

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25104006

研究課題名(和文) 分子機能を生み出す柔らかさの時間分解観測とその発現機構解明

研究課題名(英文) Time-resolved Observation and Elucidation of Functionally-important Molecular Flexibility

研究代表者

水谷 泰久(Mizutani, Yasuhisa)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60270469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 85,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は人工の分子では成し得ない高度な機能を有する。したがって、タンパク質を理解することは生命現象の理解のみならず、高度な機能性分子の創成に重要なヒントを与える。タンパク質の機能発現では、複数の機能単位が相互に連動して構造変化することが必須の役割を果たす。そのため、その機構解明には安定構造をもとにした議論のみでは不十分であり、機能する際に起きる構造変化を明らかにすることで理解が進む。本研究課題では、主に時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、機能部位間の連動的な構造変化を可能にするタンパク質の構造変化と、構造変化を駆動する分子内のエネルギーフローを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Proteins can exhibit high functionality which artificial molecules cannot do. Thus, understanding of protein helps us not only to understand life phenomena but also to create highly functional molecules. Because coupling of functional units in structural changes is indispensable for proteins to function, dynamic structure as well as static one of proteins is needed to be elucidated. We revealed structural changes important for allostery and energy flow driving functionally-important motions mainly by using time-resolved resonance Raman spectroscopy.

研究分野：生物物理化学

キーワード：ラマン分光学 アロステリー 時間分解分光学

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能は、分子内に含まれる複数の機能部位が互いに連動的に働くことによって生み出される。例えば光駆動型イオン輸送タンパク質では、光吸収によって発色団が構造変化すると、タンパク質構造に逐次的に変化が起き、この動きによってイオン結合部位の親和性が変わり、イオンがタンパク質内を輸送される。また、ガスセンサータンパク質では、ガス分子がタンパク質に結合すると、結合部位に構造変化が生じ、その変化が触媒部位の構造を変化させ酵素活性の制御がなされる。このような複数の機能部位が連動している性質はアロステリーとよばれるもので、そこではタンパク質の構造変化が本質的に重要な役割を果たす。われわれはこれまでに、時間分解共鳴ラマン分光法を用いてタンパク質ダイナミクスに関する研究を行ってきた。分光システムの新規開発、性能向上および測定技術のノウハウの蓄積により、不安定で少量の試料しか得られない新規タンパク質や変異体タンパク質にも幅広く申請者の手法が適用可能となった。また、機能活性とダイナミクスとを結び付けてタンパク質を理解することは極めて重要であるものの、現在そのような研究例は皆無である。そこで、ダイナミクス観測にとどまらず、機能発現の原理解明および原理解明に基づいた機能性分子設計に向かう準備が整ったと考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、機能発現のトリガーとなる変化からそのキーステップに至る過程において、複数の機能部位に起きる構造変化を多面的に観測し、複数の機能部位間の連動性を明らかにする。次に、明らかになった連動的な構造変化とタンパク質の機能活性の相関を定量的に調べ、どのような構造変化がタンパク質機能を生み出す鍵であるのかを同定する。また、構造変化を駆動する、さまざまなモード間のエネルギーの流れを解明する。機能を生み出す構造変化とその構造変化を生み出すエネルギーの流れを同定することによって、柔らかな分子系が示す、機能を生み出す動きの本質を明らかにする。このような作動原理の解明に基づき、新規機能をもった人工タンパク質の創成を行う。

## 3. 研究の方法

連動的な構造変化によって機能する代表的なタンパク質である、光駆動型イオン輸送タンパク質、ガス分子結合タンパク質を対象に研究を行った。これらのタンパク質が機能する際に起きる構造変化を、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて観測した。構造変化の観測においては、共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして、複数の機能部位に起きる構造変化を多面的に調べた。これらの観測データに基づいて、構造変化の連動性を明らかに

した。また、タンパク質の機能を定量的に評価するために、イオン輸送活性および酵素活性を測定した。構造ダイナミクス計測と活性測定を多数の変異体タンパク質について行い、構造変化と活性の相関を調べた。この相関をもとにして、タンパク質のどのような構造変化が機能を生み出しているのかを明らかにした。またタンパク質の構造変化は、分子エナジेटックスの視点からは活性化障壁を越える運動として理解される。そこで、この運動を駆動する分子内エネルギーフローについて機構解明を行った。これらの研究は、柔らかな分子系解析班 (A01 項目) および創成班 (A03 項目) とともに連携し推進した。

