

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07324

研究課題名(和文) クロライドポンプNM-R3イオン輸送機構の解明と時分割シリアルフェムト秒構造解析

研究課題名(英文) Time-resolved serial femtosecond crystallography at an XFEL to reveal conformational changes in Cl<sup>-</sup> pump rhodopsin, NM-R3

研究代表者

保坂 俊彰 (Hosaka, Toshiaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：40462725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Nonlabens marinus由来NM-R3は、構造既知の光駆動性のCl<sup>-</sup>ポンプであるが、その分子メカニズムについては不明点が残っている。ここでは、NM-R3についてSACLAにおける時分割実験を行った。発色団レチナールの光異性化後、初期位置からアニオンが移動し、アニオンと相互作用しているAsn98の側鎖がアニオンが移動して空いたスペースに入り込むように動き、helix Cが曲がっていった。この動きにより、イオンの逆流を防ぎイオンの一方向への輸送を達成する。また、ハライドイオンからの異常分散シグナルにより、イオンの輸送される過程を観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SACLAでの時分割実験の研究成果は、中間体のような「静的な構造」ではなく、そのタンパク質が作動中の「動的な構造」変化を実際に目に見える形でとらえることができることを示している。今回のNM-R3での研究の特徴は、タンパク質の動作を見るだけでなく基質の動きを同時に見えることを示せたことである。今後は、コンピューターシミュレーションでの研究などを用いて、より詳細なイオン輸送機構を調べるなど光駆動ポンプの統合的な理解につながることを期待できる研究になったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The marine bacterium derived Nonlabens marinus rhodopsin-3 (NM-R3) is a light-driven chloride ion-pump. Although we previously determined the crystal structure of NM-R3, its detailed ion transporting mechanism remains unknown. In this study, we used time resolved serial femtosecond crystallography with an X-ray free electron laser to observe the conformational changes during ion pumping process in NM-R3. After photoisomerization of retinal chromophore, causes simultaneous migration of anion from base position. In addition, the side chain of Asn98 that associates with anion in the ground state moves to the empty space created by the anion transfer, causing helix C to distort. Consequently, an ion transport pathway is created in the cytoplasmic interhelical space. In addition, we speculated that the location of the anion moved from the ground state to the cytoplasmic side of the NM-R3. A series of conformational changes explains how NM-R3 transports the anion across the protein.

研究分野：タンパク質の構造解析

キーワード：時分割構造解析 X線自由電子レーザー 膜タンパク質 クロライドイオンポンプロドプシン

## 1. 研究開始当初の背景

*all-trans retinal* を発色団として持ち、7回膜貫通ヘリックスで構成される微生物型ロドプシンは、 $H^+$ を輸送するバクテリオロドプシン(BR)や、 $Cl^-$ を輸送するハロロドプシン(HR)を中心に構造学・生化学・分光学的な研究が進められてきた(1)。これら BR や HR は高度好塩古細菌から単離され、近年まで、微生物型ロドプシンは極端な環境にしか存在しないものと考えられてきた。しかしながら、2000年以降、海洋性細菌に微生物型光駆動ロドプシンが広く分布することが明らかとされ、真核生物・真菌類・古細菌類の全てに、この微生物型光駆動ロドプシンが広がっていることが分かってきた。また、その機能も  $H^+$ や  $Cl^-$ だけでなく  $Na^+$ を輸送するポンプも見つかるなど、多様な機能を持つことが明らかとなってきた(1)。この光駆動性のポンプは、光遺伝学(2)の開発や  $Na^+$ 輸送性ポンプの変異により  $Cs^+$ を輸送(3)できるように改良されるなど、本来の機能を基に様々な応用に向けた研究も進展してきている。

今回の研究対象である海洋性細菌 *Nonlabens marinus* 由来 NM-R 3 (*N. marinus* rhodopsin-3)は、光駆動性  $Cl^-$ ポンプであるが、 $Cl^-$ ポンプとして良く研究されている HR とは、アミノ酸配列の相溶性が約 20%と低く、輸送に関わるアミノ酸が保存されていないなど大きな違いがあった。これは、*N. marinus* の生息域が海洋中で、HR を持つ高度好塩古細菌である *Halobacterium salinarium* とは独立に発生・進化してきたためだと考えられる。

