

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19370068

研究課題名 (和文) 固体NMRによる7回膜貫通蛋白質複合体の構造解析

研究課題名 (英文) Solid-state NMR analysis of membrane protein complexes with 7-transmembrane helices

研究代表者

藤原 敏道 (FUJIWARA TOSHIMICHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：20242381

研究成果の概要 (和文)：

固体NMR実験で、ハロロドプシンとトランスデューサ *pHtrII*、ペプチド・マストパラン X について解析を行った。*pHtrII* では、溶媒のバルクな水の ^1H からの距離測定を行うと同時に、二重膜両親媒性領域のアミノ酸残基を帰属した。*pHtrII* の水溶性領域は、 β 構造と α ヘリックスが観測されたが、これは天然構造と考えられた。データ解析では、帰属されていないNMR構造パラメータも構造決定に利用する方法を開発した。

研究成果の概要 (英文)：

Solid-state NMR enables the structural determination of biological molecular complexes in unoriented solids. We verified the usefulness of magic-angle spinning solid-state NMR based on dipolar and J couplings for the structural analysis of ^{13}C uniformly labeled biomolecular complexes. We applied solid-state NMR to halorhodopsin, mastoparan-X and 159-residue transducer protein *pHtrII* in lipid bilayers. Solid-state NMR provided the detailed structure of mastoparan-X with membranes by combining NMR constraints with replica exchange molecular dynamics simulation using implicit membrane environment. This method was applied to NMR analysis of larger membrane proteins. ^1H - ^{13}C correlations of mobile segments of *pHtrII* were analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：構造生物学、生物物理、蛋白質、原子・分子物理、ナノバイオ、生体分子

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質の機能を構造に基づいて解析するには、リン脂質二重膜にある状態で、いくつもの中間状態について原子分解能の全構造を知る必要がある。つまり、レチナールの光異性化による構造変化や、そのオリゴマー形成による反応制御を、原子分解能で明らかにすることが重要である。しかし、通常の溶液NMR法では、脂質二重膜を含む系では有効分子量が大きくなり過ぎ、分子構造情報を取得することができない。脂質二重膜を含む膜蛋白質では単結晶を作るのが難しく、X線結晶構造解析するのは困難である。また、これらについては二次元結晶の作成も難しく、電子線回折での構造決定も困難である。このボトルネックになっている課題を、私たちが開発した多次元固体NMR法で解決して行くのがこの研究である。

これまで、私たちは固体NMR法の専門家として方法論を開発し、生体高分子の全構造決定に応用してきた。脂質二重膜に結合した状態で残基数 20 程度のペプチドについては原子分解能で全構造決定できることを示した。脂質極性基のリン酸に接している残基、疎水的なコア領域にあるアシル鎖に直接接しているアミノ酸側鎖などを特定し、そのペプチドのリン脂質二重膜における位置を決定できることを示した。また、完全 ^{13}C , ^{15}N 標識蛋白質について炭素間距離と水素間距離測定を行うことによって、繊維状の分子集合体を作るアミロイド分子の複合体構造決定ができることを示した。また、私たちは、このような方法を脂質二重膜に存在するより大きな膜蛋白質に応用している。膜にある分子モータ F_0F_1 -ATP 合成酵素の膜貫通領域 F_0 を構成している約 80 残基からなる c サブユニット・モノマーについて、完全 ^{13}C , ^{15}N 標識した試料を対象にしてほぼ完全な NMR 信号の

帰属と残基分解能での構造解析を行った。これには、私たちが開発した NMR データベースに基づく多次元 NMR スペクトル・シミュレーション法が有効であった。また、光アンテナである ^{13}C 完全標識したバクテリオクロフィル集合体構造を、固体 NMR で求めた分子間での炭素間距離から算出した。これら構造決定には、1990 年代から現在まで開発してきた多次元高分解能固体 NMR による信号帰属法と核間距離測定法を応用した。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を発展させて、250 残基程度の膜蛋白質の構造決定できる方法を確立・実証する。具体的には、同位体標識法、脂質二重膜への再構成法が確立しているフォボロドプシン、ハロロドプシンを主要な対象にする。膜貫通している疎水領域と膜外にある親水領域は運動性の違いから、分別してスペクトルを単純化して測定する。また、さらに単純化するためにアミノ酸選択的同位体標識も行う。これらの新しいスペクトル単純化法と、これまでに開発した蛋白質内の核間距離測定法と蛋白質と脂質分子間の距離測定法を組み合わせ、脂質二重膜にある、これまでより大きい膜蛋白質の構造決定を行う。

