

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770101

研究課題名（和文）

In-situ 光照射-固体 NMR による光受容膜タンパク質の構造解析手法の開発

研究課題名（英文）

Structure of photoreceptor membrane protein by In-situ photo-irradiated solid-state NMR

研究代表者 川村 出 (KAWAMURA IZURU)

横浜国立大学・工学研究院・助教

研究者番号：20452047

研究成果の概要（和文）：*In-situ* 光照射固体 NMR 測定システムを發展させ、細胞膜中でのファラオスフォロドプシン ppR(センサリロードプシン II)およびその変異体 T204A の M 中間体をうまく観測したことを実証した。特にトランスデューサーと複合体形成した[20-¹³C]レチナールをもつ ppR の ¹³C NMR 信号から 13-cis, 15-anti 型レチナール配座である複数の M 中間体が存在することを明らかにした。我々の結果は ppR のフォトサイクル反応の知見を与える。

研究成果の概要（英文）：*In situ* photoirradiated solid-state NMR have been developed and demonstrated to successfully observe the M-photointermediate of *pharaonis* phorbodopsin (ppR) and T204A mutant in the lipid environment. The ¹³C NMR signals of [20-¹³C]retinal-ppR with transducer revealed that multiple M-photointermediates with 13-cis, 15-anti retinal configuration under continuously photoirradiated condition. Our results provide insights into the process of photocycle in the ppR with transducer protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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 / バクテリオロドプシン / 光中間体 / レチナール / センサリロードプシン / 細胞膜

1. 研究開始当初の背景

レチナールを発色団とする光受容膜タンパク質は、光を吸収することでレチナールの光異性化反応が起こり、タンパク質の構造変化を引き起こしてその機能発現に至る。光活性化によるタンパク質の構造変化を生理条件に近い条件で調べることは機能発現メカニズムを理解する上で極めて重要である。これまでに申請者らは光照射-固体 NMR 測定シ

ステムを開発してきた。このシステムをさらに改良して、光励起効率を上げることでタンパク質の NMR 信号変化を観測しやすくなる着想した。

2. 研究の目的

本研究では光励起効率が高い光照射固体 NMR システムの開発および最適化を行う。それを用いて、レチナールを発色団とする光

受容膜タンパク質の構造解析を行い、光活性化メカニズムを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

レチナルおよびタンパク質側の NMR 信号を観測するために、大腸菌の培養から目的タンパク質の同位体標識試料を調製し、ドデシルマルトシド DDM で可溶化、Ni-NTA による精製後、細胞膜に再構成した。In-situ 照射-固体 NMR 測定は横浜国立大学に設置してある固体 CMX-400 infinity NMR 分光器で行った。測定は暗状態と照射条件の NMR スペクトルを観測し、それらを比較することで光活性構造を調べる。また、高度好塩菌を用いてバクテリオロドプシンを大量発現させ、精製し温度変化の測定を行った。

4. 研究成果

① In-situ 照射固体 NMR 装置の開発

光受容膜タンパク質の信号伝達機能の解明に当たって、光反応サイクルで生成する光中間体の性質を知ることが重要である。特に照射時にタンパク質の構造がどのように変化するかを調べるためには、固体 NMR 装置に照射システムを組み込むことが重要である。今年度は MAS を用いた固体 NMR 装置で作動する照射システムの開発を行った。このシステムのレイアウトは Y. Tomonaga, I. Kawamura et al. (2011) *Biophys. J.* 101 L50-L52 に詳しく示している。照射光源には 5mW 532 nm の波長をもつグリーンレーザーおよび出力 50 mW, LED 光源 (520 nm) を用いた。光源からの光は超伝導磁石の外から光ファイバーを通してプローブヘッドまで導入した。プローブヘッドにおいてファイバーの軸をローターの軸に平行に固定した。ローターに試料を入れた後、ガラスの先端を細くして、さらに表面を粗くしたガラス棒を挿入して試料を封入した。このガラス棒の先から光ファイバーによって、ローターに接触することなく光を照射して、この光が試料内に導入されるように設計した。さらに光の試料への照射効率を上げるため、ガラス棒の先端を粗くしていることで光が散乱して試料に垂直に照射できるように設計した。

② In-situ 照射固体 NMR によるファラオニスフォボロドプシン ppR の光中間体の捕捉と構造の解析

ppR の M 中間体は他の中間体に比べて格段に寿命が長いことが分かっている。そこで 520 nm の波長の光を連続照射すると、M-中間体が捕捉できると着想した。実際、ppR に照射 NMR 装置を用いて、照射実験を行ったところ、0 °C では 20% が基底状態から

M-中間体に転移していた。この状況は ppR/pHtrII 複合体でも同じであった。一方、マイナス 20 °C においては ppR, ppR/pHtrII ともに 70% の基底状態が M 中間体に変換した。さらに M 中間体の信号は多重線 (M1, M2, M3) になっていることから、M 中間体は複数の状態が存在することが明らかになった。また負の走光性機能が失活する T204A 変異体では野生型とは異なる化学シフトに信号が現れ、M 中間体は多重線ではなかった。(Y. Tomonaga et al. (2011) *Biophys. J.* 101 L50-L52.)

