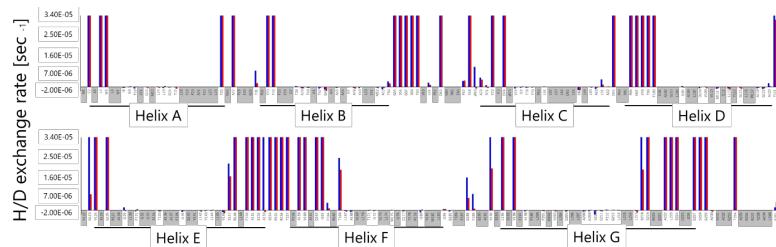


実施課題名：異なる周辺膜環境における複数回膜貫通型タンパク質の物性・構造解析

【背景】近年の構造生物学的解析手法の進展により、膜タンパク質の機能を立体構造の観点から議論することが可能となってきた。一方、生体膜マイクロドメイン(脂質ラフト等)の存在で知られるように、機能する膜タンパク質は、分子を取り囲む膜環境の変化により、その機能・構造・物性等が変調されることが知られているが、構造的見地から原子レベルでその要因が解明された例はほとんどない。本申請研究では、複数の異なる膜様環境中に存在する七回膜貫通型タンパク質RxRの比較NMR解析を実施することで、周辺環境の相違が膜タンパク質構造・物性に与える影響を原子レベルで明らかにすることを目的とする。単なる化学シフト変化のみならず、圧力を印加したNMR解析の実施を考えており、分子の安定性、動的構造の相違に関する情報が得られることが期待される。

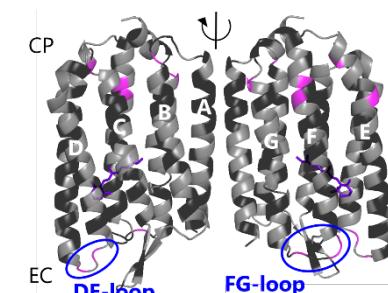
【実施内容】七回膜貫通型タンパク質である微生物型ロドプシンRxRにおいて、その熱安定性が異なることが判明している膜様環境である β -OGとDH₇PC中(それぞれRxR/ β -OG、RxR/DH₇PC)における比較NMR解析を実施した。RxR/ β -OGとRxR/DH₇PC間で¹H-¹⁵N TROSYスペクトルを比較したところ、顕著な化学シフト変化を示した残基はループ部分やヘリックス膜界面近傍部分に多く存在していた。局所的構造安定性の相違を推定する目的で、高圧NMR実験を行ったところ、1) RxRの膜界面近傍の残基において、圧力依存的な大きな化学シフト変化が観測され、構造安定性に寄与する可能性が示唆された、2) レチナール結合部位付近の残基で、圧力変化に非線形に依存したレスポンスが見られたことから、活性部位近傍に動的構造平衡が存在することが推定された。が、これらの現象は膜様環境の相違で顕著に異なるものではなかった。次に異なる膜様環境における、水素/重水素(H/D)交換実験を行った結果、RxR/ β -OGにおいてRxR/DH₇PCよりH/D交換速度が速い残基がDEループとFGループに集中していた。特にFGループは、RxRのX線結晶構造においてヘリックスFとヘリックスGの端側に覆いかぶさるような相互作用を形成しており、このFGループを欠損した変異体を作製すると、活性は保持しながらも熱安定性は低下することが明らかとなったことから、FGループはRxRの熱安定性に関与していることが推定された。以上より、膜様環境の相違によるRxRの熱安定性の違いは、RxRが有するFGループとヘリックス端との相互作用に界面活性剤が影響を与えることに起因すると推察された。このような膜様環境に依存するロドプシンの熱安定性に関する知見は、ロドプシン分子の生命工学的応用において有用なものとなる。

Fig. 1



(左) RxR/ β -OGとRxR/DH₇PCのH/D交換速度定数の比較: RxR/ β -OGを青色、RxR/DH₇PCを赤色、H/D交換速度が遅いため解析対象外となった残基の背景を灰色で表示。

