている<sup>17)</sup>。このようなことから、溶媒組成や温度・圧力等を自由に変えて測定できる時分割X線小角散乱法の利点は大きく、遺伝子工学に代表される新しい生化学的手法の開発と共に今後益々その応用範囲が広がっていくものと期待している。

### 謝辞

本研究は、PF共同利用研究課題(91-070)のもと、多くの方々と共同で行なってきたものである。長期間にわたりご指導ご協力いただきました伊藤雄而(東大・物性研)、原田三男、木原 裕、香川靖雄(自治医大)、鶴田博嗣(スタンフォード大学)、若林克三(阪大・基礎工)、雨宮慶幸(KEK・PF)の各先生方に心より感謝の意を表します。また、ストップフロー装置および温度ジャンプ装置については、植木龍夫(理研)、終 弓 絃(京大・化研)の各先生方から貴重なご意見をお聞かせいただきました。この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

### 文献

- 1) P. Mitchell, *Nature* **191**, 144 (1961).
- 2) Y. Kagawa, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **241**, 2461, 2467, 2475 (1966).
- 3) Y. Kagawa, *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 29 (1972).
- 4) S. Ohta, M. Yohda, M. Ishizuka, H. Hirata, T. Hamamoto, Y. Otawara-Hamamoto, K. Matsuda, Y. Kagawa, *Biochim. Biophys. Acta* **933**, 141 (1988).
- 5) 佐藤 衛, 蛋白質 核酸 酵素 (共立出版) **35**, 2833 (1990).
- 6) M. Harada, S. Ohta, M. Sato, Y. Ito, Y. Kobayashi, N. Sone, T. Ohta, Y. Kagawa, *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 279 (1991).
- 7) A. Guinier, G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-Rays*, John-Wiley & Sons Inc., New York (1955).
- 8) O. Glatter, O. Kratky, *Small-Angle X-ray Scattering*, Academic Press Inc., London (1982).
- 9) 木原 裕, 鶴田博嗣, *生化学*, **60**, 1371 (1988).
- 10) T. Ueki, Y. Hiragi, M. Kataoka, Y. Inoko, Y. Amemiya, Y. Izumi, H. Tagawa, Y. Muroga, *Biophys. Chem.* **23**, 115 (1985).
- 11) H. Tsuruta, T. Nakamura, Z.-W. Wang, K. Kimura, Y. Igarashi, A. Kajita, Y. Amemiya, K. Wakabayashi, H. Kihara, *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 2356 (1989).
- 12) Y. Hiragi, H. Nakatani, K. Kajiwara, H. Inoue, Y. Sano, M. Kataoka, *Rev. Sci. Instrum.* **59**, 64 (1988).
- 13) M. Sato, M. Kato, N. Kasai, Y. Hata, N. Tanaka, M. Kakudo, M. Tanaka, T. Ozawa, *Biochem. International* **5**, 595 (1982).
- 14) M. Harada, Y. Ito, M. Sato, O. Aono, S. Ohta, Y. Kagawa, *J. Biol. Chem.* **266**, 11455 (1991).
- 15) M. Sato, Y. Ito, M. Harada, H. Kihara, H. Tsuruta, Y. Amemiya, K. Wakabayashi, *Photon Factory Activity Report* **9**, 268 (1991).
- 16) J. Hajdu, *Abstracts of the 4th International Conference on Biophysics and Synchrotron Radiation*, A5-06(1992).
- 17) 勝部幸輝, 日本の科学と技術 (日本科学技術振興財団 科学技術館), **30**, 51 (1989).