

2PA021

バクテリオロドプシンの3次元結晶中における脂質の存在様式

松井耕宏 竹田一旗 佐藤英憲 日野智也 奥村英夫
金森英司 神谷信夫¹ 神山勉 (名大・理、理研¹)

バクテリオロドプシン (bR) は高度好塩菌に存在する光駆動プロトンポンプである。bR は細胞膜中で3量体を単位とした2次元結晶(紫膜)を形成するが、3量体形成機構において蛋白質-脂質間相互作用が重要な役割を担っていると考えられている。bR に結合した脂質分子の動的、静的構造を決定することで3量体及び結晶形成への脂質分子の寄与を明らかにできると考えている。これまでに紫膜に少量の界面活性剤を加えて球殻構造体を形成させ、さらに低温での濃縮により球殻構造体を融合させることで3次元結晶(P622)を作成する方法を開発した。室温のX線結晶構造解析(分解能 3.5 Å)から、3次元結晶中においても紫膜中で見られる3量体構造が保持され、また細胞質側のAヘリックスと隣の分子のDヘリックスに挟まれた位置に観測されたリン脂質(脂質①)が3量体構造の保持に寄与していることを明らかにした。結晶中にはこの他にも脂質は存在しており、今回の実験では室温の解析結果からは観測されなかった脂質分子の位置決定を行うため、低温(100K)においてより高分解能(2.5 Å)のX線回折測定を行った。

結果 低温の解析結果からは脂質①に加えて細胞外側の3量体中心付近に存在する糖脂質(脂質②)、3量体の外周に3つの脂質分子が観測された。

考察 低温において新たな脂質が観測されたのは温度因子の低下や分解能の向上によるものと考えている。脂質①は3量体内部で2つの単量体に挟まれているため他の脂質に比べ温度因子が低く室温でも観測できたのではないかと推察される。脂質②も3量体内部で2つの単量体と相互作用する位置にあることから3量体構造の保持に重要であると考えられる。その他3つの脂質は3量体同士の間位置していることから、3次元結晶中では3量体を単位とした蜂の巣型構造、また紫膜中においては2次元六角格子(p3)の形成に重要であると考えている。

[1]H. Sato *et al.* (1999) *Acta Cryst.* D55, 1251-1256

Y. Matsui K. Takeda H. Sato T. Hino H. Okumura E. Kanamori
N. Kamiya T. Kouyama : Distribution of Lipids in the Hexagonal Crystal of Bacteriorhodopsin

2PA023

酸素発生光化学系II複合体の結晶化

○沈 建仁・神谷信夫(理研・播磨研)

光合成の光化学系II複合体は、約10種の膜蛋白質と3種の膜表面蛋白質を含む、分子量25万の超分子複合体であり、太陽の光エネルギーを利用し水分解・酸素発生という生物学的に極めて重要な反応を触媒している。我々は、系II複合体の立体構造解析を目的として、その三次元結晶化を行っている。55-60℃で生育する好熱性らん色細菌 *Synechococcus vulcanus* から系II複合体をカラムクロマトグラフィー法により単離・精製し、マイクロ透析法を用いて、PEG2000を沈殿剤とし、ドデシルマルトシドを界面活性剤として結晶を作製した。結晶の外形は主に菱形で、最大0.7 x 0.6 x 0.1 mmまで成長する。電気泳動により、得られた結晶が系IIの主要サブユニットであるCP47, CP43, D1, D2, チトクロム b-559 αとβサブユニット、及び表面性の33 kDa, 12 kDa, チトクロム c-550を含んでいることが確認された。ゲル濾過により、結晶中の系IIが二量体であることがわかった。SPRING-8の放射光を利用し100 Kにて測定したところ、最高分解能3.5 Åの回折斑点が確認された。結晶の空間群はP2₁2₁2₁で、格子定数はa=130 Å, b=227 Å, c=308 Åであった。現在、重原子同型置換体の作製・探索を行っている。

J.-R. Shen, N. Kamiya: Crystallization of oxygen-evolving photosystem II complex.

