

平成22年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20770080

研究課題名（和文） 光照射装置を組み込んだ固体 NMR による構造解析の研究

研究課題名（英文）

Structural analysis by solid-state NMR with photo-illumination system

研究代表者

川村 出 ( KAWAMURA IZURU )

国立大学法人横浜国立大学・大学院工学研究院・研究教員

研究者番号：20452047

研究成果の概要(和文)：本研究では固体 NMR 測定中に試料に対して選択的に光照射を行い、光活性化させた光受容膜タンパク質の NMR 信号を解析し、その活性メカニズムを明らかにすることが目的である。光受容膜タンパク質内の発色団レチナールの光異性を NMR 信号の変化として観測することができ、NMR 測定中に光活性化状態をコントロールできる光照射システムの構築に成功した。今後、発色団周りのタンパク質構造変化の観測に展開できる。

研究成果の概要(英文)： To reveal photo-activation mechanism of photoreceptor membrane proteins, we have developed photo-illumination system on solid-state NMR measurements. By means of this system, we could successfully observe the photo-isomerization of retinal as a chromophore in protein from ground state to excited state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：固体 NMR / 膜タンパク質 / 構造生命科学 / レチナール / バクテリオロドプシン / センサリーロドプシン

## 1. 研究開始当初の背景

固体NMR測定では高分解能NMRスペクトルを獲得するための標準的な手法として静磁場に対して54.7°傾けた軸の周りでNMR試料管を2-50 kHz程度のスピードで高速回転させるマジック角回転MAS (Magic Angle Spinning) を行う。このため試料管の強度が重要でセラ

ミック製製の試料管を使用する事が多く、光を透過させることが難しい。この点を改良し、申請者はMAS と同時に光照射を行うシステムを開発し、*In-situ* photo-illumination under MAS conditionとして発表している。それはNMRの磁石の外からプローブに装填した光ファイバーとNMR試料管の上部をファイバ

一キャップで構成することで、MASの回転を妨げずに、光によるNMR信号の変化を高分解能で観測することができる画期的なシステムである(図1)。

この光照射-固体NMRシステムを、近年、数多くの種類が発見されているレチナルタンパク質に適用する。特に細菌中などで光認識するセンサータイプのレチナルタンパク質(センサーロドプシンI、II(SRI, SRII)など)に適用する。これらのタンパク質はその光活性中間体とされるM中間体が数秒以上の長寿命をもつものが多く、NMR測定には都合が良い。さらに、センサータイプのレチナルタンパク質はその共役するトランスデューサータンパク質との相互作用により光情報の信号伝達をするため、光のオン/オフを利用してタンパク質-タンパク質相互作用を介した信号伝達メカニズムを理解することができる。本システムはこのような長寿命の光中間体をもつレチナルタンパク質の構造解析に特に有効であり、得られる光活性構造変化の情報からその機能を理解することができると思われた。

## 2. 研究の目的

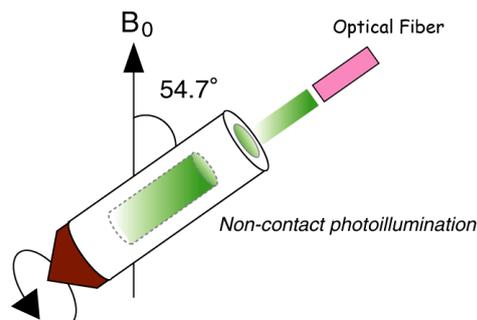


図1 *In-situ* Photo-Illumination under MAS condition.

I. Kawamura et al. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129 1016-1017.

本研究では固体NMR分光器に導入した光照射システムの最適化と、そのシステムを利用した光受容膜タンパク質の構造解析を行うものである。光受容膜タンパク質としてバクテリオロドプシンを代表とする、発色団にレチナルを有するレチナルタンパク質を研究対象の中心とする。これはレチナルの光異性化によってのみタンパク質が活性化することから基底状態の構造に加えて、その光活性構造を分子レベルで理解することが重要であるため、光照射-固体NMR測定により、その光活性構造情報を明らかにする。

## 3. 研究の方法

大腸菌の培養から各測定に必要な目的タンパク質の同位体標識試料を調製し、適切な界面活性剤で可溶化、Ni-NTA アガロースを利用した精製後、脂質二重膜に再構成した。バクテリオロドプシンの試料に関しては、高度好塩菌 *H. salinarum* から直接取れる紫膜を使用した。NMR測定には横浜国立大学に設置してある固体 CMX-400 Infinity NMR 分光器を用いた。光照射 NMR 測定には 524 nm のレーザーの光をファイバーにより、NMR 磁石の中に導入して試料管内のサンプルを光励起させて測定した。この条件で定常的に光を照射することで、光活性状態といわれる M 中間体が蓄積される。MAS の回転数は通常は 4 kHz で設定し、加圧実験の場合はその速度を 12 kHz 程度まで上げて測定を行った。

