

博士論文

光照射固体 NMR による
センサーロドプシン I および II の
光中間体のレチナールの構造の解明

Structure of retinal at the photo-intermediates
in sensory rhodopsin I and II as revealed by
in-situ photo-irradiation solid-state NMR

横浜国立大学大学院

理工学府

榎野 義輝

Yoshiteru Makino

2018 年 6 月

目次

概要	1
第 1 章 序論.....	3
1-1 光受容膜タンパク質.....	3
1-2 センサリーロドプシン	4
1-3 フォトサイクル	5
References	7
第 2 章 光照射固体 NMR の開発	9
2-1 光照射固体 NMR に関する概要.....	9
2-2 固体高分解能 NMR [15-17].....	10
2-3 <i>In-situ</i> 光照射固体 NMR 分光法	12
2-4 光中間体の定常捕捉観測の戦略と光反応経路の解析手法.....	16
References	19
第 3 章 センサリーロドプシン I の光中間体の構造解析.....	21
3-1 <i>Salinibacter ruber</i> 由来のセンサリーロドプシン I (<i>SrSRI</i>)	21
3-2 <i>SrSRI</i> の試料調製.....	23
3-3 <i>SrSRI</i> の光反応過程に関する光照射固体 NMR 測定	23
3-4 520 nm (Green) および 595 nm (Orange) の光照射による変化.....	23
3-5 365 nm (UV) 光照射による P 中間体の捕捉.....	25
3-6 暗状態に対する 365nm (UV) 光の直接照射.....	26
3-7 <i>SrSRI</i> のフォトサイクル.....	27
References	28
第 4 章 センサリーロドプシン II の光中間体の構造解析と計算化学によるレチナールの構造評価	29
4-1 <i>ppR/pHtrII</i> タンパク質複合体.....	29
4-2 <i>ppR</i> および <i>pHtrII</i> の試料調製.....	32
4-3 <i>ppR/pHtrII</i> 複合体 に関する光照射固体 NMR 測定.....	33

4-3-1	ppR/pHtrII 複合体に対する 520 nm (Green) 光照射による変化	34
4-3-2	光中間体の緑色光照射状態 (Green) から暗状態 (Dark2) への熱緩和過程 ...	36
4-3-3	M 中間体の UV light 照射による O 中間体への光反応過程.....	36
4-4	ppR に関する光照射固体 NMR 測定.....	38
4-4-1	-40°C における ppR の光反応過程	38
4-4-2	-60°C における ppR の光照射固体 NMR 測定の結果.....	39
4-4-3	ppR の光中間体における[14- ¹³ C] retinal の ¹³ C 化学シフト値.....	41
4-5-1	レチナールのねじれに対する化学シフト値の DFT 計算	43
4-5-2	O および N' 中間体に対するレチナールの二面角 Φ の決定	43
4-5-3	O 中間体の二面角 Ψ の決定.....	46
4-5-4	N' 中間体の二面角 Ψ の決定	47
4-6	ppR のフォトサイクルと後期中間体の構造.....	48
	Reference.....	50
第 5 章 結言.....		52
謝辞.....		54

公表論文

1. Hiroki Yomoda, **Yoshiteru Makino**, Yuya Tomonaga, Tetsuro Hidaka, Izuru Kawamura, Takashi Okitsu, Akimori Wada, Yuki Sudo, Akira Naito.
“Color-Discriminating Retinal Configurations of Sensory Rhodopsin I by Photo-Irradiation Solid-State NMR Spectroscopy” *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, **53** (27), 6960-6964.
2. **Yoshiteru Makino**, Izuru Kawamura, Takashi Okitsu, Akimori Wada, Yuki Sudo, Naoki Kamo, Kazuyoshi Ueda, Akira Naito.
“Retinal configuration of ppR intermediates revealed by photo-irradiation solid-state NMR and DFT” *Biophys. J.* 2018 (in press)

概要

本学位論文は 5 章から構成される。第 1 章では序論としてセンサリーロドプシンについてまとめる。第 2 章では *in-situ* 光照射固体 NMR 装置の開発と光照射固体 NMR 測定法について述べる。第 3 章では光照射固体 NMR を用いて明らかにしたセンサリーロドプシン I の光中間体の定常捕捉とレチナールの構造変化について述べる。第 4 章ではセンサリーロドプシン II の光反応過程における活性光中間体のレチナール構造に関して論じた。

レチナール(ビタミン A アルデヒド)を発色団として持ち、光を受容して機能する膜タンパク質を総じてロドプシン類(レチナールタンパク質)と呼ぶ。微生物型ロドプシン(Type I 型ロドプシン)の一つに分類されるセンサリーロドプシンは、レチナールを発色団として持つ 7 回膜貫通ヘリックス型の膜タンパク質である。このようなセンサリーロドプシンは、膜中で固有のトランスデューサータンパク質と複合体を形成して、光に対する走性である走光性を司る信号を伝達する機能をもつ。センサリーロドプシンにはその機能の観点から 2 種類に分類され、緑色光に対する誘引応答と近紫外光に対する忌避応答の 2 種類の信号を伝達する機能を併せ持つセンサリーロドプシン I(SRI)と近紫外光に対する忌避応答の信号を伝達する機能を担うセンサリーロドプシン II(SRII)が存在する。

例えば、高度好塩好アルカリ性細菌である *Natronomonas pharaonis* は有害な紫外領域の光から逃避するための忌避応答である負の走光性を示す。この機能は *Natronomonas pharaonis* の膜中に存在する SRII、あるいは *pharaonis* phoborhodopsin (*ppR*)とも呼ばれる光受容膜タンパク質が固有の transducer タンパク質である 2 本膜貫通型の *pHtrII* と生体膜中で 2:2 量比の複合体を形成する。この *ppR/pHtrII* 複合体により走光性を司る信号伝達機能が発現する。*ppR/pHtrII* 複合体は光照射によって、基底状態(G 状態)からエネルギーの高い K、L、M、O の中間体を経て G 状態に戻るフォトサイクルと呼ばれる一連の光異性化反応を起こす。この中で、*pHtrII* は *ppR* からの信号を受け取り下流域のリン酸化酵素系を調節し最終的に好塩菌の鞭毛の回転を制御することで負の光走性を示す。

また近年、大量発現が可能になった真正細菌 *Salinibacter raber* 由来の SRI である *SrSRI* は誘引・忌避応答である正および負の走光性を担う信号を伝達する機能を持つレチナールタンパク質である。ここでフォトサイクル中に生じる M 中間体は正の走光性を担う信号を伝達する。M 中間体から生じる P 中間体は負の走光性に対する信号を伝達する機能をもつ中間体である。このように、*SrSRI* は機能に対応する中間体を光の波長によって機能を切り替え、信号伝達をするユニークな膜タンパク質であるが、その光反応過程の詳細は解明されていない。

本研究ではこれらセンサリーロドプシンの光照射によって生成する光中間体におけるレチナールの構造を明らかにすることを目的として、光照射固体 NMR の開発を行った。*in situ* 光照射固体 NMR は 520 nm、595 nm、395 nm の LED 光源を使用することで、光照射下で中間体を定常捕捉して固体 NMR 信号の定常的な観測を可能にした。

光中間体のレチナール構造は各々のセンサリーロドプシンについて、レチナールの 20 位のメチル炭素の ^{13}C NMR 化学シフト値の変化からレチナールの 13-*cis/trans* を決定した。また、センサリーロドプシン II に関しては各光中間体におけるレチナールの 15-*syn/anti* 配座を決定するために 14- ^{13}C 標識レチナールを保持した試料を調製し、光反応過程での ^{13}C NMR 化学シフト値をモニタリングした。加えて、量子化学に基づいた化学シフト値計算を行い、詳細なレチナールの配座を決定した。

以上の結果をまとめると、*SrSRI* の波長依存的な光反応過程を明らかにすることに成功した。また、*ppR/pHtrII* 複合体は、フォトサイクル中で今までに観測されていなかった N' 中間体を捕捉することに成功し、M 中間体に対する紫外光 (365 nm) 照射では O 中間体に光異性化することが明らかになった。

第1章 序論

1-1 光受容膜タンパク質

膜タンパク質はエネルギー獲得やイオンなどの物質輸送のみならず、膜内外の情報伝達など重要な役割を果たしている[1]。特に膜貫通タンパク質は細胞の内外での物質の輸送、情報の伝達に深く関わっており、それら膜タンパク質の原子レベルでの作用機構の解明は化学、生化学、医学、薬学の分野で非常に重要な研究テーマである。

近年では2012年に Robert J. Lefkowitz と Brian K. Kobilka らが GPCR (Gタンパク質共役受容体) の1つである β アドレナリン受容体の単離と作動機構の解明などの業績によりノーベル化学賞を受賞している。このことは膜タンパク質の作用機構の解明がいかに重要かを裏付けている。

GPCR と同様の7本膜貫通型の構造を持った膜タンパク質で、光を受容する膜タンパク質にロドプシがある。このロドプシン類は発色団レチナール (ビタミン A アルデヒド) がタンパク質の特定のリジン残基とシッフ塩基結合をしている。光を受容することで、このレチナールが光異性化反応を起こし、その光異性化がトリガーとなってタンパク質の構造変化がおこり、最終的に機能を発現する[1]。

これらロドプシン類は、微生物に存在する Type I 型と動物に存在する Type II 型に分類される。Type II 型のロドプシン類は目の網膜中に存在し、色覚機能を担っている。Type I 型のロドプシンは古細菌や真正細菌など多くの微生物中の膜中に存在し、イオンポンプ機能や光センサー機能を担っている。Type I 型と Type II 型における、大きな相違点の1つは Type II 型ロドプシンは光異性化した後、アポタンパク質であるオプシンからレチナールがブリーチして退色するが、微生物中の Type I 型ロドプシンは光異性化した後、再び元の構造に戻る、特有のフォトサイクルと呼ばれる光励起過程を持つためレチナールが退色しない点にある[2-4]。

本研究において対象としたセンサリーロドプシンは、微生物由来の Type I 型のロドプシンであり、レチナールの光異性化に伴うフォトサイクルを経て機能を発現する。これら微生物由来のロドプシン類のうち、高度好塩菌には4つのロドプシン類が発見されており、バクテリオロドプシン (BR) とハロロドプシン (HR) はイオンポンプ機能を持ち、センサリーロドプシン I (SRI) とセンサリーロドプシン II (SRII または pR) は光センサー機能を有している[1, 3-6]。そのレチナール光異性化による光反応過程と、それに伴うタンパク質構造変化を原子レベルで解明することは構造生物学上、重要な研究テーマである。

1-2 センサリーロドプシン

センサリーロドプシンは光受容膜タンパク質であり、微生物の膜中では固有のトランスデューサータンパク質と 2:2 量比の複合体を形成して機能を発現する。その機能は、光に対する誘引・忌避応答の信号伝達である。光信号の伝達の結果、微生物はその応答として、正・負の走光性を発現する[1, 7-11]。

これら信号伝達はセンサリーロドプシンの発色団レチナールの光異性化から始まる。センサリーロドプシンは光を感受すると、その発色団であるレチナールが主として 13-*trans* から 13-*cis* へ光異性化する。この光異性化されたレチナールが 13-*trans* へと熱緩和によって戻る際に、センサリーロドプシンのタンパク質構造変化が引き起こされる。続いて、このセンサリーロドプシンの構造変化が、固有のトランスデューサータンパク質へ構造の変化を促し、信号が伝達される。トランスデューサータンパク質は下流域でのリン酸酵素反応を調節し、結果的にべん毛の駆動を制御する。このべん毛回転が微生物の走光性の表現を示す[1, 10-12]。

例としてセンサリーロドプシン I においては、緑色光のような生物にとって有益な波長の光ではべん毛の回転方向を反時計回り (CCW) に、有害な近紫外光に対しては時計回り (CW) に駆動する。べん毛が CCW 方向に回転している時、細菌は直進し、CW 方向に回転している時はその場でタンブリングをする。タンブリングの前後で細菌はその進行方向が変わる。このようにして、光の波長によって短波長領域では反転頻度が高くなり、その結果、細菌は負の走光性を示す (Fig. 1-2-2) [1, 10-12]。

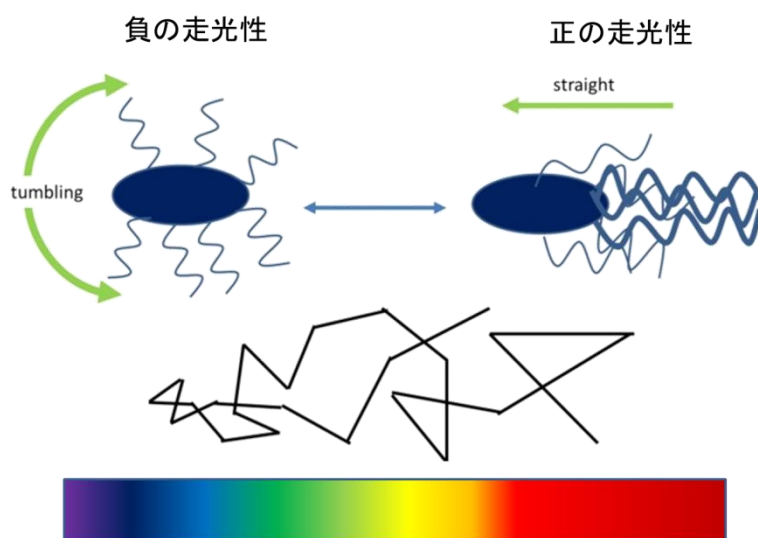


Fig. 1-2-2 センサリーロドプシンの光応答、鞭毛の回転制御による反転頻度のモデル図 [10]

1-3 フォトサイクル

センサリーロドプシンの光反応過程はレチナールの異性化に伴う特有のフォトサイクルを回ることからなる。

センサリーロドプシン II のフォトサイクルは代表的に Fig.1-3-1 に示される。ロドプシン類においては、暗状態での初期状態を基底状態 (G 状態) と称する。基底状態にある SRII は光励起され、一度励起状態を経た後、高いエネルギーで安定な K 中間体へ至る。その後、熱緩和によってエネルギーを放出し L、M、O 中間体へ異性化し、再び基底状態に戻る。それぞれの中間体はレチナールの異性化によって異なる極大吸収波長を持っている。また、フォトサイクル中に生成する M 中間体ではレチナールのシッフ塩基部位の脱プロトン化・プロトン化反応が起きていることも特徴的である[1, 10, 11, 13-15]。

ここで Fig. 1-3-1 には O 中間体の構造を 13-*trans*,15-*syn* とした[16]。しかし、O 中間体の膜中でタンパク質に結合したレチナールの構造は未だ明らかになっていない。

このフォトサイクル中で生成する M 中間体が信号伝達活性状態であり、M 中間体がほかの中間体より長寿命であることから、活性状態を長く保つことが信号伝達に重要であると考えられている。またセンサリーロドプシンは固有のトランスデューサータンパク質と複合体を形成することで M 中間体の寿命が単量体の ppR より 10 倍ほど長くなることが知られている。さらに、M 中間体はシッフ塩基の窒素原子が脱プロトン化の状態にある。そのため M 中間体は他の中間体と比べて短波長にシフトした極大吸収波長を示す[1, 10, 11, 16]。

センサリーロドプシン I に関しても、センサリーロドプシン II と同様に基底状態 (G 状態) から光によって K 中間体への異性化が生じ、その後、シッフ塩基は脱プロトン化して M 中間体へと至る。M 中間体は熱的に G 状態に緩和する。ここで、センサリーロドプシン I の M 中間体は正の走光性を担う。このような基本的なフォトサイクルに加え、センサリーロドプシン I の M 中間体は近紫外光を吸収することで P 中間体と呼ばれる別の中間体へと光異性化する。P 中間体のレチナール配座は今までのところ決定されていない。P 中間体はセンサリーロドプシン I に固有の中間体であり、負の走光性を担っている。機能としては ppR の M 中間体に相当する[1, 10, 11, 18-20]。

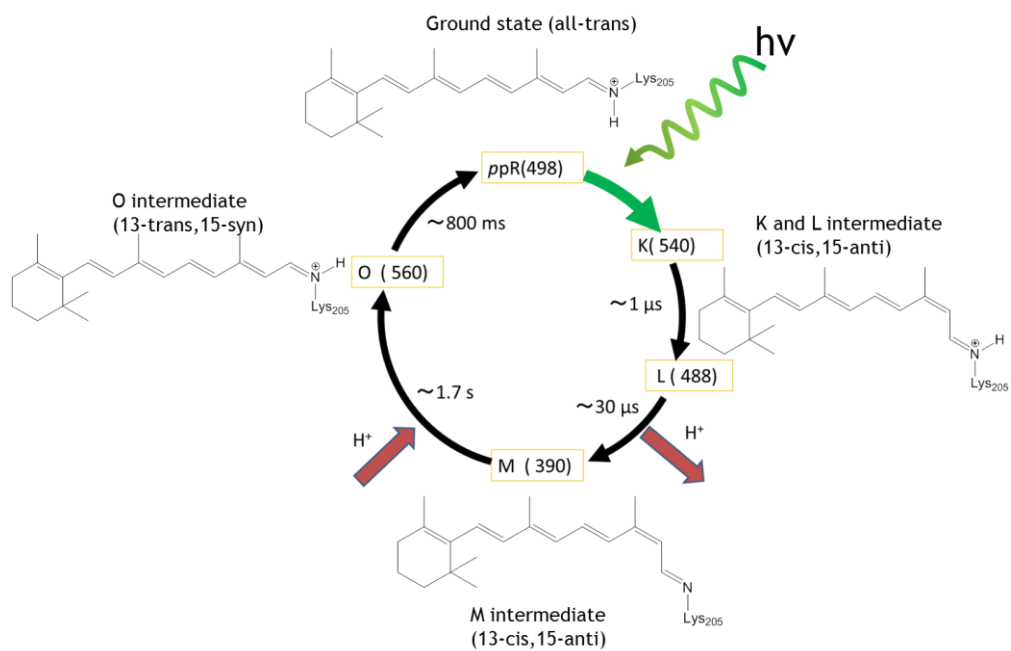


Fig. 1-3-1 センサリーロドプシン II の代表的なフォトサイクル。フォトサイクル中に表記した () 内の数字は各々の中間体の極大吸収波長 [nm] を表している。

References

1. D. Suzuki, H. Irieda, M. Homma, I. Kawagishi and Y. Sudo, *Sensors*, 2010, **10**, 4010-4039.
2. O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L.S. Brown and H. Kandori, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 126–163.
3. A. Kaneko, K. Inoue, K. Kojima, H. Kandori and Y. Sudo, *Biophys. Rev.*, 2017, **9**(6) 861–876.
4. A. K. Sharma, J. L. Spudich and W. F. Doolittle, *Trends Microbiol.*, 2006, **14**, 463-469.
5. R. Henderson, J.M. Baldwin, T.A. Ceskat, F. Zemlin, E. Beckmann and K.H. Downing, *J. Mol. Biol.*, 1990, **213** 899-929.
6. G. Varo, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1460**, 220-229.
7. J.L. Spudich and H. Luecke, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2002, **12**, 4, 540-546.
8. X. Chen and J.L. Spudich, *Biochemistry* 2002, **41**, 3891-3896.
9. W. Stoeckenius, E.K. Wolff and B. Hess, *J. Bacteriol.*, 1988, **170**, 2790-2795.
10. K. Inoue, T. Tsukamoto and Y. Sudo, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1837**, 562–577.
11. A. Naito and I. Kawamura. Photoactivated structure changes in photoreceptor membrane proteins as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR spectroscopy. In: Frances Separovic, A. Naito. editors. *Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides*, 2014, **Chap.20**, pp. 387-404.
12. J.L. Spudich and R.A. Bogomolni, *Nature*, 1984, **312**(5994), 509-513.
13. S. Roy, T. Kikukawa, P. Sharma and N. Kamo, *IEEE Trans. Nanobioscience*, 2006, **5**(3), 178–187.
14. Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy and A. Naito, *Biophys. J.*, 2011, **101**, L50–L52.
15. K. Inoue, J. Sasaki, M. Morisaki, F. Tokunaga and M. Terazima, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 2587–2597.
16. Y. Imamoto, Y. Shichida, J. Hirayama, H. Tomioka, N. Kamo and T. Yoshizawa, *Biochemistry*, 1992, **31**, 2523.
17. Y. Sudo, M. Imamoto, K. Shimono and N. Kamo, *Biochemistry*, 2004, **43**, 13748-13754.
18. R.A. Bogomolni and J.L. Spudich, *Biophys. J.* 1987, **52**, 1071-1075.

