

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04336

研究課題名(和文) 固体NMRによる光受容蛋白質ロドプシンのレチナル結合部位の精密構造解析法の開発

研究課題名(英文) Development of solid-state NMR structural study of retinal-binding site in rhodopsin with a chromophore

研究代表者

川村 出 (Kawamura, Izuru)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：20452047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微生物型タンパク質であるロドプシンの発色団レチナルの結合部位の精密構造解析のために、レチナルオキシム体からアルデヒドへの変換反応の探索と高度好塩菌由来のバクテリアオロドプシンから¹³C標識レチナルの抽出および固体NMRを用いたレチナル結合部位の構造解析を行った。その結果、オキシム体からレチナルへの効率的な変換反応の構築を達成し、¹³Cセグメント標識レチナルの生成に成功した。また、固体NMRを用いてセンサリーロドプシンIIやクロキノバクターロドプシン2などのレチナル結合部位の構造を明らかにした。さらに、光照射固体NMRによるセンサリーロドプシンIIの光中間体を観測した。

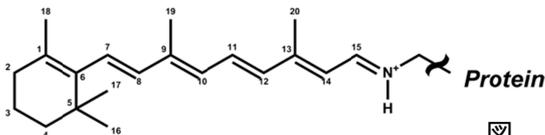
研究成果の概要(英文)：In order to investigate the retinal-binding pocket of microbial rhodopsin, we performed a investigation of the transformation from retinal oxime to retinal, the creation of ¹³C isotope-labeled retinal from Halobacteria and solid-state NMR study of retinal-binding pocket. The effective transformation from oxime to retinal was achieved. Consequently, segment ¹³C isotope labeled retinal was successfully created. The structure of retinal binding pocket in sensory rhodopsin II and Krokobacter rhodopsin 2 were revealed by solid-state NMR spectroscopy. In addition, the structure of photo-intermediates in sensory rhodopsin II were revealed by in-situ photo-irradiation solid-state NMR.

研究分野：構造生物化学

キーワード：固体NMR レチナル ロドプシン 膜タンパク質 細胞膜 ¹³C安定同位体標識

1. 研究開始当初の背景

発色団であるレチナールが光を吸収することで初めて機能を発現する光受容膜タンパク質ロドプシンは、近年のゲノム解析によって数多くの種類が発見され、微生物から高等生物まで広く分布していた。一方でレチナールと7本膜貫通ヘリックスで構成される共通の構造モチーフでありながら、さらにそれらは特定の吸収波長で制御されているため、その機能や色は多様化している。これには反応中心であるレチナール結合部位の局所的な構造が関わっていると推測され、ロドプシタンパク質の機能を分子レベルで理解する上で、レチナールと近傍アミノ酸残基の間の相互作用は極めて重要であるため、タンパク質に結合したレチナール(図1)の基礎的かつ高度な構造情報が必要とされている。このような構造情報は、脳神経科学の分野において、ロドプシンが基盤的な役割を果たすオプトジェネティクス(光遺伝学)の技術にも影響を及ぼすものである。



1 ロドプシン中のレチナールの構造

2. 研究の目的

このような背景のもと、 ^{13}C 標識安定同位体標識レチナールの NMR 信号を観測することが重要であると考え、本研究では、レチナールオキシムからのレチナールの変換反応の構築、それを利用したセグメントまたは全 ^{13}C 標識レチナールの生成および微生物型ロドプシンのレチナール結合部位の構造解析のための固体 NMR 法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) レチナールオキシムからレチナールへの変換反応: レチナールは酸、光、熱などに対して不安定と予想される共役オレフィン部分を有するため、反応時間や酸化剤など種々の酸化条件によるレチナールへの変換反応について検討した。

(2) オキシム-レチナール変換反応を用いた ^{13}C 標識安定同位体標識レチナールの生成: 高価である安定同位体標識レチナールの高度好塩菌の ^{13}C 標識バクテリオロドプシンからの生成を試みた。ヒドロキシルアミンを用いた反応によりバクテリオロドプシンからレチナールをオキシム体として抽出し、さらにアルデヒド体への再変換反応を検討した。

(3) 固体 NMR 分光法によるレチナール結合部位の構造解析: 微生物型ロドプシンのレチナール結合ポケットの構造解析を行うために、レチナールとその周辺のアミノ酸残基に ^{13}C 標識を施した試料を大腸菌を用いて発現させ、精

