

# 光照射 NMR 技術によるタンパク質の 光中間体構造の検出に成功

～光を利用して働くタンパク質の  
ダイナミックな構造変化の理解につながる成果～

## 本研究のポイント

- ・フォボロドプシンが生成する中間体のレチナールの NMR 信号の検出に成功
- ・実験的に観測した NMR 信号を計算化学によって説明
- ・多くのロドプシン類タンパク質の機能発現のメカニズムの理解に貢献する

## 【研究概要】

横浜国立大学の内藤 晶 名誉教授、川村 出 准教授、上田一義 教授、槇野義輝博士、岡山大学 須藤雄気教授、神戸薬科大学 和田昭盛教授、沖津貴志講師、北海道大学 加茂直樹名誉教授らの研究グループは、光照射型-固体核磁気共鳴分光(NMR)装置を用いて、ロドプシンタンパク質の一つであるフォボロドプシンが光吸収後に生成する複数の光中間体のレチナールの構造を解明しました。この成果によって、タンパク質が機能を発現するために必要なダイナミックな構造変化を明らかにすることが期待されます。

本研究成果は米国生物物理学会誌 *Biophysical Journal*, vol. 115 (1) (7 月 3 日号, 米国)に発表され、その表紙を飾りました。なお、本研究成果は科学研究費補助金 基盤研究(B) 基盤研究(C)、新学術領域研究、特別研究員奨励費、CREST, AMED の支援のもとに行われました。

## <発表雑誌>

雑誌名: *Biophysical Journal*, Vol. 115, No.1 (2018) (雑誌表紙)

論文題目: Retinal configuration of  $\rho$ pR intermediates revealed by photoirradiation solid-state NMR and DFT

(光照射固体 NMR と DFT 計算によるフォボロドプシンの光中間体のレチナールの構造の解明)

著者: Yoshiteru Makino, Izuru Kawamura\*, Takashi Okitsu, Akimori Wada, Naoki Kamo, Yuki Sudo, Kazuyoshi Ueda\* and Akira Naito\*

(槇野義輝、川村 出\*、沖津貴志、和田昭盛、加茂直樹、須藤雄気、上田一義\*、内藤 晶\*)

DOI: 10.1016/j.bpj.2018.05.030.

本件に関するお問い合わせ先

横浜国立大学大学院工学研究院 機能の創生部門 准教授 川村 出

電話: 045-339-4224 e-mail : izuruk@ynu.ac.jp

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授 須藤 雄気

電話: 086-251-7945 e-mail : sudo@okayama-u.ac.jp

# 光照射 NMR 技術によるタンパク質の 光中間体構造の検出に成功

～光を利用して働くタンパク質の  
ダイナミックな構造変化の理解につながる成果～

## <研究背景>

ロドプシンは、哺乳類の網膜から微生物の細胞膜にまであらゆる生物が光を利用するために保持しているタンパク質であり、その中にレチナールと呼ばれる化学物質(発色団)を必ず持っています。通常、レチナールには光を吸収する性質があり、その構造が変化する光異性化反応が起きます。つまり、ロドプシンはレチナールを利用して、イオン輸送や信号伝達などの機能を発現するタンパク質として生物の中で活躍しています。生物物理学をはじめとして広い研究分野において、ロドプシンは注目を集めているタンパク質であり、機能を発現する過程で次々と現れる中間体の構造はロドプシンの仕組みを理解する上で極めて重要な情報です。横浜国立大学の内藤 晶 教授と川村 出 准教授は分子構造を原子レベルで観測できる固体核磁気共鳴分光法<sup>注1</sup>を用いて、このようなロドプシンの光中間体を検出するために、世界的に見てもユニークな光照射固体 NMR の開発とその改良を重ねてきました(図 1)。固体 NMR において、高分解能な NMR 信号を得るためにマジック角回転法<sup>注2</sup>が利用されますが、これに光照射を組み合わせ、試料に対して高い効率で光をあてることを可能にしたのが光照射固体 NMR 技術です。

