

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18523

研究課題名(和文)プロテオロドプシンのプロトン輸送機構における中間体構造の解明

研究課題名(英文)Analysis of intermediate structure in proton pump mechanism of proteorhodopsin

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・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：40462725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性細菌から発見されたプロテオロドプシン(PR)は光駆動H⁺ポンプである。本研究では、PRの構造解析を目指した。当初の計画通り、大腸菌無細胞合成系からの精製・LCP法結晶化により、490 nmと530 nmの光を吸収する2種類のPRの構造、SACLAでの放射線損傷のない構造、PRの光吸収に関するアミノ酸変異体の構造を得た。特に光吸収に関するアミノ酸と水分子が、レチナールの構造変化を引き起こすことを、構造から明らかとした。また当所計画に加え、SACLAにおけるBRの中間体構造解析に参加し、PRの類縁体である光駆動型Cl⁻輸送ロドプシンの構造解析にも、世界に先駆けて報告した。

研究成果の概要(英文)：Proteorhodopsin (PR) is one of microbial-type rhodopsins such as bacteriorhodopsin (BR) and functions as a light-driven proton pump. PR-bearing bacteria are widely found among microorganisms in the sea and fresh water. In this study, we aimed for structural analysis of these PRs. PRs were prepared and purified from E. coli cell-free synthesis system and crystallized by LCP method. I presented here (1) two types of PR crystal structure that absorb light at 490 nm and 530 nm, (2) radiation damage-free PR structure, and (3) light absorption-mutant structure of PR. In particular, the structure revealed that the interaction of the amino acid and a water molecule which related to light absorption causes structural changes of retinal. I participated in the structural analysis of BR intermediate at SACLA and also reported structural analysis of light-driven Cl⁻-pumping rhodopsin that is a homolog of PRs.

研究分野：生物学、生物科学、生物物理学

キーワード：ロドプシン X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

2000年にバクテリア型ロドプシンが海洋性細菌の間に広く分布することが明らかになり、プロテオロドプシンと命名された。プロテオロドプシンはオプシタンパク質に発光団のレチナールが結合した光受容タンパク質で、光を受容すると細胞内からプロトン排出する光駆動型プロトンポンプである。

光駆動型プロトンポンプとして広く研究されているバクテリオロドプシンとの比較では、プロトン輸送に関与するアミノ酸が保存されており、光反応サイクルも類似していると考えられていた。しかしながら、全体のアミノ酸配列の相同性は約30%と低く、プロトン排出部位近傍のアミノ酸配置の保存性が低いなどの違いも認められる。

最初に発見され機能や分光学的な研究が進められてきた *gamma-proteobacterial* SAR86由来のプロテオロドプシンは結晶化の成功例 (Wang N., et al. (2012) *Acta Cryst. F*) はあったものの、構造についての報告は出されていなかった。2013年になって初めて、このプロテオロドプシンとは別種であるハワイ沖由来菌株と地中海由来菌株から単離された3種のプロテオロドプシンの構造が明らかとなった (Gushchin I., et al. (2013) *PNAS*; Ran T., et al. (2013) *Acta Cryst. D*)。このように、プロテオロドプシンの機能と構造に関する知見は徐々に増えてきているが、バクテリオロドプシンと比べると、その構造面の研究は遅れていた。

我々は、大腸菌無細胞合成系による膜タンパク質の発現と精製系を開発してきた。この系を用いることで、X線結晶構造解析を行うのに十分な量と精製度を持つプロテオロドプシンを合成・精製することができることを明らかにした。また、近年の膜タンパク質の結晶化に汎用されている脂質メソフェーズ法 (LCP法) に関する装置や脂質の開発も行っており、これらの系を用いることでプロテオロドプシンの構造解析を進め、機能と構造との相関に関する知見を充実させることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオロドプシンの光駆動ポンプ機構解明には構造情報を知ることが重要であるという観点から、数種類の野生型プロテオロドプシタンパク質について、大腸菌無細胞系からの合成、精製、結晶化を行っていく。また、構造が得られたプロテオロドプシンの各種変異体の構造解析や、X線自由電子レーザー (XFEL) を用いた構造解析を行うことで、様々な構造情報を得ることでプロテオロドプシンの機能に対する統合的な理解向上を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 野生型プロテオロドプシタンパク質の合成・精製・結晶化・構造解析

脂質と界面活性剤を添加した大腸菌無細胞合成系により、4種類のプロテオロドプシタンパク質の合成を行った。このうち、3種類の精製とLCP法による結晶化、X線結晶構造解析を行った。

(2) 光吸収に関する変異体の結晶化・構造解析

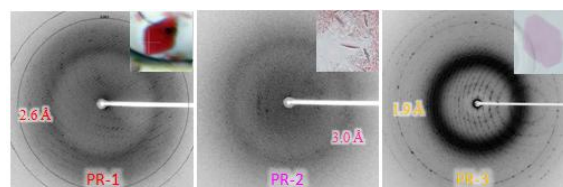
構造解析に成功した490 nmの光を吸収する野生型プロテオロドプシタンパク質について、光吸収に関与すると考えられたレチナール周辺のGlnをLeuにする変異を導入した。これにより、光吸収波長が30 nm赤色シフトする変異体の取得に成功し、このサンプルを用いた構造解析を行った。