(右) H/D交換におけるRxR/ β -OGとRxR/DH₇PCのH/D交換速度定数比較のマッピング図(PDB: 6KFQ): RxR/DH₇PCに対してRxR/ β -OGのH/D交換速度定数が2倍以上の残基をマゼンタ、2倍以下の残基を灰色、解析対象外残基を黒色で表示した。



NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF23-01-062		
利用課題名	異なる周辺膜環境における複数回膜貫通型タンパク質の物性・構造解析		
所属機関	横浜市立大学		
所属部署	大学院生命医科学研究科		
役職・氏名	役職	教授	氏名
利用実施時期、及び期間	2023 年 8 月～2025 年 7 月 総利用日数： 21 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

近年の構造生物学的解析手法の進展により、膜タンパク質の機能を立体構造の観点から議論することが可能となってきた。一方、生体膜マイクロドメイン(脂質ラフト等)の存在で知られるように、機能する膜タンパク質は、分子を取り囲む膜環境の変化により、その機能・構造・物性等が変調されることが知られているが、構造的見地から原子レベルでその要因が解明された例はほとんどない。

申請者は、これまでに七回膜貫通型タンパク質である微生物型ロドプシン RxR を研究対象として、異なる膜様環境が分子の熱安定性を変化させ、光反応サイクルを変調させる事実を見出している。また、RxR は可溶化した分子量が 6 万超の研究対象であるが、すでに大部分の主鎖アミド基の NMR シグナル帰属が完了している状況にある。

本申請研究においては、複数の異なる膜様環境中に存在する RxR の比較 NMR 解析を実施することで、周辺環境の相違が膜タンパク質構造に与える影響を原子レベルで明らかにすることを目的とする。単なる化学シフト変化のみならず、圧力を印加した NMR 解析の実施を考えており、分子の安定性、動的構造の相違に関する情報が得られることが期待される。

2. 成果の概要

実施内容

七回膜貫通型タンパク質である微生物型ロドプシン RxR において、その熱安定性が異なることが明らかとなっている膜様環境である β OG と DH₇PC 中(それぞれ RxR/ β OG, RxR/DH₇PC) の比較 NMR 解析を実施した。 RxR/ β -OG と RxR/DH₇PC 間で $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY スペクトルを比較したところ、顕著な化学シフト変化を示した残基はループ部分やヘリックス膜界面近傍部分に多く存在していた。次に、圧力印加に伴う構造変化から局所的構造安定性の相違を推定する目的で、東京大学薬学部に設置されている高圧 NMR 装置(最大印加圧力 2500psi)を利用した解析を行った。高圧 NMR 実験結果から、1) RxR の膜界面近傍の残基において、圧力依存的な大きな化学シフト変化が観測され、構造安定性に寄与する可能性が示唆された、2) レチナール結合部位

付近の残基で、圧力変化に非線形に依存したレスポンスが見られたことから、活性部位近傍に動的構造平衡が存在することが示唆された。しかしながら、これらの現象については、 β -OG と DH₇PC 環境中で大きな差異は見られなかつた。次に水素/重水素(H/D)交換実験による、異なる膜環境下における局所的安定性の解明を試みた。その結果、RxR/ β -OGにおいて RxR/DH₇PC より H/D 交換速度が速い残基が DE ループと FG ループに集中していた。特に FG ループは 11 残基からなる長いループで、RxR の X 線結晶構造においてヘリックス F とヘリックス G の端側に覆いかぶさるような相互作用を形成している。この FG ループを欠損した変異体を作製すると、活性は保持しながらも熱安定性は低下することが明らかとなつたことから、FG ループは RxR の熱安定性に関与していると推定された。以上より、膜様環境の相違による RxR の熱安定性の違いは、RxR が有する FG ループとヘリックス端との相互作用に、界面活性剤が影響を与えることに起因すると推察された。このような膜様環境に依存するロドプシンの熱安定性に関する知見は、ロドプシン分子の生命工学的応用において有用なものとなる。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