製した試料を細胞膜に再構成した。レチナール結合部位の構造解析のために、様々なロドプシタンパク質について、レチナールと周辺アミノ酸残基との ^{13}C - ^{13}C 相関信号など固体 NMR 実験を行った。また、光照射-固体 NMR によるレチナール光異性化反応の NMR 信号の定常観測と DFT 計算を組み合わせより詳細な構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) レチナールオキシムからレチナールへの変換反応:

単純なアルデヒドのモデル化合物からオキシムへの変換反応は CuCl_2 を用いた反応で 90%以上の収率であったが、レチナールからは極端に収率が下がったため、より温和な条件での酸化剤として DMP(Dess-Martin Periodinane)を用いたオキシムからアルデヒド変換反応を実施したところ、得られたレチナールの収率は 18%であった。さらに反応時間などの条件を改良することで 32%まで向上させ、利用可能な反応系を構築することに成功した。

(2) オキシム-レチナール変換反応を用いた ^{13}C 標識安定同位体標識レチナールの生成:

炭素源を制限した ^{13}C 標識培地で高度好塩菌 *H. salinarum* を培養し、そこから得たバクテリオロドプシンからレチナールをオキシム体で抽出した。さらに(1)で構築した反応を適用し、 ^{13}C 標識レチナールオキシム体から ^{13}C 標識レチナールへの変換反応を実施し、セグメントに ^{13}C 標識が入ったレチナールの生成に成功した。この ^{13}C 標識レチナールは大腸菌で生合成可能な他のロドプシンに利用できる可能性があるため、固体 NMR による精密なレチナールの構造解析の期待がある。

(3) 固体 NMR 分光法によるレチナール結合部位および光中間体の構造解析:

光照射固体 NMR を用いて、バクテリオロドプシンの Tyr185 変異体の O 中間体や 13-*cis*, 15-*syn* 由来の中間体 CS*などの NMR 信号の定常的な観測に成功した。これらの中間体の NMR 信号の観測は初めてであり、バクテリオロドプシンの新たな中間体を NMR で観測した成果である。

負の走光性機能をもつセンサーロドプシン II のレチナールと Tyr174 の ^{13}C - ^{13}C 相関信号を観測し、レチナールの配座および Tyr174 の水素結合強度を評価することに成功した。特に、レチナール近傍の Thr204 の変異体の場合に、これら二つの化学シフト値が大きく変化し、機能発現制御において重要な構造変化であることを明らかにした。センサーロドプシン II に関してはさらに In-situ 光照射固体 NMR による M, O および N' 光中間体のレチナールの NMR 信号の観測に成功した。DFT 計算によるレチナールの詳細なコンフォメーションを示し、信号伝達機構の理解を深めた。

光駆動型ナトリウムイオンポンプロドプシン KR2 のレチナル結合ポケットに対しても pH 変化に対するプロトン化シッフ塩基の NMR 信号変化を観測した。この化学シフト値や pH に対する挙動が他のロドプシンとは異なるため、KR2 特有の現象であることを明らかにし、光駆動型ナトリウムイオンポンプ活性の理解につながる成果である。さらに細胞外側のナトリウム結合サイトとレチナル結合ポケットの長距離相互作用の存在を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 19 件)

Y. Makino, I. Kawamura*, T. Okitsu, A. Wada, N. Kamo, Y. Sudo, K. Ueda*, A. Naito*. (2018) “Retinal configuration of ppR intermediates revealed by photo-irradiation solid-state NMR and DFT” *Biophys. J.* in press, 査読有り, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.05.030> (Cover article)

A. Shigeta, S. Ito, R. Kaneko, S. Tomida, K. Inoue, H. Kandori*, I. Kawamura* (2018) “Long-distance perturbation on Schiff base-counterion interaction by His30 and the extracellular Na⁺-binding site in *Krokinobacter rhodopsin 2*” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 8450-8455. 査読有り, DOI: [10.1039/C8CP00626A](https://doi.org/10.1039/C8CP00626A).