これは、脂質二重膜にある蛋白質の構造決定法の進歩、NMR の応用など、方法論の点からも、もっとも先進的な研究成果になる。膜蛋白質の構造決定は、構造プロテオミクスを進める上でも障害になっている。ゲノムの 3 割が膜蛋白質であり、エネルギー変換や膜を介しての信号伝達で極めて重要な役割を担っており、GPCR など医学上も重要であるのにかかわらず、立体構造解析は進んでいない。特に、生理的条件に近い、二重膜存在下の構造解析は極めて少ない。したがって、本研究

のような膜蛋白質の全構造決定法の進展は生物物理を初めとする生命科学に大きなインパクトを持つ。

3. 研究の方法

多次元マジック角試料回転固体NMRで分子量数万の膜蛋白質の全体構造を解析した。対象にする膜蛋白質は、以下のような微生物による大量試料調製法と、脂質二重膜への再構成法が確立している系である。また、対象にする膜蛋白質は最小培地などでの安定同位体標識が効率的に行った。光センサーであるフォボロドプシン pR とそのトランスデューサーである pHtrII の複合体、光イオンポンプであるハロロドプシン phR について主に立体構造解析を行った。これらロドプシンは7回膜貫通のGPCRの良いモデルであり、高い蛋白質濃度の脂質二重膜を対象にして測定できるので、高い感度のNMR測定が期待できる。また、H⁺-ATP合成酵素の膜貫通領域であり、二回膜貫通ヘリックスを持つサブユニットcについても、簡単な系として構造解析を行った。

初年度

1. 膜蛋白質測定条件の最適化

上記の試料について多次元マジック角試料回転固体NMRスペクトルが、高い分解能で得られるよう膜蛋白質-脂質二重膜の試料系の最適化を行った。スペクトル分解能を高めるには、これまで距離測定で行ってきた脂質膜がゲル状態ではなく、運動性のある液晶状態での測定が有効であると考え、固体NMRによる研究例は少ない。具体的に検討するのは、水含量、脂質と蛋白質の濃度比、測定温度などである。特に、運動性の低い膜貫通領域と、運動性の高い水溶性領域を、分別して選択的にNMR測定することができるので、運動性を制御することは重要である。このために上記パラメータを変化させた。これらは、天然存在比の試料について¹³C-固体NMRを測定することで行った。実験法としては、運動性の低い領域については交差分極法(CPMAS)を用い、運動性の高い領域についてはH⁺-デカップリングを行った¹³C-NMRパルス励起法を用いた。この実験のための試料調製を行う。これらを、フォボロドプシン pR とそのトランスデューサーである pHtrII の複合体、ハロロドプシン・オリゴマー、リング状のc-サブユニットについて行った。

以上のような測定条件をより敏感に反映する2次元¹³C-NMR測定を行う。このためにフォボロドプシンやハロロドプシン、2回膜貫通蛋白質サブユニットcについて、完全¹³C,¹⁵N標識した試料を調製した。膜に再構成した蛋白質を固体NMR測定するための最適な水和や温度条件を確認した。2次元¹³C固体

NMR測定は、比較的感度の高い¹Hスピン拡散法を用いた方法で行う。なお、これら実験は、大阪大学・蛋白質研究所にある3台の固体NMR専用分光装置を用いて行った。また、固体NMRで低温実験するために窒素ガス発生装置を設備費で購入した。

2. 膜蛋白質¹³C,¹⁵N-NMRシグナルの帰属
上記の測定条件で、多次元¹³C,¹⁵N双極子相関法で残基内と残基間の双極子相関から信号帰属を行う。膜間領域のNMR測定では、運動性の低い固体試料に用いる交差分極、リカップリング法を用いた。水溶性領域の測定では、溶液NMRの方法に近いHR-MAS法(High-Resolution Magic-Angle Spinning)で高い分解能を確保してNMR測定を行う。200残基以上あるGPCRのような蛋白質の主鎖とCβの¹³C,¹⁵N-NMR信号帰属をほぼ完全に行うためには、測定条件や含水量など試料系を最適化する以外に、高度な半選択的同位体標識法と組み合わせる必要がある。試料は、¹³C,¹⁵N完全標識試料と、(V, L, F, Y)のみ標識しない(リバース標識)試料について行った。また、リバース・ラベリング法では、信号帰属に用いる多くのスピン間結合を保ったままの状態、アミノ酸選択ラベルを行える。なお、NMR信号帰属については、私たちが開発した約5種類の多次元固体NMRを用いるプロトコルの詳細が記されている。リング状ではないcサブユニットについては行った。なお、この段階で得られた化学シフトは、蛋白質NMRデータベースを用いて主鎖の二面角に関する制約としても利用した。また、この時、蛋白質NMRデータベースに基づく、スペクトル・シミュレーション法を行い、効率的に信号帰属と二次構造解析を行った。