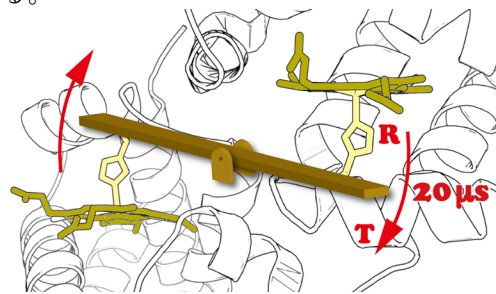
## 4. 研究成果

(1) アロステリック機構を生み出す構造変化の解明

アロステリック機構で機能するタンパク質としてガス分子結合タンパク質および光駆動イオン輸送タンパク質を選び、これらが機能する際に起きる構造変化を調べた。前者については、ガスセンサータンパク質のリガンド脱離に伴う連動した構造ダイナミクスおよびヘモグロビンの四次構造と三次構造のカップリングを明らかにした。また、後者については、光反応中間体の発色団構造およびシッフ塩基の水素結合強度を基に、イオン輸送機構を解明した。また、シッフ塩基と水分子との間の振動共鳴エネルギー移動を利用して、両者が形成する水素結合について考察した。

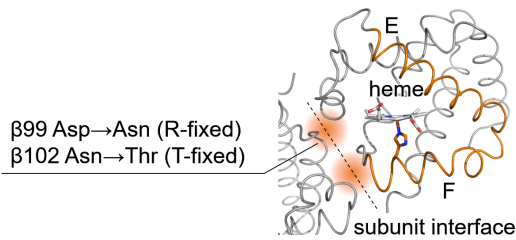
① ガス分子輸送タンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

ヒトヘモグロビンは、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の 2 種類のサブユニットが 2 つずつ会合した四量体で、サブユニット間の構造変化を介した相互作用により協同性を示す。われわれは  $\alpha$  鎖のヘムでリガンド脱離後に起きた構造変化がサブユニット界面を介して  $\beta$  鎖のヘムに約 20  $\mu$ s で伝播することを明らかにした。これは、ひとつのサブユニットから隣接するサブユニットへの構造伝搬を観測した最初の例である。



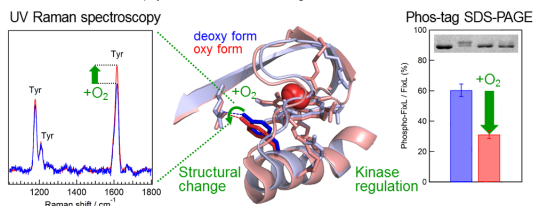
ヒトヘモグロビンに関して、サブユニット間相互作用が三次構造変化の速度に及ぼす影響を調べた。四次構造を保ったもとの三次構造ダイナミクスを観測し、三次構造変化が四次構造に強く依存することを明らかにした。ヘムとサブユニット間相互作用部位と

の間で、EFヘリックス（ヘムを保持しているヘリックス）を介した双方向的な原子変位の伝播が起きていると結論した。



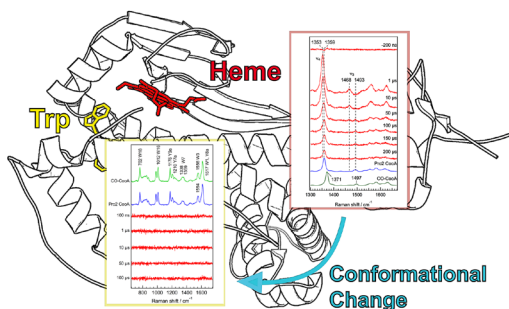
② ガスセンサータンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

FixL はマメ科植物と共生する根粒菌に含まれる酸素センサータンパク質で、細胞内酸素濃度を感知する。低酸素下ではリン酸化酵素活性を持ち、高酸素下では活性を抑制することで窒素固定系遺伝子の発現調節を担う。本研究では、紫外共鳴ラマン分光法による全長 FixL の構造変化の観測に加え、リン酸化活性測定を行うことで、活性制御に重要な残基の構造変化を調べた。その結果、酸素の結合に伴って起きる Tyr201 の水素結合強度変化が活性制御に重要であることを明らかにした。さらに、時間分解紫外共鳴ラマン分光法を用いて、酸素の脱離に伴い Tyr201 の水素結合強度が数マイクロ秒の時定数で変化していることを明らかにした。