19. I. Szundi, T.E. Swartz and R.A. Bogomolni, *Biophys. J.*, 2001, **80**, 469-479.
20. D. Suzuki, Y. Furutani, K. Inoue, T. Kikukawa, M. Sakai, M. Fujii, H. Kandori, M. Homma and Y. Sudo, *J. Mol. Biol.*, 2009, **392**, 48–62.

第2章 光照射固体 NMR の開発

2-1 光照射固体 NMR に関する概要

固体 NMR 分光法はセンサリーロドプシンのような膜タンパク質の構造を膜に埋め込まれた天然に近い環境で観測することに適した分光法の一つである。特に光受容膜タンパク質の光反応過程や光活性状態におけるタンパク質の構造変化を解明するためには極めて有用な研究手法である。しかしながら、固体 NMR の標準的手法であるマジックアングル回転 (MAS) 下での光照射システムの構築が極めて困難であるため、光照射下での固体 NMR を用いた実験は容易ではない。これまでに行われてきた光照射固体 NMR の実験の多くはプローブの外で光照射を行い、サンプルを凍結させることで光中間体の反応を止めて、固体 NMR 測定を行う freeze-trap によって光中間体を捕捉してきた。

バクテリオロドプシンの光中間体の研究では、freeze-trap による光照射固体 NMR 測定を用いることで、M 中間体、N 中間体といった光中間体を捕捉してきた [1-4]。その後、光ファイバーを用いてプローブ頭部に光を伝送して、光照射固体 NMR 測定が行われるようになった。この手法では光は試料管の外側から照射されている [5-7]。近年、筆者らが開発した *in-situ* 光照射固体 NMR では試料管にガラス製のキャップを挿入することで光照射効率の高い光照射固体 NMR 測定が行われている [8-10]。

固体 NMR の ZrO_2 サンプル管は不透明であるため、サンプル管の外部からの照射光の導入では試料に対して均一でかつ効率的な光照射が実現できない。そこで *in-situ* 光照射固体 NMR においては、透明なガラス製のキャップを用いて試料管内部に光を導いて高効率の試料への光照射を可能にした。マグネット外部に置かれた LED 光源から発生した光を、光ファイバーを用いてプローブ内へと導入した。光ファイバーの先端は試料管のガラスキャップ上端で試料管と平行な方向へ固定した。この時、光ファイバーとガラスキャップを非接触とすることで、固体 NMR の標準的手法であるマジック角回転(MAS)下での光照射固体 NMR 測定を可能にした。また、595 nm、520 nm および 365 nm の LED 光源を設置することで MAS NMR 測定中に光の波長を容易に切り替えることを可能にした。このように、NMR 測定中に光源を切替ることによって、SRI のように光の波長に依存して発現する機能を制御する反応経路に現れる中間体の生成とレチナールの構造を同時に調べることができる。

センサリーロドプシンのような微生物型ロドプシンはフォトサイクルと経て機能を発現する [11-13]。この光反応過程では熱緩和によっていくつかの不安定な光中間体を経て最後に初期状態に戻る [14]。また、センサリーロドプシンの機能に重要であると考えられる後期中間体は初期中間に比べてその寿命が長いこ

とが特徴である[11]。そのため、特定の波長の光照射下では緩和時間の長い中間体が定常的に捕捉される。このように、本研究では連続光照射固体 NMR を用いることで光定常状態での中間体構造を観測することを可能とした。

2-2 固体高分解能 NMR [15-17]

一般に電子や陽子、中性子といった粒子はスピン量子数を 1/2 を持つ。それらの粒子からなる原子核もスピン量子数をもっている。例えば、 ^{12}C はスピン量子数が 0 であり、 ^{13}C はスピン量子数が 1/2 である。陽子と中性子の数の総和が質量数であるから質量数が偶数の核は核のスピンが 0 か整数となり、質量数が奇数の核は核のスピンが半整数となる。核のスピンが 0 でない核は静磁場中でその核スピン I の磁気モーメントによって $2I+1$ のエネルギー準位に分裂する。このエネルギー分裂をゼーマン分裂と呼び、分裂したいくつかのエネルギー準位のことをゼーマンエネルギーと呼ぶ。式 (2-1) にはスピン 1/2 の核スピンの 2 つのゼーマンエネルギーの差を示した。炭素原子に関しては天然において ^{12}C の存在はおおよそ 99% であり、 ^{13}C の天然存在比がわずかに 1% ほどである。

そこで、本研究のように ^{13}C NMR 測定を行う際には ^{13}C 安定同位体標識したサンプルを用いることで、その感度を向上させる必要がある。本研究ではレチナールの 14 位、20 位の炭素原子を ^{13}C で標識したサンプルを用いることでその感度を向上させ、かつ部位選択的な測定を行っている。NMR の共鳴条件は式 (2-1) で表わされる。

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (2-1)$$

ここで、 γ は磁気回転比と呼ばれ核種によって異なる固有の値をもつ。 B_0 は静磁場の大きさを静磁場の値が大きければ大きいほどゼーマンエネルギーの差は大きくなる。本研究では ^1H の共鳴周波数が 400 MHz に対応する静磁場 (9.4 T) を用いている。

静磁場 B_0 方向を向いている巨視的磁化に対して、X 軸方向から振動磁場 B_1 を照射することで、その巨視的磁化は X 軸回りを回転して -Y 軸方向へ倒れる。この時の振動磁場の回転角速度を $2\pi\nu$ にすると、最も効率よく横磁化を生成することができるようになる。この ν はラーモア周波数であり式 (2-2) を満たす。

$$2\pi\nu = \gamma B_0 \quad (2-2)$$

以上のように振動磁場とラーモア周波数を共鳴させて横磁化を生成するが、この時、X 軸から 90 度だけ巨視的磁化を倒すためのパルスラジオ波を 90 度パルスと呼び、この状態からの緩和過程を観測することで観測核の運動情報を得

ることができる。90度パルス照射後のZ方向への緩和過程を縦緩和と呼びその緩和時間を T_1 であらわす。縦緩和の速度 $1/T_1$ はもとの熱平衡縦磁化に戻るまでの間、指数関数的に熱平衡状態に戻る挙動を示す。Y方向から見た緩和を横緩和と呼び、その緩和時間を T_2 であらわす。この横緩和の速度 $1/T_2$ は自由誘導減衰の振動曲線となりその信号をFID信号と呼ぶ。このFID信号をフーリエ変換することでNMRスペクトルを得ることができる。同じ核種を観測した場合でも、その核の化学的環境が異なると遮蔽磁場も異なるために、化学種の異なる核は共鳴周波数からずれた横磁化を生成することになり、結果としてわずかにずれた共鳴周波数を観測することになる。この共鳴周波数からの差は化学シフトと呼ばれ、以下の式(2-3)で与えられ、一般に 10^{-6} 程度の大きさなのでppmで表記される。

$$\delta = \frac{\nu_{\text{sample}} - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ref}}} = \frac{\nu_{\text{sample}}}{\nu_{\text{ref}}} - 1 \quad (2-3)$$

一般に ^{13}C NMRの化学シフト値の基準としてはTMS(テトラメチルシラン)を0ppmとして用いる。本研究では、20°Cにおけるグリシン(TMS基準で176.03ppm)を外部標準物質として用いている。

固体NMRでは、分子が固定されているので静磁場の方向に依存する化学シフト異方性を生じるが、このような異方的な相互作用を消去するためにマジック角回転(MAS)法が利用される。試料を静磁場方向から54.7度傾けて高速回転させると異方性が除去され、化学シフトが等方値に平均化される。この手法により異方性により生じていた幅広い信号を先鋭な信号として観測し、分解能を向上することが可能となる。

本研究ではレチナールの ^{13}C NMRスペクトルを観測することを目的としている。 ^{13}C の核磁気回転比は ^1H の1/4程度である。先に述べたようにNMRの信号強度は同一静磁場中においてはその核磁気回転比に比例する。信号強度を上げるための手法として、CP法(交差分極法)がある。これは、希釈核である ^{13}C に90度パルスを照射せず、存在比が高い ^1H に90度パルスを照射し、引き続き ^1H 核に横方向にロックパルスを照射する。同時に ^{13}C 核に接触パルスを $\gamma_{\text{C}}\text{H}_{1\text{C}} = \gamma_{\text{H}}\text{H}_{1\text{H}}$ (Hartmann-Hahn条件)を満たすように照射し、回転系で熱的に接触させることで磁化を移動させる方法である。CP法の効率は静的な双極子相互作用の強さに依存する。そのため、運動性が高い領域では双極子相互作用が平均化されてしまうのでCP効率が低く、運動性の低い領域はCP効率が高くなる。そのため、CP法は運動性の低い領域の ^{13}C 核を選択的に観測することができる。また、CP効率が最も良い条件をHartmann-Hahn条件と呼び、2重回転系でラーモア周波数を一致させることで実現可能となる。特に、本研究で対象にしてい

る膜タンパク質のように運動性がある程度小さい分子に対する ^{13}C NMR 測定ではこの CP 法が基本の測定手法となる。

上記のように MAS 法と CP 法を組み合わせると、高分解能でかつ固い領域（膜貫通領域）に選択的な NMR 観測が可能となる。このように、膜タンパク質の ^{13}C NMR 測定に関しては以下の 2 つの条件が必要であることがわかる。

1. ^{13}C で安定同位体標識した試料を用いること
2. CP-MAS 法による測定を行うこと

測定試料の調製に関しては 3 章、4 章で述べる。ここで、光照射固体 NMR の開発においては、光照射下での CP-MAS 法による ^{13}C NMR の測定が課題となる。

2-3 *In-situ* 光照射固体 NMR 分光法

本研究で使用した光照射 NMR は次の 3 点の特徴的な点を持つように工夫をして実験を行った。*In-situ* 光照射固体 NMR の概念図を Fig. 2-3-1 に示した。

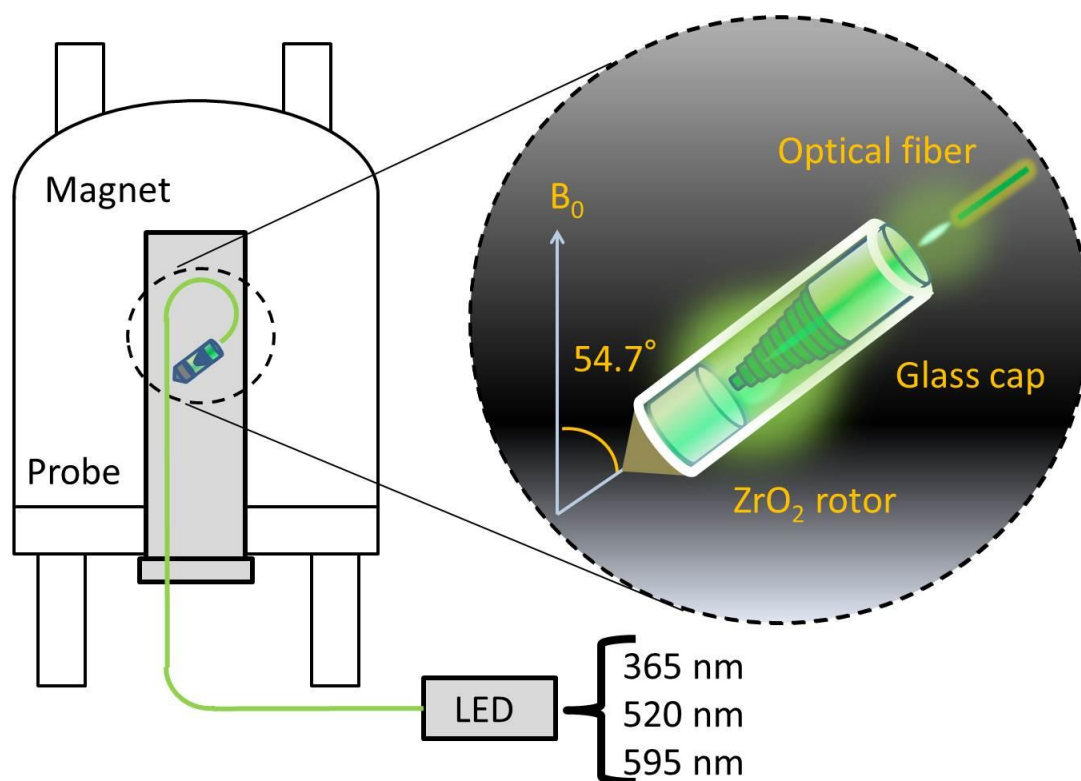


Fig. 2-3-1 *in-situ* 光照射固体 NMR の概略図

まず第 1 に光照射システムに関しては、ガラス製のキャップを用いて光源からの光を試料管内部へと導き、*in-situ* での光照射を行った[8-10]。固体 NMR の ZrO_2 サンプル管は不透明である。そのためサンプル管の外部からの光照射では

試料に対して均一かつ効率的な光照射が実現できない。そこで *in-situ* 光照射固体 NMR においては、透明なガラス製のキャップを用いて試料管内部に光を導いて高効率の光照射を可能にした。また、ガラスキャップの先端を加工し、すりを入れることで光を NMR 試料管に垂直に散乱させることで試料表面での全反射を防ぎ、試料に対して光が十分に浸透する。このようにして高い光照射効率を実現した。Fig. 2-3-2 ではロッドのままのガラスキャップでは光が直進しかしていませんのに対して、加工したものでは光が効率よく散乱している様子が示されている。

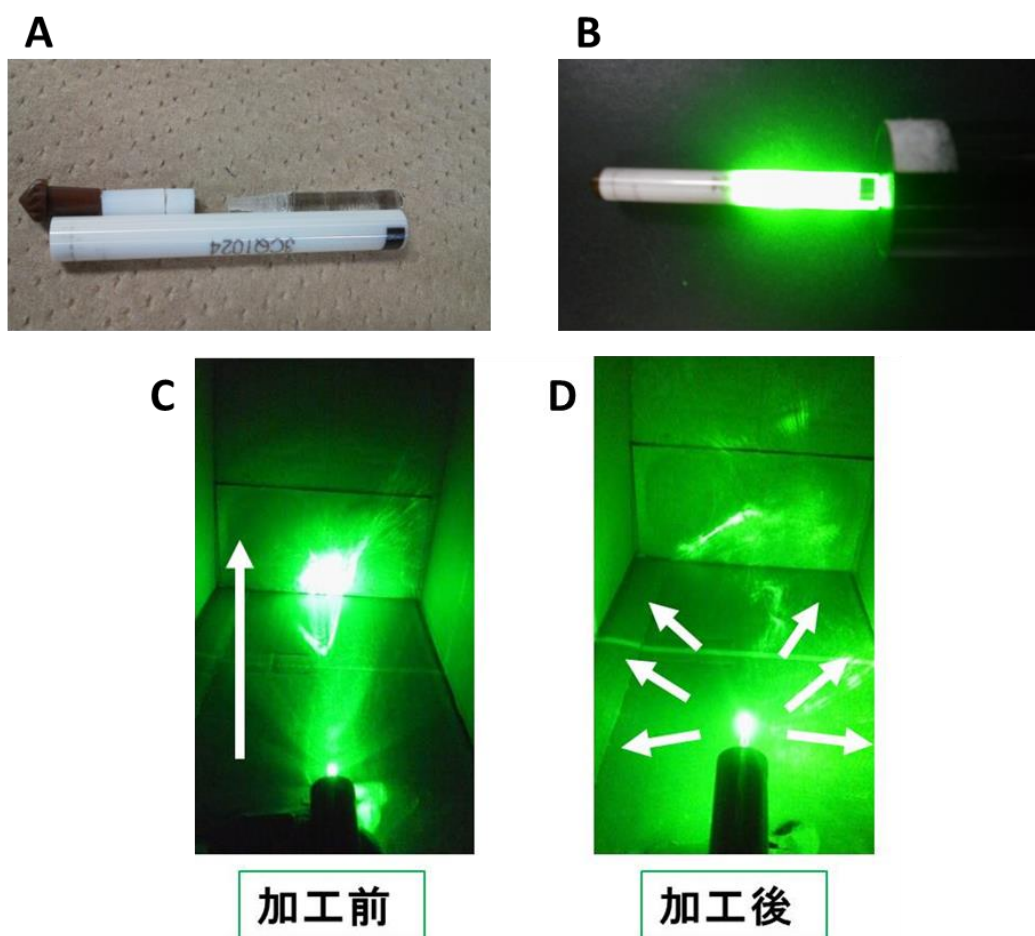


Fig. 2-3-2 ガラスキャップの加工とすり入りガラスの光の散乱の様子, A) すりの入った三角錐のガラスキャップ, B) 試料管内部から光が照射されている状態, C) ロッド型のガラスキャップの光散乱の様子, D) すり入り三角錐型のガラスキャップの光散乱の様子

第2に MAS 回転下での光照射の実現である。Fig. 2-3-3 に示したように、プラスチック製ステーターを用いて、光ファイバーを試料管に対して平行な方向（マジック角）に固定し、ファイバー先端をガラスキャップと非接触とした。これにより、光照射下で固体 NMR の化学シフト異方性を巧みに扱うためのマジック角スピニング（MAS）で高速回転することが可能となり、高分解能の測定が可能になった[8-10]。