2PA022

光捕集クロロフィル蛋白質複合体がつくる球殻構造体のX線結晶構造解析

○金森英司、日野智也、奥村英夫、松井耕宏、
沈建仁、井上頼直、神山勉
(名大・理・物理、¹理研)

序論 光捕集クロロフィル蛋白質複合体II (LHC II) は葉緑体チラコイド膜に最も多量に存在する蛋白質であり、一本のポリペプチド鎖と>12個のクロロフィルa, bにより構成され生理的条件下で三量体を形成している。LHC IIは吸収した光のエネルギーを反応中心に伝える重要な機能を果たしている。

LHC IIは界面活性剤により球殻状の構造体を形成するが(後述)、その球殻構造体が集積して形成する結晶をX線を用いて解析した。

結晶化 エンドウの葉から精製したLHC IIを用い、界面活性剤としてノニルグルコシド、沈殿剤として塩化カリウムを使用し、蒸気拡散法によって濃縮すると、正八面体の結晶を得ることができる。

X線回折実験・解析 この結晶を用いて放射光施設SPRING8で回折実験を行い、分解能13.5 Å、空間群P2₁3、格子定数(a=388 Å, α=90°)、Rmerge 11.5%、完全性 98.8%のデータを収集した。

この結晶は格子定数や空間群等を考慮することによりLHC IIが球殻構造体を形成しそれが最密充填したものであると考えられ、電子顕微鏡によっても結晶中に球状の構造が観察されている。

この球殻構造体はパターン図の回転対称軸を探すことによって調べることができ、三量体が一つの面を成す正二十面体であることが強く示唆された。

現在球殻構造体の径を決定するため解析中である。

E. Kanamori, T. Hino, H. Okumura, Y. Matsui, J.-R. Shen, Y. Inoue, T. Kouyama: X-ray crystallographic study of spherical assembly of light-harvesting chlorophyll a/b protein complex

2PA024

カワヤツメオキシヘモグロビンのX線結晶構造解析

○上堂地美佳¹、姚闕¹、毎田徹夫²、矢沢洋³、田中勲¹ (¹北大・院理・生物科学、²長崎大・医・生化学、³北教大・養護・基礎医学)

ヘモグロビン(Hb)は、幅広い生物種に分布する酸素運搬蛋白質であり、生物種が異なっても立体構造と酸素結合能を保持している一方で、種独特の機能を獲得して著しい多様性を示す蛋白質でもある。脊椎動物中最も原始的な無顎類に属するヤツメウナギのHbは、酸素結合状態の違いによりモノマー/ダイマー変換を起こすことなど、多くの脊椎動物Hbとは異なった性質を持っている。我々は、ヤツメウナギの一種であるカワヤツメHbの性質と構造を解析することでHbの分子進化と構造-機能相関について明らかにすることを目的として研究を進めている。

カワヤツメ *Lampetra japonica* Hbは、カワヤツメ血液より調製した赤血球溶解液をイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけることで精製した。Hbのアミノ酸配列をエドマン法により決定したところ、アミノ酸数149個、分子量は16,524 Daであった。また、21%PEG6000, 0.1M HEPES (pH 7.0)の条件下で、オキシ型について空間群がP1、格子定数がa=59.21 Å, b=73.61 Å, c=105.87 Å, α=103.95, β=91.52, γ=97.64の結晶が得られた。回折強度データは、つくば Photon FactoryのBL18Bにおいて測定し、分解能2.3 Åまでのデータを、R_{merge}=7.8%, completeness=97.8%で得た。ウミヤツメ *Petromyzon marinus* デオキシHbを検索モデルとしたamoreによる分子置換法を適用し、現在精密化中である。

M. Kamidochi, M. Yao, T. Maita, Y. Yazawa and I. Tanaka : X-ray crystal structure analysis of oxyhemoglobin from river lamprey *Lampetra japonica*