

実施課題名: 高磁場固体NMR分光法による脂質膜環境中の7回膜貫通型光受容膜タンパク質の立体構造解析

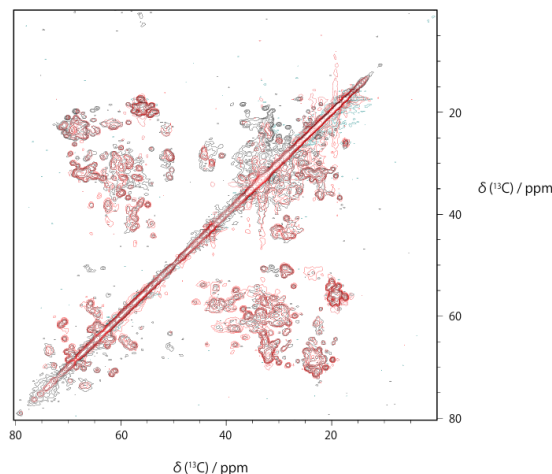
【背景】

微生物型ロドプシンは、レチナールを発色団とする7回膜貫通ヘリックス型タンパク質であり、レチナールの光吸収を引き金としてタンパク質の立体構造変化を誘起し、多様な生理機能を発現する。光遺伝学を支える基盤分子として利用されており、新規ロドプシンの発見および機能・分光特性を自在に制御する分子設計が重要な研究課題となっている。近年、600–700 nmの長波長光を吸収可能なロドプシンが相次いで報告され、従来型ロドプシンとは異なる吸収波長制御機構や立体構造的特徴に大きな注目が集まっている。本研究では、高磁場固体NMRを用いた構造解析により、野生型と長波長化のロドプシンのNMR信号比較を通じて、長波長化を実現する構造原理を明らかにすることを目的とする。

【実施内容】

^{13}C , ^{15}N リバース標識および ^{13}C -14,20標識レチナールのグロイオバクター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DARR・DREAM・NCA・NCO、3次元NCOCX・CONCA・NCACXおよびfsREDOR-NCAなどの一連の多次元NMR測定を実施した。スペクトルの分解能(Fig.1, Fig. 2)はリーズナブルなものであった。各アミノ酸残基に対応するスピン系の構築および連結情報を探索中であり、また一次構造情報に基づいて、連鎖帰属の作業を続けている。

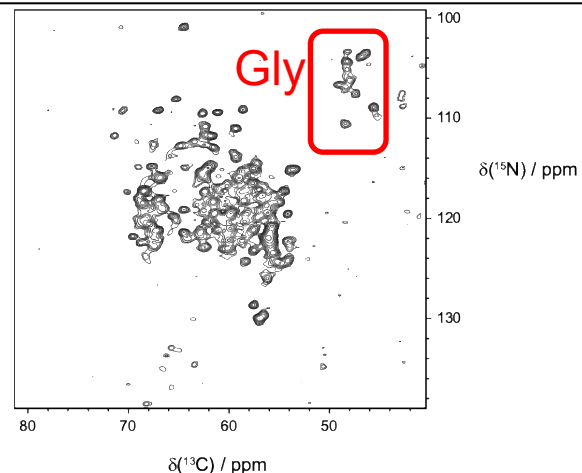
Fig. 1



DARR/DREAMスペクトル

Fig. 2

NCA



NCAスペクトル

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF25-01-091			
利用課題名	高磁場固体 NMR 分光法による脂質膜環境中の 7 回膜貫通型光受容膜タンパク質の立体構造解析			
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	2025 年 12 月 9 日～2025 年 12 月 19 日 (10 日間) 2025 年 3 月 2 日～2026 年 3 月 13 日 (11 日間) 総利用日数:21 日 ☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

微生物型ロドプシンは、レチナールを発色団とする 7 回膜貫通ヘリックス型タンパク質であり、レチナールの光吸収を引き金としてタンパク質の立体構造変化を誘起し、多様な生理機能を発現する。近年では、光遺伝学を支える基盤分子として広く利用されており、そのさらなる発展に向けて、新規ロドプシンの発見および機能・分光特性を自在に制御する分子設計が重要な研究課題となっている。近年、600–700 nm の長波長光を吸収可能なロドプシンが相次いで報告され、従来型ロドプシンとは異なる吸収波長制御機構や立体構造的特徴に大きな注目が集まっている。しかし、その長波長化を支配する原子レベルの構造基盤については未解明な点が多い。