## 4. 研究成果

光照射-固体NMRシステムの構築と光励起による NMR 信号変化のモニターおよび関連する光受容膜タンパク質の NMR 信号解析を行った。

(1) 脂質二重膜環境中および界面活性剤中のセンサーロドプシンに関して、光照射-固体NMRシステムによる測定(図1)を行い、レチナル光異性化による化学シフト変化を観測した。これは All-trans 型から 13-cis, 15-anti 型への光異性化を示し、M 中間体についての化学シフト値を決定することができた。これはレチナルの光異性化によって機能するタンパク質の構造変化を観測するための重要な基礎データのひとつとなる。これにより、NMR 測定中での光励起状態を生成することに成功し、光照射システムの構築ができた。今後、光励起状態の割合を高めるなど最適化を試み、センサーロドプシンの蛋白質構造変化を観測して、タンパク質-タンパク質相互作用を介した光信号伝達機構の分子レベルでの解明ができると考えられる。具体的には導入する光強度の調節、低温測定用チラーの使用やファイバーキャップの改良などが必要である。また、界面活性剤中で生成する M 中間体とは異なる化学シフト値を示したことから、脂質膜環境中での変化は構造-機能相関を議論する上で重要であることも考えられる。

(2) バクテリオロドプシンの暗順応状態では All-trans 型と 13-cis, 15-syn 型のレチナルが 1:1 の割合の熱平衡状態で存在する。固体 NMR のマジック角回転 MAS の手法を応用して、この回転速度を上げることで試料内に遠心力を生み出すことができる。これは比較的小さい圧力ではあるが、加圧することでレチナルの熱平衡状態を変化させ、13-cis,

15-syn 型の割合を高めることに成功した。光異性化とは異なるこの現象は、同時に起きるタンパク質構造変化とカップルしており、その際に生じる体積変化などの情報に関してもレチナル-タンパク質間相互作用を理解する上で重要である。また、高速 MAS は試料に対して加圧するツールとなることも実験的に示した。

(3) センサリロドプシン D75N 変異体を用いた共役トランスデューサーとの相互作用について調べるために固体 NMR による測定を行った。試料は $[3-^{13}\text{C}]\text{Ala}$ -標識試料を用い、C 末端領域の Ala に関しては、変異体サンプルを利用して信号を帰属した(I. Kawamura et al. (2007) *Photochem. Photobiol.* 83 339-345. )。センサリロドプシン単体ではその細胞質側にある C 末端領域の運動性は高いが、トランスデューサーと結合した場合はその C 末端部位の運動性が減少した。これに比べてトランスデューサーと結合した D75N 変異体では C 末端部位の運動性が増加したことから、レチナル-プロトン化シッフ塩基の対イオンである Asp75 の変化によって、C 末端領域近傍でのトランスデューサーとの相互作用が変化したと考えられる。また、この減少にカップルしてトランスデューサーの細胞質側の運動性が減少した。この結果からセンサリロドプシンの C 末端の運動性が信号伝達機構時に変化し、タンパク質-タンパク質間の相互作用によってトランスデューサーの運動性が大きく変化する信号伝達経路の一部が明らかになったと考えている。

I. Kawamura et al. (2008) *Photochem. Photobiol.* 84 921-930.

(4) レチナル再構成バクテリオロドプシンおよびバクテリオ-オプシンの BC ループの構造を  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  NMR で評価したところ、Wild-type のバクテリオロドプシンとは運動性や構造が異なることが判明した。それは  $[1-^{13}\text{C}]\text{Val}$  や  $[^{15}\text{N}]\text{Pro}$  標識 BR の CP-MAS 測定から、BC ループの Val69 および Pro70 の大幅な信号強度変化が観測された。一方で培養時にレチナル欠損株に対して外因的にレチナルを加えた場合の BR に関しては、これらの信号強度が野生型 BR と同じ強度を示した。このことからレチナルの再構成条件やレチナルと BC ループの遠距離相互作用などがタンパク質の正しいフォールディングに関係していることが示唆された。

