

1A12

固体高分解能 NMR によるレチナール異性化に応答する バクテリオロドプシン主鎖の局所構造解析

(1. 横浜国立大学 2. 兵庫県立大学)

○川村 出¹、田辺 純子¹、木原 尚樹¹、辻 暁²、内藤 晶¹

バクテリオロドプシン(Bacteriorhodopsin; BR)は高度好塩菌 *H. salinarum* の紫膜中の膜タンパク質であり 7 本の膜貫通ヘリックスと発色団レチナールで構成され、レチナールの光異性化をトリガーにして、細胞外へプロトンを送る光駆動型プロトンポンプである。BR 中のレチナールは暗順応状態で All-trans 型と 13-cis, 15-syn 型が 1:1 で存在し、明順応状態では All-trans 型のみで存在する。また圧力順応状態では 13-cis, 15-syn 型の割合が増加する (Figure 1) [1]。このレチナールの異性化に対するタンパク質の構造変化はその機能発現を理解する上で重要である。特に BR の暗順応状態で存在する All-trans 型レチナールはプロトンポンプ活性を有するが、13-cis, 15-syn 型レチナールはポンプ活性が無いことから、この 2 つの間で起きている構造変化はプロトンポンプ機能において重要と考えた。

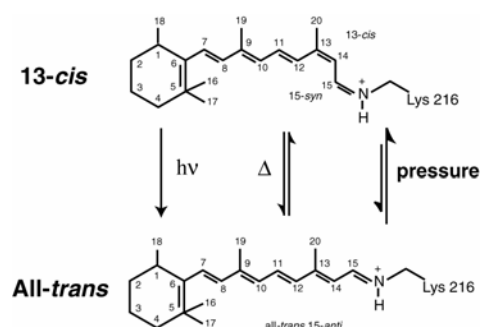


Figure 1. Isomerization pathways between 13-cis, 15-syn and all-trans retinal configurations in bR.

本研究では、固体 NMR の距離測定手法である回転エコー二重共鳴 REDOR を応用して、¹³C, ¹⁵N 同位体標識 BR から得られる複数の NMR 信号からアミノ酸 1 残基の信号に選択し、レチナールの異性化によるタンパク質主鎖の局所構造変化を観測することを目的とした。

【実験方法】 BR 中に存在する 11 個の Tyr 残基の C 末端側に結合するアミノ酸の種類を考慮すると、ユニークな Tyr-X 配列をもつ Tyr が数多く存在することがわかる (Figure 2A)。同位体標識試料には、[1-¹³C]Tyr/[¹⁵N]Pro-, [1-¹³C]Tyr/[¹⁵N]Gly-BR などの [¹⁵N]X のアミノ酸を変えた 7 試料をそれぞれ調製した。このような同位体標識を行うことで、Tyr-X 部分のペプチド結合に ¹³C-¹⁵N の直接結合をタンパク質中に 1 箇所だけ作ることができる (Tyr-Ala の場合を除く)。¹³C-¹⁵N 同位体標識試料に、異種核間の磁気双極子相互作用を選択的に復活させる REDOR (rotational echo double resonance) 法を適用して、強い磁気双極子相互作用を有するタンパク質内のアミノ酸配列に由来する ¹³C NMR 信号を選択して観測できる (REDOR Filter)[2]。

【結果・考察】 REDOR Filter 法によって、C 末端側に各々のアミノ酸が結合した単独の Tyr のカルボニル炭素の ¹³C NMR 信号を観測した。Tyr185 の信号は REDOR によって選択したにもかかわらず、177.7 ppm と 173.4 ppm の 2 本の信号が観測された (Figure 2B)[2]。この結果は暗順応状態ではほぼ同量存在する BR 中の 2 種類のレチナールに依存して、局所的に構造変化していると考えられる。このほかに細胞外側の Tyr57, 79 においても 2 本の信号が観測された。一方で Tyr26, 64, 150 に関してはそれぞれ 1 本の信号が得られた。

BR の暗順応状態の 2 つのレチナールの割合は、明順応状態と圧力順応状態によってコントロールでき、それぞれ All-trans 型と 13-cis, 15-syn 型の割合を増加させることができる [1]

(Figure 1). 明順応状態と暗順応状態で CP-MAS の差スペクトルを作ると、173.4 ppm から 177 ppm を含む領域に信号がシフトしていることがわかった。この結果から、レチナールを異性化させた場合に Tyr57, 79, 185 はその異性化にตอบสนองして構造変化することがわかった。

Tyr57, 79, 185 について 2 本の ^{13}C NMR 信号が現れた結果と、それらがレチナールの異性化に依存する理由をまとめると、レチナール近傍に Tyr185 が位置し、BR のレチナール結合部位から細胞外側へ伸びる水素結合のネットワークに Tyr57, 79 などが含まれ[3]、レチナールの異性化がネットワークを通して、タンパク質の主鎖のコンフォメーションに影響を及ぼしていることを明らかにした。レチナール近傍の Tyr を変異させるとプロトンポンプ効率が減少することや 13-*cis*, 15-*syn* 型レチナールではプロトンポンプができないことなど[4,5]を考えると、これらの Tyr が結ぶ水素結合のネットワークは機能に非常に重要であることが判明した。

[1] I. Kawamura et al. (2007) *Photochem. Photobiol.* **83** 339-345.