得られた知見を基に、人工タンパク質の創成研究も行った。酸素センサータンパク質のドメイン置換によって酸化還元状態に応答するリン酸化酵素を作製し、共通のメカニズムによって酵素活性が制御されていることを実証した。

一酸化炭素センサータンパク質 CooA について、一酸化炭素の脱離に伴う構造ダイナミクスを、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて調べた。可視光のプロープでヘムを、紫外光のプロープでポリペプチド鎖の構造変化を観測したところ、ヘム-プロリン残基 (Pro2) 間結合の解離が一酸化炭素依存的な活性化の引き金になっていることが明らかになった。

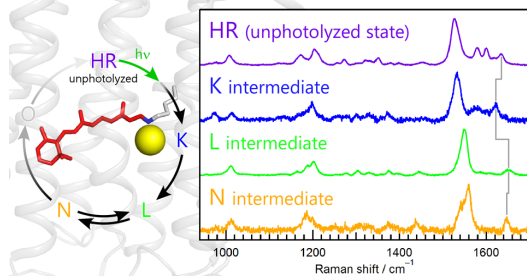


(2) 光受容タンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

レチナルタンパク質では、レチナル発色団に光異性化が起きることによってタンパク質の局所的な構造変化が誘起される。これがタンパク質の大域的な構造変化を起し、機能が発現する。われわれは、種々のイオンポンプについて、時間分解共鳴ラマン分光法で光サイクル中に見られる反応中間体の発色団構造を決定した。

① 光駆動塩化物イオン輸送タンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

光駆動塩化物イオン輸送タンパク質ハロロドプシンについて、光励起に伴う発色団の構造ダイナミクスを、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて調べた。光サイクルにおける発色団構造の遷移、特にシッフ塩基が形成する水素結合の変化をスペクトルに基づいて明らかにした。ここから、イオン輸送の鍵となる過程におけるプロトン化シッフ塩基と水分子との水素結合形成を示すことができた。さらにハロゲン化物イオン依存性を調べ、水素結合パートナーのスイッチングを伴うイオン輸送のモデルを提案した。



塩化物イオンポンプ Fulvimarina rhodopsin (FR) についてもその構造ダイナミクスを調べ、機能発現機構について考察した。FR のアミノ酸残基のうち 3 つを置換した変異体 (N110D、Q121E、S255F) では、プロトン輸送活性を示すことが報告されている。野生型と変異体はほとんど同じ配列を持ちつつ機能だけが異なることから、輸送するイオンを決定する要所のみには違いがあると考えられる。そこで、反応中間体の発色団構造を比較することによって、塩化物イオン輸送とプロトン輸送を支配する因子を明らかにした。

② 光駆動ナトリウムイオン輸送タンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

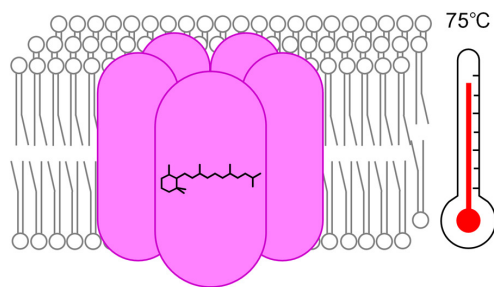
Krokinobacter rhodopsin 2 (KR2) は、光駆動ナトリウムイオンポンプである。タンパク質中におけるナトリウムイオンの輸送経路には、他のイオンポンプ同様、レチナル発色団のプロトン化シッフ塩基があると考えられている。ナトリウムイオンは、発色団付近を移動するとき、プロトン化シッフ塩基上の正電荷と静電反発を生じる。KR2 においてナトリウムイオンがどのように静電反発を避けて輸送されるかを理解するため、光サイクル反応の全段階の発色団構造を明らかにする必要がある。本研究では、KR2 のレチナ



ール発色団の時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。光サイクルに現れるすべての中間体の過渡共鳴ラマンスペクトルを初めて得て、各段階での発色団構造を同定した。また、光サイクルにおけるスペクトルのカチオン依存性を調べ、タンパク質中のナトリウムイオンの結合サイトについて議論した。