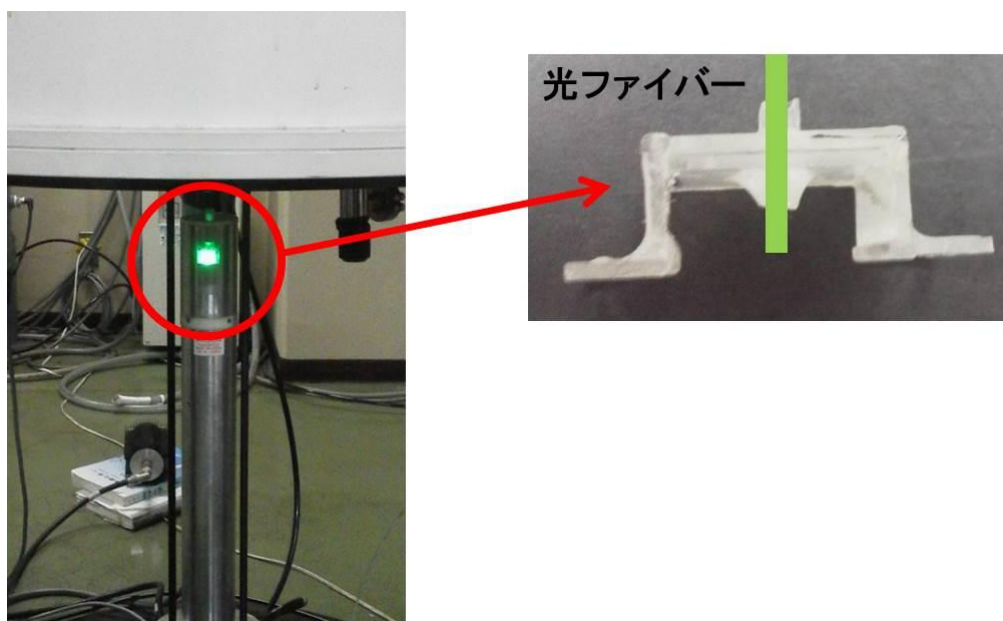


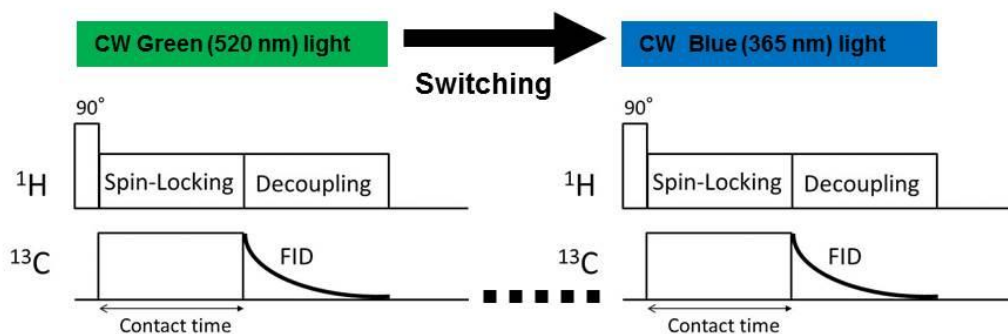
Fig. 2-3-3 プロブヘッド(左)とファイバーのステーター(右)

第3に、選択的な光の切り替えである。特に SRI の P 中間体を観測するためには緑色光から青色光への切り替えが必要であったため、複数のカラーバリエーション（365, 520 595 nm）を整え、Fig. 2-3-4 のように光源として LED を用いることにより光の波長の選択制を可能とした。また、光源は NMR 分光器とは独立するようにしたため、Fig. 2-3-5 に示す NMR のパルスシーケンスにおいて光源だけを切り替えることができるようにした。



Fig. 2-3-4 LED 光源

Photo Irradiation



CP MAS

Fig. 2-3-5 NMR パルスシーケンスと CW 光照射

光照射固体 NMR に関しては、その光の強度が重要なファクターである。本研究で光照射に用いた LED 光源は 520 nm および 595 nm が光源出力 100 mW であり、365 nm が 50 mW のものを使用した。Fig. 2-3-6 のようにプローブ内へは 1 m のプラスチック製の光ファイバーを 2 本コネクして光を導入した。ここで、光の強度が減少される箇所は光源でのレンズ、コネクション部位、およびファイバーの曲げによる欠損であるので、Fig. 2-3-6 の a)、b)、c) の各々においてパワーメーターで、その光の強度を測定した。365 nm の光の波長はパワーメーターでの測定が不可能であったので、ここでは 520 nm での測定結果を代表値として示した。光源の出力を最大にした場合、b) では 78 mW で出力されコネクション

をつける前に 58 mW まで減衰し、コネクションを接続することで 29 mW に減衰した。最終的に a) の部位では 25 mW まで強度が減少した。このように、曲げによる光の強度の欠損はほとんどなく、コネクションによる欠損が大部分を占めている。実際の測定では 520 nm の LED 光源に関してはおよそ 20 mW の最終出力程度での測定を行った。このため、弱い強度の照射光になったが、本システムが *in-situ* 光照射であり高効率な光照射を実現できていることからこの光の強度は問題とならない。また、タンパク質試料に対して光によるダメージが少ないという点でも、この光の強度は適当であると考えられる。



Fig. 2-3-6 光源からの光の導入

2-4 光中間体の定常捕捉観測の戦略と光反応経路の解析手法

本研究において、筆者らが開発した *in-situ* 光照射固体 NMR によって、光定常状態におけるセンサーロードプシンの中間体の定常捕捉 (stationary trapping) が可能になった。以下にその原理を示す。

センサーロードプシン II のフォトサイクルを Fig. 2-4-1 に示した[11-13]。信号伝達活性の中心である M 中間体はその寿命が他の中間体に比べ transducer タンパク質との複合体を形成時では 1.7 s と長いため[11]、連続光照射下ではその存在比率が大きくなる。そのため固体 NMR の時間分解能の範囲で光定常的に光中間体が捕捉できる。さらには、M 中間体はシッフ塩基が脱プロトン状態にある

ため、その極大吸収波長が大きく短波長にシフトしており、例えば Green light 照射下では M 中間体は励起されず M 中間体に溜めることができる。

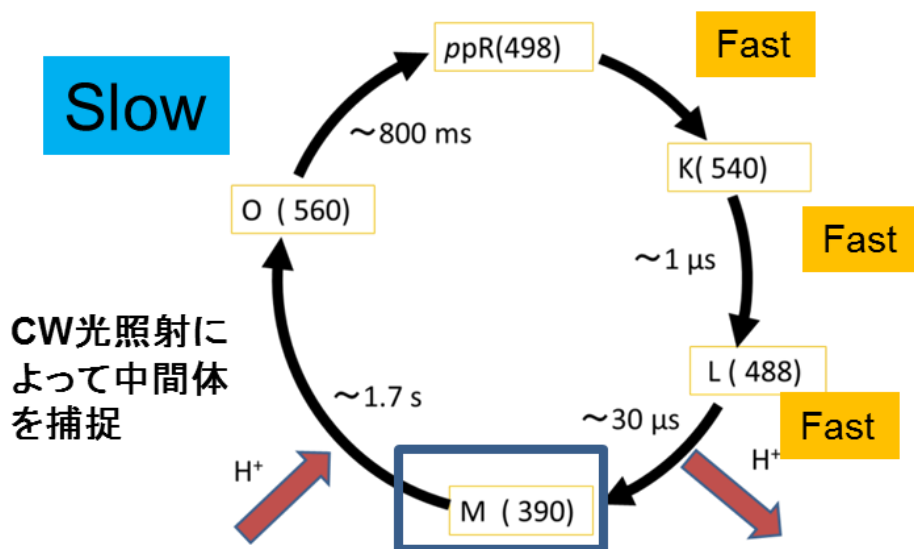


Fig. 2-4-1 連続光照射による定常状態観測

また、レチナールの 20 位のメチル基 (Fig. 2-4-2) の ^{13}C の化学シフト値は Table 2-4-1 のように中間体のレチナール配座とよい相関を示している [8]。このように $[20-^{13}\text{C}]$ Retinal のような中間体のレチナール配座と相関のある箇所を ^{13}C 標識したレチナールを用いることで中間体の構造を決定することができる。

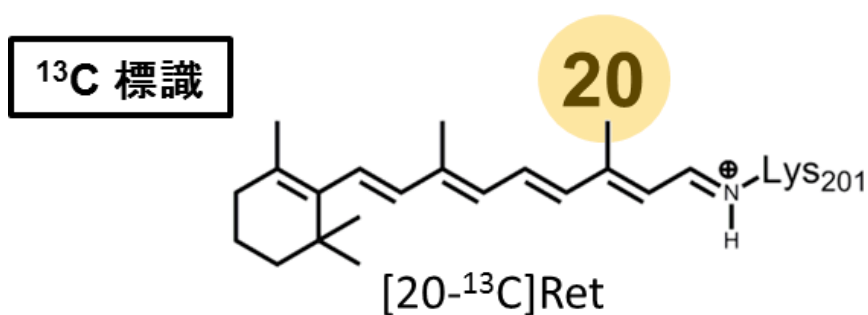


Fig. 2-4-2 レチナールと ^{13}C 標識部位

Table 2-4-1 $[20-^{13}\text{C}]$ -retinal の化学シフト値 (ppm)

	G-state	M-intermediate
<i>ppR</i> (0 °C)	13.3* (13- <i>trans</i>)	22.3* (13- <i>cis</i>)

*Ref. [8]

^{13}C NMR スペクトルの解析には差スペクトルを用いた。例えば、光照射下と暗状態のように2つの状態での NMR 測定を行い、Fig. 2-4-3 のような（光照射下）－（暗状態）の差スペクトルを利用することで反応に関与していない信号を消去して、どの反応物（負の信号）からどの生成物（正の信号）に変化したかを同定し、その反応過程を解析することが可能となる。

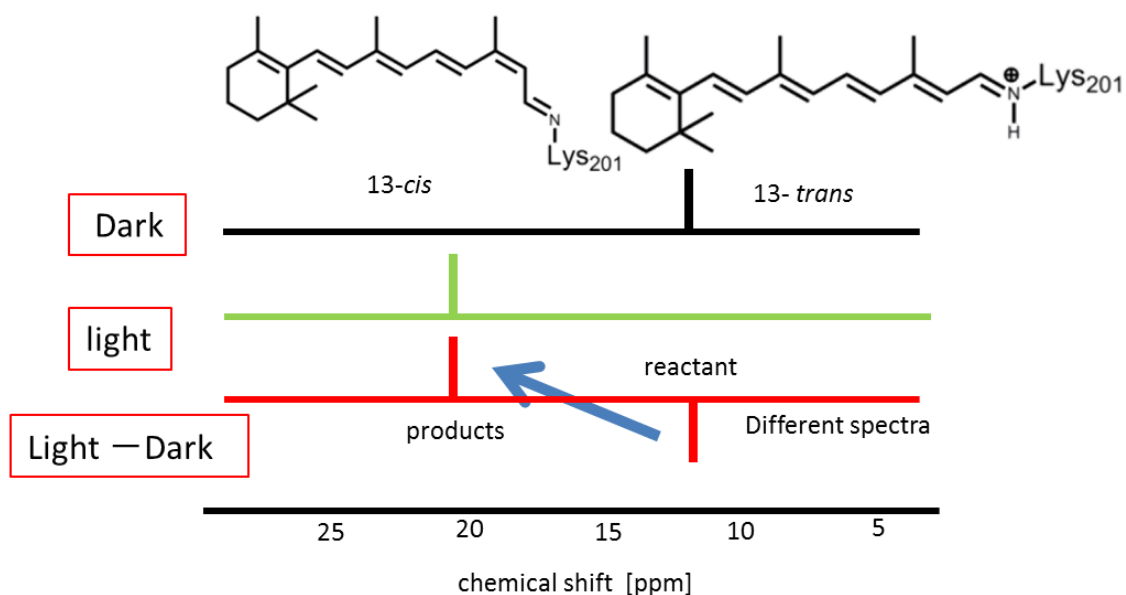


Fig. 2-4-3 差スペクトルを用いた反応過程の解析手法の概念図

References

- 1 S.O. Smith, H.J.M. de Groot, R. Gehard, J.M.L. Courtin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld and R.G. Griffin, *Biochemistry*, 1989, **28**, 8897.
- 2 A.E. McDermott, L.K. Thompson, C. Winkel, M.R. Farrar, S. Pelletier, J. Lugtenburg, J. Herzfeld and R.G. Griffin, *Biochemistry*, 1991, **30**, 8366.
- 3 M.R. Farrar, K.V. Lakshmi, S.O. Smith, R.S. Brown, J. Raap, J. Lugtenburg, R.G. Griffin and J. Herzfeld, *Biophys. J.*, 1993, **65**, 310.
- 4 K.V. Lakshmi, M.R. Farrar, J. Raap, J. Lugtenburg, R.G. Griffin and J. Herzfeld, *Biochemistry*, 1994, **33**, 8853.
- 5 J.G. Hu, B. Q. Sun, M. Bizounok, M.F. Matcher, J.G. Lansing, J. Raap, P.J.E. Yerdegem, J. Lugtenburg, R.G. Griffin and J. Herzfeld, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8088.
- 6 A.T. Petkova, M. Hatanaka, C.P. Jaroniec, I.G. Hu, M. Belenky, M. Verhoeven, J. Lugtenburg, R.G. Griffin and J. Herzfeld, *Biochemistry*, 2002, **41**, 2429.
- 7 E. Crocker, M. Eilers, S. Ahuja, V. Hornak, A. Hirshfeld, M. Sheves and S.O. Smith, *J. Mol. Biol.*, 2006, **357**, 163-172.
- 8 Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Osawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy and A. Naito, *Biophys. J.*, 2011, **101**, L50.
- 9 I. Kawamura, N. Kihara, M. Ohmine, K. Nishimura, S. Tuzi, H. Saito and A. Naito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1016-1017.
- 10 K. Oshima, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa and A. Naito, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**, 1694–1702.
- 11 D. Suzuki, H. Irieda, M. Homma, I. Kawagishi and Y. Sudo, *Sensors*, 2010, **10**, 4010-4039.
- 12 K. Inoue, T. Tsukamoto and Y. Sudo, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1837**, 562–577.
- 13 A. Naito and I. Kawamura. Photoactivated structure changes in photoreceptor membrane proteins as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR spectroscopy. In: Frances Separovic, A. Naito. editors. *Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides*, 2014, **Chap.20**, pp. 387-404.
- 14 K. Inoue, J. Sasaki, M. Morisaki, F. Tokunaga and M. Terazima, *Biophys. J.*, 2004, **87**, 2587–2597.
- 15 竹腰清乃理 核磁気共鳴-NMR –核スピンの分光学– サイエンス社 (2011)
- 16 斎藤肇, 安藤勲, 内藤晶 NMR 分光学—基礎と応用— 東京化学同人 (2008)
- 17 H. Saito, I. Ando, A. Naito: Solid-state NMR spectroscopy for biopolymers:

principals and applications. *Springer* 2006.

第3章 センサリーロドプシン I の光中間体の構造解析

3-1 *Salinibacter ruber* 由来のセンサリーロドプシン I (*SrSRI*)

センサリーロドプシン I (SRI) は緑色光に対する誘因応答 (正の走光性) と近紫外光に対する忌避応答 (負の走光性) の信号伝達機能を併せ持ち、光の波長に依存して活性が変化するユニークな膜タンパク質である[1-3]。このセンサリーロドプシン I (SRI) は高度好塩菌 *H. salinarum* より発見された膜タンパク質であるが、*H. salinarum* 由来の *HsSRI* は不安定であり試料調製が困難であった[1,2]。近年になって *H. salinarum* 由来の *HsSRI* よりも極めて安定な真正細菌 *S. ruber* 由来のセンサリーロドプシン I (*SrSRI*) を、大腸菌を用いて大量発現できる方法が確立され比較的容易に試料調製が可能となった[4]。*SrSRI* の基底状態における極大吸収波長は 557 nm である[4]。*SrSRI* はその信号伝達機能に関しては固有の 2 本膜貫通型の transducer タンパク質である Halobacterial transducer I (HtrI) と生体膜中で安定な 2:2 量比の複合体を形成し機能を発現するが、HtrI 単量体での大腸菌を用いた大量発現系が確立されていないため、本研究では *SrSRI* 単量体に関して研究を行った。しかしながら、*SrHtrI* は、その収率は 1 L の LB 培地で 0.1 mg 程のわずかではあるが、全長発現が達成されている[5]。そのため、センサリーロドプシン I の下流域のリン酸酵素系まで含めた信号伝達機構の全容解明の研究に期待ができる。*SrSRI* のアミノ酸配列を Fig. 3-1-1 に示した[6]。

センサリーロドプシン I の走光性の信号伝達機能はフォトサイクルを経て発現する。*HsSRI* の基本的なフォトサイクルは $SRI_G(587) \rightarrow K(625) \rightarrow L(540) \rightarrow M(373) \rightarrow G(587)$ である。ここで、M 中間体が正の走光性の活性中心である。一方、負の走光性を担う P 中間体は M 中間体に対する近紫外光によって生成される。その際のフォトサイクルは、 $SRI_G(587) \rightarrow (hv) \rightarrow K(625) \rightarrow L(540) \rightarrow M(373) \rightarrow (hv) \rightarrow P(520) \rightarrow G(587)$ である[7, 8]。

本章の研究の第一の目的は、生体膜中での *SrSRI* の M-および P-中間体のレチナール配座の原子レベルでの高分解能構造解析を、固体 NMR を用いて行うことである。また、複数の LED 光源を扱うことで天然環境に近い生体膜に埋め込まれた *SrSRI* のフォトサイクルを光照射固体 NMR によって明らかにすることが第 2 の目的である。

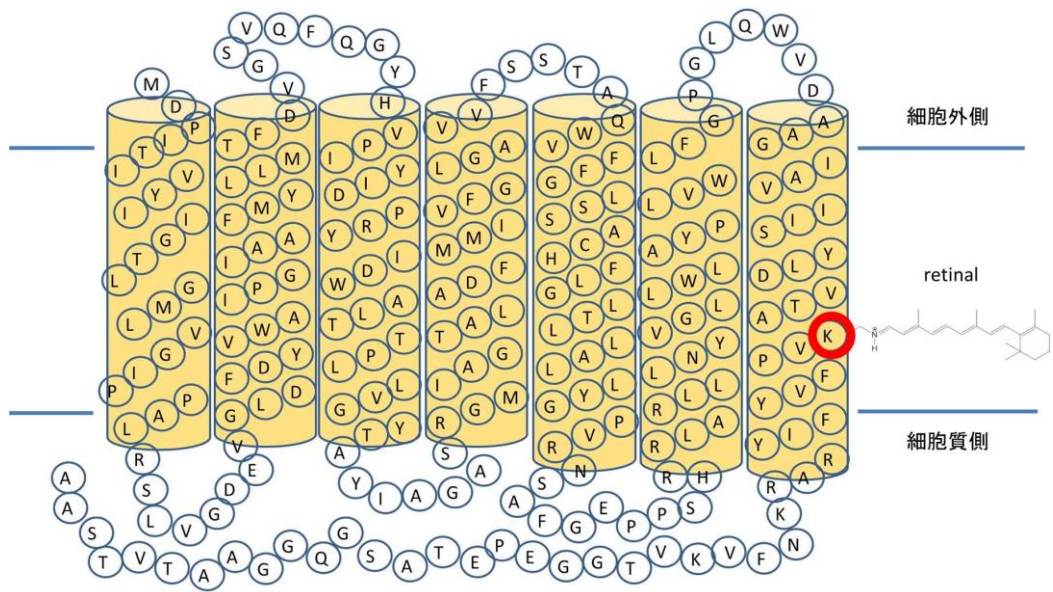


Fig. 3-1-1 SrSRI のアミノ酸配列 [6]