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

[3] H. Luecke et al. (1999) *J. Mol. Biol.* **291** 899-911.

[4] F. Garczarek et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** 3633-3638.

[5] N. Mizuide et al. (2006) *Biochemistry.* **45** 10674-10681.

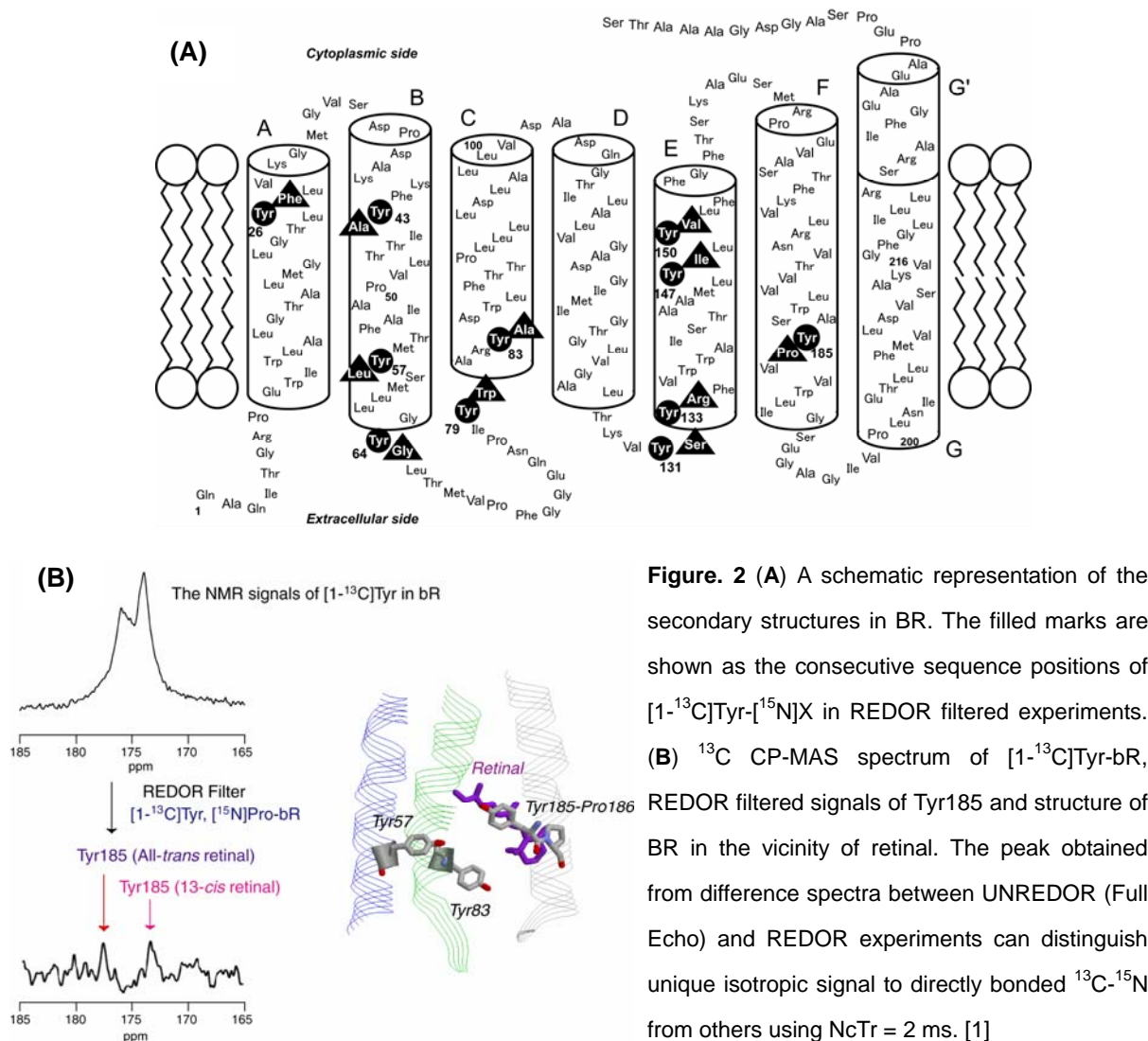


Figure 2 (A) A schematic representation of the secondary structures in BR. The filled marks are shown as the consecutive sequence positions of $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}-[^{15}\text{N}]\text{X}$ in REDOR filtered experiments. (B) ^{13}C CP-MAS spectrum of $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr-bR}$, REDOR filtered signals of Tyr185 and structure of BR in the vicinity of retinal. The peak obtained from difference spectra between UNREDOR (Full Echo) and REDOR experiments can distinguish unique isotropic signal to directly bonded $^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ from others using $\text{NcTr} = 2$ ms. [1]