### ③ 光駆動プロトンイオン輸送タンパク質の熱安定性の研究

多くのタンパク質はオリゴマーを形成して機能する。オリゴマーを形成することによって、協同性などモノマーでは持ち得ない高度な機能をもつ。したがって、オリゴマーの安定性を理解することは、タンパク質の構造-機能相関を理解する上で重要である。微生物型ロドプシンは脂質膜中で一般にホモオリゴマーを形成する。サーモフィリックロドプシン (TR) は、2013年に高度好熱菌JL-18のゲノム解析から発見されたタンパク質で、プロトン輸送の機能をもつ。TRにおいて、オリゴマー形成の安定性について注目すべき結果が報告された。それは、室温ではオリゴマーをとっているTRは、高度好熱菌の生育温度である75°C付近ではモノマーに解離するというものであった。もし、菌中でも同様の現象が起きているとすると、TRは菌中でモノマーとして働いていることになる。しかし、これは界面活性剤で可溶化したタンパク質試料について調べられたものである。ミセル中(可溶化状態)と脂質中ではタンパク質の安定性に違いがあることが知られている。したがって、TRのオリゴマー安定性を理解するには、脂質中についても調べる必要がある。そこで、本研究では脂質中でのTRの構造およびその熱安定性を共鳴ラマン分光法によって調べ、可溶化状態と比較した。その結果、膜断片試料と再構成試料では、加熱による単量化が起こらず、多量体を維持していることがわかった。すなわち、細胞膜中と脂質二重膜中では、可溶化状態と比べると、多量体を形成するTRが高い安定性を持つことが明らかとなった。



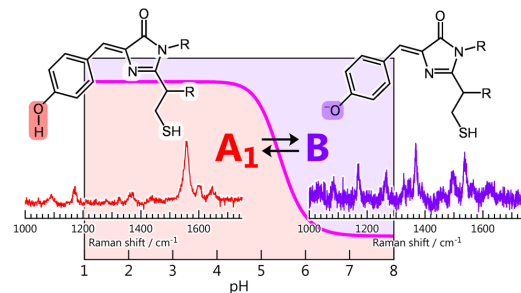
### ④ 光駆動プロトンイオン輸送タンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

グロイオバクターロドプシン (GR) は、光エネルギーを利用してプロトンを細胞内から細胞外へと輸送する。本研究では、共鳴ラマン分光法を用いて、ナノ秒からミリ秒領域におけるレチナール発色団の構造および周辺残基との相互作用を調べた。その結果、過

渡吸収分光法による研究では1種類とされていたL中間体に2種類があること、プロトン移動に先立ってレチナール発色団とカウンターイオンとの間の水素結合が強くなりプロトン移動のエネルギー障壁を低くする構造変化が起きることを明らかにした。さらに、プロトン輸送に関与している Glu132 残基と発色団の間には 10 Å 以上の距離があるにも関わらず、初期中間体の段階で相互作用が形成されることを明らかにした。

### ⑤ フォトクロミック蛍光タンパク質の構造変化と機能発現機構の研究

蛍光タンパク質 Dronpa は、蛍光を発する明状態 B と発しない暗状態 A<sub>2</sub> との間でフォトクロミズムを示す。また、これらに加えて無蛍光性の状態 A<sub>1</sub> の存在も報告されている。共鳴ラマン分光法はタンパク質中の発色団構造を調べるのに適しているが、Dronpa は強い蛍光を発するため可視共鳴ラマンスペクトルの測定は難しく、これまでに報告例はなかった。本研究では、適切なプローブ光の波長を探索し、かつ蛍光のバックグラウンドをスペクトル解析により除去することで、Dronpa 発色団のラマンスペクトルの観測に成功した。スペクトルに基づいて、各状態での発色団の幾何構造およびプロトン化状態を決定した。



### (3) タンパク質エネルギーフローの解明

ヘムを分子ヒーター、トリプトファン残基をエネルギープローブとして用い、タンパク質内のエネルギーフローを計測した。われわれはタンパク質内の異なる位置にトリプトファン残基を導入し、その時間分解アンチストークス共鳴ラマンスペクトルに基づいて、エネルギーフローのラマン時空間マッピングを行った。

