

# 固体 NMR によるバクテリオロドプシンのレチナール異性化に 依存した Tyr 残基の動的構造変化の解析

(1 横浜国立大、2 兵庫県立大)

○川村 出<sup>1</sup>、田辺 純子<sup>1</sup>、西尾 拓道<sup>1</sup>、辻 暁<sup>2</sup>、内藤 晶<sup>1</sup>

## Dynamic structure of Tyr residues in bacteriorhodopsin corresponding to retinal configurations as studied by solid-state NMR

○ Izuru Kawamura<sup>1</sup>, Junko Tanabe<sup>1</sup>, Takudo Nishio<sup>1</sup>,  
Satoru Tuzi<sup>2</sup>, Akira Naito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Yokohama National University,

<sup>2</sup>Department of Life Science, University of Hyogo

Bacteriorhodopsin (bR) from purple membrane (PM) of *H. salinarum* cells is a retinal-binding membrane protein which functions as a light-driven proton pump. It is important to understand how retinal configurations activate protein in view of retinal-protein interactions. Therefore, we investigate dynamic structure of bacteriorhodopsin (bR) corresponding to retinal configurations. Carbonyl carbon signals of Tyr26, 57, 64, 79, 133, 150 and 185 in bR were uniquely observed by REDOR technique in solid state NMR at 293K. In particular, two <sup>13</sup>C NMR peaks were observed for REDOR-filtered spectra of Tyr57, 79, 133 and 185 in the dark, respectively. Our results indicate that protein local conformations and dynamics with the change of hydrogen bond network between retinal binding site and extracellular surface are different from the state of two retinal configurations in the dark.

**【緒言】**バクテリオロドプシン(bR)は高度好塩菌 *H. salinarum* の紫膜中で2次元的に配列した膜タンパク質であり、レチナールの光異性化によって細胞外へプロトンを送る。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 の割合で存在し、光や圧力でその割合を変化させることができる。当研究室では bR 中の Tyr をプローブとして、REDOR 法を用い、レチナールの配座に対応する局所構造解析を行ってきた。本研究では、さらに他の Tyr について REDOR を用いた観測を行い、温度変化を行った測定などとあわせて、レチナールの All-trans 型と 13-cis, 15-syn 型に対応したタンパク質の動的な構造について検討した。

**【実験】**[1-<sup>13</sup>C]Tyr, [<sup>15</sup>N]X-bR (X= Leu, Pro, Val, Arg, Phe, Gly or Trp) の二重標識試料をそれぞれ調製した。<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N 同位体標識した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回転エコー二重共鳴法 REDOR を適用して、蛋白質内で <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N

---

固体 NMR、REDOR Filter、レチナール、ダイナミクス、膜タンパク質

かわむら いずる、たなべ じゅんこ、にしお たくど、つじ さとる、ないとう あきら

が直接結合で結ばれることで、強い磁気双極子相互作用を有する Tyr の  $^{13}\text{C}$  NMR 信号を選択して観測した (REDOR Filter<sup>1</sup>)。測定は Chemagnetics CMX Infinity-400 FT-NMR 分光器、三重共鳴プローブを用いて、MAS 4 kHz、測定温度 20°C、REDOR 展開時間を 2 ms に設定して行った。この設定時間では  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  が直接結合している場合に REDOR 効果による信号の減衰が特に速くなり、多重標識試料からも他のアミノ酸と区別できるため、信号の帰属が可能となる。またレチナールをブリーチした  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$  標識バクテリオオプシン(bO)や3-40°Cの温度範囲でbRの $^{13}\text{C}$  CP-MAS測定を行い、レチナールが結合していない状態や温度に対する Tyr の信号変化を観測した。

**【結果と考察】** これまでに REDOR Filter によって、Tyr57, 79, 185 に関しては暗順応状態 bR で 2 種類存在するレチナールに対応した 2 つのコンフォメーションをもつことを明らかにしている<sup>1,2</sup>。今回さらに Tyr133 についても 173.8 ppm(13-*cis*, 15-*syn* 型)と 176.1 ppm (All-*trans* 型)に信号を観測し、レチナール異性化に依存する残基であることが判明した。REDOR を用いた Tyr に関する結果から、Tyr57, 79, 133, 185 の  $^{13}\text{C}$  化学シフト差が大きい 2 つの信号は、レチナールが All-*trans* 型と 13-*cis*, 15-*syn* 型でタンパク質の構造がかなり異なることを示している。これによって CP-MAS で観測される 174.0 (13-*cis*, 15-*syn* 型)と 176.0 ppm(All-*trans* 型)の 2 つの主要な信号は、レチナールの配座に依存した Tyr の信号と考えることができる (Figure 1 (A))。さらにレチナールを除去したオプシン bO の  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR スペクトル (Figure 1 (B)) においては、これらの信号が大きく減少することからも、Tyr の信号はレチナールに強く依存していることがわかった<sup>3</sup>。また Tyr57, 79, 133, 185 などは BR のレチナール結合部位から細胞外側の間で発達している水素結合ネットワークに関係し、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主鎖のコンフォメーションにまで影響を及ぼしていることが示唆された。

これらの帰属をもとに、 $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bR の温度変化や緩和時間測定を行ったデータから、レチナールの配座に依存したタンパク質のダイナミクスについて考察を行う予定である。

### 【参考文献】

1. I. Kawamura et al. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129** 1016-1017.
2. 第 46 回 NMR 討論会講演要旨集、(2007) 札幌、**3L1** 54-57.
3. I. Kawamura et al. (2007) *Biochim. Biophys. Acta.* **1768** 3090-3097.

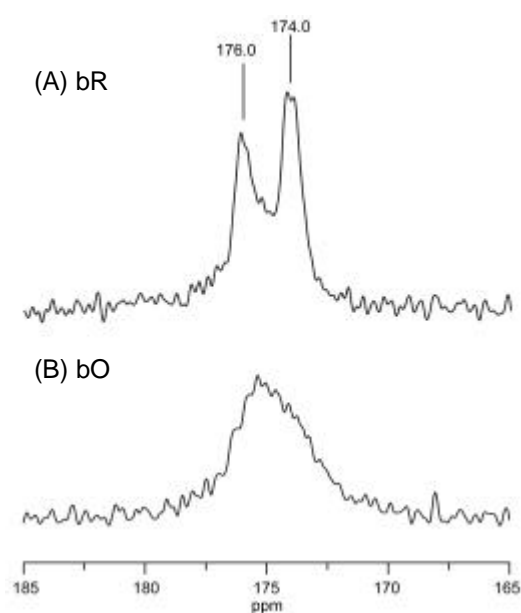


Figure 1.  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR spectra of  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bR (A) and  $[1-^{13}\text{C}]\text{Tyr}$ -bO.<sup>3</sup>