1E1730

バクテリオロドプシンの反応中間体の X 線結晶構造解析

○松井 耕宏¹、竹田 一旗²、佐藤 英憲¹、日野 智也¹、奥村 英夫¹、金森 英司¹、神谷 信夫²、足立 伸一²、飯塚 哲太郎²、神山 勉¹ (¹ 名大・理、² 理研)

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌に見出された膜蛋白質で、光エネルギーを利用してプロトンを細胞の内側から外側へと輸送する。このプロトン輸送サイクルにおいて 5 つの中間体 (K, L, M, N, O) が形成される。今回、M 中間体の構造解析について報告する。基底状態、および M 中間体についてそれぞれ 3 つの独立なデータを基に 2.5 Å 分解能での X 線結晶構造解析を行い計 6 つの立体構造を得た。それら全ての構造において 1 分子あたり 5 個の脂質分子が存在している。基底状態、M 中間体のそれぞれ同じ状態での 3 つのモデル間には高い相似性があり、基底状態と M 中間体の構造比較から M 中間体形成に伴った以下の構造変化が示された。

(1) G-helix が膜面に対して垂直に細胞外側へ約 0.34 Å スライドする (図参照)。(2) Lys216, Arg82, Glu194 などのプロトン輸送経路に沿ったいくつかの残基が大きく構造変化する。(3) Asp85 と Asp212 の間に位置していた水分子が見えなくなるなど、蛋白質内部における水分子の存在様式が変化する。(4) (1, 2, 3) に起因した、プロトン輸送経路に沿った水素結合ネットワークの様相の変化。年会では、以上の構造変化を基にプロトン輸送について議論する。

図：C α 原子による基底状態とM中間体のZ座標の比較。太線は各ヘリックスごとの平均変位。

Y. Matsui, K. Takeda, H. Sato, T. Hino, H. Okumura, E. Kanamori, N. Kamiya, S. Adachi, T. Iizuka, T. Kouyama : X-ray crystallographic study of bacteriorhodopsin's reaction intermediates

1E1800

アーキロドプシンの高次構造の形態変化の研究

○奥村 英夫、五藤 俊明、杉山 康雄、神山 勉 (名大・理)

アーキロドプシン (aR) は西オーストラリアで採取された高度好塩菌の細胞膜に見出された膜蛋白質である。バクテリオロドプシン (bR) と同様、光駆動プロトンポンプとして機能するが、色素としてレチナールの他にバクテリオルベリンも保有している。aR は細胞膜上で赤紫膜を形成しているが、我々のこれまでの研究から新鮮な赤紫膜は紫膜と同じように低イオン強度下でシート状構造として存在すること、赤紫膜を低イオン強度下で長期間保存するとシート状構造がチューブ状構造へと形態変化を起こすことが明らかにされている。今回、新鮮な赤紫膜の X 線回折像の解析を行い、2 次元結晶 (格子定数 $a=b=62.7$ Å) であることを明らかにした。これにより bR の 2 次元結晶と同様に aR 三量体が六方格子をつくっていることが示された。一方、細いチューブ構造の電顕像からチューブの太さが均一であることが示され、チューブ状構造においても特殊な周期構造を有することが示唆された。この形態変化を起こした aR サンプルの吸収スペクトルの測定データによるとレチナールによる吸収帯は保存されていたが、バクテリオルベリン由来の吸収帯が消失しておりバクテリオルベリンと膜の形態変化の関連性が示唆された。