## <今回の成果>

横浜国立大学の内藤 晶 名誉教授、川村 出 准教授、上田 一義 教授、槇野 義輝 博士、岡山大学 須藤 雄気 教授、神戸薬科大学 和田 昭盛 教授、沖津 貴志 講師、北海道大学 加茂 直樹 名誉教授の研究グループは微生物型ロドプシン<sup>注3</sup>の一つであるフォボロドプシン<sup>注4</sup>に<sup>13</sup>C 安定同位体標識<sup>注5</sup>したレチナールを組み込み、いくつかの光中間体<sup>注6</sup>のレチナールの構造を光照射型-固体核磁気共鳴分光法(NMR)による実験データから解明しました。特に、フォボロドプシンの大きな構造変化を引き起こすことが予測されている M 中間体と O 中間体に加えて、今回新たにこれらの中間体を結ぶ N' 中間体の解明に成功しました。N' 中間体は光可視吸収スペクトル<sup>注7</sup>だけでは完全な区別が難しく、これまで検出が難しかったと考えられています。また、量子化学計算<sup>注8</sup>によるアプローチで各中間体におけるレチナールの構造変化を説明することに成功しました。

## <今後の展開>

生物はロドプシンを利用して光の情報を巧みに利用しています。光照射固体 NMR を利

用した成果は今後、レチナールを取り囲んでいるフォボロドプシンのダイナミックな構造変化を捉えることに発展すると同時に、あらゆる生物が持つロドプシンに適用することが可能になります。このような情報を手掛かりに、生物がロドプシンを通じて、光を利用する仕組みの解明につながる展開が期待されます。

<謝辞>

なお、本研究成果は科学研究費補助金 基盤研究(B)、基盤研究(C)、新学術領域研究“柔らかな分子系”、新学術領域研究“動的秩序と機能”、特別研究員奨励費、CREST、AMEDの支援のもとに行われました。

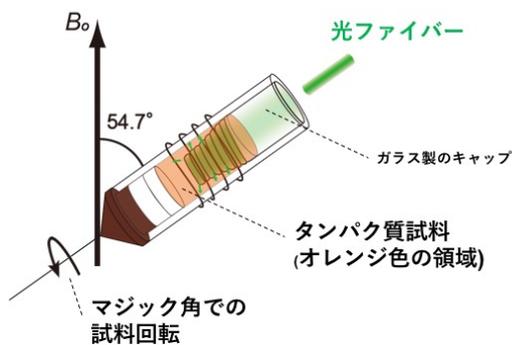


図1 光照射-固体 NMR 測定 の概略図

高分解能化技術の一つであるマジック角回転条件でのロドプシン試料への光照射のイメージ。B<sub>0</sub>は NMR 磁石の磁場方向、54.7° に傾けた筒状の試料管にタンパク質が充填してある。