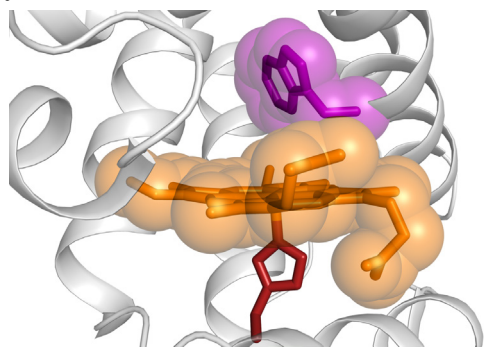
### ① タンパク質から水へのエネルギー移動に関する研究

ミオグロビン中のヘム周辺の異なる位置にトリプトファン残基を導入した変異体を用いて、残基から溶媒へのエネルギー移動について調べた。残基の溶媒露出面積とエネルギー移動速度に相関がみられ、溶媒の水分子が効率的なエネルギー受容体として働いていることが明らかになった。われわれは以前ヘムのプロピオン酸基がタンパク質表面に露出しており、溶媒との接触がヘムのエネルギー緩和に寄与していることを明らかにして

いる。本研究で得られた描像は、これとコンシステントであり、タンパク質の水和の理解を深めるものである。

## ② エネルギーフローの機構に関する研究

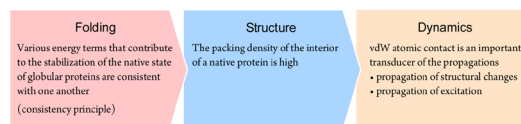
本研究では、タンパク質内エネルギー移動における共有結合の効果を直接的に調べるために、プローブ分子であるトリプトファン残基を導入し、ヒーター分子であるヘムとポリペプチド鎖の間の共有結合を切断した変異体を作製した。通常ミオグロビンは、ヘムとポリペプチド鎖がヒスチジン残基によって共有結合している。このヒスチジンをヘムと共有結合しないグリシンに変異させることで、ヘムとポリペプチド鎖間の共有結合をなくした。さらに、共有結合をなくしたミオグロビンに対して、ヒスチジンと類似の構造をもつイミダゾールを1分子配位させた。そして、共有結合の有無に対するヘム近傍のトリプトファン残基へのエネルギー移動の影響を調べた。その結果、ヘムからポリペプチド鎖へのエネルギーフローには、主鎖を経由した経路の寄与は小さく、原子間接触を通じた経路が大きな寄与をなすことを示している。



(4) タンパク質分子の機能に関わる柔軟性を表現する概念”Functional Compactness (機能的稠密性)”の創出

本研究で得られた実験データに基づいて、アロステリック効果を生むタンパク質の構造的特徴として、”functional compactness (機能的稠密性)”という概念を提案した。本研究の実験結果では、複数のサイト間の共有結合や水素結合を切断してもその間で構造変化が伝播することがいくつかのタンパク質で観測された。また、タンパク質内の振動エネルギー移動は、主に原子間接触を通じて起きていることを明らかにした。タンパク質には、天然構造において二次構造と三次構造すべての相互作用が整合して全体を安定化しているという特徴がある(整合性原理)。その結果として、原子が密にパックした立体構造をもつ。タンパク質は液体に比べ1桁高い等温圧縮率をもつ事実はこの稠密な構造を反映している。われわれのタンパク質ダイナミクス研究は、この稠密な構造が天然構造を効率的に形成するために重要だけでなく、機能発現において原子変位や励起を効率的に伝達するためにも重要であることを明

らかにした。一方、タンパク質構造には粗な部分もあり、粗密の密度不均一性が構造変化やエネルギーフローの異方性を生んでいると考えられる。以上のように、「タンパク質構造は稠密性を持つが故に、あるサイトに起きた構造変化が構造歪みの伝播により別のサイトに構造変化を生み出している」という概念を提案し、これを”functional compactness (機能的稠密性)”と名付けた。この概念は、柔らかな分子系の特徴である「系が状況に応じて柔軟に変化して最適な機能を発現する」性質と密接に関連している。系が状況に応じて柔軟に変化して機能発現するためには、複数の機能単位が互いに連動する必要がある。この連動性は稠密な原子パッキングによって成立しているというのが functional compactness の考え方である。稠密な原子パッキングは単純には固い性質を想像させる。しかし、そのような固い性質が機能発現に必須の柔軟な構造変化を制御している。このように、functional compactness の概念は、分子の単なる柔らかさではなく、機能を生み出す分子の柔らかさの本質を表現するものといえる。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 21 件)