3-2 *SrSRI* の試料調製

C 末端に His-Tag を導入した *SrSRI* を、大腸菌 BL21 (DE3) を用いて M9 培地で培養した。インダクションは 1 mM IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside) を使用し、IPTG 添加後に終濃度でおよそ 10 μ M [20- 13 C]レチナールを添加した。DDM (n-dodecyl- β -D-maltoside) で可溶化したタンパク質を Ni-NTA カラムを用いて精製した。DDM によって可溶化した精製済みのタンパク質を PG 膜 (L- α -phosphatidyl-DL-glycerol ammonium salt from egg yolk lectin) に、*SrSRI* と PG 膜が 1 : 30 のモル比になるように混合し 4°C で穏やかに一晩、攪拌した。Bio-Beads を用いて DDM を除去して、脂質二重膜に再構成した。再構成試料は 5 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl-1-piperiziny) ethanesulfonic acid])、10 mM NaCl 溶液 (pH 7.0) で置換して測定用試料とした。

3-3 *SrSRI* の光反応過程に関する光照射固体 NMR 測定

本実験では、NMR 分光計は固体 NMR (Chemagnetics CMX infinity-400) FT-NMR を用いて、標識した 13 C 核の NMR 信号観測を行った。測定温度は -40°C で CP-MAS 法を用いて行った。また MAS 速度は 4 kHz で光照射は 520 nm、595 nm、365 nm の LED 光源を用いた。Table 3-3-1 に NMR 測定のパラメータを示した。

Table 3-3-1 NMR パラメータ

H 90 pulse [μ s]	6.0	pulse delay [s]	4.00
contact time [ms]	1.0	acq time [ms]	51.20
TPPM dcpl pulse [μ s]	11.4	H rf ampl	0.80
reciver delay [μ s]	10.0	X CP ampl	0.27
dwell time [μ s]	25.0	H CP ampl	0.80
acq delay [μ s]	15.0	H dec ampl	0.80

3-4 520 nm (Green) および 595 nm (Orange) の光照射による変化

520 nm (Green)、595 nm (Orange) 光照射下で生成する光中間体の定常捕捉を行うために、-40°C において CP-MAS 法で 13 C NMR 測定を行った。その結果、Fig. 3-4-1 に示す NMR スペクトルが得られた。

Green light 照射によって 13.8 ppm の all-*trans* を表す信号 (G 状態) が減少し、19.8 ppm の 13-*cis* を表す信号が増加した (Fig. 3-4-1 A (c))。 *SrSRI* のフォトサイクルにおいて K 中間体の寿命は短く、NMR 測定において M 中間体の寿命は十分長い[4,9]。そのため光照射下では M 中間体が光定常的に捕捉されている。よ

って 13-*cis* 配座を示す 19.8 ppm の信号は M 中間体由来のものであると帰属した。G 状態および M 中間体の配座は *ppR* [10] やバクテリオロドプシン (BR) [11-13] との比較からも明らかである。*SrSRI* の G 状態の極大吸収波長は 558 nm であるため、595 nm (Orange light) での変化も観測した (Fig. 3-4-1 B)。その結果、Green light のときと同様に 19.8 ppm の信号が増加したため、確かにこの信号は M 中間体であることが明らかとなった。

両者のスペクトルにおいて 19.8 ppm よりも低磁場側にも光照射によって増加した信号 (▼) が観測できたが、これは波長によって異なる化学シフト値であったので膜等の信号の変化であり、レチナールの変化に由来する信号ではないと判断した。

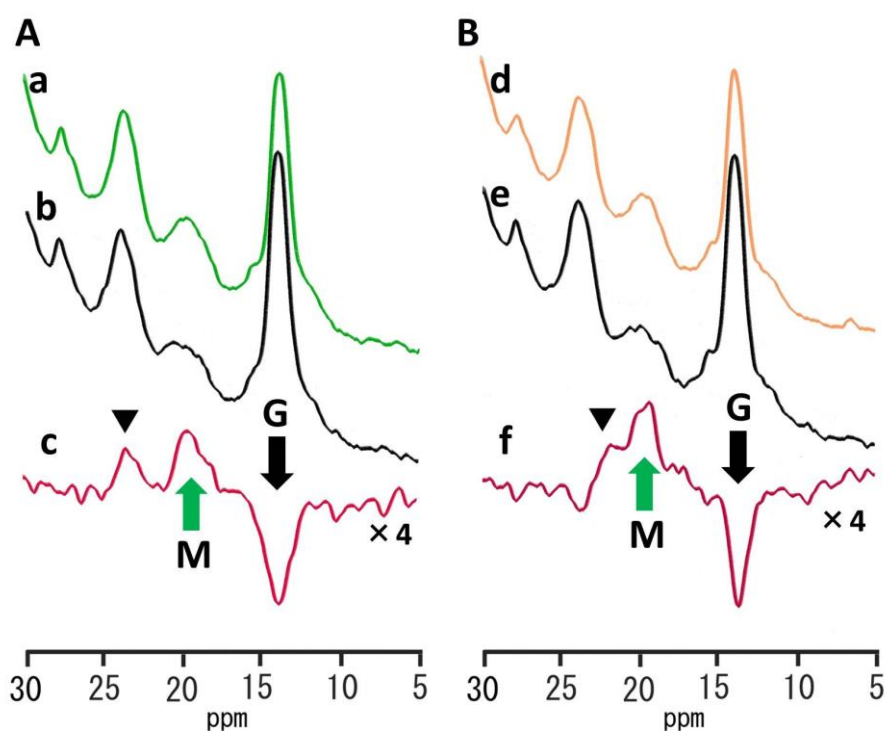


Fig. 3-4-1 [20-¹³C]Ret SRI の ¹³C CP-MAS スペクトル, 測定温度-40 °C, 積算 20000 回, MAS 4 kHz, 5–35 ppm, TMS 基準,

A) (a) 520 nm(Green)光照射下, (b) Dark 状態, (c) Green-Dark の差スペクトル,
 B) (d) 595 nm(Orange)光照射下, (e) Dark 状態, (f) Orange-Dark の差スペクトル,
 ▼は光照射による lipid の信号変化

3-5 365 nm (UV) 光照射による P 中間体の捕捉

SRI は UV light によって M 中間体から P 中間体へ光異性化により転移すると考えられているため、緑色光によって十分に M 中間体を捕捉した後、光の光源を UV 光 (365 nm) に切り替えてその変化を観測した。

UV light 照射によって 19.8 ppm の M 中間体を示す信号は減少し、新たに 24.8 ppm の信号が増加した (Fig. 3-5-1 A)。すなわち 24.8 ppm の化学シフト値を示す別の中間体に転移したことを示している。さらに、この 19.8 ppm の信号は再び暗状態にしたとき G 状態へと戻った (Fig. 3-5-1 B)。よって、この 24.8 ppm の信号を P 中間体と帰属した。さらに、P 中間体の配座はその化学シフト値が 24.8 ppm であることから 13-*cis* 型であることが明らかとなった。この実験により、UV light によって $M \rightarrow (hv) \rightarrow P \rightarrow G$ の反応過程の存在が明らかになった。これは、Green light から UV light への光の波長の切り替えによって、M 中間体から P 中間体への光反応経路の切り替えが起きていることを示す結果である。

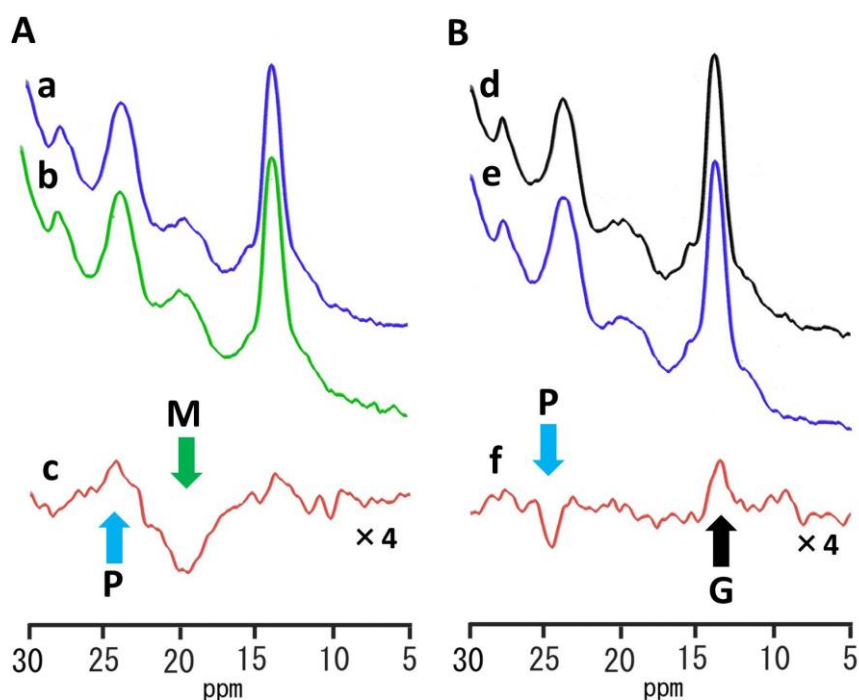


Fig. 3-5-1 [20-¹³C]Ret SRI の ¹³C CP-MAS スペクトル, 測定温度-40 °C, 積算 20000 回, MAS 4 kHz, 5–35 ppm, TMS 基準,
A) (a) 365 nm 光照射下(Blue), (b) 520 nm 光照射下(Green), (c) Blue-Green の差スペクトル,
B) (d) Dark 状態, (e) 365 nm 光照射下(Blue), (f) Dark-Blue の差スペクトル.

3-6 暗状態に対する 365nm (UV) 光の直接照射

SRI が UV light によって P 中間体を生成した 3-5 の結果は、UV light での定常状態において P 中間体が生成したことを示す結果である。よって暗状態に直接 UV light を照射すれば同様の変化が得られるであろうことを着想し、G 状態に対し UV light を照射した。その結果、Fig. 3-6-1 A に示す結果が得られた。ここで、UV light 照射下では M 中間体の信号の増加は観測されず、P 中間体の信号のみの増加が観測できた。この結果は、G 状態から直接 P 中間体の光異性化が生じる 1 光子過程の存在を示唆するものである。一方、M 中間体の極大吸収波長が 390 nm であるので、365 nm の光の吸収によって G 状態から M 中間体へ異性化し、さらに P 中間体へ光異性化する 2 光子過程の存在も否定できない。

また、M 中間体を熱的に緩和する実験を行ったところ、Fig. 3-6-1 の B の結果が得られた。これは、M 中間体から G 状態への反応の経路が存在することを示す結果である。

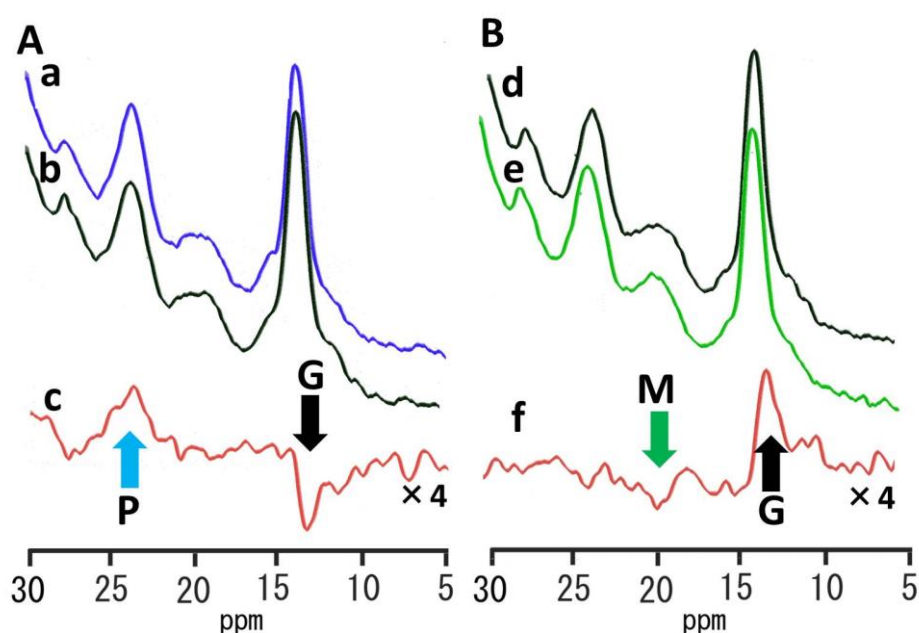


Fig. 3-6-1 [20-¹³C]Ret SRI の ¹³C CP-MAS スペクトル, 測定温度-40 °C, 積算 20000 回, MAS 4 kHz, 5–35 ppm, TMS 基準,

A) (a) Dark 状態に対して行った 365 nm 光照射下(Blue), (b) Dark 状態, (c) Blue-Dark の差スペクトル,

B) (d) Dark 状態, (e) 520 nm 光照射下(Green), (f) Dark-Green の差スペクトル.

3-7 SrSRI のフォトサイクル

以上の結果より、SrSRI の従来のフォトサイクルにおいて、新たに基底状態から 1 光子過程により P 中間体が生じることを考慮に入れた Fig. 3-7-1 に示すフォトサイクルが本実験結果をよく説明できると結論した。また P 中間体の配座が 13-*cis* 型であり、吸収極大値からプロトン付加体であることも明らかになったため、Fig. 3-7-1 にはプロトン付加レチナールの配座も併記した。次に、そのプロトン付加過程について述べる。

まず、正の走光性を示す M 中間体は 520 nm の Green light によって定常的に捕捉できた。一方、負の走光性を示す P 中間体は 365 nm の近紫外光によって定常捕捉された。ここで M- および P-中間体は 13-*cis*, 15-*anti* 配座であり、M 中間体は 365 nm によって減衰したことからそのシッフ塩基は脱プロトン状態にあることが示された。さらに、本研究からは M 中間体から P 中間体への変化はレチナールの大きな構造変化を伴わないプロトン移動による変化であることが示唆されている。

また、本研究では G 状態から P 中間体への 1 光子過程での変換の可能性を初めて提唱するものである。P 中間体は微生物にとって有害な近紫外光からの忌避応答の信号伝達を担う中間体である。確かに G 状態から P 中間体への直接変化の過程が存在する可能性は、微生物の緊急避難的にその走光性を負の走光性へと変化させるために必要な光反応経路であることを示唆している。

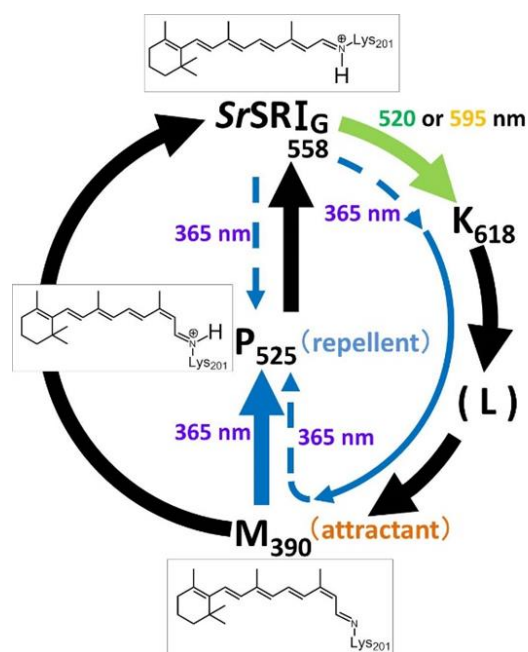


Fig. 3-7-1 SrSRI のフォトサイクル

References

- 1 J.L. Spudich and R.A. Bogomolni, *Nature*, 1984, **312**(5994), 509-513.
- 2 D. Suzuki, H. Irieda, M. Homma, I. Kawagishi and Y. Sudo, *Sensors*, 2010, **10**, 4010-4039.
- 3 K. Inoue, T. Tsukamoto and Y. Sudo, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, **1837**, 562–577.
- 4 T. Kitajima-Ihara, Y. Furutani, K. Suzuki, K. Ihara, H. Kandori, M. Homma and Y. Sudo, *J. Biol. Chem.* 2008, **283**, 23533-23541.
- 5 Y. Sudo, A. Okada, D. Suzuki, K. Inoue, H. Irieda, M. Sakai, M. Fujii, Y. Furutani, H. Kandori and M. Homma, *Biochemistry*. 2009, **48**(42), 10136-45.
- 6 E.F. Mongodin, K.E. Nelson, S. Daugherty, R.T. Deboy, J. Wister, H. Khouri, J. Weidman, D.A. Walsh, R.T. Papke, G. Sanchez Perez, A.K. Sharma, C.L. Nesbø, D. MacLeod, E. Baptiste, W. F. Doolittle, R. L. Charlebois, B. Legault and F. Rodriguez-Valera, *PNAS*, 2005, **102**(50), 18147-52.
- 7 R.A. Bogomolni and J.L. Spudich, *Biophys. J.* 1987, **52**, 1071-1075.
- 8 T.E. Swartz, I. Szundi, J.L. Spudich, and R. A. Bogomolni, *Biochemistry*, 2000, **39**, 15101-15109.
- 9 D. Suzuki, Y. Sudo, Y. Furutani, H. Takahashi, M. Homma and H. Kandori, *Biochemistry*, 2008, **47**, 12750.
- 10 Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Osawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy and A. Naito, *Biophys. J.*, 2011, **101**, L50-L52.
- 11 G.S. Harbison, S.O. Smith, J.A. Pardo, P.P.J. Mulder, J.L. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. Mathies and R.G. Griffin, *Biochemistry*, 1984, **23**, 2662-2667.
- 12 S.O. Smith, H.J.M. de Groot, R. Gehard, J.M.L. Courtin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld and R.G. Griffin, *Biochemistry*, 1989, **28**, 8897-8904.
- 13 V.S. Bajaj, M.L. Mark-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld and R.G. Griffin, *PNAS*, 2009, **106**, 9244-9249.