## 2. 研究の目的

海洋性細菌 *Nonlabens marinus* 由来 NM-R 3 (*N. marinus* rhodopsin-3)は光駆動性  $Cl^-$ ポンプである。光駆動性  $Cl^-$ ポンプの中で最も研究が進んでいる HR とは異なる系統から独自に進化し、アミノ酸配列から大きな違いが認められる。申請者は、世界で初めてこの構造解析に成功し HR との違いを明らかとしたが(4)、詳細な  $Cl^-$ 輸送機構については未知の部分が残っている。本研究では、 $Cl^-$ 輸送経路や光反応サイクルの同定、中間状態構造の解明をすることで  $Cl^-$ 輸送機構の詳細な解明を目指す。具体的には、分光学を用いた機能解析、基質輸送に関わる変異体の構造解析や、Br を基質として加え X 線自由電子レーザー(XFEL)でのフェムト秒時分割構造解析法を用いて、基質移動の可視化を含む中間状態の構造解析による輸送機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

大腸菌無細胞合成系を用いて、NM-R3 の大量調製を行った。微結晶を得るための結晶化条件探索を広く行った。基質は臭素、もしくはヨウ素を用いた。このタンパク質溶液、もしくは微結晶を用いて、共同研究者による時間分解分光実験を行い、溶液と結晶中での反応の相違点について調べた。X 線回折実験は、播磨にある XFEL 施設 SACLA (SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser) の BL3 ビームラインを用いた。レチナールを異性化させるためにポンプ光を照射後、10  $\mu$ sec と 1 msec のデータを収集した。

## 4. 研究成果

結晶化条件を変えることで、基質を保持していないアポ型の構造と、時分割構造解析に用いる多量の微結晶(20-30  $\mu$ m)を得ることに成功した。分光学実験により、結晶中では 1 msec までの構造変化が顕著にみられることが明らかとなったことから、この段階までの時分割構造解析を行うことにした。時分割実験においては、光発色団レチナールが異性化すると、初期位置からアニオンが移動していた。また、アニオンと相互作用している helix C の真ん中に位置する Asn98 の側鎖が 1 msec にかけて、アニオンが移動して空いたスペースに入り込むように動き、helix C 全体が曲がっていった。この Asn98 の動きは基質の無いアポ型の構造でも認められることから、基質移動が起こることで、この動きが引き起こされると考えられた。この Asn98 の動きがスイッチ機能となり、イオンの逆流を防ぎ一方方向へのイオン輸送が可能となっていると推定された。また、ヨウ素からの異常分散シグナルにより、イオンの輸送される過程を観察することに成功した。一連の構造変化から、NM-R3 のアニオン輸送機構に関わる重要な構造変化を明らかとした。

## 引用文献

(1) Ernst O. P., et al. (2014) Chem. Rev. 114, 126-163

- (2) Deisseroth K. (2011) *Nature methods*, 8, 26-29
- (3) Konno M., et al. (2015) *J. Phys. Chem. Lett.*, 7, 51-55
- (4) Hosaka T., et al. (2016) *J. Biol. Chem.*, 291, 17488-17495

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Needham David M., Yoshizawa Susumu, Hosaka Toshiaki et. al.	4. 巻 116
2. 論文標題 A distinct lineage of giant viruses brings a rhodopsin photosystem to unicellular marine predators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20574 ~ 20583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1907517116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosaka T, Okazaki M, Kimura-Someya T, Ishizuka-Katsura Y, Ito K, Yokoyama S, Dodo K, Sodeoka M, Shirouzu M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structural characterization reveals novel oligomeric interactions of human voltage-dependent anion channel 1.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1749-1758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.3211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保坂俊彰
2. 発表標題 Cl-イオンポンプロドプシンの時分割XFEL結晶構造解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保坂俊彰
2. 発表標題 Structural changes in Cl- pump rhodopsin by time-resolved serial femtosecond crystallography
3. 学会等名 CBI学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保坂俊彰, 吉澤晋, 中島悠, 大沢登, 羽藤正勝, Edward F. DeLong, 木暮 一啓, 横山茂之, 染谷友美, 岩崎涉, 白水美香子
2. 発表標題 Nonlabens marinus由来新規光駆動性クロライドポンプの結晶構造解析
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------