

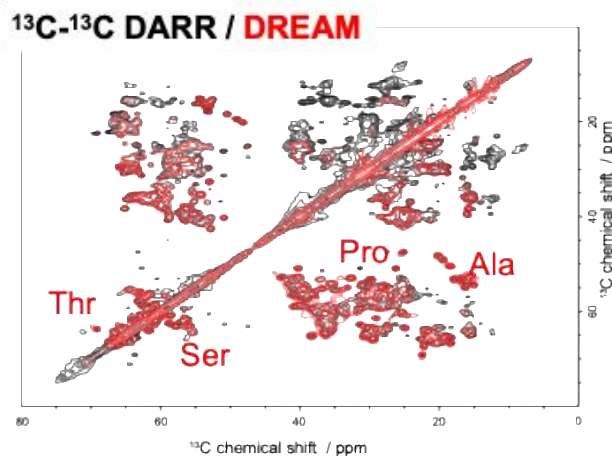
## 実施課題名：固体NMRによる細胞膜中のイオン輸送型ロドプシンの立体構造解析

【背景】ロドプシンはレチナール発色団を有する7回膜貫通型タンパク質であり、レチナールの光吸収をトリガーとしたタンパク質構造変化により機能を発現する。近年のメタゲノム解析によって数千種類のロドプシンが発見され、光遺伝学の基盤となる生体分子としてその分子メカニズムや新たな分子設計が注目されている。一方で、脂質膜中の膜タンパク質の構造解析は依然として困難な点が多く、NMRによる構造解析技術のさらなる発展や解析事例を増加させる必要がある。このような背景のもと、本研究課題では新型の光駆動型イオン輸送タンパク質の細胞膜結合構造に注目し、最先端の固体NMR分光計を用いて、多次元NMRによる細胞膜中での立体構造解析を行う。

### 【実施内容】

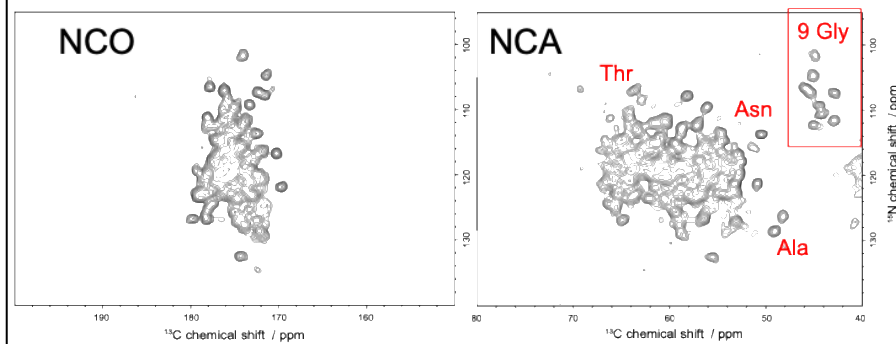
$^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 均一標識およびリバース標識の野生型シゾロドプシンの脂質膜再構成試料を準備し、3.2 mm試料管にパッキングした。700 MHz 固体NMR分光計 Avance NEOを用いて、2次元 $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  DARR・DREAM・NCA・NCO、3次元NCOCX・CONCA・NCACXなどの一連の多次元NMR測定を実施した。リバース標識体ではREDORを併用し、 $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ 連結情報を得た。また、800 MHz NMR分光計・1.3 mmプローブを利用して、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ 相関などの測定を実施した。これらのデータから、タンパク質の一次構造情報に基づいて、連鎖帰属を行った。また、シゾロドプシンの点変異体( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ 均一標識)を準備し、2次元NMR測定(DARR, NCA)を実施した。野生型と変異体のNMRスペクトル比較解析を進めた。

Fig. 1



$^{13}\text{C}$  DARRおよびDREAM測定によるアミノ酸残基指紋領域の観測

Fig. 2



NCOとNCAスペクトル: スピン系の連結

NMR プラットフォーム  
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-061			
利用課題名	固体 NMR による細胞膜中のイオン輸送型ロドプシンの立体構造解析			
所属機関	横浜国立大学			
所属部署	大学院工学研究院			
役職・氏名	役職	教授	氏名	川村 出
利用実施時期、及び期間	2023 年 8 月 29 日～2023 年 9 月 5 日 (8) 2023 年 9 月 19 日～2023 年 9 月 26 日 (8) 2023 年 10 月 18 日～2023 年 10 月 20 日 (3) 2024 年 8 月 6 日～2024 年 8 月 9 日 (4) 2024 年 9 月 18 日～2024 年 9 月 25 日 (8) 2024 年 9 月 25 日～2024 年 10 月 2 日 (7) 2025 年 6 月 4 日～2025 年 6 月 9 日 (6)  総利用日数: 44 日  <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