第4章 センサリーロドプシンIIの光中間体の構造解析と計算化学によるレチナールの構造評価

4-1 ppR/pHtrII タンパク質複合体

センサリーロドプシン II (SRII) は phoborhodopsin と称され、*Pharaonis* phoborhodopsin(ppR)は高度好塩好アルカリ性細菌である *Natrononas pharaonis* 由来の phoborhodopsin である。ppR は Fig. 4-1 のように発色団としてレチナールをもった 7 本膜貫通型の光受容膜タンパク質であり、基底状態での極大吸収波長は 498 nm である。この ppR は固有の 2 本膜貫通型の transducer タンパク質である *pharaonis* Halobacterial transducer II (pHtrII) と生体膜中で安定な 2:2 量比の複合体を形成している (Fig. 4-1-1) [1-6]。

ppR は 239 残基からなる分子量 26 kDa の膜タンパク質であり、C 末端が細胞質側にある。一方、pHtrII は全長が 543 残基からなるタンパク質であるが、大腸菌を用いて発現可能で、安定な複合体を形成するために必要な 159 残基までを発現させている[7]。ppR と pHtrII のアミノ酸配列を Fig. 4-1-2, Fig. 4-1-3 に示した[8]。

このタンパク質複合体は微生物の有害な近紫外の光から逃避する忌避応答である負の走光性を担っている。この走光性はフォトサイクルと呼ばれる特有の光反応過程を経て発現する。ppR/pHtrII 複合体は基底状態 (G 状態) と呼ばれる初期状態において極大吸収波長が 498 nm である。光を吸収することで G 状態にある ppR は極大吸収波長が 540 nm である K(540)中間体へ変化する。その後、L (498 nm), M(390 nm), O(560 nm)といった幾つかの光中間体を熱緩和過程によって経ることでフォトサイクルは進行する。O 中間体は熱的な緩和機構によって再び G 状態に戻ることでフォトサイクルは完結する[9]。

ここで、K 中間体は 13-*cis*, 15-*anti* 配座であり、その寿命はおよそ 1 μ s と短い。K 中間体に続いて生じる L 中間体は 13-*cis*, 15-*anti* 配座であり、その寿命は 30 μ s 程度である。L 中間体ではタンパク質とレチナールの共有結合部位であるシッフ塩基がプロトン化した状態であるが、M 中間体への変化の際にシッフ塩基のプロトンが脱離する。このようにして生じた M 中間体の寿命は 1.7 s であり、レチナールは脱プロトンシッフ塩基状態にある 13-*cis*, 15-*anti* 配座である。この M 中間体においてシッフ塩基が再プロトン化して、O 中間体が生じる。O 中間体は 13-*trans*, 15-*syn* 配座のレチナールを保持している[1,2,9,10]。

このように M 中間体及び O 中間体は K 中間体や L 中間体に比べてその寿命が長く、そのためこれらの M 中間体、O 中間体は負の走光性の信号伝達の活性中心であると考えられている。

このようなフォトサイクルはレチナールの光異性化によって説明される。*ppR*の発色団レチナールはシッフ塩基を介して特定の Lys 残基 (Lys205) と共有結合している。動物型ロドプシン (*type II* 型ロドプシン) は光異性化に際し退色を示す、一方本研究課題である微生物型ロドプシン (*type I* 型ロドプシン) はフォトサイクル中でレチナールを保持したままである。そのため、*ppR* に対して連続光照射を行った場合、レチナールが退色せずフォトサイクルが回り続けるため光中間体の定常状態捕捉が可能となる[2,3,5]。

この *ppR* の信号伝達機構を原子分解能レベルで明らかにすることは一般的な信号伝達をするタンパク質の代表的なモデルを提示する意味で重要な研究である。本研究においては、信号伝達に関して重要であるフォトサイクルの *M* 中間体以降に生じる後期中間体に関して、レチナール配座の決定と反応経路を明らかにすることを主たる目的としている。特に後期中間体に関しては、*ppR* 中での *O* 中間体のレチナール配座が決定されておらず、またバクテリオロドプシン (*BR*) の *N* 中間体に相当する中間体の固体 NMR による観測がなされていない。このような後期光中間体を観測することが、*ppR* のフォトサイクルの解明に関する課題である。本研究ではこれら中間体の詳細な構造を明らかにすることも目的としており、 ^{13}C NMR 信号がレチナールの $^{13}\text{C}=\text{C}^{14}\text{C}$ の *cis/trans* 配座変化と相関のある 20 位の ^{13}C 安定同位体標識に加えて、 $^{15}\text{C}=\text{N}\zeta$ の *syn/anti* 配座に鋭敏な 14 位が ^{13}C 安定同位体標識された、[14, 20- ^{13}C]-labeled-retinal を用いている[11–13]。

また、レチナールの詳細構造の解明の観点から、実験で得られる中間体の化学シフト値の評価するために、DFT 計算を用いてレチナールのねじれ構造に対する化学シフト値の変化を計算した。

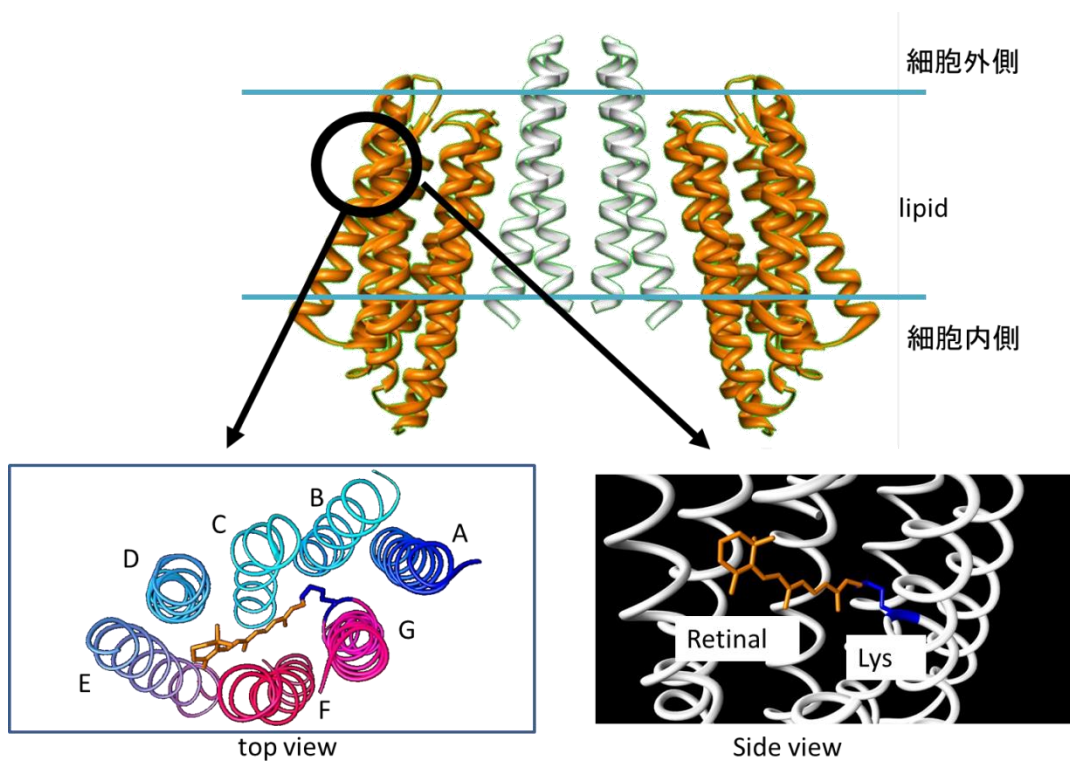


Fig. 4-1-1 ppR/pHtrII 複合体と発色団レチナールの結合 (PDBcode:1H2S)

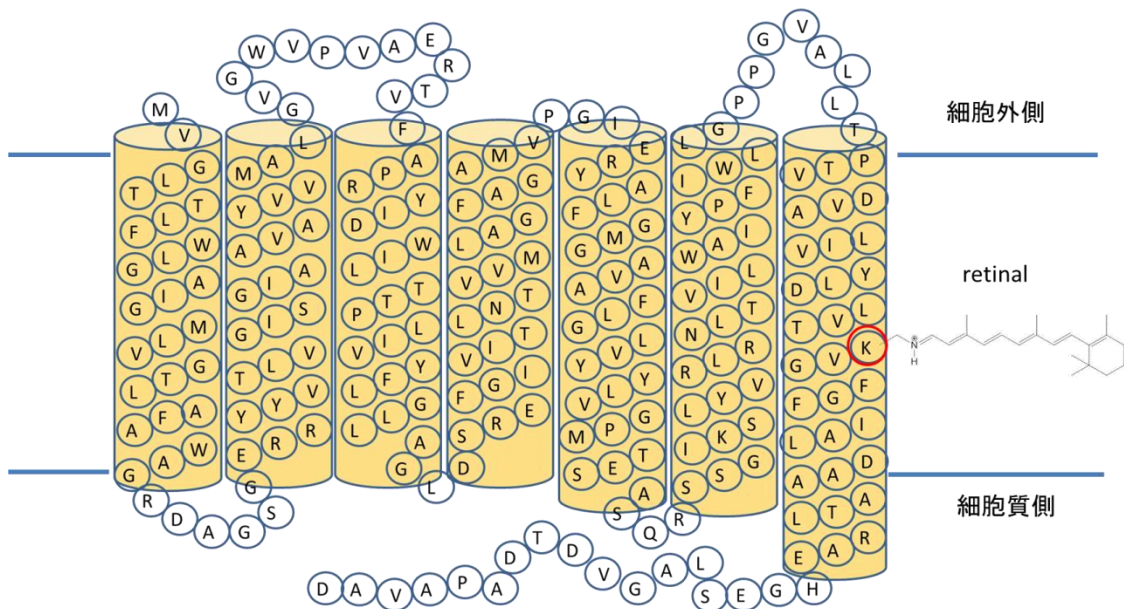


Fig. 4-1-2 ppR のアミノ酸配列とレチナールのシッフ塩基結合部位 [8]

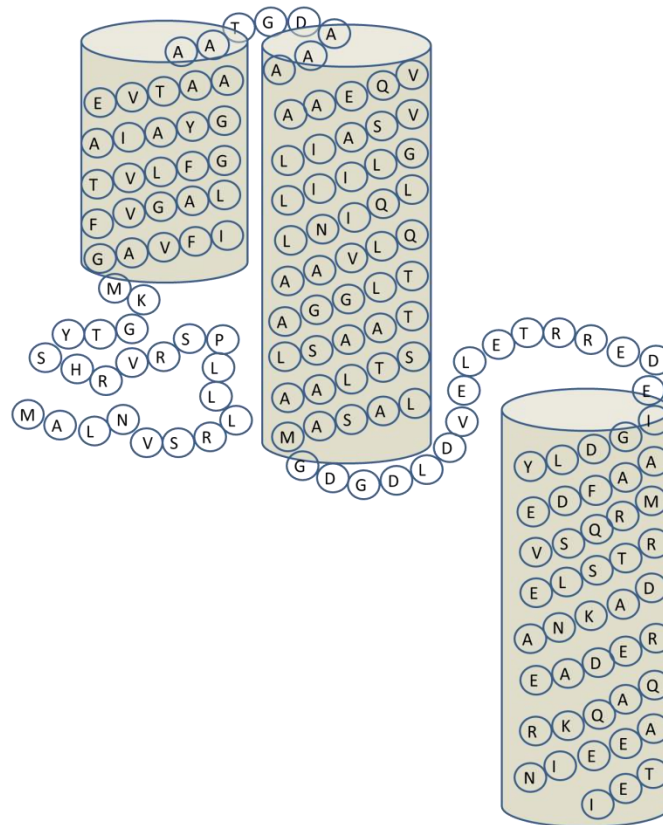


Fig. 4-1-3 *pHtrII* のアミノ酸配列 [8]

4-2 *ppR* および *pHtrII* の試料調製

C 末端に His-Tag (6×His) を導入した *ppR* および *pHtrII* を、大腸菌 BL21 (DE3) あるいは BL21 (C41) 株を用いて LB 培地で培養した。インダクションは 1 mM IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) を使用し、IPTG 添加後に 10 μM [14, 20-¹³C] レチナールを添加した。DDM (n-dodecyl-β-D-maltoside) で可溶化したタンパク質を Ni-NTA を用いて精製した。DDM によって可溶化した精製済みのタンパク質を Egg-PC 膜に、*ppR* と PC 膜が 1 : 30 のモル比になるように混合し 4°C で穏やかに一晩、攪拌した。Bio-Beads を用いて DDM を除去して、脂質二重膜に再構成した。再構成試料は 5 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl-1-piperiziny) ethanesulfonic acid])、10 mM NaCl 溶液 (pH 7.0) で置換して測定用試料とした [7,11,14]。 *ppR/pHtrII* 複合体は各々調製した *ppR* と *pHtrII* は、紫外 - 可視吸光度、SDS-PAGE 電気泳動法、および熱安定性試験 [15] によって確認し、1 : 1 のモル比になるように混合した。DDM 中で 1 晩穏やかに攪拌し形成した複合体を上記と同様の方法で Egg-PC 脂質二重膜に再構成した。

4-3 *ppR/pHtrII* 複合体 に関する光照射固体 NMR 測定

本研究において、固体 NMR 測定は CMX-400 infinity (Chemagnetics, Frot Collins, USA) を用いて行った。測定用の試料を Zr 製の試料管に詰め、ガラスキャップでしっかりと密閉した。¹³C 核観測の共鳴周波数はおよそ 100 MHz で、¹H の共鳴周波数は 400 MHz で測定を行った。測定温度は -40 あるいは -60°C であり、CP-MAS 法を用いて行った。また MAS 速度は 4 kHz で光照射の光源は 520 nm、365 nm の LED を用いた。¹³C NMR 化学シフト値は TMS、0.0 ppm 基準にするために、グリシンの結晶のカルボニル炭素を 176.03 ppm とした[11,13,16]。

光照射固体 NMR は微生物型ロドプシンのフォトサイクルを解明する上で有用な手法である。以下、光照射固体 NMR を用いた *ppR* の光中間体の定常捕捉の戦略に関して説明をする。M 中間体や O 中間体は他の K 中間体や L 中間体に比べて長い寿命を持っている (Fig. 4-4 A)。そのため、試料に対して green light を連続光照射することで、M 中間体のような寿命の長い中間体が定常状態で捕捉される (Fig. 4-4 B)。1D NMR スペクトルにおいては脂質由来などの信号との重なりが観測される。そこで、光照射前後の差スペクトルを用いることで光反応過程における反応物と生成物を、負のピークおよび正のピークとしてそれぞれ観測することができる (Fig. 4-4 B d,e)。G 状態から K 中間体への光反応過程以外は上述したように熱緩和過程で進行する。そのため、測定温度を調節し、低温で測定することによって中間体の寿命を延ばすことで中間体の捕捉がより可能になる。また、M 中間体はそのシッフ塩基が脱プロトン状態にあるため極大吸収波長が短波長シフトしている。よって、M 中間体に対して 365 nm の UV light 照射を行うことで M 中間体を選択的に光反応させることが可能である。このように測定温度、照射光を調節することによって特定の間接体を捕捉することが可能となる。

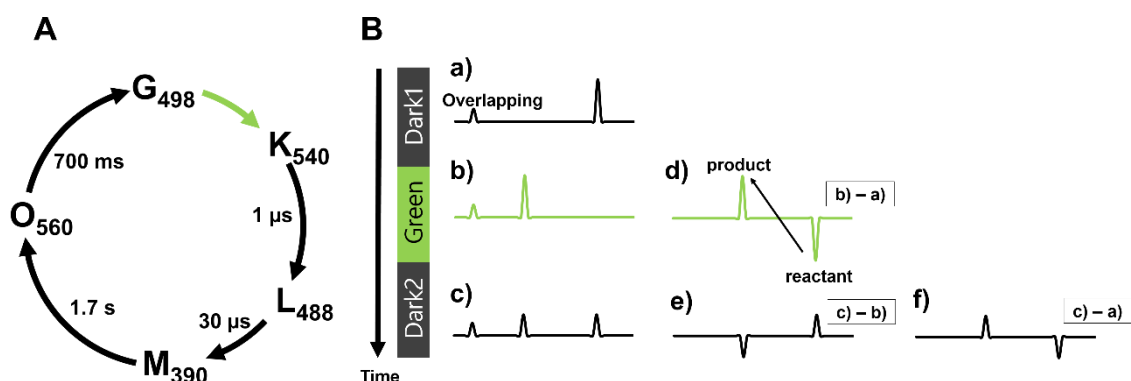


Fig. 4-4 (A) *ppR* の代表的なフォトサイクル, M 中間体および O 中間体は K, L 中間体に比べ長い寿命である。(B) 光照射 NMR 実験のプロトコルと解析手法, 光照射のパターンは最初の暗状態 (Dark1) (a)、その後に光照射状態 (Green) (b)、最後に再び暗状態 (Dark2) (c) の順で測定を行った。解析は差スペクトルを用いて行った。B(d) = (b) - (a); B(e) = (c) - (b); B(f) = (c) - (a) で示した差スペクトルでは *overlap* のシグナルが消去されている。差スペクトルにおける負のピークは光照射による反応物を、正のピークは生成物を示している。

4-3-1 *ppR/pHtrII* 複合体に対する 520 nm (Green) 光照射による変化

-40°C において CP-MAS 法で NMR 測定を行った結果、Fig. 4-4 A の ^{13}C NMR スペクトルが得られた。実験は暗状態 (Dark1) で NMR 測定を行った後、Green 光照射下 (Green) で行った。実験はその後、再び暗状態で測定を行った (Dark2)。解析のために、差スペクトルを用いた (Fig 4-4 B)。

[20- ^{13}C] *retinal* の信号は Fig. 4-4 A に示したとおり大きく脂質由来の信号と重なっている。そこで、光照射によって生じる光反応過程を明らかにするために差スペクトル (Green-Dark1) を用いて解析を行った (Fig. 4-4 B (d))。先に述べたように、差スペクトルにおける負のピークは反応物を、正のピークは生成物を示している。光照射による差スペクトル (Fig. 4-4 B (d)) では、13.5 ppm の 13-*trans* 配座を持つ基底状態 (G 状態) の信号が減少し、22.1 ppm、22.9 ppm の 13-*cis* 配座を示す M 中間体 (M1, M2) および 23.9 ppm で同じく 13-*cis* 配座の N' 中間体の信号が増加した。さらに、光照射下では 13-*trans* 配座である 16.1 ppm の信号の増加も観測された。この 16.1 ppm の信号は 13-*trans* 配座を示す信号ではあるが、G 状態 (13.5 ppm) とは異なる化学シフト値であった。それ故、この信号を O 中間体であると帰属した。N' 中間体の帰属に関しては後述する。

