

多次元マジック角回転固体 NMR 法による膜タンパク質 ハロロドプシンの構造解析

(¹ 北大院・先端生命、² 阪大・蛋白研、³ 北大院・理)

○樋口真理花¹、江川文子²、神谷昌克¹、相沢智康¹、河野敬一³、藤原敏道²、出村誠¹

Structural Analysis of Membrane Protein Halorhodopsin by Solid State NMR under MAS

¹Faculty of Life Sci., Hokkaido Univ., ²Institute for Protein Research, Osaka Univ.,

³Faculty of Sci., Hokkaido Univ.

Marika Higuchi¹, Ayako Egawa², Masakatsu Kamiya¹, Tomoyasu Aizawa¹, Keiichi Kawano³,
Toshimichi Fujiwara², and Makoto Demura¹

Rhodopsin is a membrane protein having a typical seven-transmembrane-helical structure. Archaeal rhodopsin, the structural family of rhodopsin, functions as light-driven ion pump or sensor. Halorhodopsin (HR), one of archaeal rhodopsin, is an inward-directed light-driven chloride pump. In the photo-excited state or chloride-bound state, HR would undergo dynamic structural changes such as helix moving, opening of uptake channel, and re-orientation of the specific side-chain. However, there is no direct evidence for these structural changes of HR. The purpose of this study is structural characterization of HR by using solid-state NMR, so we performed optimization of sample preparation and various 2D solid-state NMR experiments of HR for signal assignments and structural analysis.

【序論】

NMR で膜タンパク質の構造・機能解析を行なうためには、安定同位体標識された大量かつ良質なサンプルが必要であるが、一般に膜タンパク質はこのような研究対象としては難解析性タンパク質として扱われる。そのため、大腸菌による大量発現系などのサンプル調製法の確立は、NMR による膜タンパク質研究の重要課題である。今回は膜タンパク質の固体 NMR 構造解析に向けたサンプル調製法の最適化と測定結果について報告する。

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーの中の 7 回膜貫通型ヘリックス構造をもつ代表例がロドプシン (rhodopsin) である。この構造ファミリーである古細菌型ロドプシンの一種にハロロドプシン (halorhodopsin) という Cl⁻を輸送する膜タンパク質がある。この Cl⁻の光駆動ポンプ機能は構造変化を伴っていると予想されているが、その原子レベルのメカニズムは詳しく解明されていない。そこで本研究では Cl⁻の存在がハロロドプシンの構造変化にどのように寄与するかを固体 NMR で解明することを目的とした。本発表では、安定同位体標識サンプル調製の最適化と各種固体 NMR 測定結果について述べる。

膜タンパク質、光駆動型アニオンポンプ、脂質再構成、多次元マジック角回転固体 NMR 法

ひぐちまりか、えがわあやこ、かみやまさかつ、あいざわともやす、かわのけいいち、ふじわらとしみち、
でむらまこと

【実験】

(1) サンプル調製

古細菌 *Natronomonas pharaonis* 由来のハロロドプシン (以下 *NpHR*) を大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換し、M9 最少培地で ^{13}C , ^{15}N の均一二重ラベル化培養を行った。菌体破碎後に得られた *NpHR* 膜画分は、界面活性剤 n-Dodecyl- β -D-maltoside (DDM) で可溶化し、Ni-NTA カラムで活性型 *NpHR* を精製した。更に、重水素化 L- α -phosphatidyl choline, dimyristoyl (DMPC- d_{67}) と *NpHR* で脂質再構成 (DDM-DMPC 置換) を行った。その際に、脂質とタンパク質の再構成比、DDM-DMPC 置換度について詳細に検討を行ない、最終的に、AFM により *NpHR* の脂質二重膜への組み込み状況を確認した。

また ^{13}C , ^{15}N の二重ラベルサンプル調製では、均一ラベルの他、特定のアミノ酸のラベル率を下げるリバースラベルサンプルも作製した。脂質再構成サンプルは、CI 結合型と CI 非結合型サンプル調製も行なった。