上田 一義, 内藤 晶, 川村 出, Namsrai Javkhlantugs “生体膜内でのペプチドの挙動の分子動力学シミュレーション” (2018) 酵素工学ニュース, 酵素工学会, 79号 27-30. 査読なし

B. Mijiddorji, S. Kaneda, H. Sato, Y. Kitahashi, N. Javkhlantugs, A. Naito, K. Ueda*, I. Kawamura* (2018) “The role of D-*allo*-isoleucine in the deposition of the anti-*Leishmania* peptide bombinin H4 as revealed by ³¹P solid-state NMR, VCD spectroscopy and MD simulation” *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics* – 1768, 7, 789-798. 査読有り, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.01.005>

E. Tanaka, H. Tateno, Y. Matsumura, K. Nakabayashi, I. Kawamura, M. Atobe* (2018) “Electrooxidative Copolymerization between 3,4-Ethylenedixithiophene and Benzene from a Mixture of Each Monomer.” *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 91, 141-146. 査読有り, DOI: [10.1246/bcsj.20170319](https://doi.org/10.1246/bcsj.20170319)

T. Takagi, I. Kawamura, Y. Oumi, Y. Miwa, H. Yoshitake* “Absorption of Cu(II) in layered diaminoalkyl- and monoaminoalkyl-polysilsequioxane” (2017) *Polymer*, 132, 227-234. 査読有り, DOI: [10.1016/j.polymer.2017.11.011](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.11.011)

川村 出 “生物の光の利用 – ロドプシンの光応答とその応用-” (2017) 化学と教育 65号 6 巻, pp. 290-293. 査読なし, DOI https://doi.org/10.20665/kakyoshi.65.6_290

ジョアンナ・ミラー / 川村 出(訳) “重水素化不要の固体 NMR によるタンパク質構造の解明” (2017) 物理科学雑誌 パリティ Vol. 32 No.6, pp. 27- 30. 査読なし

F. Lu, T. Takaya*, K. Iwata, I. Kawamura, A. Saeki, M. Ishii, K. Nagura, T. Nakanishi*. “A Guidance to Architect Functional Molecular Liquids with Tailorable Properties Using Pyrene-Fluorescence as A Probe.” (2017) *Scientific Reports*, 7, 3416. 査読有り, DOI: [10.1038/s41598-017-03584-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-03584-1)

K. Norisada, N. Javkhlantugs, D. Mishima, I. Kawamura, H. Saito, K. Ueda, A. Naito. “Dynamic structure of melittin bound to acidic lipid bilayers as revealed by solid-state NMR and molecular dynamics simulation” (2017) *J. Phys. Chem. B.* 121 (8), 1802-1811. 査読有り, DOI: [10.1021/acs.jpcc.6b11207](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11207)

H. Sato*, I. Kawamura, A. Yamagishi, F. Sato. “Solid-State Vibrational Circular Dichroism Spectra of Isoleucine and Its Related Compounds: Effects of Interplay between Two Chiral Centers.” (2017) *Chem. Lett.* 46 (4), 449-452. (Editor’s Choice) 査読有り, DOI: [10.1246/cl.161043](https://doi.org/10.1246/cl.161043)

A. Shigeta, S. Ito, K. Inoue, T. Okitsu, A. Wada, H. Kandori, I. Kawamura* “Solid-state nuclear magnetic resonance structural study of the retinal-binding pocket of sodium ion pump rhodopsin.” (2017) *Biochemistry* 56, 543-550. 査読有り, DOI: [10.1021/acs.biochem.6b00999](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00999)

R. Matsui, N. Uchida, M. Ohtani, K. Yamada, A. Shigeta, I. Kawamura, T. Aida, Y. Ishida*. “Magnetically Alignable Bicelles with Unprecedented Stability by Tunable Surfactants Derived from Cholic Acid.” (2016) *ChemPhysChem* 17 (23) 3916-3922. 査読有り, DOI: [10.1002/cphc.201600897](https://doi.org/10.1002/cphc.201600897)

H. Yoshitake*, T. Kodate, T. Takagi, I.

Kawamura, A. Naito. "Polysilsesquioxanes with mixed self-assembled organic tethers: Alkyl chains and alkanolate-aminopropyl pairs." (2016) *Reactive and Functional Polymers* 99 9-16. 査読有り, DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2015.12.002

Y. Kawasaki, K. Kondo, R. Narizuka, T. Endo, M. Katahira, I. Kawamura, M. Sato, M. Takeda*. "Presence of *N*-L-lactyl-D-perosamine residue in the sheath-forming polysaccharide of *Thiothrix fructosivorans*." (2016) *Int. J. Biol. Macromol.* 82 772-779. 査読有り, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.028