ロドプシンはレチナール発色団を有する 7 回膜貫通型タンパク質であり、レチナールの光吸収をトリガーとしたタンパク質の立体構造変化が生じ、機能発現に至る。近年のメタゲノム解析によって数千種類のロドプシンが発見され、その機能や吸収波長は様々であり、近年では光遺伝学の基盤となる生体分子として分子メカニズムや新たな分子設計が注目されている。一方で、脂質膜中の膜タンパク質の構造解析は依然として困難な点が多く、そのため、NMR による構造解析技術のさらなる発展や解析事例を増加させる必要がある。このような背景のもと、本研究課題では新型の光駆動型イオン輸送タンパク質の細胞膜結合構造に注目し、イオン輸送メカニズムの解明を目的とし、高磁場の固体 NMR 分光計を用いて、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  多次元 NMR による細胞膜中での立体構造解析を行う。

2. 成果の概要

実施内容

課題実施者は  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  均一標識およびリバース標識の野生型シゾロドプシンの脂質膜再構成試料を準備し、3.2 mm 試料管にパッキングした。700 MHz 固体 NMR 分光計 Avance NEO を用いて、2 次元  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  DARR・DREAM・NCA・NCO、3 次元 NCOCX・CONCA・NCACX などの一連の多次元 NMR 測定を実施した。リバース標識体では REDOR を併用し、各アミノ酸残基に対応するスピン系の構築や  $^{13}\text{C}'$ - $^{15}\text{N}$  連結情報を得た。また、800 MHz NMR 分光計・1.3 mm プローブを利用して、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  相関などの測定を実施した。これらのデータから、タンパ

ク質の一次構造情報に基づいて、連鎖帰属を行った。また、シゾロドプシンの点変異体( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  均一標識)を準備し、2 次元 NMR 測定(DARR, NCA)を実施した。野生型と変異体の NMR スペクトル比較解析を進めた。

### 本課題により得られた成果と当初目標との比較

今回用いた膜タンパク質のシゾロドプシンは 201 アミノ酸残基で構成されている。リバース標識体などを利用した固体 NMR データをもとに、連鎖帰属を行った結果、現在までに 168 残基の帰属を完了し、約 83%の帰属率を達成した。当初目標の 90% (181 残基の帰属に相当)には及ばなかったが、一部の側鎖の帰属も達成し、構造解析のために十分な結果を得ることができた。また、レチナール結合部位で、機能発現に重要とされるプロトン化シッフ塩基の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  交差ピークを観測することができたことは今後。点変異体との比較から、7 回貫通ヘリックスバンドルの内側に位置する残基などで顕著な信号減少を確認し、変異によってヘリックス間の相互作用が変化していることが示唆された。

### 成果発表

#### データベース登録

1. BMRB ID 26374 (Hold for publication, 2025/9/18)  
“Solid-state NMR  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of a seven-transmembrane helical protein, schizorhodopsin 1” Akito Kitaguchi, Toshio Nagashima, Takumi Kanazawa, Toshio Yamazaki, Keiichi Inoue, Izuru Kawamura

#### 学会発表

2. 川村 出 “Residue-specific insights on microbial rhodopsin using solid-state NMR” 第 63 日本生物物理学会 年会 シンポジウム「NMR の方法論開発と複雑な生体分子系への応用の新展開」 奈良県コンベンションセンター、2025 年 9 月 26 日 (招待講演)
3. Izuru Kawamura “Exploring structure of microbial rhodopsins in Lipid Environment via solid-state NMR” China-Japan Symposium on Solid-State NMR Spectroscopy, South China University of Technology, 2025 年 5 月 10-11 日 (Invited)
4. 北口暁土, 長島敏雄, 山崎俊夫, 井上圭一, 川村出 “多次元固体 NMR による 7 回膜貫通型膜蛋白質のシグナル解析” 第 2 回高分子学会 NMR シンポジウム, 積水化学 研究所, 2024 年 12 月 10 日 (口頭発表)
5. 川村 出 “固体 NMR 分光法による膜タンパク質・抗菌ペプチドの動的構造解析” 酵素工学会 第 92 講演会、川崎味の素 CLIENT INNOVATION CENTER、2024 年 11 月 15 日 (招待講演)
6. 北口暁土, 長島敏雄, 山崎俊夫, 井上圭一, 川村出 “多次元固体 NMR による 7 回膜貫通型タンパク質シゾロドプシンの NMR 信号解析” 第 63 回 NMR 討論会, 北海道大学, 2024 年 10 月 30 日-11 月 1 日 (ポスター発表)
7. Akito Kitaguchi, Toshio Nagashima, Toshio Yamazaki, Keiichi Inoue, Izuru Kawamura “Solid-state NMR analysis of wild-type and mutant schizorhodopsin” IUPAB2024, 京都国際会議場, June 24-28, 2024 (Poster)
8. 熊谷咲里, 長島敏雄, 山崎俊夫, 神取秀樹, 川村出 “固体 NMR を用いた TaHeR のレチナール近傍の His 残基の構造解析” 第 61 回日本生物物理学会年会、名古屋国際会議場, 2023 年 11 月 14-16 日 (ポスター)
9. 熊谷咲里, 長島敏雄, 山崎俊夫, 片山耕大, 神取秀樹, 川村出 “NMR 固体 NMR による TaHeR のレチナール近傍の His23 と His82 の構造解析”, 第 62 回 NMR 討論会, 横須賀芸術劇場 2023 年 11 月 7-9 日 (ポスター発表) + 熊谷咲里 日本核磁気共鳴学会 優秀若手ポスター賞 (昭光サイエンス賞), 第 62 回 NMR 討論会 2023 年 11 月 8 日
10. Izuru Kawamura, “Solid-state NMR study of microbial rhodopsin in a lipid environment”, 10<sup>th</sup> Asia-Pacific NMR