これまでに、先行研究において -20°C で green light 照射下では G 状態から 3 種類の M 中間体 (M1, M2, M3) への光反応過程が報告されている [11]。本研究

においては、 -40°C において ^{13}C -*cis* 配座を示す信号 (22.9, 22.1 ppm) を、M1 および M2 と帰属した。加えて、 N^{\prime} -中間体 (23.9 ppm) の存在を新たに明らかにし、 ^{13}C -*trans* 配座の信号 (16.1 ppm) を O-中間体であると決定した。これら光中間体の化学シフト値を Table 1 にまとめた。

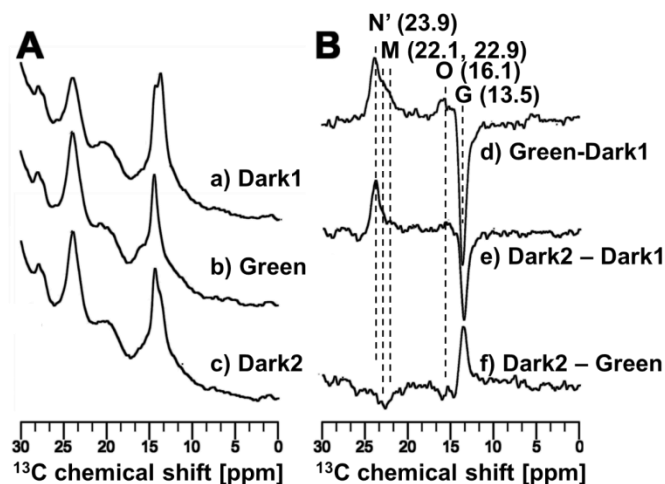


Fig. 4-5 [$^{20}\text{-}^{13}\text{C}$]標識 retinal-ppR/ pHtrII の ^{13}C CP-MAS スペクトル。(A) スペクトルは -40°C 、積算 40000 回、MAS 4kHz、表示範囲 0–30 ppm のスペクトル範囲である。(a) 最初の暗状態における NMR スペクトル (Dark1) (b) 緑色光照射下での NMR スペクトル (Green) (c) 最後の暗状態における NMR スペクトル。(B) ^{13}C CP-MAS 差スペクトル、(d) Green-Dark1、(e) Dark2-Dark1 (f) Dark2-Green。

Table 1. NMR 実験によって得られた光中間体の化学シフト値

		chemical shift [ppm]		Configuration
		$^{20}\text{-}^{13}\text{C}$	$^{14}\text{-}^{13}\text{C}$	
<i>ppR/pHtrII</i> (-40°C)	G-state	13.5		$^{13}\text{-trans}$, $^{15}\text{-anti}$
	O-intermediate	16.1		$^{13}\text{-trans}$
	M-intermediate	22.1, 22.9		$^{13}\text{-cis}$, $^{15}\text{-anti}$
	N^{\prime} -intermediate	23.9		$^{13}\text{-cis}$
<i>ppR</i> (-40°C)	G-state	13.5	121.7	$^{13}\text{-trans}$, $^{15}\text{-anti}$
	M-intermediate	22.3	126.8	$^{13}\text{-cis}$, $^{15}\text{-anti}$
<i>ppR</i> (-60°C)	G-state	13.6	121.6	$^{13}\text{-trans}$, $^{15}\text{-anti}$
	O-intermediate	16.4	115.4	$^{13}\text{-trans}$
	M-intermediate	22.6	127.1	$^{13}\text{-cis}$, $^{15}\text{-anti}$
	N^{\prime} -intermediate	23.9	115.4	$^{13}\text{-cis}$

4-3-2 光中間体の緑色光照射状態 (Green) から暗状態 (Dark2) への熱緩和過程

緑色光照射下において捕捉された光中間体は熱緩和過程によって続く暗状態 (Dark2) に変化する。Fig. 4-4 A(c) において *ppR/pHtrII* 複合体の緑色光照射後に光を切りおよそ 1 日経過したときの ^{13}C CP-MAS NMR スペクトルを示した。Fig. 4-4 B(e) では最初の暗状態 (Dark1) と最終の暗状態 (Dark2) の間の差スペクトルである。この差スペクトルにおいて、22.1 および 22.9 ppm の信号 (M 中間体) が減少しているが、23.9 ppm の信号 (N' 中間体) は残ったままである。Fig. 4-4 B(f) で示した差スペクトルは最終の暗状態 (Dark2) から緑色光照射状態 (Green) を引くことによって得られた。この差スペクトルからは M 中間体を示す 22.1, 22.9 ppm の信号、O 中間体を示す 16.1 ppm の信号の減少と、それに伴う G 状態の信号の増加が観測された。これらの結果から 23.9 ppm の信号は M 中間体由来のものではなく熱緩和の寿命が M 中間体とは大きく異なる N' 中間体由来のものであることを示唆している。また、この結果を受けて N' 中間体の G 状態への緩和は M 中間体や O 中間体に比べて極めて長いことが示された。

4-3-3 M 中間体の UV light 照射による O 中間体への光反応過程

Green light による光定常状態で十分に M 中間体を捕捉した後、光源を UV light (365 nm) に切り替え、その変化を観測した。M 中間体はシッフ塩基が脱プロトン化状態にあるため極大吸収波は 390 nm である。よって、M 中間体は積極的に 365 nm の UV light の光を吸収し、選択的に減衰することが予測できる。一方先行研究においては、azide を用いて M 中間体の緩和速度を速め、N 様中間体の捕捉がなされており、その極大吸収波長は 500 nm であり、構造は 13-*cis* 配座であることが示されている[17]。本研究においては、この N 様中間体の存在を確かめるべく、初期の暗状態 (Dark1) に対して緑色光照射を行い (Green)、十分に M 中間体を捕捉した後、光源を 365 nm の紫外光に切り替えて測定を行った。緑色光照射下においては G 状態の減少と M-, O-, N' 中間体の増加が観測された (Fig. 4-6 A (a))。その後、365 nm の紫外光照射によって、M 中間体は速やかに減衰し、O 中間体を示す 16.1 ppm の信号の増加が確認された (Fig. 4-6 A (b) (c))。この結果は M 中間体から O 中間体への変換が 365 nm の光照射によって促進される光反応経路が存在していることを示している。しかしながら、Green light 照射によって生じていた 23.9 ppm の信号は UV light によって大幅には減少せず NMR 測定時間では残ったままであった。よって、23.9 ppm の 13-*cis* 配座を持つ中間体は M 中間体とは異なり、シッフ塩基がプロトン化した状態にある中間体である

と判断した。そこで、この 23.9 ppm の化学シフト値によって示される中間体を N' 中間体と帰属した。前節で述べたとおり、この N' 中間体は Green light 照射下の後の熱緩和過程でも著しい減衰は認められなかった (Fig. 4-5 B (e))。すなわち、N' 中間体はこの温度では十分に熱緩和ができない程度、寿命が長いことが考えられる。また、この N' 中間体の熱緩和による減衰は、O 中間体と同時に観測された (Fig. 4-6 B (e) (f))。このことは O 中間体と N' 中間体が熱平衡状態にあることを示唆する結果である。Blue light 照射時には M 中間体が O 中間体へ積極的に変換する光反応経路があることは先に述べたが、Blue light を照射している光定常状態では、O 中間体が豊富に存在していた (Fig. 4-6 B (d))。このようにして O 中間体を十分に捕捉した後、暗状態に戻したところ (Fig. 4-6 B (e))、O 中間体から N' 中間体への熱的な構造変換が観測された (Fig. 4-6 B (f))。すなわち、O 中間体と N' 中間体の間は N' 中間体に偏った平衡状態にあることを示唆している。

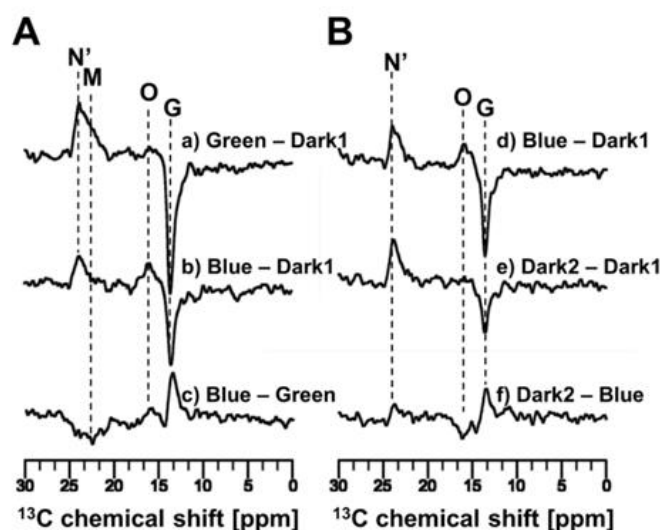


Fig. 4-6 [20-¹³C]標識 retinal-ppR/ pHtrII の ¹³C CP-MAS 差スペクトル。

A; (a)Green - Dark1, (b)Blue - Dark1, (c) Blue-Green.

B; (d)Green - Dark1, (e)Dark2 - Dark1, (f)Dark2-Green.

C; (g)Blue - Dark1, (e)Dark2 (after blue light irradiation) - Dark1, (f) Dark2(after blue light irradiation) -Blue.

各スペクトルは-40 °C、積算 40000 回、0-30 ppm のスペクトル範囲である。

4-4 ppR に関する光照射固体 NMR 測定

続いて、以上で得られた N' 中間体および O 中間体の詳細構造とその光反応経路を明らかにすることを目的として、[14, 20-¹³C]-retinal-ppR を、光照射固体 NMR を用いて測定した。先に述べたとおりレチナール 14 位の炭素原子は特に 15C=N₂ の *syn/anti* 構造変化に鋭敏に反応して、その化学シフト値が変化する部位である。測定温度は-40°C あるいは-60°C で CP-MAS 法を用いて行った。また MAS 速度は 4 kHz で光照射の光源は 520 nm と 365 nm の LED 光源を用いた。

4-4-1 -40°C における ppR の光反応過程

まず ppR/pHtrII 複合体との比較のため、ppR 単体に関して ppR/pHtrII 複合体と同一の-40°C での測定を行った。ppR 単体においては Green light (520 nm) 照射下では、13-*trans* 配座である G 状態 (13.5 ppm) が減衰し、13-*cis* 配座を持つ M 中間体 (22.3 ppm) のみが増加した (Fig. 4-7 A)。また、Green light 照射後に光を切り、再び暗状態に戻したところ M 中間体 (22.3 ppm) の信号は急速に減衰し、G 状態 (13.5 ppm) の信号が復活した (Fig. 4-7 B)。これは、ppR 単体においては ppR/pHtrII 複合体に比べて運動性が高く、M 中間体以降の後期中間体の寿命が短くなったために、定常的に捕捉されていないことを意味する結果であった。

さらに、同一スペクトルにおける 100-150 ppm の範囲を Fig. 4-7 C, D に示した。繰り返しになるが、レチナール 14 位の ¹³C はその 15-*syn/anti* 構造に敏感である。光照射下における ¹³C CP-MAS NMR スペクトルおよび初期の暗状態である Dark1 状態との差スペクトルから、光照射下においては顕著に 126.8 ppm の信号が増加する結果を得た。上述したとおり 20 位の ¹³C の NMR 信号を示した Fig. 4-7 A, B のスペクトルでは、ppR 単体では-40°C において光照射による産物は唯一 M 中間体であった。すなわち、光照射によって生じた 126.8 ppm の信号は M 中間体に属する信号であることが示された。詳細に関しては後述する。

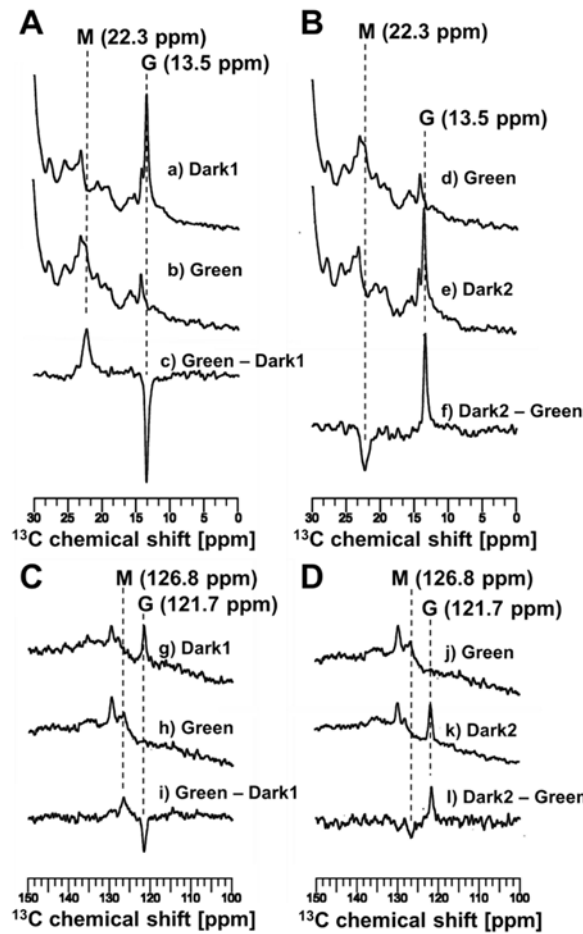


Fig. 4-7 (A, B) $[20-^{13}\text{C}]$ 標識 retinal-ppR の ^{13}C CP-MAS スペクトルおよび差スペクトル、 -40°C 、スペクトル範囲 0–50 ppm : (a)初期の暗状態 (Dark1) , (b)Green light 照射下 (Light) (c) Light-Dark の差スペクトル, (d)Green light 照射下 (Light) , (e) 光照射後の Dark 状態 (Dark2) , (f) Dark2-Green.

(C,D) $[20-^{13}\text{C}]$ 標識 retinal-ppR の ^{13}C CP-MAS スペクトルおよび差スペクトル、 -40°C 、スペクトル範囲 100–150 ppm : (g)初期の暗状態 (Dark1) , (h)Green light 照射下 (Light) , (i) Light-Dark の差スペクトル, (j)Green light 照射下 (Light) , (k) 光照射後の Dark 状態 (Dark2) , (l) Dark2-Green.

4-4-2 -60°C における ppR の光照射固体 NMR 測定の結果

温度を下げ ppR の運動性を下げることで、M 中間体以降の後期中間体が定常捕捉できることを確かめるため、 -60°C での測定を行った。初めに暗状態 (Dark 1) 状態で測定を行い、次いで 520 nm の Green light 照射下での光照射固体 NMR 測定を行った。その後、光源を 365 nm の UV light に変え O 中間体の捕捉を試みた。最後に UV light 照射下の定常状態からの熱緩和過程を観測するために再度、

暗状態 (Dark 2) での測定を行った。暗状態から Green light 照射を行うと、13-*trans* 配座を持つ G 状態 (13.6 ppm) が 13-*trans* 配座の O 中間体 (16.4 ppm) と 13-*cis* 配座である M 中間体 (22.6 ppm) と N' 中間体 (23.9 ppm) へと変化した (Fig. 4-8 A(a))。ここにおいて、これら中間体は-40 °C における ppR/pHtrII 複合体と同一のものとなり、各中間体の光定常捕捉に成功した。続いて M 中間体の UV light による反応を観測するために、365 nm の光照射下での測定を行ったところ M 中間体を示す信号の減少と同時に O 中間体を示す信号の増加が同時に観測された (Fig. 4-8 A(b))。このことは、ppR 単体においても ppR/pHtrII 複合体の時と同様に 365 nm の UV light 照射によって M→(hν)→O 中間体の光反応経路が存在することを示している。このように十分に効率の良い光照射下において、タンパク質の運動性を温度可変により適当に制御することで O 中間体が選択的に捕捉可能であることが判明した。次に、O 中間体の熱緩和過程を明らかにするために光を切って Dark 状態にしたところ、O 中間体を示す信号は N' 中間体と G 状態を示す信号へと変化した (Fig. 4-8 B(e) (f))。このスペクトル (Fig. 4-8(f)) では同時に O 中間体の一部は熱緩和によって G 状態へと戻ったことが示されているが、N' 中間体の増加が認められたことから、O 中間体から熱緩和での N' 中間体への経路が存在することを示している。

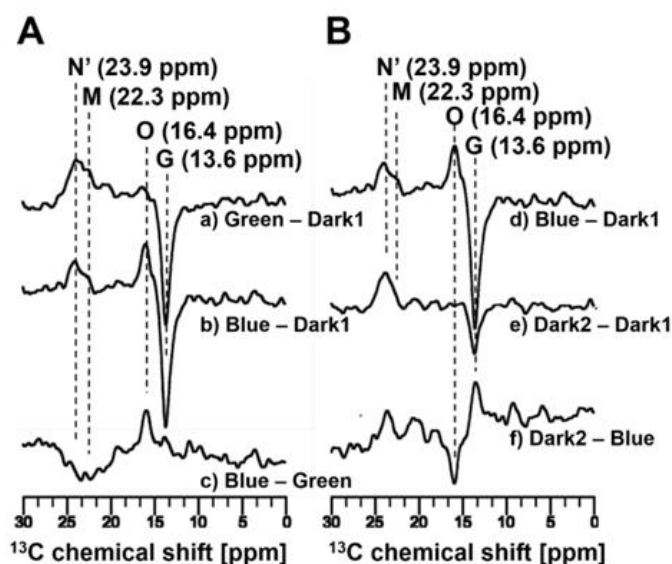


Fig. 4-8 [20-¹³C]標識 retinal-ppR の ¹³C CP-MAS 差スペクトル. -60 °C, スペクトル範囲 0–50 ppm. A ; (a)Green-Dark1, (b)Blue-Dark1, (c)Blue-Green, B ; (d)Blue-Dark1, (e)Dark2-Dark1, (f)Dark2-Blue.