残基数の少ないサブユニットcについては上記の標識試料でほぼ完全な信号帰属を行えると考え。しかし、7回膜貫通蛋白質について、分解能が十分確保されないときは、別のアミノ酸についてリバース・ラベルした試料を用いて帰属を行う。信号が重なる場合には、スペクトル・シミュレーション法なども使い信号をデコンボリューションした。

次年度以降

3. 核間距離情報の取得

蛋白質内の核間距離相関、蛋白質とリン脂質の原子間距離、脂質二重膜外の水分子と蛋白質の距離相関、部位特異的スピンラベルを用いた長距離測定を行い膜蛋白質の全構造解析を行った。

蛋白質内の炭素間距離を¹³C双極子相互作用によるスピン拡散法で測定する。この方法が蛋白質の3次構造決定に有用であることを示した。これ以外に、開発した方法を用いて、脂質二重膜のリン原子が蛋白質に接している部分、脂質の炭化水素鎖が接している蛋白

質部分を求めた。また、運動性の高い水層の水分子と接している蛋白質分子部分も特定する。これら測定にも、7回膜貫通蛋白質ではスペクトル分解能を確保するためリバーズ・ラベル試料を必要に応じて用いる。また、炭素間距離については、原子間の直接的な分極移動による距離を求めるため、複数の混合時間についてスピン拡散スペクトルを測定して、より正確な炭素原子間距離を算出した。これら方法により、単に膜蛋白質の構造だけでなく、蛋白質間の位置関係(4次構造)、脂質二重膜の親水基や疎水部との相対位置関係も含めて、立体構造に関する情報を得ることができた。また、設備としては固体NMRで低温実験するためのチラーを購入した。膜蛋白質複合体の総分子量の大きい系で、サブユニットの位置関係を決定するためには、上記のような6 Å以内の短い核間距離以外に、長い核間距離情報を得ることが重要である。このことは短時間に構造決定を行うためにも重要である。長距離情報取得のために部位特異的電子スピン標識を行い、その電子スピンと核スピンの距離を測定して構造解析に利用した。このために特定部位をCysに置換した蛋白質を作り、発現させる。膜蛋白質トランスデュサー-pHtrIIとpRの複合体について適用し、その有効性を実験的に調べた。また、膜中での電子スピンの緩和などが、核・電子スピン間の距離測定に与える影響も調べた。

4. 固体NMRデータ解析による構造決定
化学シフトから得た二面角と距離相関から得た情報を組み合わせて構造決定を行う。距離相関の帰属は、スペクトル分解能の制約から容易ではない。しかし、距離相関のスピン対への帰属と構造決定を同時に行う方法で、構造を収束させながら、その構造情報も利用して距離相関情報のスピン対への帰属を進める。データ解析にはCNS、CYANAなどのシミュレート・アニーリング法を用いた。

蛋白質の構造をほぼ決めた後に、リン脂質二重膜のリン原子と炭化水素鎖、水層の水との相対的位置関係を定める。また、このことからハロロドプシンのオリゴマー構造やサブユニットcのリング状の構造を決定する。脂質に関する情報も含んだ系では、脂質二重膜と蛋白質から成る系について、制約付き分子動力学を行って構造の最適化を行う。この時にはCharmMの力場を用いた計算を行った。

5. NMRの高感度化では、高磁場DNP法を採用した。これによりタンパク質の固体NMR信号の感度を向上させることを試みた。新しいピ・ラジカル化合物などを用いて、電子スピン共鳴させるテラヘルツ波の周波数や強度など条件を最適化することで、NMR感度

を約30倍向上できた。これをタンパク質に応用した。

4. 研究成果

固体NMR実験では、ハロロドプシンとフォボロドプシンのトランスデュサー pHtrII、モデルとしたペプチド・マストパンXについて詳しく解析を行った。ハロロドプシンではループ領域について、選択標識試料も用いてアミノ酸への帰属はほぼ終わり、一次構造特異的な信号帰属は約65%まで進めた。トランスデュサー pHtrII では、溶媒のバルクな水のHからの距離測定を行うと同時に、二重膜の両親媒性領域にあるアミノ酸残基を帰属した。pHtrIIの水溶性領域については、試料調製に依存してβ構造とαヘリックスが観測されたが、精製途中の膜画分の固体NMRでは pHtrII 構造はヘリックスであり、これが天然構造であると考えられた。データ解析では、帰属されていないNMR構造パラメータも構造決定に利用する方法を開発した。この方法ではNMR構造制約の下で二重膜環境を考慮した高速な分子動力学計算により構造決定する。モデル系の計算では、これまでより少数の実験値であっても正しく構造決定できることがわかった。NMRの高感度化では、新しいピ・ラジカル化合物などを用いて、電子スピン共鳴させるテラヘルツ波の周波数や強度など条件を最適化することで、NMR感度を約30倍向上できた。これをタンパク質に応用した。