(2) 固体 NMR 測定

脂質再構成サンプル約 50mg (湿重量) を固体 NMR 試料管(4mm ϕ)に詰めて密閉した。固体 NMR 測定は、2 次元 ^{13}C スピン拡散測定では Chemagnetic Infinity-plus 600 分光計 (^{13}C 共鳴周波数は 150MHz) を用い、マジック角試料回転速度 12kHz、プローブ温度 -40°C で行なった。2 次元 ^1H - ^{13}C FLOPSY 測定 (Fig. 1) では、Chemagnetic Infinity-plus 700 分光計 (^{13}C 共鳴周波数は 175MHz) を用い、マジック角試料回転速度 12kHz、プローブ温度 15°C で行なった。FID は NMRPipe で処理し、スペクトルの解析には SPARKY を使用した。

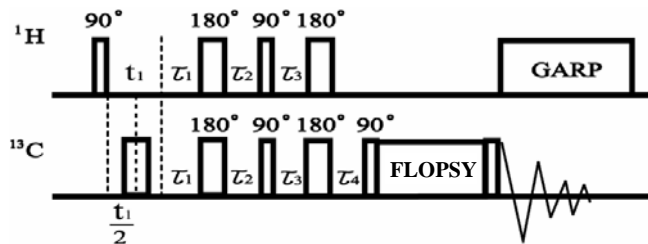


Fig.1 HCC-FLOPSY pulse sequence

【結果と考察】

(1) サンプル調製

本研究で作製した ^{13}C , ^{15}N 均一二重ラベル *NpHR* 試料は大腸菌発現系で約 10mg/L の収率で“活性型”として得られ、固体 NMR 試料として十分な発現量であった。また、界面活性剤可溶化系から脂質膜への再構成では、脂質相転移温度以下の条件で調製する方法が組み込み効率がよいことがわかった。更に脂質再構成比と得られる試料の性質を詳細に検討した結果、モル比で *NpHR* : DMPC = 1 : 30 が最適であり、AFM により *NpHR* が脂質二重膜中に均一に組み込まれた二次元結晶が確認で

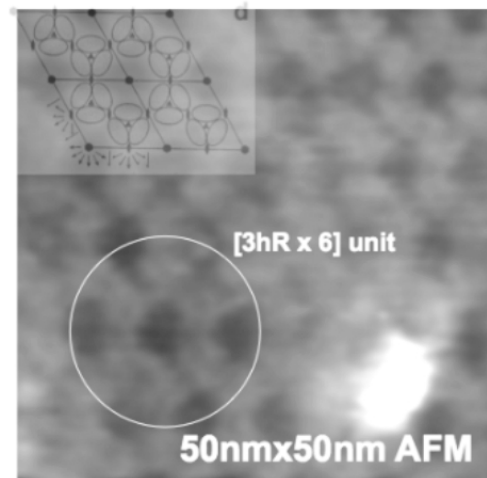


Fig.2 AFM Image of *NpHR* showing [6 x trimer] units. Protein : Lipid = 1 : 30 (30mM NaCl, 10mM MOPS, pH7.0)

きた(Fig. 2)。従来の古細菌ロドプシンの固体 NMR 測定用の脂質再構成では、Protein : Lipid = 1 :50 再構成モル比が用いられることが多かったが、二次元固体 NMR 等の測定には、試料管への Filling factor の向上は S/N 向上にメリットもあり、今回、*NpHR* と DMPC の再構成比を NMR 測定用に最適化できたことは貴重な成果である。

なお、 ^2H , ^{13}C , ^{15}N 均一三重ラベル *NpHR* 試料の大腸菌発現系の構築も進めており、約 8mg/L の収率で固体 NMR 試料として十分な発現量を得ることに成功している。

以上より、膜タンパク質の NMR 試料調製は一般的に難しいにも関わらず、本研究では NMR の測定・解析を行なうために大量かつ良質な安定同位体サンプルの大腸菌発現系を構築できた。更に脂質再構成比を検討することで二次元結晶化に成功し、固体 NMR 構造解析に向けたサンプル調製法を最適化できた。