4-4-3 ppR の光中間体における [14-¹³C] retinal の ¹³C 化学シフト値

[14-¹³C] retinal-ppR の ¹³C CP-MAS NMR 測定を行うことによって O- と N'-intermediate の配座決定をおこなった。レチナールの 14 位の炭素原子の化学シフト値は 15-*syn/anti* の配座変化に鋭敏に対応し、その化学シフト値が変化する。Fig. 4-7 に示したスペクトルは Fig. 4-6 で示したスペクトルと同一の実験における 100.0 ppm から 150.0 ppm に相当する領域を示したものである。-60°C において、暗状態 (Dark1) から緑色光照射下 (Green) に対応して、126.1 ppm の *all-trans* すなわち 15-*anti* 配座の G 状態を示す信号が減少し、127.1 ppm の M 中間体の信号が増加した (Fig. 4-7 A(a))。緑色光照射に続いて、紫外光照射を行うと 115.4 ppm の信号が増加した。[20-¹³C] retinal に関しては、紫外光照射下においては O 中間体が豊富に定常捕捉されることは既に上述した。すなわち、差スペクトル (Fig. 4-7 A(b)) における主たる正のピークは O 中間体であると帰属され、その [14-¹³C] retinal の化学シフト値は 115.4 ppm であると決定した。上述したとおり、M 中間体は UV light 照射によって O 中間体に変換する。よって Fig. 4-7 A(c) の差スペクトルからも確かに 115.4 ppm の信号は O 中間体であることが示された。

Fig. 4-7 B(e) に示した差スペクトルは 115.4 ppm の信号は O 中間体であると同時に N' 中間体由来のものであることを示している。Fig. 4-6 (b,e) で示したように N' 中間体は -60 °C で極めて長い寿命を持つことが示されている。さらに、O 中間体の熱緩和過程は Fig. 4-7 B(f) によっても示された。

以上の光中間体の化学シフト値及びその配座に関する結果を Table. 4-1 にまとめた。M 中間体は SrSRI(第 3 章参考) [18]、野生株バクテリオロドプシン(wt-BR) [19] やバクテリオロドプシン Y185F 変異体(Y185F-BR) [13] との比較から、明らかに 13-*cis*,15-*anti* 配座である。また、M 中間体は blue light 照射によって速やかに減衰した結果から、そのシッフ塩基は脱プロトン状態にあることが示唆された。

同様の比較をすることで、レチナールの 13C=14C 配座に関しては O 中間体、N' 中間体はそれぞれ 13-*tran* 配座、13-*cis* 配座であることを示している。一方、15C=Nζ の配座に関しては、115.4 ppm という化学シフト値が 15-*syn/anti* が決定できない境界領域であり、その配座決定はより挑戦的な課題である。例えば F Y185F-bR における CS* と呼ばれる光中間体は [14-¹³C] retinal の 115.3 ppm である化学シフト値を 15-*syn* に帰属されている [13]。一方、wt-bR の N 中間体に関しては [14-¹³C] retinal の化学シフト値 115.2 ppm が 15-*anti* 配座であると帰属されている [20]。よって、以下では ppR の O 中間体、N' 中間体の詳細な配座を決定するべく、DFT 計算を行って議論をした。

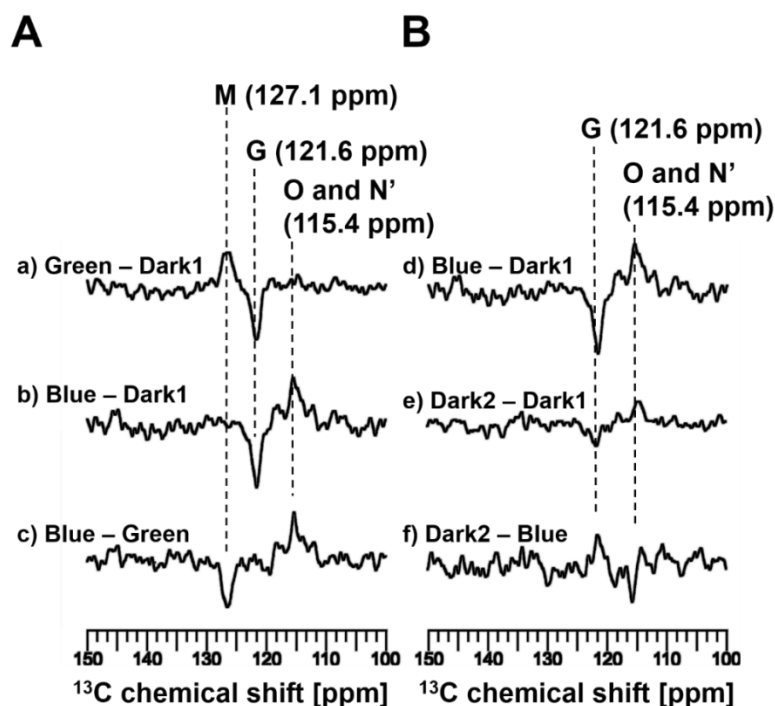


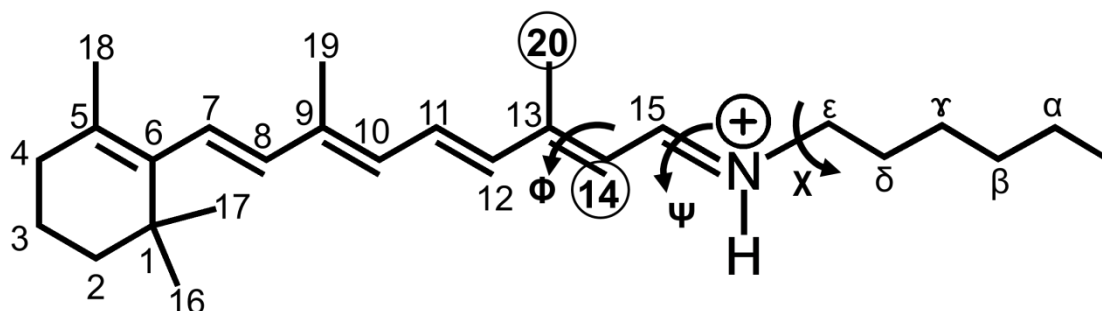
Fig.4-8 [$^{14}\text{-}^{13}\text{C}$] 標識 retinal-ppR の ^{13}C CP-MAS 差スペクトル. -60°C , スペクトル範囲 100–150 ppm、A ; (a)Green-Dark 1, (b)Blue-Dark1, (c)Blue-Green, B ; (d)Blue-Dark1, (e)Dark2-Dark1, (f)Dark2-Blue.

Table 4-1 実験による ppR のレチナールの ^{13}C NMR 化学シフト値 [ppm]

		chemical shift [ppm]		Configuration
		$20\text{-}^{13}\text{C}$	$14\text{-}^{13}\text{C}$	
ppR/pHtrII(-40°C)	G-state	13.5		13- <i>trans</i> , 15- <i>anti</i>
	O-intermediate	16.1		13- <i>trans</i>
	M-intermediate	22.1, 22.9		13- <i>cis</i> , 15- <i>anti</i>
	N ³ -intermediate	23.9		13- <i>cis</i>
ppR (-40°C)	G-state	13.5	121.7	13- <i>trans</i> , 15- <i>anti</i>
	M-intermediate	22.3	126.8	13- <i>cis</i> , 15- <i>anti</i>
ppR(-60°C)	G-state	13.6	121.6	13- <i>trans</i> , 15- <i>anti</i>
	O-intermediate	16.4	115.4	13- <i>trans</i>
	M-intermediate	22.6	127.1	13- <i>cis</i> , 15- <i>anti</i>
	N ³ -intermediate	23.9	115.4	13- <i>cis</i>

4-5-1 レチナールのねじれに対する化学シフト値の DFT 計算

^{13}C 化学シフト値は Gaussian 09 プログラム[21] を用い B3LYP/6-311+g**の theory/basis set の GIAO(Gauge-Independent Atomic Orbital)法[22–26] によって DFT 計算を行った。得られた化学シフト値は TMS 基準で、ppm 単位で表した。化学シフト値計算に用いたレチナールの構造は Scheme 1 に示した。ここで、レチナールは Lys205 の側鎖とシッフ塩基結合を介して結合した状態にある。また、シッフ塩基はプロトン化している。初期構造は G 状態に相当する結晶構造 (PDB ID:1jgj [27]) の all-*trans* 配座を用いた。本研究においては、O 中間体、N' 中間体の配座を決定することを目的として、 $12\text{C}-13\text{C}=14\text{C}-15\text{C}$, $14\text{C}-15\text{C}=\text{N}\zeta-\text{C}\epsilon$, および $15\text{C}=\text{N}\zeta-\text{C}\epsilon-\text{C}\delta$ の二面角 (各々を Φ, Ψ, X と定義した) のねじれと ^{13}C 化学シフト値の依存性を計算した。シフト値計算に際して、各々のねじれに対する重原子の構造は固定し、水素原子のみを上述した theory/basis set において構造最適化した。



Scheme 1 レチナールの構造。レチナールはシッフ塩基を介して Lys205 と共有結合している。 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ で表された炭素原子はそれぞれ ppR の Lys205 の炭素原子である。○で囲った炭素原子は ^{13}C CP-MAS NMR によって観測された炭素原子である。 Φ, Ψ, X で表した二面角は各々 $12\text{C}-13\text{C}=14\text{C}-15\text{C}$, $14\text{C}-15\text{C}=\text{N}\zeta-\text{C}\epsilon$, $15\text{C}=\text{N}\zeta-\text{C}\epsilon-\text{C}\delta$ に対して定義した。

4-5-2 O および N' 中間体に対するレチナールの二面角 Φ の決定

O 中間体、N' 中間体の配座を決定するために、レチナールの配座と ^{13}C NMR 化学シフト値の関係性を DFT 計算によって求めた。G 状態に相当する初期配座は結晶構造(PDB ID:1jgj [27])を用い、その二面角は $\Phi=-177^\circ$, $\Psi=-175^\circ$, $X=-66^\circ$ であった。この初期配座に対する化学シフト値は、 $20\text{-}^{13}\text{C}$ および $14\text{-}^{13}\text{C}$ に対して、それぞれ 17.5 ppm, 128.1 ppm と計算された。これらの計算結果は Table 2 に

まとめた。Touw らによる先行研究の結果[28]では *all-trans-retinal* に対する $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ の化学シフト値の計算結果は 18.0 ppm であり、本研究で得られた結果と酷似していた。しかしながら、これらの本研究で得られた計算結果は、実験値である 13.6 ppm および 121.6 ppm と幾ばくかの差異を含んでおり、計算結果の方が実験結果に対して $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$, $^{14}\text{-}^{13}\text{C}$ の化学シフト値がそれぞれ 3.9 ppm, 6.5 ppm だけ大きく見積もられていた。Touw らも同様の傾向を示した報告を行っている[28]。よって、以下では $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$, $^{14}\text{-}^{13}\text{C}$ の化学シフト値は実験値に対して、それぞれ 3.9 ppm, 6.5 ppm だけ加えた値を用いて議論を行った。

レチナールの $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ の化学シフト値に対する二面角 Φ 、 Ψ の依存性は Fig. 4-8 に示した結果となった。二面角 Φ のねじれに対して、レチナールの $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ 化学シフト値は大きな変化を示したが (Fig. 4-8 (A))、二面角 Ψ のねじれに関してはレチナールの $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ 化学シフト値は大きな変化は示さず (Fig. 4-8 (B))、 $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ 化学シフト値は二面角 Φ に依存的であることが計算によって判明した。これらの結果は、レチナールの $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ 化学シフト値は二面角 Φ の決定に有用であることを示している。実験におけるレチナールの $^{20}\text{-}^{13}\text{C}$ 化学シフト値は O 中間体、N' 中間体においてそれぞれ、16.4 ppm, 23.9 ppm であった (Table 4-1)。先に述べたように、これらの値は計算において議論する場合には、それぞれ 20.3 ppm, 27.8 ppm に補正された。各々の化学シフト値は Fig. 4-8(A) に示した二面角 Φ と相関があった。結果として、O 中間体の二面角 Φ は -150° 、N' 中間体の二面角 Φ は -63° であると決定した。以上の結果は、Table 4-2 にまとめた。

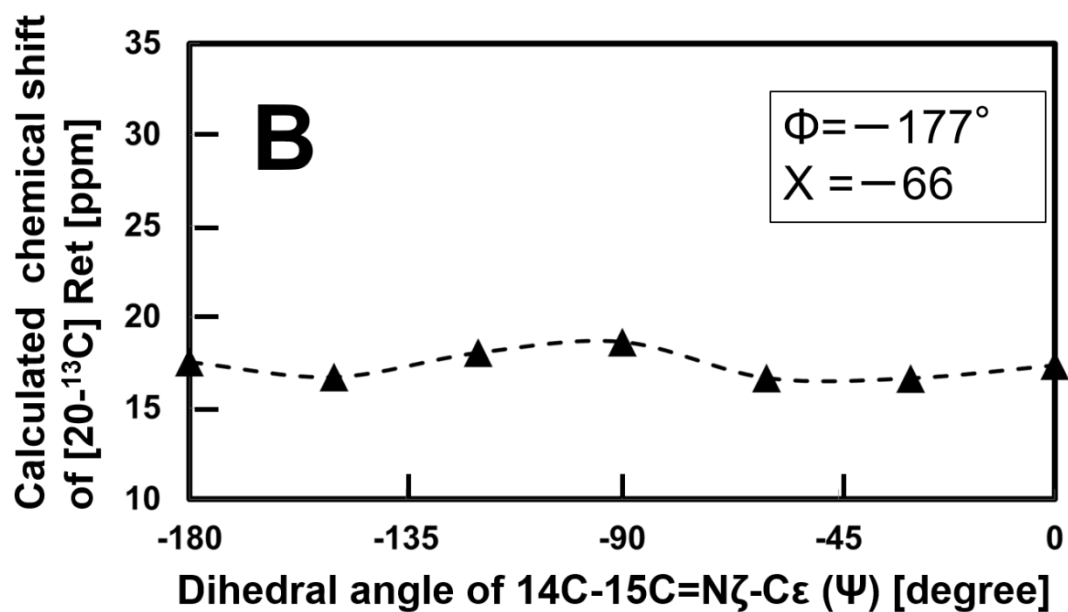
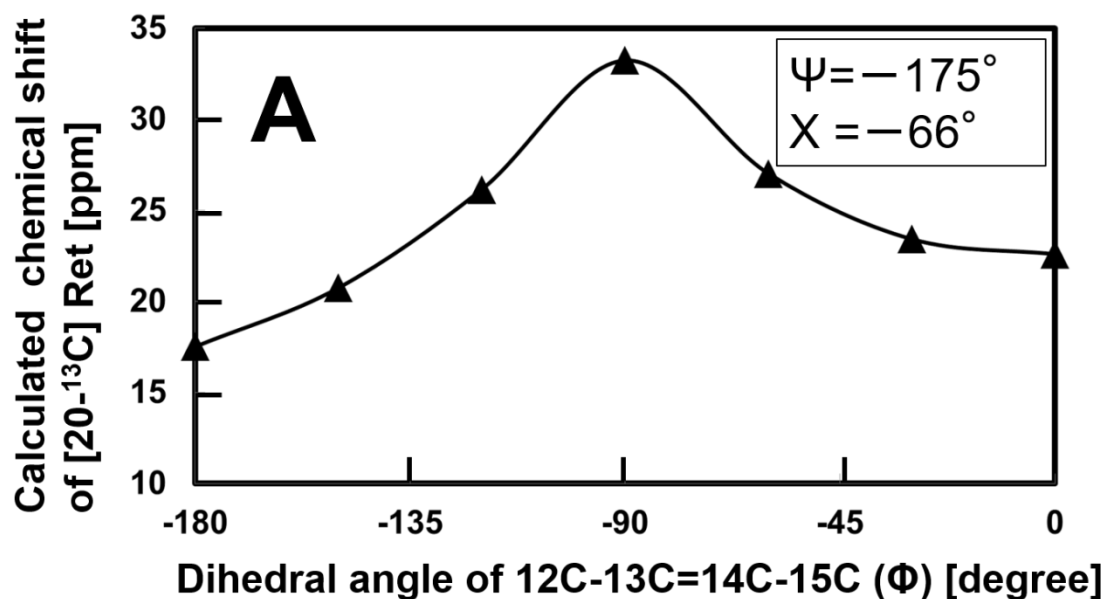


Fig. 4-9 レチナールの $20\text{-}^{13}\text{C}$ 化学シフト値に関する二面角 Φ 、 Ψ の依存性。(A) 二面角 Φ のみを *trans* (-180°)から *cis* (0°)まで変化させた場合の $[20\text{-}^{13}\text{C}]$ retinal 化学シフト値変化。ただし、 Ψ および X はそれぞれ -175° と -66° に固定した。(B) 二面角 Ψ のみを *anti* (-180°)から *syn* (0°)まで変化させた場合の $[20\text{-}^{13}\text{C}]$ retinal 化学シフト値変化。ただし、 Φ および X はそれぞれ -177° と -66° に固定した。

Table 4-2 中間体の二面角 Φ, Ψ, χ と DFT 計算による化学シフト値

	Chemical shift [ppm]		Dihedral angle [degree]			Configuration
	20- ¹³ C	14- ¹³ C	Φ	Ψ	χ	
G-state	17.5	128.1	-177 ^a	-175 ^a	-66 ^a	13- <i>trans</i> , 15- <i>anti</i>
O-intermediate	20.3	121.9	-150	0	-180	13- <i>trans</i> , 15- <i>syn</i>
N ⁷ -intermediate	27.8	121.9	-63	-175	-180	13- <i>cis</i> , 15- <i>anti</i>
				-7	-180	13- <i>cis</i> , 15- <i>syn</i>
				-175	-66 ^a	13- <i>cis</i> , 15- <i>anti</i>

^a) PDB ID:1JGJ [27]

4-5-3 O 中間体の二面角 Ψ の決定

O 中間体における二面角 Φ の値は -150° と見積もった。次いで、O 中間体に関する二面角 Ψ を決定するために、二面角 Ψ の変化に対応するレチナールの 14-¹³C 化学シフト値の依存性を計算した。これらの計算はまず、 Φ を -150° 、 χ を -66° に固定して行った。その結果は Fig. 4-10 (破線) に示したようになり、15-*syn* 配座は 15-*anti* 配座に比べて大きな値を示した。しかしながら、先行研究の実験結果ではその傾向はむしろ逆である。例えば、bR におけるレチナール 14-¹³C の化学シフト値は 15-*anti* では 122.0 ppm であり、15-*syn* では 110.5 ppm である。このように、*syn* 状態は *anti* 状態に対して、高磁場方向の化学シフト値を示していなければならない。

そこで、上記の問題を解消するために、二面角 χ の値を -180° にして計算を行った。二面角 χ が -180° (*trans*) である時、レチナール 14-¹³C のプロトンは Lys 側鎖の ϵ 位のプロトンと相互作用ができ、 γ -効果を受けうる[29]。この結果は Fig. 4-9 においても現れている。レチナール 14-¹³C の化学シフト値は *syn* 構造 ($\Psi=0^\circ$) のほうが *anti* 構造 ($\Psi=-180^\circ$) に対して -4.0 ppm だけ変化する結果となった (Fig. 4-9 (実線))。O 中間体の配座はこの化学シフト値の変化の結果から見積もることが可能である。実験における O 中間体のレチナール 14-¹³C の化学シフト値は 115.4 ppm であったので、上述した補正により 121.9 ppm を計算結果に当てはめた。その結果、O 中間体の二面角 Ψ は 0° であると決定された。すなわち、O 中

間体の配座は Table 2 にまとめたように二面角 $\Phi = -150^\circ$ であり、二面角 $\Psi = 0^\circ$ であった。これらの結果から、O 中間体は 13-*trans*,15-*syn* 配座であることが示唆された。

