3H1330

光捕集クロロフィル a/b 蛋白質複合体が形成する正二十面体の X 線結晶構造解析

○日野 智也¹、沈 建仁²、神山 勉¹ (¹ 名大院・理・物質理学、² 理研播磨)

我々は、当研究室により開発された、膜融合を利用した膜蛋白質の結晶化法の結晶成長機構を理解することを目的とし、光捕集クロロフィル a/b 蛋白質複合体 (LHC-II) を試料として用い、融合の前段階である膜小胞の構造を解析してきた。これまでに、LHC-II の膜小胞からなる結晶を作成し、電子顕微鏡及び X 線結晶解析により、この膜小胞は正二十面体対称性を持つことを明らかにした。今回は、9.5 Å 分解能での X 線結晶構造解析の結果について報告する。

Kühlbrandt らにより報告されている LHC-II 三量体の分子モデルを用いた分子置換法により、分解能が 20-9.5 Å の範囲で、R-factor が 39.7% となる正二十面体モデルを得ることができた。しかし、20 Å より低分解能では R-factor が高かった。結晶化母液には 40%(wt/vol) の Xylitol が含まれており、溶媒部分の電子密度が蛋白質の電子密度に近いこと、さらに、結晶化中に含まれる脂質は蛋白質と溶媒の電子密度より低いことから、低分解能では、脂質の構造因子への寄与が大きいことが考えられた。そこで、脂質及び蛋白質を球殻として、内径外形をそれぞれ変化させ、2つの球殻の重ねあわせにより得られる構造因子と、観測された構造因子を比較した。その結果、196-50 Å の分解能範囲において、観測値とよく一致する脂質及び蛋白質の球殻モデルを見出すことができた。現在、さらに精密なモデルを作成し、これを初期位相として、非結晶学的な 5 つの分子の平均化による位相の改良、拡張及び detwin の操作を行うことで 9.5 Å 分解能での、LHC-II - 脂質複合体の電子密度マップを作成中である。

T. Hino, J-R. Shen and T. Koyama : X-ray crystallographic study of the icosahedral assembly of light-harvesting chlorophyll a/b protein complex

3H1400

高度好塩菌 *Halorubrum sp. Aus-1* 由来のアーキロドプシンの X 線結晶構造解析

○江波 信生、奥村 英夫、神山 勉 (名大・院理)

アーキロドプシン (aR-1) は高度好塩菌 *Halorubrum sp. Aus-1* 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部から外部へと輸送する。類似蛋白質であるバクテリオロドプシン (bR) と同様、3 量体が六方格子状に集合し、生理的条件下で 2 次元結晶を形成する。bR と aR-1 との一次構造の相同性は 60% であるが、aR-1 は好塩菌特有のカロチノイド、バクテリオルベリンを含んでいるという大きな相違点がある。アーキロドプシンの三次元結晶化は沈殿剤として硫酸、界面活性剤としてオクチルチオグルコシド、添加剤として heptanetriol を用い、蒸気拡散法にて行い、八面体の結晶 (0.15x0.15x0.1mm³) を得た。直線二色性の測定から、結晶の 4 回軸と垂直方向にレチナールの吸収双極子が向いていることが明らかになった。SPRing-8・BL41XU にて低温 X 線回折実験を行い、分解能 3.5 Å の回折データを収集した。消滅則より空間群は P₄₁2₁2 または P₄₃2₁2 と求まり、また格子定数は a=b=127.9 Å, c=109.9 Å、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ と求められた。初期モデルとして bR の構造を用い、分子置換法による構造解析を行ったところ、空間群は P₄₃2₁2 が妥当で、非対称単位中に aR-1 が 2 分子含まれることが明らかになった。ダイマー構造は互いの EF ヘリックスの疎水結合、および Y135 と T183 の水素結合により安定していることが明らかとなった。aR-1 と bR との構造比較から、N 端を除き、ポリペプチドの主鎖の構造はほぼ同じであった。また、レチナール近傍の構造もよく保存されているのが明らかになった一方、蛋白質表面 (膜内、膜外) の残基は大きく変化しており、三量体形成に重要な役割をしていると考えられる脂質の結合部位に大きな差が確認された。