- ① Misao Mizuno, Ayumi Nakajima, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Structural Evolution of a Retinal Chromophore in the Photocycle of Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*,” *J. Phys. Chem. A* 122, 2411–2423 (2018). 査読有 DOI: 10.1021/acs.jpca.7b12332
- ② Shanyan Chang, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa and Yasuhisa Mizutani, “Tertiary Dynamics of Human Adult Hemoglobin Fixed in R and T Quaternary Structures,” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3363–3372 (2018). 査読有 DOI: 10.1039/C7CP06287G
- ③ Yasuhisa Mizutani, “Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy and Application to Studies on Ultrafast Protein Dynamics,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 90, 1344–1371 (2017). 査読有 DOI: 10.1246/bcsj.20170218
- ④ Akihiro Otomo, Haruto Ishikawa, Misao Mizuno, Tetsunari Kimura, Minoru Kubo, Yoshitsugu Shiro, Shigetoshi Aono, and Yasuhisa Mizutani, “A Study of the Dynamics of the Heme Pocket and C-helix in CooA Upon CO Dissociation Using

- Time-resolved Visible and UV Resonance Raman Spectroscopy,” *J. Phys. Chem. B* 120, 7836–7843 (2016). 査読有  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05634
- ⑤ Takeo Yamawaki, Haruto Ishikawa, Misao Mizuno, Hiro Nakamura, Yoshitsugu Shiro, and Yasuhisa Mizutani, “Regulatory Implications of Structural Changes in Tyr201 of the Oxygen Sensor Protein FixL,” *Biochemistry* 55, 4027–4035 (2016). 査読有  
DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00405
- ⑥ Masato Kondoh, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, “Importance of Atomic Contacts in Vibrational Energy Flow in Proteins,” *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 1950–1954 (2016). 査読有  
DOI: 10.1021/acs.jpcclett.6b00785
- ⑦ Asuka Higashino, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, “Chromophore Structure of Photochromic Fluorescent Protein Dronpa: Acid-base Equilibrium of Two *cis* Configurations,” *J. Phys. Chem. B* 120, 3353–3359 (2016). 査読有  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01752
- ⑧ Misao Mizuno and Yasuhisa Mizutani, “Protein response to chromophore isomerization in microbial rhodopsins revealed by picosecond time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy: a review,” Recent progress in colloid and surface chemistry with biological applications, American Chemical Society, 1215, 329-353 (2015). 査読有  
DOI: 10.1021/bk-2015-1215.ch016
- ⑨ Naoki Fujii, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa, and Yasuhisa Mizutani, “Observing Vibrational Energy Flow in a Protein with the Spatial Resolution of a Single Amino Acid Residue,” *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 3269–3273 (2014). 査読有  
DOI: 10.1021/jz501882h
- 〔学会発表〕 (計 93 件)
- ① Yasuhisa Mizutani, “Time-resolved Resonance Raman Study on Roles of Hydrogen Bonds in Light-driven Ion-pumping Proteins,” The 6th Asian Spectroscopy Conference (Hsinchu, Taiwan, September 3-6, 2017)
- ② Yasuhisa Mizutani, “Importance of Atomic Contacts to Propagations in Protein: Functional Compactness,” Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics (Telluride, Colorado, USA, July 31-August 4, 2017)
- ③ Misao Mizuno, “Determining Factors for Ion Pumping Mechanism in Microbial Rhodopsins,” Eighteenth International Conference on Time-Resolved Vibrational

- Spectroscopy (Churchill College, Cambridge, UK, July 16-21, 2017)
- ④ Yasuhisa Mizutani, “Vibrational Energy Flow in Hemeproteins,” The XXV International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2016) (Fortaleza, Brazil, August 14–19, 2016)
- ⑤ Yasuhisa Mizutani, “Temporal Raman mapping of vibrational energy flow in hemeprotein,” The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20, 2015)
- ⑥ Yasuhisa Mizutani, “Time-resolved resonance Raman spectroscopy on retinal proteins,” 16th International Congress on Photobiology (Córdoba, Argentina, September 7–12, 2014)
- ⑦ 水谷泰久, “タンパク質内エネルギー散逸のラマン時空間マッピング” 第8回分子科学討論会 (2014年9月21日~24日 広島大学東広島キャンパス)
- 上記7件はいずれも招待講演である。

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 生物物理化学研究室  
<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
水谷 泰久 (MIZUTANI, Yasuhisa)  
大阪大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：60270469
- (2)研究分担者  
石川 春人 (ISHIKAWA, Haruto)  
大阪大学・大学院理学研究科・講師  
研究者番号：40551338
- 水野 操 (MIZUNO, Misao)  
大阪大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号：10464257
- (3)連携研究者 ( )  
研究者番号：
- (4)研究協力者 ( )