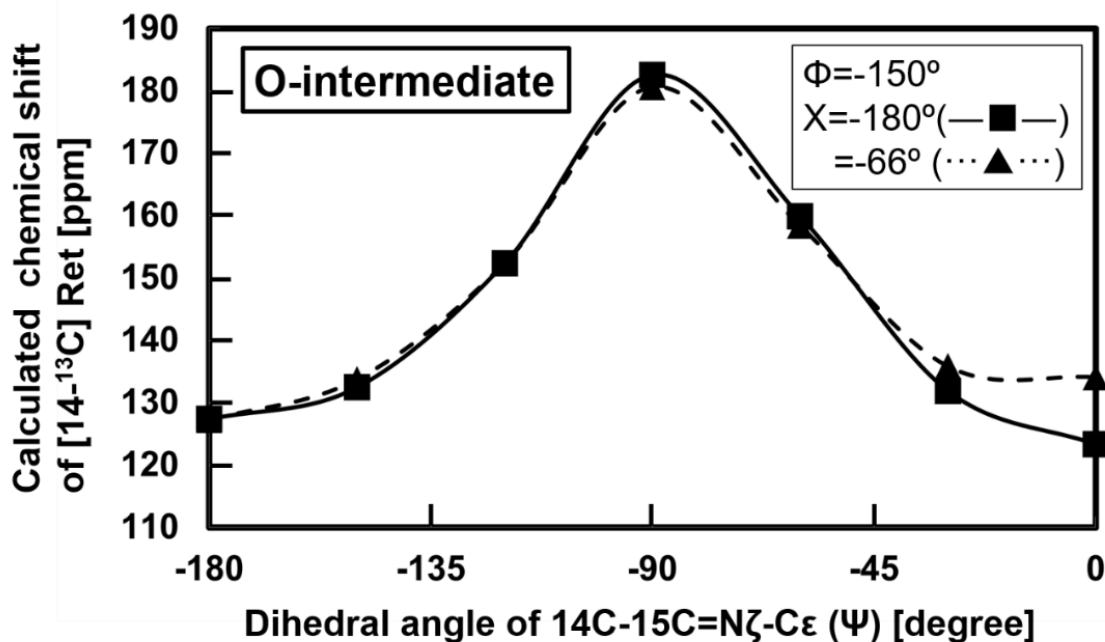


Fig. 4-10 二面角 Ψ の変化に対するレチナール $14-^{13}\text{C}$ の化学シフト値変化。二面角 Φ は Fig. 4-8 で決定した O 中間体の -150° に固定された。二面角 X は結晶構造の -66° (\blacktriangle) および *trans* 配座の -180° (\blacksquare) で計算を行った。

4-5-4 N' 中間体の二面角 Ψ の決定

前節と同様にして、N' 中間体に関して二面角 Ψ を決定した。N' 中間体の配座を決定するために、二面角 Ψ とレチナールの $14-^{13}\text{C}$ 化学シフト値の関係性について DFT を用いて計算し、その結果を Fig. 4-11 に示した。Fig. 4-9 (A) で、N' 中間体の二面角 Φ は -63° と見積もられたので、 $\Phi = -63^\circ$ に固定をした。また、二面角 X に関しては 2 つの固定した値を使用した。1 つは結晶構造に由来する -66° であり、もう一つは *trans* 構造である -180° とした。各々の計算結果は Fig. 4-11 に示した。得られた化学シフト値と二面角 Ψ の関係を用いて N' 中間体の構造を考察した。実験における N' 中間体のレチナール $14-^{13}\text{C}$ の化学シフト値は 115.4 ppm であったので、上述した補正により 121.9 ppm を計算結果に適用した。その

結果、Fig. 4-11 において3つの Ψ の結果を得ることができた。二面角 Ψ および X は次の3つが示唆された。すなわち、($\Psi = -175^\circ, X = -66^\circ$), ($\Psi = -175^\circ, X = -180^\circ$), および ($\Psi = -17^\circ, X = -180^\circ$)の3つである。以上のようにN'中間体の二面角 Φ に関しては $\Phi = -63^\circ$ ではあるが、二面角 Ψ および X については3つの構造の可能性が示唆される結果となった。少なくともN'中間体は13-*cis*配座であることが解明された。

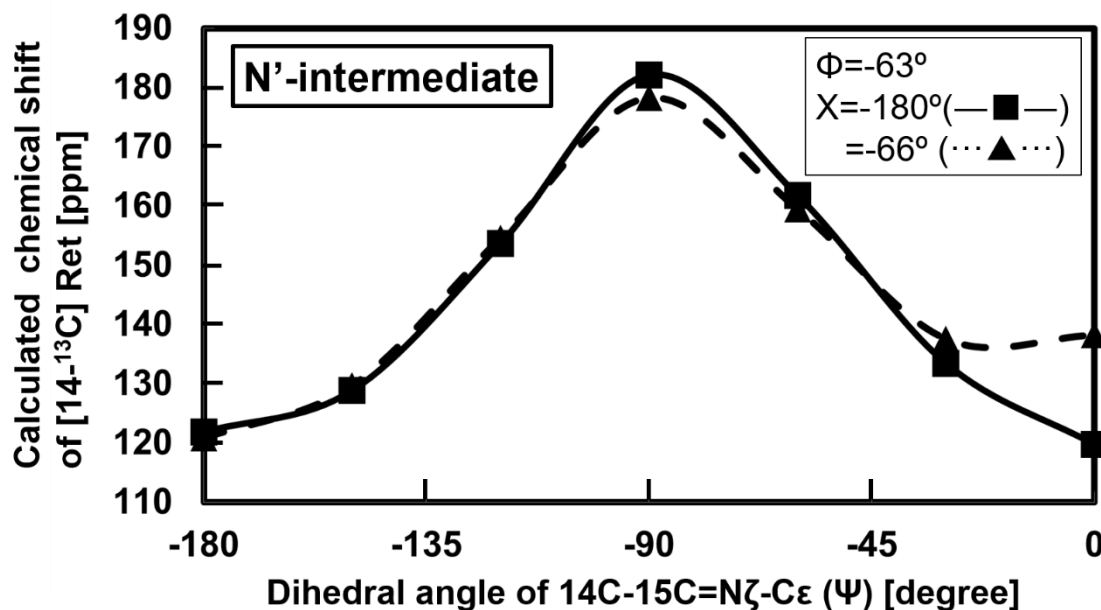


Fig. 4-11 二面角 Ψ の変化に対するレチナール $14-^{13}\text{C}$ の化学シフト値変化。二面角 Φ はFig. 4-8で決定したN'中間体の -66° に固定された。二面角 X は結晶構造の -66° (\blacktriangle)および*trans*配座の -180° (\blacksquare)で計算を行った。

4-6 ppR のフォトサイクルと後期中間体の構造

以上の結果より、ppRのフォトサイクルにおいて、光照射固体NMRを用いることで、新たにO中間体とN'中間体の定常捕捉に成功し、その配座を決定した。また、これまで考えられていなかったM中間体からUV lightでO中間体へと促進される反応経路を明らかにした (Fig. 4-12)。

DFT計算を併用することでO中間体は13-*trans*,15-*anti*配座、N'中間体は13-*cis*配座であり、その両者は偏った平衡状態にある。N'中間体はO中間体に対するプールのような存在であると考えられ、後期中間体を長寿命化させることで信号伝達に関わる増幅機構の一端を担っていると考えられた。

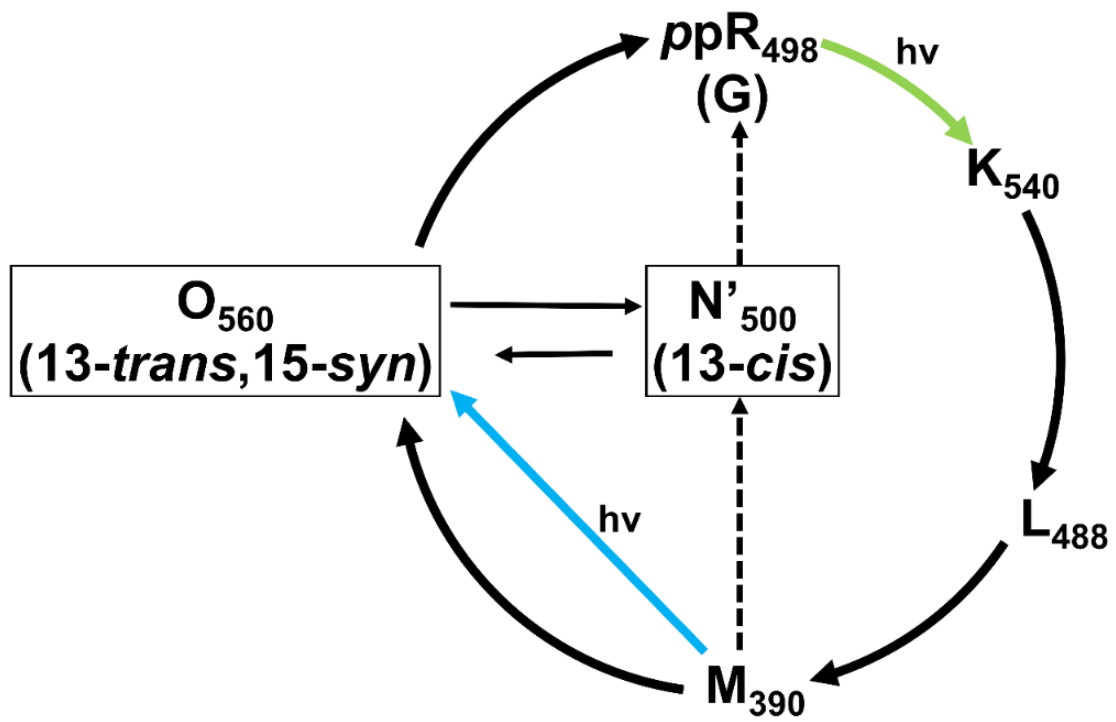


Fig. 4-12 N'中間体を含めた ppR のフォトサイクル。N'中間体と O 中間体は偏った平衡にある。M 中間体は紫外光の照射により O 中間体へと変化し、その反応経路は青色の矢印にて示した。

Reference

- [1] D. Suzuki, H. Irieda, M. Homma, I. Kawagishi, Y. Sudo, *Sensors* 2010, **10**, 4010–4039.
- [2] K. Inoue, T. Tsukamoto, Y. Sudo, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2014, **1837**, 562–577.
- [3] O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, S. B. Leonid, H. Kandori, *Chem. Rev.* 2014, 1–7.
- [4] J. L. Spudich, Hh. Luecke, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002, **12**, 540–546.
- [5] E. G. Govorunova, O. A. Sineshchekov, H. Li, J. L. Spudich, *Annu Rev Biochem* 2017, **86**, 845–872.
- [6] W. D. Hoff, K.-H. Jung, J. L. Spudich, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1997, **26**, 223–258.
- [7] Y. Sudo, M. Iwamoto, K. Shimono, N. Kamo, *Photochem Photobiol* 2001, **74**, 489–494.
- [8] R. Seidel, B. Scharf, M. Gautel, K. Kleine, D. Oesterhelt, M. Engelhard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, **92**, 3036–3040.
- [9] N. Kamo, K. Shimono, M. Iwamoto, Y. Sudo, *Biochem.* 2001, **66**, 1277–1282.
- [10] Y. Imamoto, Y. Shichida, J. Hirayama, H. Tomioka, N. Kamo, T. Yoshizawa, *Biochemistry* 1992, **31**, 2523–2528.
- [11] Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Nishio, K. Ohsawa, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, N. Kamo, A. Ramamoorthy, et al., *Biophys. J.* 2011, **101**, L50–L52.
- [12] J. G. Hu, B. Q. Sun, M. Bizounok, M. E. Hatcher, J. C. Lansing, J. Raap, P. J. E. Verdegem, J. Lugtenburg, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Biochemistry* 1998, **37**, 8088–8096.
- [13] K. Oshima, A. Shigeta, Y. Makino, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa, A. Naito, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015, **14**, 1694–1702.
- [14] K. Shimono, M. Iwamoto, M. Sumi, N. Kamo, *FEBS Lett.* 1997, **420**, 54–56.
- [15] Y. Sudo, M. Yamabi, M. Iwamoto, K. Shimono, N. Kamo, *Photochem. Photobiol.* 2003, **78**, 511–6.
- [16] 辻 暁, *Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan*, 2012, **3**, 110–113.
- [17] Y. Tateishi, T. Abe, J. Tamogami, Y. Nakao, T. Kikukawa, N. Kamo, M. Unno, *Biochemistry* 2011, **50**, 2135–2143.

- [18] H. Yomoda, Y. Makino, Y. Tomonaga, T. Hidaka, I. Kawamura, T. Okitsu, A. Wada, Y. Sudo, A. Naito, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, **53**, 6960–6964.
- [19] M. R. Farrar, K. V. Lakshmi, S. O. Smith, R. S. Brown, J. Raap, J. Lugtenburg, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Biophys. J.* 1993, **65**, 310–315.
- [20] K. V. Lakshmi, M. R. Farrar, J. Raap, J. Lugtenburg, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Biochemistry* 1994, **33**, 8853–8857.
- [21] Gaussian 03, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004
- [22] F. London, *J. Phys. Le Radium* 1937, **8**, 397–409.
- [23] R. Ditchfield, *J. Chem. Phys.* 1972, **56**, 5688.
- [24] R. Ditchfield, *Mol. Phys.* 1974, **27**, 789–807.
- [25] K. Woliński, A. J. Sadlej, *Mol. Phys.* 1980, **41**, 1419–1430.
- [26] K. Wolinski, J. F. Hinton, P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, **112**, 8251–8260.
- [27] H. Luecke, B. Schobert, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, J. L. Spudich, *Science*, 2001, **293(5534)**, 1499–1503.
- [28] S. I. E. Touw, H. J. M. De Groot, F. Buda, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2004**, **711**, 141–147.
- [29] G. S. Harbison, S. O. Smith, J. A. Pardoen, C. Winkel, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. Mathies, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1984, **81**, 1706–1709.

第5章 結言

本学位論文の第5章は結言として本研究において得られた結果をまとめる。

本研究で得られた成果は、第一に *in-situ* 光照射固体 NMR を開発、改良しセンサーロードプシンの光中間体の捕捉に成功したことである。光照射固体 NMR 装置の改良点は透明ガラスの先端をスリ状にして試料への光照射効率を格段に向上したことに加えて、波長の異なる光源を光照射固体 NMR 装置に組み込んだことである。改良した光照射固体 NMR を用いることでセンサーロードプシン I の光の波長依存的な光反応経路を明らかにした。すなわち、緑色光照射下では正の走光性の信号伝達機能を担う M 中間体が生じ、近紫外光照射下では負の走光性の信号伝達機能を担う P 中間体が選択的に定常捕捉される。このことは P 中間体が G 状態からの直接光変換で生じることを示唆している。P 中間体が有害な近紫外光からの忌避応答の信号伝達を担う中間体であることを考えると、生物の緊急避難的な走光性を確保していると推測することができる。また、本研究で明らかになった、M 中間体から P 中間体への変換はレチナールの異性化反応ではなくプロトン移動反応である点は興味深い結果である。これはプロトンの輸送方向が走光性の正負を決定する可能性があることを示唆する結果である。

センサーロードプシン II に関しては O 中間体、N' 中間体の光定常捕捉に初めて成功した。特に N' 中間体は既存のセンサーロードプシン II のフォトサイクルでは、これまで提唱されていない中間体である。また、M 中間体からの近紫外光照射による O 中間体への反応経路が存在することを初めて明らかにできたことも重要な結果である。高度好塩菌に共存するセンサーロードプシン I との比較をすれば、毒性の強い近紫外光照射により M 中間体から O 中間体への変換経路が存在することは、細菌が生存するために、熱緩和によって M 中間体から O 中間体に変換する経路に比べてより強い負の走光性の信号伝達が起こる可能性を考えることができる。

O 中間体と N' 中間体の配座は DFT 計算を用いることで 15-*syn/anti* 配座を含めて O 中間体が 13-*trans*,15-*anti* 配座、N' 中間体が 13-*cis* 配座であることが判明した。このような配座を取ることでシッフ塩基はカウンターイオンとより静電相互作用を受けやすくなる。このレチナールタンパク質間相互作用はセンサーロードプシン II の後期中間体の寿命を長くすることで信号伝達機能を向上する要因であると考えられ、興味深い。

以上のように、光が多波長制御可能な光照射固体 NMR はセンサーロードプシンのようなレチナールタンパク質の光の波長依存的、あるいは光の波長選択的な光反応経路の解明に有用な手法であることを明らかにした。さらに、計算化学を用いて化学シフト値を解釈することは単にレチナール配座の決定のみなら

ず、レチナール-タンパク質間相互作用の解明に対しても強力な手法となり得ることを示すことができた。

本研究は、センサリーロドプシンの発色団であるレチナールの光異性化に着目して研究を行った。1章及び3章、4章で述べたとおり、センサリーロドプシンの機能に関わるさらなる重要な知見を得るためには、シッフ塩基のプロトン化・脱プロトン化やレチナール近傍におけるレチナール-タンパク質間作用、さらにセンサリーロドプシンと対となるトランスデューサーとのタンパク質-タンパク質間相互作用などを解明していくことが必要とされる。本研究で示した光照射固体 NMR の技法、および本研究で得られた結果、すなわち各々のセンサリーロドプシンにおける光中間体が温度や照射光の波長によって個別に、あるいは同時にではあっても化学シフトとしては異なって得られる結果は、今後の光受容によるタンパク質のダイナミクスを探求するうえで十分に有益な結果である。レチナールのたった 1 つの（あるいは 2 つの）二面角のねじれが蛋白質の大きな構造変化を引き起こし、数百残基も遠方のリン酸酵素反応を調節しているようなシグナル伝達メカニズムの全容解明を果たすための 1 つの重要なステップが本研究で行われた結果であることを明言して、本稿を括る。

謝辞

本研究は長年にわたって、多くの方々のご教授とご支援を頂いて行われました。特に、長年にわたり、研究のみならず多くの場面で、ご指導を頂いた内藤晶名誉教授、上田一義教授、川村出准教授には格段の感謝を申し上げます。

また、須藤雄気教授(岡山大学)、加茂直樹教授(北海道大学)におかれましては、タンパク質発現に必要なプラスミドを提供して頂き、有益な議論をしていただきました。

固体 NMR 測定に必要な安定同位体標識されたレチナールは和田昭盛教授、沖津貴志先生にご提供を頂きました。この場を借りて深く感謝を申し上げます。

センサリーロードプシン I の研究にあたっては、内藤・川村研究室の友永雄也氏、日高徹郎氏、四方田洋紀氏の貢献が大きくあります。あらためて感謝の意を表します。

本研究は内藤・川村研究室、そして上田研究室のみなさまの励ましとお力添えあって行われてきました。すべての皆様に深く感謝いたします。

また、本研究の一部は JSPS 科研費 JP16J00073 の助成を受けて行われたものです。謝辞を申し上げます。