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17件)

1. Hiroki Takahashi, Masatsune Kainosho, Hideo Akutsu and Toshimichi Fujiwara, "H-Detected H-H Correlation Spectroscopy of a Stereo-Array Isotope Labeled Amino Acid under Fast Magic-Angle Spinning", J. Magn. Reson. 203, 253-256 (2010). 査読有
2. Yoh Matsuki, Hiroki Takahashi, Keisuke Ueda, Toshitaka Idehara, Isamu Ogawa, Mitsuru Toda, Hideo Akutsu and Toshimichi Fujiwara, "Dynamic Nuclear Polarization Experiments at 14.1 T for Solid-State NMR", Phys. Chem. Chem. Phys., in press DOI:10.1039/c002268c (2010). 査読有
3. Toshitaka Idehara, Kosuke Kosuga, La Agusu, Ryusuke Ikeda, Isamu Ogawa, Teruo Saito, Yoh Matsuki, Keisuke Ueda,

- and Toshimichi Fujiwara, "Continuously Frequency Tunable High Power Sub-THz Radiation Source - Gyrotron FU CW VI for 600 MHz DNP-NMR spectroscopy" *J. Infrared Millim. Terahz. Waves*, in press DOI 10.1007/s10762-010-9643-y (2010). 査読有
4. 藤原敏道, "固体NMR分光法による生体分子複合体の構造解析", *日本物理学会誌*, 「実験技術」, 64, (3月号) pp.179-186 (2009). 査読有
 5. 藤原敏道, "固体NMR膜蛋白質複合体構造解析技術(融合発展する構造生物学とケミカルバイオロジーの最前線)", *蛋白質核酸酵素*, 54 (12) pp. 1499-1505 (2009). 査読無
 6. Masatoshi Kobayashi, Andrey V. Struts, Toshimichi Fujiwara, Michael F. Brown, Hideo Akutsu, "Fluid Mechanical Matching of H⁺-ATP synthase Subunit c Ring with Lipid Membranes Revealed by 2H Solid-State NMR", *Biophys. J.* 94, 4339-4347 (2008). 査読有
 7. Hiroki Takahashi, Hideo Akutsu, and Toshimichi Fujiwara, "A Magic-Angle-Spinning NMR Method for 1H-1H Distance Measurement Using Coherent Polarization Transfer in 13C-Labeled Organic Solids", *J. Chem. Phys.* 129, 154504, 1-12 (2008). 査読有
 8. 阿久津秀雄, 八木宏昌, 藤原敏道, "H⁺-ATP 合成酵素のエネルギー変換機構とそこにおけるソフトな相互作用(特集:ソフトな相互作用による膜インターフェースの機能制御)" *生化学*, 第80巻, 第10号, pp. 907-916 (2008). 査読無
 9. A. Egawa, T. Fujiwara, T. Mizoguchi, Y. Kakitani, Y. Koyama, and H. Akutsu. "Structure of the Light-Harvesting Bacteriochlorophyll c Assembly in Chlorosomes from Chlorobium Limicola Determined by Solid-State NMR", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 790-795 (2007). 査読有
 10. La Agusu, T. Idehara, I. Ogawa, T. Saito, T. Kanamaki, H. Takahashi. and T. Fujiwara "Detailed Consideration of Experimental Results of Gyrotron FUCWII Developed as a Radiation Source for DNP-NMR Spectroscopy", *Int. J. Infrared Millim. Waves*, 28, 499-511 (2007). 査読有
 11. Y. Matsuki, H. Akutsu, and T. Fujiwara. "Spectral Fitting for Signal Assignment and Structural Analysis of Uniformly 13C-Labeled Solid Proteins by Simulated Annealing Based on Chemical Shifts and Spin Dynamics" *J. Biomol. NMR*, 38, 325-339 (2007). 査読有
 12. Nobuyasu Komi, Kayo Okawa, Yukihiro Tateishi, Masahiro Shirakawa, Toshimichi Fujiwara, and Hideo Akutsu, "Structural Analysis of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptides Bound to Phospholipid Membranes by Magic Angle Spinning Solid-State NMR", *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1768, 3001-3011(2007). 査読有
- [学会発表](計34件)
1. 樋口真理花、江川文子、田巻初、神谷昌克、相沢智康、河野敬一、藤原敏道、出村誠、膜タンパク質ハロロドプシンの多次元固体 NMR 法による構造解析、第 48 回 NMR 討論会(福岡)、2009/11/10
 2. 池田 恵介、亀田 倫史、原田 英里砂、阿久津 秀雄、藤原敏道、Implicit membrane model を用いた分子動力学計算と固体 NMR スペクトルシミュレーションによる膜結合ペプチド・マストパラン X の構造解析(ポスター発表)、第 48 回 NMR 討論会(福岡)、2009/11/10
 3. 藤原敏道、Method for the dynamic structural analysis of membrane proteins based on NMR、口頭、第 47 回日本生物物理学会、徳島、2009/11/1
 4. A. Egawa, K. Hayashi, C. Kojima, H. Akutsu and T. Fujiwara、Mainchain structural analysis of transmembrane halobacterial transducer pHtr II by multi-dimensional MAS solid-state NMR、"The 3rd Asia-Pacific NMR Symposium, (Jeju, Korea)、2009/10/25
 5. 藤原敏道、Structural analysis of biomolecular complexes by solid-state NMR、口頭、"International Symposium on Biological NMR、Seoul, Korea、2009/10/23
 6. Toshimichi Fujiwara、Solid-state NMR structural analysis of membrane proteins and sensitivity enhancement、