本研究では、高磁場固体 NMR を用いた構造解析により、野生型と長波長化ロドプシンの NMR 信号比較を通じて、長波長化を実現する構造原理を明らかにし、ロドプシンの吸収波長制御に向けた新たな分子設計を提示することを目的とする。

2. 成果の概要

実施内容

^{13}C , ^{15}N リバース標識および ^{13}C -14,20 標識レチナールのグロイオバクター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}C - ^{13}C DARR・DREAM・NCA・NCO、3 次元 NCOCX・CONCA・NCACX および fsREDOR などの一連の多次元 NMR 測定を実施し、スペクトルの分解能はリーズナブルなものであった。得られた NMR 情報をもとに、各アミノ酸残基に対応するスピン系の構築および連結情報を探索中であり、また一次構造情報に基づいて、連鎖帰属の作業を続けている。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

今回用いたグロイオバクターロドプシンの 280 残基超えのタンパク質であるが、一部の残基の信号は分子運動

性の影響で信号が消失していた。リバーズ標識体の固体 NMR データをもとに、連鎖帰属を行った結果、現在までに 18 残基の帰属を完了した。また、レチナールとレチナール結合部位のプロトン化シッフ塩基の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ を帰属することもでき、吸収波長変化の際のコントロールデータとなる。一方、長波長化させた三重変異体タンパク質は発現量が十分でなく、今期の NMR 測定は完了できなかったが、今後も比較解析を行っていく予定である。そのため当初目標のうちの 50%~60%である。

成果発表

原著論文 (NMR プラットフォーム謝辞あり)

1. Akito Kitaguchi, Takumi Kanazawa, Toshio Nagashima, Toshio Yamazaki, Keiichi Inoue, Izuru Kawamura* “Site-resolved $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ solid-state nuclear magnetic resonance analysis of schizorhodopsin 1 in lipid bilayers.” *Biophys. Chem.* 335 107635 (2026). <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2026.107635>

学会発表 (NMR プラットフォーム謝辞あり)

1. ○Izuru Kawamura “Solid-state NMR Insights into Retinal Schiff Base Chemistry in Microbial Rhodopsins” *Pacificchem 2025*, Honolulu, Dec. 16, 2025 (Invited lecture).

今後の展開

本研究課題の残りの部分は、3 重変異体の固体 NMR スペクトルの取得・解析の遂行であり、微生物型ロドプシン グロイオバクターロドプシンの長波長化機構の解明が進むものと考えている。これにより、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構築につながるものと考えている。

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 構造解析技術の発展は、基礎科学のみならず、医療・産業分野への波及も期待される。特にロドプシンは、光遺伝学を支える重要な分子であり、その構造理解の深化は、神経活動を高精度に制御する次世代技術の開発につながる。また、膜タンパク質の高分解能解析技術の進展は、創薬標的の構造解析を加速し、新規医薬品や治療法の開発にも貢献すると期待される。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

前回の利用時にも感じたことですが、理化学研究所の NMR 施設を利用することにより、高磁場 NMR 分光計および多様なプローブを活用することができるため、タンパク質構造解析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、標準的な多次元 NMR 測定だけでなく、磁気双極子相互作用の理カップリング技術を利用した測定は大変有益なものでした。施設全体のサポート体制が充実しており、環境が整備されていることはユーザー側として心強い限りでした。担当して下さった長島敏雄先生に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ました。

5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待

施設環境がよく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たく、より高度な NMR 研究を支えていただきたいと思います。

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

特になし

8. 利用施設

理化学研究所

固体 700 MHz

利用期間 1: 2025 年 12 月 9 日～2025 年 12 月 19 日

利用期間 2: 2026 年 3 月 2 日～2026 年 3 月 13 日

9. その他の利用施設

特になし