川村 出 "固体 NMR による膜タンパク質の立体構造解析" (2016) 生物物理 Vol. 56, pp.36-39. (査読有り), DOI: <https://doi.org/10.2142/biophys.56.036>

川村 出 "固体 NMR による生体分子立体構造決定の最近の展開" (2015) 日本核磁気共鳴学会誌 NMR, Vol. 6, pp. 65-68. (査読有り)

T. Nagao, D. Mishima, N. Javkhlantugs, J. Wang, D. Ishioka, K. Yokota, K. Norisada, I. Kawamura, K. Ueda, A. Naito*. "Structure and Orientation of Antibiotic Peptide Alamethicin in Phospholipid Bilayers as Revealed by Chemical Shift Oscillation Analysis of Solid State Nuclear Magnetic Resonance and Molecular Dynamics Simulation" (2015) *Biochim. Biophys. Acta -Biomembranes-* 1848 (11) 2789-2798. 査読有り, DOI: 10.1016/j.bbmem.2015.07.019

K. Oshima, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura*, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa, A. Naito*. "Characterization of photo-intermediates in the photo-reaction pathways of bacteriorhodopsin Y185F mutant using in situ photo-irradiation solid-state NMR spectroscopy" (2015) *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 1694-1702. 査読有り, DOI: 10.1039/c5pp00154d

[学会発表] (計 28 件)

A. Shigeta, R. Kaneko, S. Ito, T. Okitsu, A. Wada, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura "Structural change of Na⁺ pumping *Krokinobacter* rhodopsin 2 induced by pH and alkali metal ions by solid-state NMR" 第 56 回 NMR 討論会, 首都大学東京, 2017 年

槇野義輝, 川村出, 沖津貴志, 和田昭盛,

須藤雄気, 加茂直樹, 内藤晶, 上田一義 "センサリーロドプシンのレチナール構造変化に対する 13C NMR 化学シフト値計算" 第 56 回 NMR 討論会, 首都大学東京, 2017 年

A. Naito, K. Oshima, Y. Otani, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa. "Stationary trapping of photo-intermediates during the photo cycles of bR and its mutants by in situ photoirradiation solid-state NMR", 第 55 回日本生物物理学会, 熊本大学, 2017 年.

A. Shigeta, S. Ito, T. Okitsu, A. Wada, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura "Structural analysis of retinal-binding pocket of KR2 under neutral and acidic pH by solid-state NMR", The 20th ISMAR, Quebec, Canada, 2017.

A. Shigeta, & I. Kawamura "Relationship between Tyr Czeta chemical shift and hydrogen bonding strength in microbial rhodopsins", International Symposium on Biophysics of Rhodopsins honoring Prof. Y. Shichida, Kyoro, 2017 年

A. Shigeta, S. Ito, K. Inoue, T. Okitsu, A. Wada, H. Kandori, I. Kawamura "Structural change in retinal- and sodium ion-binding site of Na⁺ pump rhodopsin at neutral and acidic pH studied by solid-state NMR." The 7th Asia-Pacific NMR symposium, Indian Institute of Science, Bangalore, India, 2017.

Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Naito, K. Ueda "In-situ 光照射固体 NMR によるセンサリーロドプシン II の光中間体の解析", 第 54 回日本生物物理学会, つくば国際会議場, 2016 年

I. Kawamura, H. Seki, A. Shigeta, Y. Makino, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo. "固体 NMR を用いたミドルロドプシンのレチナール結合ポケットの構造解析", 第 54 回日本生物物理学会, つくば国際会議場, 2016 年

A. Shigeta, S. Ito, T. Okitsu, A. Wada, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura "酸性および中性におけるナトリウムイオンポンプ KR2 のレチナール結合ポケットの固体 NMR 構造解析", 第 54 回日本生物物理学会, つくば国際会議場, 2016 年

重田安里寿, 伊藤奨太, 沖津貴志, 和田昭盛, 井上圭一, 神取秀樹, 川村出 "固

体 NMR による光駆動型ナトリウムイオンポンプ KR2 の pH 変化に対するレチナル結合サイトの構造変化の解析” 第 55 回 NMR 討論会, 広島国際会議場, 2016 年