(2) 固体 NMR 測定

一般に脂質二重膜を貫通する膜タンパク質の運動性は、膜貫通領域と膜表面領域で異なると考えられる。本研究ではそれらの運動性の違いを利用した二次元 NMR 信号の検出を行い、帰属作業の簡略化に適用できるかをまず検討した。

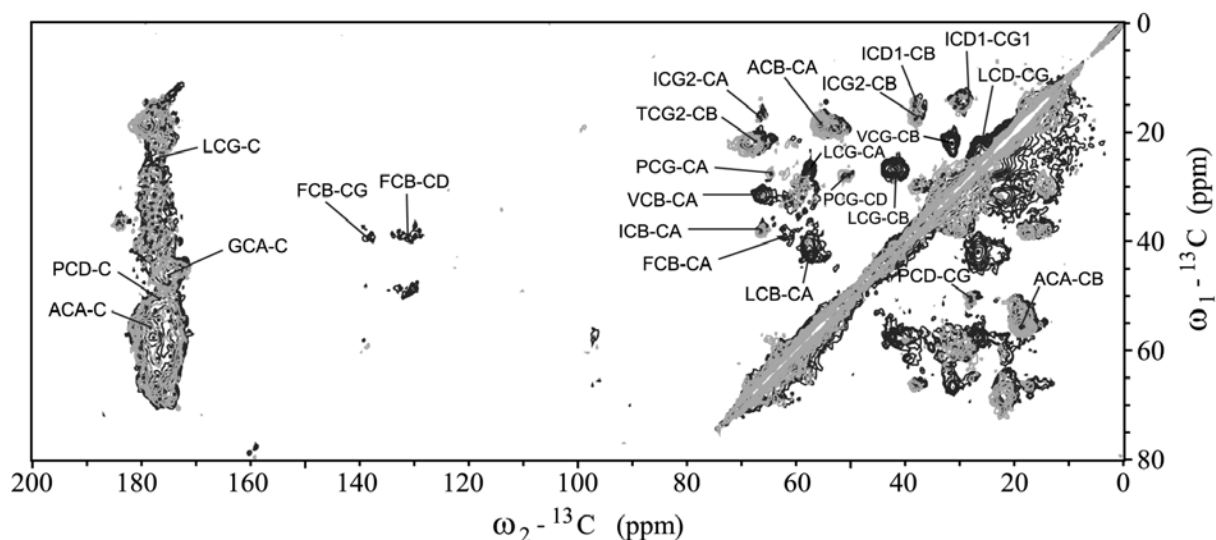


Fig.3 2D ^{13}C - ^{13}C spin diffusion spectrum for immobile region of labeled *NpHR*. (black) $\text{U}[^{13}\text{C}]$ -labeled *NpHR* with Cl^- , (gray) $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}(\text{V,L,F,Y})]$ -labeled *NpHR* with Cl^- . The MAS frequency was 12 kHz. The probe temperature was set at -40°C .

immobile region な膜貫通領域をターゲットとして ^{13}C , ^{15}N の均一二重ラベルサンプルで 2次元 ^{13}C スピン拡散測定を行った (Fig.3 black)。その結果 ^{13}C ピーク強度から全ての炭素が均一ラベルされている良質なサンプルであることがわかり、更に 180ppm 付近の C' ピークは *NpHR* モデル立体構造から計算される C' の二次化学シフトとよく一致した。この測定は -40°C の低温で行っているため、*NpHR* (299a.a.) のほぼ全領域について観測されている。この帰属の簡略化を目的とし、*NpHR* の 1 次配列中の約 32% を占め、大多数が膜貫通領域に存在する Val, Leu, Phe, Tyr をノンラベルにしたリバーラベルサンプルについて同様の測定を行った (Fig.3 gray)。その結果、特定領域の相関ピークの減少を観測できる