- "2nd Symposium on Structural Analysis of Biological Macromolecules & 7th Japan-Korea Bilateral Symposium on Biological NMR、札幌、2009/7/27
7. 藤原敏道、高磁場 DNP と固体 NMR 生体分子複合体構造解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー「先端磁気共鳴がもたらす生体体系研究の新展開」、大阪、2008/7/29
 8. 藤原敏道、高橋大樹、江川文子、佐伯美和子、阿久津秀雄、林こころ、児島長次郎、出原敏孝、小川勇、戸田充、膜タンパク質固体 NMR 構造解析と高磁場 DNP、第 47 回 NMR 討論会、筑波、2008/11/13
 9. 藤原敏道、出村誠、児嶋長次郎、固体 NMR 膜蛋白質複合体構造解析技術、第 46 回生物物理学会シンポジウム、福岡、2008/12/5
 10. 江川文子、佐伯美和子、林こころ、児嶋長次郎、阿久津秀雄、藤原敏道、Structural analysis of transmembrane halobacterial transducer pHtrII by multi-dimensional high-resolution solid-state NMR, 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science, ケアンズ, 2008/6/23
 11. Toshimichi Fujiwara, Solid-State NMR for Structural Analysis of Biomolecular Complexes, Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR, ソウル, 2008/4/25
 12. H. Takahashi, A. Egawa, H. Akutsu, and T. Fujiwara, ^{13}C - ^{13}C and ^1H - ^1H Distance Analysis from the Polarization Transfer in Uniformly ^{13}C -Labeled Organic Solids under Magic-Angle Spinning, the 49th Experimental NMR Conference, Asilomar Conference Grounds, Pacific Grove, CA, USA, March 10, 2008:口頭発表.
 13. Marika Higuchi, Ayako Egawa, Masakatsu Kamiya, Tomoyasu Aizawa, Keiichi Kawano, Toshimichi Fujiwara, and Makoto Demura, Solid-state NMR of pharaonis halorhodopsin, Optimization of sample preparation, 第 45 回生物物理学会、パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21 日-23 日:口頭発表.
- 化学同人 (2009).
2. Y. Todokoro, M. Kobayashi, T. Fujiwara and H. Akutsu, Structural analysis of membrane systems by solid-state NMR. in Chemistry, Physics, and Biology in Macromolecular Science ed. T. Sato, 173-182, Osaka University Press, Osaka (2008).
 3. T. Fujiwara and H. Akutsu, "Secondary Structure Analysis of Proteins from Angle Dependent Interactions" Modern Magnetic Resonance, vol. 1., Ed. G. Webb, Springer Netherlands, 731-736 (2007).
 4. 阿久津秀雄, 藤原敏道, "固体高分解能 NMR" 生命科学のための機器分析実験ハンドブック(実験医学別冊), pp 157-162, 編集:西村善文、羊土社、(2007)

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/biophysics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 敏道 (FUJIWARA TOSHIMICHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 20242381

[図書] (計 5 件)

1. 藤原敏道, 池上貴久 "タンパク質の同位体ラベルと NMR 分光法" in 「タンパク質をみるー構造と挙動」 pp. 167-196,