ロドプシンは、オプトジェネティクス分野や生命工学的応用が期待されている膜タンパク質分子であることから、その機能のみならず、物性を理解することは重要となる。今回の実験では、RxR の膜貫通ヘリックス部分の H/D 交換情報については、その交換速度が遅すぎたため有用な情報は得られなかつた。変性状態の占有率を高めることを意図した、高圧条件下での H/D 交換実験も行ったが、数日の実験では、交換現象がほとんど見られず、当初想定していたヘリックス分子内部の局所的安定性に関する情報を得ることができなかつた。それでも、今回明らかになつた、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスを連結する特定のループ構造が熱安定性に影響を与えるという成果は、今後、熱安定化分子をデザインしていくうえで有用な、興味深い知見であると考えられる。

成果発表

学会発表：

第 61 回日本生物物理学会年会：“Analysis of the physical properties, structure and function of proton-pumped rhodopsin RxR under different membrane-mimetic environments”，C. Kikuma, R. Suzuki, K. Kojima, Y. Tokunaga, K. Takeuchi, Y. Sudo and H. Takahashi (2023/11/14)

第 63 回 NMR 討論会：“異なる膜様環境下での光駆動膜タンパク質 RxR の構造および熱安定性の比較解析”，菊間千滉，鈴木里佳，徳永裕二，竹内恒，小島慧一，須藤雄氣，高橋栄夫 (2024/10/30)

第 47 回日本分子生物学会年会：“異なる膜様環境下でのプロトンポンプ型ロドプシン RxR の構造および熱安定性の比較解析”，菊間千滉，鈴木里佳，徳永裕二，竹内恒，小島慧一，須藤雄氣，高橋栄夫 (2024/12/1)

今後の展開

今回の実験では、研究対象としたロドプシン分子自体の熱安定性が並外れて高かつたため、膜貫通ヘリックスからの局所的安定性に関する情報を得ることができなかつた。分子内部からの H/D 交換情報を引き出すためには、少し熱安定性が低いロドプシン類で解析することが必要であり、今後の研究展開の視野に入れている。また、膜タンパク質の周辺環境としては、より生体系に近い脂質二重膜からなる、ナノディスクやバイセルに膜タンパク質を内包した状態での解析、さらには脂質の不飽和度、アルキル鎖長、電荷環境、が物性や機能に与える影響についても明らかにしていきたい。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

ロドプシンは、オプトジェネティクス分野や生命工学的応用が期待されている分子であることから、分子を取り巻く周辺膜環境の機能・物性への影響を理解することは重要な課題となる。本研究で実施した、膜様環境の相違が局所構造に影響し、熱安定性を変化させるメカニズムを解明する NMR 解析アプローチは、産業応用へと展開

する熱安定化ロドプシンを創製していくうえで有用なものになると考へる。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

高圧 NMR 測定における試料調製から測定にいたるまで、スタッフの先生にマンツーマンで対応いただき、円滑に測定を進めることができた。高温での高圧測定において生じた問題に対しても、対処方法を検討していただき大変助かった。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

今回利用させていただいた高圧 NMR 装置や高磁場 NMR 装置など、多くの研究者が通常ではアクセスしにくいような装置類が利用できるシステムは大変魅力的なものと考へる。

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

東京大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2023 年 9 月 19 日～2023 年 9 月 22 日

利用期間 2: 2023 年 11 月 6 日～2023 年 11 月 7 日

利用期間 3: 2023 年 11 月 28 日～2023 年 11 月 29 日

利用期間 4: 2024 年 3 月 28 日～2024 年 3 月 29 日

利用期間 5: 2024 年 6 月 13 日～2024 年 6 月 15 日

利用期間 6: 2024 年 8 月 6 日～2024 年 8 月 9 日

利用期間 7: 2024 年 8 月 21 日～2024 年 8 月 24 日

9. その他の利用施設