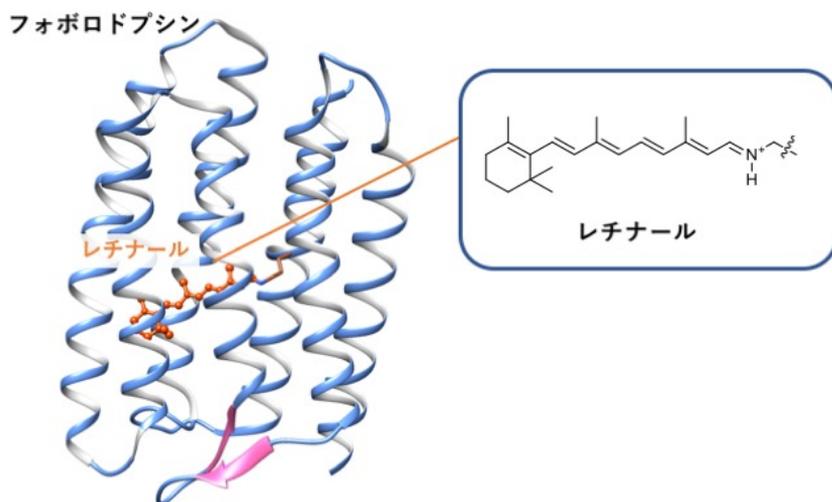


図2 フォボロドプシンとその発色団であるレチナール。右はレチナールの化学構造。

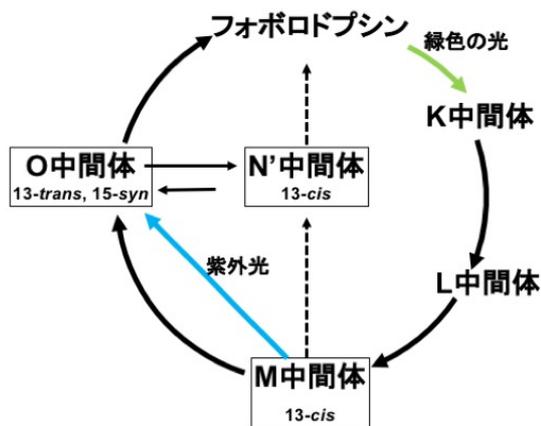


図3 今回の光照射 NMR 実験によって判明した光中間体の構造と反応経路。

<用語解説>

注1. 固体核磁気共鳴分光法(NMR)

NMR は、強い磁場中で分子を構成する原子核が持つ核スピンの挙動を精密に観測することによって、原子核の周りの電子状態を反映した NMR 信号を得ることができます。この信号が原子の化学的な結合状態を知る手がかりになるため、様々な分子構造の解析に広く利用されています。その中で固体 NMR 法は試料状態に依存することが少ないため、細胞膜中のタンパク質のような流動性の低い試料でも NMR 信号を測定することが可能になります。

注2. マジック角回転法

通常、流動性が低く固体状態に近い試料の NMR 信号は広幅になり、分解能は低いですが、磁場方向に対して試料を詰めた試料管を 54.7° 傾けた軸の周りで高速回転させることで、分解能が飛躍的に向上する。この角度がマジック角と呼ばれる。本研究はこれに光照射を組み合わせた光照射固体 NMR によって行った実験です。

注3. 微生物型ロドプシン

ロドプシンはその中に含まれるレチナールが光を吸収することで、機能を発現するタンパク質である。細菌などに存在する微生物型ロドプシンと人間などに存在する動物型ロドプシンに分けられる。

注4. フォボロドプシン

フォボロドプシンは高度好塩好アルカリ性菌に含まれる微生物型ロドプシンであり、この細菌にとって有害な近紫外領域の光を吸収した時に、そこから細菌が逃げ

るための信号を生み出すことに関わっている。

注5.  $^{13}\text{C}$  安定同位体標識

NMR では天然での存在比がおよそ 99%の  $^{12}\text{C}$  の信号を観測することができないため、本研究ではその同位体である  $^{13}\text{C}$  で標識したレチナールの  $^{13}\text{C}$  NMR 信号を検出した。

注6. 光中間体

微生物型ロドプシンは光を吸収することで、レチナールの構造変化に基づく光中間体を生成することが知られている。

注7. 紫外可視吸収スペクトル

物質がどの波長の光を吸収することができるか調べる分光法の一つ。レチナールは紫外可視域の光を吸収する性質をもつ。

注8. 量子化学計算

分子を構成する原子周りの電子の状態について量子化学の原理に基づいて計算する方法で、計算に用いるコンピュータの発展により、分子の構造、化学結合を始め、分子間相互作用や分子分光学に関連する電子スペクトルなどが求められるようになった。NMR についても、その電子状態から核スピンの遮蔽定数として算出し、理論的に NMR 信号の化学シフト値を求めることができる。