ことがわかり、重なるの多い Val, Leu, Ile など疎水性残基の帰属を効率化できた。

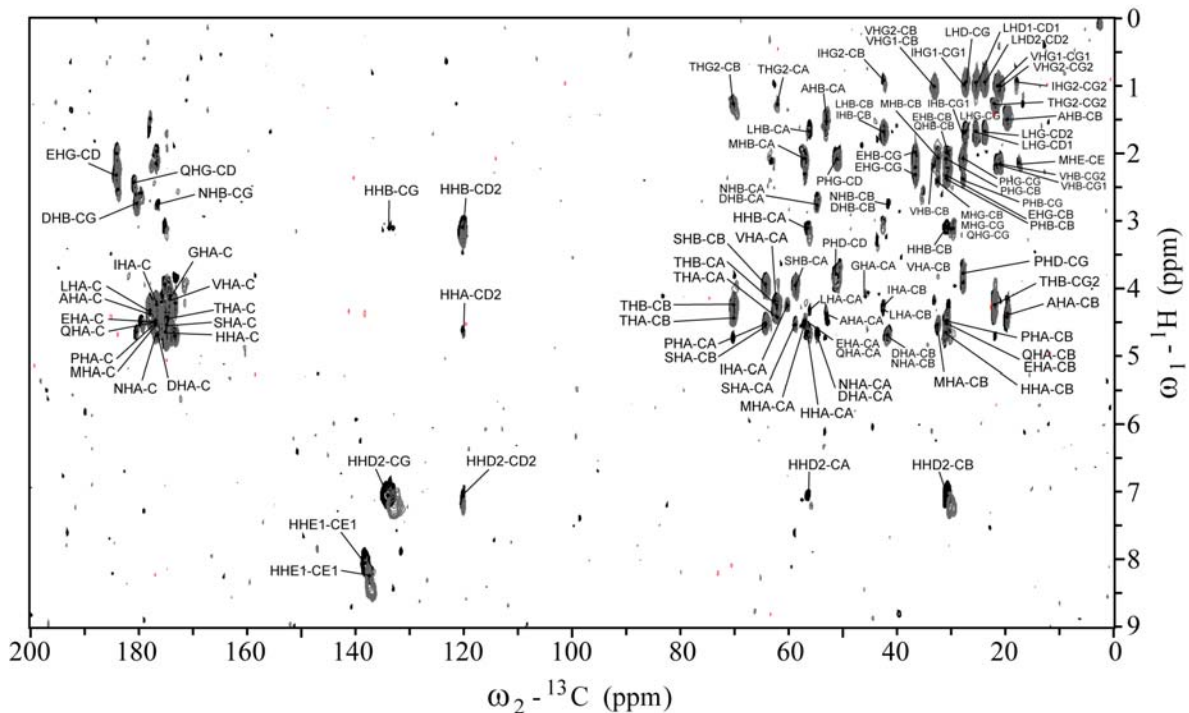


Fig.4 2D ^1H - ^{13}C FLOPSY spectrum for mobile region of labeled *NpHR*. (black) $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -labeled *NpHR* with Cl^- , (gray) $\text{U}[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ -labeled *NpHR* without Cl^- . The MAS frequency was 12 kHz. The probe temperature was set at 15°C .

膜表面領域のループ構造は Cl^- の輸送に重要な働きをしていることが予想されている。そこで mobile region をターゲットとして Cl^- 結合に伴う構造変化の解析を行なうために、 Cl^- 結合型と Cl^- 非結合型の2種類のサンプルについて各々2次元 ^1H - ^{13}C FLOPSY測定を行った (Fig. 4)。アミノ酸レベルでの帰属結果から主鎖構造の指標であるCSI (化学シフトインデックス) 計算を行なったところ、mobile region の ^{13}C 化学シフトは Cl^- 非結合型より Cl^- 結合型の*NpHR*の方がよりヘリシティが高い傾向であった。これは*NpHR*の mobile region のコンフォメーション変化に Cl^- 依存性があることを示唆する。

【まとめ】

*NpHR*の固体NMR測定のための安定同位体試料調製を最適化し、多次元固体NMR測定と帰属を行った。*NpHR*は Cl^- 依存性の化学シフト変化を示すことがわかった。今後、ダイナミクスやインターフェイスを考慮した詳細測定、連鎖帰属から局所的な立体構造情報の収集と解析を進める予定である。

【謝辞】

AFM測定では金沢大学の安藤敏夫教授、内橋貴之准教授、山下隼人氏に感謝いたします。