



レチナル蛋白質の光反応中間体の結晶構造解析

神山勉¹, 村上緑²

1 名古屋大学, 2 名古屋大学理学研究科

キーワード：ハロロドプシン, 光駆動塩素イオンポンプ, レチナル異性化反応

1. 背景と研究目的

ファラオニス・ハロロドプシン (pHR) は好アルカリ性高度好塩菌 *Natronomonas pharaonis* の細胞膜に見出された7回膜貫通型膜タンパク質であり、光駆動塩素イオンポンプとして機能する。pHRは発色団レチナルを含み、光を吸収すると各種中間体(K, L1, L2, N, N', O, HR')を経て始状態に戻る。このサイクリックな反応の間に塩素イオンが細胞外側から細胞質側に能動輸送される。2016年度までの研究で、膜融合法により結晶(空間群 C2、 $a = 152.33 \text{ \AA}$, $b = 98.76 \text{ \AA}$, $c = 99.16 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0$, $\beta = 127.99$, $\gamma = 90.0$) を作製し、これを用いて pHR の塩素イオン結合状態および非結合状態の構造を 2.0~1.8 Å の分解能で求め^[1,2]、4種類の反応中間体 (L1, N, N', O) についての構造決定も行った^[3]。今回の測定では HR' の高分解能の構造決定を掲げる。

2. 実験内容

HR'の構造決定を実現するには、結晶を低温(263 K)で照射し、液体プロパンで急速凍結してHR'の捕捉率を50%以上まで高める、などの試行錯誤を繰り返す必要がある。

3. 結果および考察

HR'を高効率で捕捉するには、結晶ソーキング液中のハロゲンイオン(臭素イオン)を高濃度にする必要があるが、ハロゲンイオンの濃度を1M以上に高めると結晶のモザイシティが増大することを今回の測定から学んだ。この経験はその後のSPring8での測定に生かされた。すなわち、1MのNaBrを含むソーキング液に結晶を浸したのち、 -10°C で照射し、液体プロパン(87 K)で急速凍結することで、2.3 Å分解能の回折データを収集することができることが示された。光非照射の結晶からの回折データと比較することで、HR'の構造を決定し(図1)、この反応状態ではレチナルが13-cis, 15-synのコンフィギュレーションをとっていることを明らかにした^[4]。

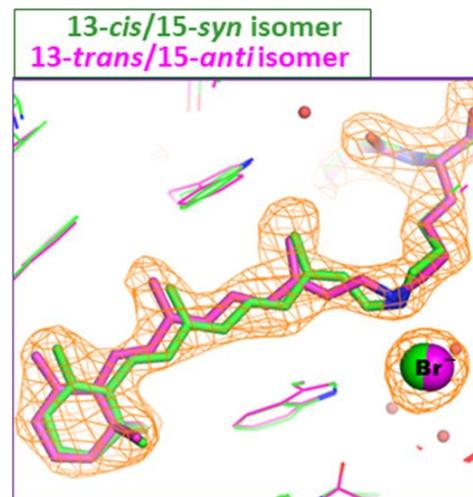


図1. pHRの13-cis異性体の構造

4. 参考文献

1. Kouyama, T.; Kanada, S.; Takeguchi, Y.; Narusawa, A.; Murakami, M.; Ihara, K. (2010) Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *J. Mol. Biol.* 396, 564–579.
2. Kanada, S.; Takeguchi, Y.; Murakami, M.; Ihara, K.; Kouyama, T. (2011) Crystal structures of an O-like blue form and an anion-free yellow form of *pharaonis* halorhodopsin. *J. Mol. Biol.* 413, 162–176.
3. Kouyama, T.; Kawaguchi, H.; Nakanishi, T.; Kubo, H.; Murakami, M. (2015) Crystal structures of the L1, L2, N, and O states of *pharaonis* halorhodopsin. *Biophys. J.* 108, 2680–2690.
4. Kouyama, T.; Ihara, K.; Maki, K.; Chan, S.-K.; (2018) Three-step isomerization of the retinal chromophore during the anion pumping cycle of halorhodopsin. *Biochemistry*, in press.