③ 熱に応答する BR の構造変化の解析

バクテリオロドプシンは光駆動型プロトンポンプ活性を有するプロトン輸送膜タンパク質である。通常暗状態では all-trans retinal と 13-cis, 15-syn retinal が約 1 : 1 の強度比で存在する。本研究では熱により応答する retinal とタンパク質の構造変化を固体 NMR 法により観測し、解析した。[20-, 15-¹³C]retinal-BR の ¹³C-CP-MAS NMR 信号の温度変化を観測したところ、信号強度は温度が下がるにつれて運動性が下がるため、CP 効率が上がって信号強度が増加した。一方、all-trans と 13-cis, 15-syn の強度比に変化はなかった。[1-¹³C]Tyr-BR の ¹³C CP-MAS NMR 信号の温度変化を観測し、260 K 付近で信号強度が不連続に増加した。バルク水の凍結がこの信号強度の増加の原因であると考えられる。興味深いことに、この温度で all-trans の強度が 13-cis, 15-syn の強度に対して増加したことを示している。[20-, 15-¹³C]retinal および [1-¹³C]Tyr の ¹³C NMR 信号の位置は温度によって変化がないことから、熱による構造変化は起こっていないことを示している。この結果をまとめると、熱による BR の構造変化は retinal については目立った構造変化は起こらず、タンパク質側では α -helix 構造が増加する構造変化が起こったことを示す結果となった。

④ アナベナセンサリーロドプシンの細胞膜中での構造解析

アナベナセンサリーロドプシン ASR は真正細菌のシアノバクテリア中で発見されたレチナルタンパク質であり、光合成に必要な光捕集系タンパク質の発現制御に関与する光センサーと考えられている。光活性構造を捉えるための準備として、タンパク質 NMR 信号の連鎖帰属を試みた。均一-¹³C, ¹⁵N 標識した ASR を脂質二重膜に再構成し、固体 NMR 試料管にパッキングした試料を測定した。¹⁵N NMR お

よび ^{13}C - ^{13}C 相関スペクトルから、線幅の狭い良く分離したNMR信号が得られ、レチナール結合部位であるシッフ塩基の ^{15}N NMR信号からASR中のレチナールAll-trans型の配座のみをとっており、脂質膜中のASRは極めて均一性の高いことがわかった。つづいて、3次元NMR測定を行い、アミノ酸残基間および残基内のスピン系を構築し、連鎖帰属を試みた。その結果、膜貫通領域においては約85%の信号帰属を達成し、BCループは β シート構造と示すことができた。さらにH/D交換の実験を行い、重水との交換により交差ピークの信号強度が変化することを利用して、ASRの脂質膜中でのトポロジーを評価した。その結果、タンパク質の細胞質側は、細胞外側に比べてH/D交換が起きており、ASRの細胞質側は脂質膜からやや突出していることが示唆された。この膜タンパク質に対する連鎖帰属の結果は他のレチナールタンパク質の解析にも適用できる可能性がある有効な成果である。(L. Shi, I. Kawamura et al. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 1302-1305., S. Wang et al. (2011) *Biophys. J.* 101 L23-L25.)

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 5 件)

- ① I. Kawamura, S. Yamaguchi, H. Nishikawa, K. Tajima, M. Horigome, S. Tuzi, H. Saito, A. Naito. “Local Dynamics Change of Bacteriorhodopsin with Retinal Isomerization under Pressure as studied by Fast Magic Angle Spinning NMR.” *Polym. J.* (2012) 印刷中 (査読有)
- ② 川村 出, 内藤 晶 “動的核分極 DNP による超高感度固体 NMR 法の生体分子への展開” *分光研究* (2012) 61 巻 印刷中(査読有)
- ③ Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy, A. Naito. “An Active Photoreceptor Intermediate Revealed by In Situ Photoirradiated Solid-State NMR Spectroscopy.” *Biophys. J.* (2011) 101, L50-L52. (査読有)
- ④ S. Wang, L. Shi, I. Kawamura, L.S. Brown, V. Ladizhansky. “Site-Specific Solid-State NMR Detection of Hydrogen-Deuterium Exchange Reveals Conformational Changes in a 7-Helical Transmembrane Protein.” *Biophys. J.* (2011) 101, L23-L25. (査読有)
- ⑤ L. Shi, I. Kawamura, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky, “Conformation of a Seven Helical Transmembrane Photosensor in the Lipid Environment.” *Angew. Chem. Int. Ed.* (2011) 50,

1302-1305. (査読有)

Dr. I. Kawamura and Dr. L. Shi contributed equally to this paper.