(3) XFELにおける構造解析

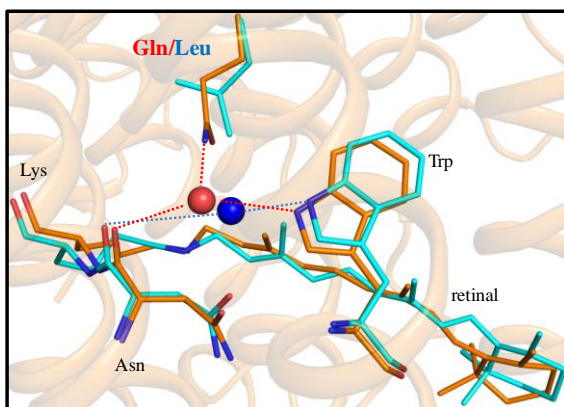
構造解析に成功した490 nmの光を吸収するプロテオロドプシタンパク質を用いて、SACLAにて20°CでX線回折実験を行い、構造解析を行った。実験方法としては、モノオレインをLCP法の脂質として用いて、スポンジフェーズとなった結晶サンプルを用いた。

4. 研究成果

大腸菌無細胞合成系による合成・精製・LCP法での結晶化により得られた3種類のプロテオロドプシン結晶を用い、SPRING-8のBL32XUにて回折データ収集を行った (下記図)。そのうち青色の光 (約490 nm) を吸収するプロテオロドプシンは2.0 Åでの構造解析に成功した。この構造とバクテリオロドプシンや他の類似タンパク質の構造との比較を行ったところ、青色の光を吸収に関与しているアミノ酸の推定、プロトンの流入から排出するまでに関与しているアミノ酸を推定することが出来た。残りの2種類のうちの1つは、緑色の光 (約520 nm) を吸収するプロテオロドプシンで、最高で3.0 Åの反射が得られ、3.5 Åでの構造解析に成功した。最後の1つは、3.0 Åを超える反射が得られているが、完全データを取得できず、構造は得られていない。



2.0 Å で構造解析に成功したプロテオロドプシンについて、その構造とアミノ酸配列データ、他のバクテリア型ロドプシン類の知見から、レチナールのシッフ塩基に近いアミノ酸である Gln がプロテオロドプシンの吸収波長に対して影響を与えることが示唆された。このため、Gln を Leu に変異させたプロテオロドプシンの合成・精製を行ったところ、狙い通りに、最大吸収波長が 490 nm から 520 nm に長波長シフトしたサンプルが得られた。このサンプルを用いて結晶化を行ったところ、3.0 Å の構造解析に成功した。野生型と光吸収変異体との構造比較を行った結果、全体構造の類似性を示す RMSD は 0.45 Å とほとんど同じであったが、変異を導入したアミノ酸周辺の構造は、Gln の側鎖は水分子と相互作用し、レチナールを結合する Lys の一つ前の Asn の主鎖と相互作用していた。一方、変異体の Leu の側鎖は水分子と相互作用はしておらず、水分子が単独で、Asn の主鎖と相互作用していた。この水分子は、他に保存性の高い Trp の側鎖とも相互作用していた。結果として、Gln は、Asn-水分子-Trp-Gln の 4 者の相互作用様式だが、Leu の方は、Asn-水分子-Trp の 3 者による相互作用様式となっていた。これが、レチナール、それとレチナール周辺の構造、特にレチナールのβ-イオン環の角度を変えるような作用を起こすことで、吸収波長が変わったものと考えられた (下記図)。



X線自由電子レーザー施設 SACLA にて、1結晶に対して、X線レーザーを1回照射してデータを収集する方法を用いて、プロテオロドプシンの結晶構造解析を行った。これにより、放射線損傷のないプロテオロドプシンの構造情報が得られた。また、中間体構造を得るために、バクテリオロドプシンでの時分割シリアルフェムト秒構造解析実験に参加し、その技術ノウハウの習得を行った。

このほか、プロトン輸送型プロテオロドプ

シンと近縁にある Cl 輸送型ロドプシンについても、プロテオロドプシンと同様の手法を駆使して構造解析を行った。この結果、1.5 Å という高解像度で、世界に先駆けて構造解析に成功し、その成果を報告した。

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 2 件)

- ① “Structural Mechanism for Light-driven Transport by a New Type of Chloride Ion Pump, *Nonlabens marinus* Rhodopsin-3” T. Hosaka, S. Yoshizawa, Y. Nakajima, N. Ohsawa, M. Hato, E. F. DeLong, K. Kogure, S. Yokoyama, T. Kimura-Someya, W. Iwasaki, and M. Shirouzu

The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 291: 17488-17495, (2016)
10.1074/jbc.M116.728220

- ② “A Three Dimensional Movie of Structural Changes in Bacteriorhodopsin” E. Nango, A. Royant, M. Kubo, T. Nakane, C. Wickstrand, T. Kimura, T. Tanaka, K. Tono, C. Song, R. Tanaka, T. Arima, A. Yamashita, J. Kobayashi, T. Hosaka, E. Mizohata, P. Nogly, M. Sugahara, D. Nam, T. Nomura, T. Shimamura, D. Im, T. Fujiwara, Y. Yamanaka, B. Jeon, T. Nishizawa, K. Oda, M. Fukuda, R. Andersson, P. Båth, R. Dods, J. Davidsson, S. Matsuoka, S. Kawatake, M. Murata, O. Nureki, S. Owada, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, G. Schertler, M. Yabashi, A.-N. Bondar, J. Standfuss, R. Neutze, and S. Iwata

Science, 査読有, 354: 1552-1557, (2016)
10.1126/science.aah3497

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

- “Cell-free synthesis of membrane proteins” T. Kimura-Someya, T. Hosaka, T. Shinoda, K. Shimono, M. Shirouzu, S. Yokoyama, "Advanced Methods in Structural Biology", Springer, (著書、2016), 123-135

[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

6. 研究組織

(1) 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・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：40462725