H. Okumura, T. Gotoh, Y. Sugiyama, T. Kouyama : Morphological Change of the Higher Order Structure of Archaerhodopsin

1E1745

BR との融合による pSRII の 2 次元結晶化の試み

○手島 直哉、佐々木 純、徳永 史生 (阪大・院理・宇宙地球科学)

pSRII (pharaonis sensory rhodopsin II) は高度好塩好アルカリ性菌 *Na-tarobacterium pharaonis* の負の光走性に関与している光レセプタータンパク質で、レチナールを発色団として持ち 7 回膜貫通 α -ヘリックス構造をしている。pSRII はトランスデューサータンパク質である pHtrII と複合体形成し相互作用している。500nm 付近の光による pSRII の構造変化は pHtrII の構造変化として伝わり、その下流のリン酸化カスケードを調整して鞭毛モーターの回転方向を制御し、負の光走性を実現している。しかし、pSRII 及び pHtrII の立体構造はいまだ解明されていないので、光を吸収して起こる構造変化の様子やそれに伴う pHtrII との相互作用などの詳細はあまりわかっていない。一方で、類似のタンパク質であり光駆動のプロトンポンプとして働く BR (bacteriorhodopsin) はヘリックス間で相互作用し 3 量体を形成し、それが展開することで膜中で 2 次元結晶を形成している。そこで pSRII も BR と同様に 3 量体形成させることができれば 2 量体である pHtrII との複合体形成を利用して、この 3 量体を 2 次元平面上に展開させることが可能と考えた。pSRII を 3 量体形成させるために、BR の 3 量体形成にかかわるヘリックスを pSRII のものと置換したキメラタンパク質を作製する。既に B 及び D ヘリックスを BR のものと入れ替えたキメラタンパク質を得た。吸収スペクトル・CD スペクトルにわずかに違いが見られるが 3 量体を形成しているようには見えなかった。今後、融合する BR の割合を増やして確実に 3 量体を形成させ、さらに pHtrII との複合体形成による 2 次元結晶化を目指す。

N. Teshima, J. Sasaki, F. Tokunaga : An Attempt of 2-D Crystalization of pSRII by Hybridization of BR

1E1815

X 線溶液散乱法によるアレスチン会合状態の解析

○田村 千恵¹、今元 泰¹、上久保 裕生²、片岡 幹雄¹ (¹ 奈良先端大・物質創成、² 高工研・物構研)

動物の視覚において高い感度と広いダイナミックレンジを可能にしているメカニズムを解明するためには、光情報伝達系の機能的蛋白質の振る舞いを明らかにすることが不可欠である。今回我々は、リン酸化したロドプシンに結合して光情報伝達を遮断する蛋白質であるアレスチンの水溶液中での構造を、X 線溶液散乱法を用いて解析した。ウシ網膜より精製したアレスチンの X 線散乱プロファイル解析したところ、濃度あたりの原点散乱強度 $I(0)/C$ は、0.5mg/ml では 11400 であったが、11mg/ml では 41100 と濃度依存的に増加し、中点濃度は 2mg/ml であった。 $I(0)/C$ は分子量に比例することが知られているため、分子量が既知の蛋白質で $I(0)/C$ と分子量の関係を調べたところ、オボアルブミン (45kDa) では 9530、ウシ血清アルブミン (66kDa) では 16200 で、いずれも濃度依存性は見られなかった。このことからアレスチン (45kDa) は濃度によって単量体と四量体の平衡状態をとっていることが示された。

次に、アレスチンの会合がどのような作用によるのかを明らかにするため、塩濃度依存性を調べた。5mg/ml のアレスチン試料の NaCl 濃度を 20~500mM に調整し、同様に解析したところ、 $I(0)/C$ は 20mM NaCl で 40200 であったものが、500mM NaCl で 16800 と、塩濃度依存的な減少が見られ、中点濃度は 200mM であった。また温度依存性を調べたところ、4~30℃ではほぼ一定であった。このことからアレスチンの会合は静電的相互作用によるものであると推測される。四量体と単量体の平衡の中点濃度は、アレスチン、塩ともに生理条件に近いので、細胞内では単量体と四量体の平衡になっていると考えられる。

C. Tamura, Y. Imamoto, H. Kamikubo, M. Kataoka : Self-Association of Arrestin Studied by X-Ray Solution Scattering