I. Kawamura et al. (2009) *Photochem. Photobiol.* 85 624-630.

(5) 光励起によるタンパク質の構造を観測する上で、本研究で構築したシステムは極めて有効に機能し、タンパク質の NMR 信号の変

化の研究に展開して、機能メカニズムを理解することができる。

## 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 I. Kawamura, J. Tanabe, M. Ohmine, S. Yamaguchi, S. Tuzi, & A. Naito. Participation of the BC loop in the Correct Folding of Bacteriorhodopsin as Revealed by Solid-state NMR (査読有) 2009、vol.85 *Photochem. Photobiol.* 624-630.
- ② I. Kawamura, H. Yoshida, Y. Ikeda, S. Yamaguchi, S. Tuzi, H. Saito, N. Kamo & A. Naito. Dynamics change of Phoborhodopsin and transducer by activation: Study using D75N mutant of the receptor by site -directed solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR (査読有) 2008 vol.84 *Photochem. Photobiol.* 921-930.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 川村 出, 堀籠 美也子, 辻 暁, 内藤 晶 “固体 NMR によるバクテリオロドプシンの Tyr の信号帰属と構造解析” 分子研研究会 拡がるロドプシンの仲間から”何がわかるか””何をもちますか” 2010年3月23日 自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター
- ② A. Naito, K. Osawa, H. Nishikawa, Y. Tomonaga, A. Wada, N. Kamo, I. Kawamura. “Photoilluminated and pressure induced isomerization of retinal in retinal proteins and the structural changes of proteins as studied by solid-state NMR” 第 48 回 NMR 討論会 2009 年 11 月 11 日 九州大学馬出病院 キャンパス医学部百年講堂
- ③ 近藤隆博, 川村 出, 西尾拓道, 加茂直樹, 内藤 晶 “固体  $^{13}\text{C}$  NMR を用いた光照射による ppR-pHtrII の細胞質表面部位の相互作用変化の観測” 第 48 回 NMR 討論会 2009 年 11 月 10-12 日 九州大学馬出病院 キャンパス医学部百年講堂
- ④ 川村 出, 堀籠美也子, 田邊純子, 大嶺将人, 辻 暁, 内藤 晶 “ $^{13}\text{C}$  固体 NMR によるバクテリオロドプシンの Tyr コンフォメーションの解析” 第 47 回 日本生物物理学会 2009 年 10 月 30 日-11 月 2 日 アスティ徳島
- ⑤ 日高徹郎, 川村 出, 西尾拓道, 大澤一弘, 加茂直樹, 内藤 晶 “固体 NMR による光受容タンパク質 ppR とその変異体 T204A の局所構造変化の解析” 第 47 回 日本生物物理学会 2009 年 10 月 30 日-11 月 2 日 アスティ徳島

- ⑥ 西川大英、田島可奈、川村 出、和田昭盛、辻 暁、内藤 晶 “固体 NMR によるバクテリオロドプシンの圧力によって誘起されるレチナル異性化機構の解析” 第 47 回日本生物物理学会 2009 年 10 月 30 日-11 月 2 日 アスティ徳島
- ⑦ 川村 出、近藤隆博、日高徹郎、西川大英、堀籠美也子、友永雄也、内藤 晶 “REDOR 法を用いたバクテリオロドプシン主鎖のレチナル異性化に対する局所構造解析” 第 10 回 若手 NMR 研究会 2009 年 9 月 4 日-6 日 神奈川県 IPC 生産性国際交流センター
- ⑧ 川村 出、田邊純子、田島可奈、成川由佳、西川大英、大嶺将人、辻 暁、内藤 晶 “レチナル再構成条件に依存したバクテリオロドプシン BC ループのフォールディング” BMB2008 (第 81 回日本生化学会大会) 2008 年 12 月 9 日-12 日 神戸ポートアイランド
- ⑨ 川村 出 “若手招待講演 –固体 NMR を用いた暗順応状態バクテリオロドプシンの Tyr 主鎖コンフォメーションによるレチナル-タンパク質間相互作用の解析” 第 46 回 生物物理学会年会 2008 年 12 月 3 日 福岡国際会議場
- ⑩ 川村 出、田邊純子、西尾拓道、辻 暁、内藤 晶 “固体 NMR によるバクテリオロドプシンのレチナル異性化に依存した Tyr 残基の動的構造変化の解析” 第 47 回 NMR 討論会 2008 年 11 月 12-14 日 筑波大学 大学会館講堂
- ⑪ I. Kawamura, J. Tanabe, T. Nishio, A. Wada, S. Tuzi, N. Kamo & A. Naito. “Backbone Conformations of Retinal Protein as Studied by Solid-state NMR” 13<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins 2008 年 6 月 15-19 日 バルセロナ
- ⑫ 川村 出、田邊 純子、西尾 拓道、内藤 晶 ” 固体 NMR を用いたレチナル異性化に対するタンパク質の動的局所構造の解析” 第 8 回 蛋白質科学会年会 2008 年 6 月 10-12 日 タワーホール船堀

[その他]

ホームページ

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)

国立大学法人横浜国立大学・大学院工学研究院・研究教員

研究者番号：20452047

### (2) 研究協力者

内藤 晶 (NAITO AKIRA)

国立大学法人横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80172245

加茂 直樹 (KAMO NAOKI)

北海道大学先端生命科学研究院・教授

研究者番号：10001976