榎野義輝, 川村出, 沖津貴志, 和田昭盛, 須藤雄気, 加茂直樹, 内藤晶, 上田一義 “光照射固体 NMR によるセンサリ-ロドプシン II の光反応過程における光中間体構造の解析” 第 55 回 NMR 討論会, 広島国際会議場, 2016 年

A. Shigeta, S. Ito, T. Okitsu, A. Wada, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura “Structural analysis of retinal binding pocket of sodium ion pumping rhodopsin, KR2, studied by solid-state NMR”, The 17th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2016), Neues Palais, Potsdam, Germany, 2016 年

I. Kawamura, R. Nishikawa, H. Seki, A. Shigeta, Y. Makino, T. Tsukamoto, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, A. Naito “Solid-state NMR structural study of Tyr residue in the retinal binding-pocket of microbial rhodopsins” The 17th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2016), Neues Palais, Potsdam, Germany, 2016 年

I. Kawamura, “Solid-state NMR structural study of photoreceptor membrane protein” 第 65 回高分子討論会 (日韓合同セッション), 神奈川大学, 2016 年.

A. Shigeta, S. Ito, T. Okitsu, A. Wada, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura “Structural analysis of retinal binding pocket of sodium pumping rhodopsin, KR2, by solid-state NMR.”, XXVII th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS2016), 京都国際会議場, 2016 年.

Y. Ohtani, A. Shigeta, Y. Kebukawa, K. Kobayashi, T. Okitsu, A. Wada, A. Naito, I. Kawamura “Structural change of Tyr185 in the vicinity of the retinal chromophore in bacteriorhodopsin by ¹³C solid-state NMR.” XXVII th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS2016), 京都国際会議場, 2016 年.

R. Nishikawa, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Naito. “Hydrogen bond alterations of Tyr174 and

Tyr199 of phorbodopsin in the lipid environment as studied by solid-state ¹³C MAS NMR”, Pacificchem 2015, Honolulu, USA, 2015 年

A. Shigeta, K. Oshima, R. Miyasa, M. Horigome, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, A. Naito. “Structural changes in the photo-reaction pathways of retinal in bacteriorhodopsin studied by in-situ photo-irradiation solid-state NMR” Pacificchem 2015, Honolulu, USA, 2015 年 (ほか 10 件)

(図書) (計 5 件)

I. Kawamura*, K. Norisada, A. Naito “Structure determination of membrane peptide and proteins by solid-state NMR.” (2018) *Experimental Approaches of NMR spectroscopy –Methodology and Application to Life Science and Material Science*, Springer, Chap. 9, pp. 253-293.

A. Naito*, Y. Makino, Y. Tasei, I. Kawamura, “Photoirradiation and Microwave Irradiation NMR Spectroscopy” (2018) *Experimental Approaches of NMR spectroscopy – Methodology and Application to Life Science and Material Science*, Springer, Chap.5, pp. 135-170.

A. Naito Y. Makino, I. Kawamura, “In-situ Photo irradiation solid-state NMR spectroscopy applied to retinal membrane proteins.” (2017) *Modern Magn. Reson. 2nd Edition* pp. 1-22.

川村出 “第1章 抗菌ペプチドの構造と機能 相關の研究” 抗菌ペプチドの機能解明と技術利用 (監修 長岡 功 順天堂大学教授), シーエムシー出版 (2017) pp.3-14. (分担執筆・単著)

A. Naito, I. Kawamura, N. Javkhlantugs “Recent Solid-State NMR Studies of Membrane Bound Peptides and Proteins.” (2015) *Annual Reports of NMR Spectroscopy* Edited by Graham A. Webb, Elsevier, Vol. 86 Chap. 5, 333-411.

(産業財産権)

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

(その他)

ホームページ等
横浜国立大学 研究者総覧
<http://er-web.jmk.ynu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 出(KAWAMURA Izuru)
横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号:20452047

(2)研究分担者

五東 弘昭(GOTOH Hiroaki)
横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号:80635235

(3)連携研究者

須藤 雄気(SUDO Yuki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号:10452202

内藤 晶 (NAITO Akira)

横浜国立大学・大学院工学研究院・名誉教授
研究者番号:80172245

(4)研究協力者

重田 安里寿(SHIGETA Arisu)
榎野 義輝 (MAKINO Yoshi teru)