## 今後の展開

本課題により、微生物型ロドプシン シゾロドプシンを対象とした固体 NMR による残基特異的な構造情報が得られ、膜タンパク質研究における解析技術の基盤が強化された。今後は、得られた連鎖帰属データを基盤として、レチナール結合部位周辺における構造変化やイオン輸送機構の詳細な解明へと発展させる。また、変異体解析をさらに進めることで、ヘリックス間相互作用の分子基盤や光応答特性との関連性を明らかにする予定である。加えて、今回適用した NMR 手法は他の微生物型ロドプシンや多様な膜タンパク質にも応用可能であり、光受容や分子輸送に関わる幅広い生命現象の理解に寄与することが期待される。将来的には、オプトジェネティクスに資するような分子設計指針の提供など、学際的研究の発展に大きく貢献することを目指す。

## **3. 社会・経済への波及効果の見通し**

本研究による膜タンパク質の固体 NMR 構造解析技術の進展は、基礎科学にとどまらず、国際的・社会的・経済的にも波及効果が見込まれる。特に、ロドプシンは光遺伝学の中核的ツールとして神経科学・医学分野で利用されており、構造理解の深化は次世代の精密な光制御技術の開発に直結する。さらに、固体 NMR 分光法による膜タンパク質研究の高度化は、製薬分野における創薬標的解析の新展開を促し、創薬効率の向上や新規治療法の開発に資することが期待される。このように、本研究で得られた知見と技術は、学術的価値に加えて、産業・医療への幅広い波及効果をもたらす可能性を秘めている。

## **4. 利用における感想(改善要望等を含む)**

理化学研究所の NMR 施設を利用することで、高磁場 NMR 分光計および多様なプローブを活用した先端的な測定を実施することができ、研究を大きく前進させることができました。特に、装置の安定性と測定環境の整備が行き届いており、長時間にわたる多次元測定を安心して遂行できた点は非常に有益でした。また、長島敏雄先生をはじめとするスタッフの方々からは測定条件の最適化やデータ解釈に関する有益な助言をいただき、研究遂行に大きな支えとなりました。施設全体のサポート体制が充実しており、利用者にとって非常に使いやすい環境が整備されていると感じます。

## **5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待**

4. に示したように、素晴らしい施設・体制が整備されているため、ユーザーとして今後も引き続き本施設を活用し、より高度な NMR 研究を展開していきたいと考えています。

## **6. 成果公開延期の希望の有無**

( ) あり : ( ○ ) なし

「あり」の場合理由:

## **7. その他**

## **8. 利用施設**

### 理化学研究所

固体 700MHz

利用期間 1: 2023 年 8 月 29 日～2023 年 9 月 5 日

利用期間 2: 2023 年 9 月 19 日～2023 年 9 月 26 日

利用期間 3: 2023 年 10 月 18 日～2023 年 10 月 20 日

利用期間 4: 2024 年 9 月 18 日～2024 年 9 月 25 日

利用期間 5: 2024 年 9 月 25 日～2024 年 10 月 2 日

利用期間 6: 2025 年 6 月 4 日～2025 年 6 月 9 日

固体 800MHz

利用期間 7: 2024 年 8 月 6 日～2024 年 8 月 9 日

## 9. その他の利用施設

該当なし