

提出日：平成 28 年 5 月 17 日

平成 27 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## (2) 研究成果の概要

課題名	固体 NMR による光受容膜タンパク質の光励起活性構造変化の解明	
研究代表者	氏名	内藤 晶
	所属機関名・部局名	横浜国立大学・大学院工学研究院
	職名	名誉教授
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員
	<input type="radio"/>	国際共同研究課題
	<input type="radio"/>	超高磁場 NMR 共同利用研究課題
	<input type="radio"/>	客員フェロー
蛋白研受入担当教員名	藤原敏道 教授 (研究室名：機能構造計測学研究室)	
<p>古細菌 <i>Halobacterium salinarum</i> には 4 種類のレチナールタンパク質、バクテリオロドプシン(BR)、ハロロドプシン(HR)、センサリーロドプシン I(SRI)、センサリーロドプシン II(SRII)が存在する。BR と HR は光のエネルギーを受けて、それぞれプロトンおよび塩素イオンを輸送する光駆動イオンポンプ活性をもつ膜タンパク質である。一方、SRI は正、SRII は負の走光性を示す光センサーであり、ともに信号伝達機能を持つ膜タンパク質である。本研究では光照射固体 NMR 分光法を用いて、センサリーロドプシンである SRII 光受容膜タンパク質について、光に応答して変化するレチナールおよびその変化が伝わったタンパク質の構造変化を解析し、光信号伝達機構を分子レベルで解明することを目的として研究を行った。また、光駆動型プロトンポンプ機能をもつバクテリオロドプシンの Y185F 変異体について、光に応答するレチナールおよびタンパク質の構造変化について解析し、プロトンポンプ機構を分子レベルで解明する研究を行った。</p> <p>ppR/pHtrII 複合体の光中間体の補足とその構造を調べるため、[20-<sup>13</sup>C, 14-<sup>13</sup>C]Ret, [1-<sup>13</sup>C]Tyr, [3-<sup>13</sup>C]Ala-ppR/pHtrII 複合体を EggPC 膜に再構成した試料を用いて、<sup>13</sup>C NMR 信号を観測した。-40℃ 暗状態で 520 nm 緑色 LED を照射して NMR 信号を観測したところ、M-中間体、N-中間体、O-中間体の 3 つの中間体が混合状態で定常的に観測された。ここで、光照射を 365 nm 青色 LED に切り替えたところ、N-中間体の信号強度は変化せず、N-中間体の信号強度は減少した。さらに O-中間体の信号強度は増加した。M-中間体が補足されたとき、タンパク質 ppR 側ではα-ヘリックスの一部がランダムコイル構造に変化することが判明した。本研究で N-中間体の NMR 信号を初めて観測することに成功した。</p> <p>バクテリオロドプシンにおいて O-中間体の寿命の長いことが知られている [14-<sup>13</sup>C, 20-<sup>13</sup>C]Ret-Y185F-bR を試料として調製し、in-situ 光照射 NMR 分光法を用いて、光中間体の観測を試みた。520 nm 緑色 LED を照射したところ、暗状態で存在する、CS-状態が CS*-中間体に変化し、一方、AT-状態が N-中間体と O-中間体に変化した。この後、光照射を止め、暗所で観測したところ、N-中間体は O-中間体に変化することが判明した。本研究で、初めてバクテリオロドプシンにおいて O-中間体の NMR 信号を観測することに成功した。</p>		