[学会発表] (計 13 件)

- ① I. Kawamura, R. Furusato, T. Hidaka, T. Okitsu, A. Wada, N. Kamo, A. Naito. “Photo-induced dynamics change of Phoborhodopsin with transducer as studied by ^{13}C solid-state NMR” *ISNMR2011*, Nov. 15-19, 2011, Yokohama Japan.
- ② I. Kawamura, R. Furusato, T. Kondo, T. Okitsu, A. Wada, N. Kamo, A. Naito. “Dynamics change of phoborhodopsin with its cognate transducer protein as studied by in-situ photo-irradiated solid-state NMR” *The 4th Asia-Pacific NMR symposium*, Oct. 16-19, 2011, Beijing, China.
- ③ 川村 出, L. Shi, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky. “固体 NMR による脂質二重膜中の 7 本膜貫通型-光受容膜タンパク質の構造解析” 第 84 回 日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館
- ④ 川村 出, 古里 龍太郎、柴藤 祐介、日高 徹郎、沖津 貴志、和田 昭盛、加茂 直樹、内藤 晶 “Photo-induced dynamics change of phoborhodopsin with transducer protein as studied by in-situ phoro irradiated solid-state NMR.” 第 49 回 日本生物物理学会年会、2011 年 9 月 16-18 日、兵庫県立大学 姫路書写キャンパス、姫路
- ⑤ 川村 出 “固体 NMR による光受容膜タンパク質の構造解析” 奈良先端大・青学大・横浜国大 光応答分子材料に関する 3 大学共同セミナー、2011 年 7 月 28 日、横浜国立大学中央図書館メディアホール、横浜
- ⑥ 川村 出 “固体 NMR によるアミロイド・膜タンパク質の構造解析” 第 12 回 若手 NMR 研究会、2011 年 6 月 22-24 日、琵琶湖リゾートクラブ、滋賀 (招待講演)
- ⑦ 川村 出, L. Shi, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky “固体 NMR による脂質膜中の 7 本膜貫通型-光受容膜タンパク質の構造解析” 第 11 回 日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 7-9 日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪
- ⑧ 川村 出, L. Shi, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky “固体 NMR による 7 本膜貫通型-光受容膜タンパク質の構造解析” 日本化学会第 91 回春季年会、2011 年 3 月 26-29 日、神奈川大学横浜キャンパス
- ⑨ I. Kawamura, M. Horigome, S. Tuzi, A. Naito. “Protein backbone conformations of archaeal-type rhodopsins as studied by solid-state NMR” *Pacificchem2010*, Dec. 16, 2010, Hawaii, Honolulu.
- ⑩ 川村 出, L. Shi, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky “固体 NMR によるアナベナセン

サリナーロドプシンの構造解析” 第 49 回 NMR 討論会、2010 年 11 月 15-17 日、タワーホール船堀、東京

⑪ **I. Kawamura**, L. Shi, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky ”Solid-state NMR structural study of anabaena sensory rhodopsin in the lipid environment.” *3rd Japanese-French Joint Seminar on Organic Photochromism – Innovations in Photochromism*, Oct. 21-22, 2010, Nisseki Yokohama Hall, Yokohama, Japan

⑫ **川村 出**, L. Shi, K.H. Jung, L.S. Brown, V. Ladizhansky “Three-dimensional solid-state NMR study of Anabaena Sensory Rhodopsin in the lipid environment – Chemical shift assignments-” 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20-22 日、東北大学川内キャンパス、仙台

⑬ **I. Kawamura**, M. Horigome, S. Tuzi, **A. Naito**. “Structural change of Tyr residues in Bacteriorhodopsin corresponding to retinal configurations as studied by solid-state NMR” *14th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2010)*, Aug. 2-6, 2010, UCSC, Santa Cruz, San Francisco.

〔図書〕 (計 1 件)

① 川村 出

“レチナール蛋白質の固体 NMR 構造解析”
「広がる核磁気共鳴 NMR の世界」
(朝倉哲郎 編) コロナ社 (2011) pp 78-81.

〔その他〕

① 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・工学研究院・助教

研究者番号： 20452047

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

内藤 晶 (NAITO AKIRA)

横浜国立大学・工学研究院・教授

研究者番号： 80172245