N Enami, H Okumura and T Kouyama : X-ray crystallography of archaerhodopsin from *Halorubrum sp. Aus-1*

3H1345

低温顕微分光法によるバクテリオロドプシン反応中間体の構造解析

○徳久 武、村上 緑、神山 勉 (名大・院理)

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌の膜上に見出された光駆動プロトンポンプであり、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。プロトンポンプの機構を明らかにするにはこれら中間体の構造を決定することが必要である。近年、X 線結晶構造解析により中間体の構造が発表されつつあるが、それに伴い構造解析に使われた仮定 (例えば三次元結晶中の構造が紫膜中の構造と同じで、光反応サイクルも同様におこる) についての傍証が必要となる。最近の研究からレチナール近傍の構造が X 線損傷による影響を大きく受けることが分かってきている。そこで、直線二色性を測定することにより、蛋白質中のレチナールの吸収双極子モーメントの方向を明らかにし、中間体形成に伴うレチナールの向きの変化を測定することを試みた。測定は低温顕微分光装置を用い、膜融合法で作成した 3 次元結晶 (空間群 P622) の結晶を対象に 100K で行った。この結晶では bR の 3 量体の蜂の巣格子が積み重なった構造をしているので紫膜と比べると高精度で吸収双極子モーメントの方向が決定できると期待される。今回行った b R と K 中間体の測定により、K 中間体の吸収双極子モーメントが膜面により平行に近いということが示された。この結果と当研究室で解析された K 中間体のモデルを比較しながら分析を行った。

T.Tokuhisa, M.Murakami, T.Koyama : structural analysis of reaction intermediates of bacteriorhodopsin by cryogenic microspectrophotometry

3H1415

高度好塩菌 *Halorubrum sp. aus-1* の赤紫膜の結晶構造

○奥村 英夫¹、江波 信生¹、則竹 信吾¹、後藤 俊明¹、杉山 康雄²、神山 勉¹ (¹ 名大院・理・物理、² 名大・遺伝子・ゲノム)

アーキロドプシン (aR) は西オーストラリアの塩湖で採取された高度好塩菌の細胞膜上に見出された膜蛋白質である。この蛋白質は色素としてレチナールを含み、プロトンポンプとして機能する。また同様の機能を持つバクテリオロドプシン (bR) と同じく 7 本の膜貫通ヘリックスを持つ。しかし、その分光特性は aR の持つ第 2 の色素であるバクテリオルベリンのために bR とは著しく異なる。aR 1 分子あたりにバクテリオルベリン 1 分子が結合していると考えられている。当研究室の研究にて aR の 3.5 Å 分解能での X 線結晶構造解析が行われ、aR の持つ残基の詳細な位置が決定された。bR と同様 aR は細胞膜上で二次元結晶 (赤紫膜) を構成しており、この赤紫膜の X 線回折データと、aR の 3 次元結晶構造解析の構造データを用いて aR の赤紫膜上での存在様式を解析した。これまでに当研究室で行われた bR の X 線結晶構造解析により、bR が紫膜を構成する際、3 量体を組む bR 分子間で相互作用する脂質分子を明らかにしている。この脂質とは bR 分子の残基のうち LYS40、ASP104、TYR147、LYS159 が相互作用しているが、これが aR 分子では LYS40 が ARG に、TYR147 が VAL に、LYS159 が ALA に置換されている。このため aR 分子は bR 分子とは異なる相互作用で 3 量体を構成しているものと考えられる。バクテリオルベリンの消失が原因と思われる赤紫膜の形態変化も観察されていることから、aR 分子同士の相互作用にバクテリオルベリンが関与していることも考えられる。

H.Okumura, N.Enami, S.Noritake, T.Gotoh, Y.Sugiyama and T.Koyama : Crystal structure of claret membrane from *Halorubrum sp. aus-1*