

機関番号：13903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年～2010年

課題番号：21770165

研究課題名（和文）2段階励起過渡回折格子法の開発と情報伝達タンパク質の光反応機構の解明と制御

研究課題名（英文）Development of 2-step excitation transient grating method, and elucidation of photo-reaction mechanism and control of signal transferring protein.

研究代表者

井上 圭一（INOUE KEIICHI）

名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90467001

研究成果の概要（和文）：過渡回折格子法を用い、真正細菌 *Salinibacter ruber* 由来の細胞の走光性を引き起こすための光受容タンパク質、Sensory Rhodopsin I の光反応ダイナミクスを調べた。その結果これまで知られていなかった中間体の存在を明らかにした。そしてさらにそれぞれの中間体のエンタルピーを決定することにも成功し、それらが塩化物イオンの結合によって大きく影響を受けることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Sensory rhodopsin I from eubacterium *Salinibacter ruber* is the photo-censor for the bacterial photo-taxis. In this study the photo-reaction dynamics of this protein was studied by transient grating (TG) method. As the result, the presences of new photo-intermediates were identified in the photo-cycle of sensory rhodopsin I. In addition, the enthalpy differences of the intermediates were determined by TG method and we found that they are significantly affected by the binding and dissociation of chloride ion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：物理化学、生体分子分光学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光受容タンパク質、過渡回折格子法

1. 研究開始当初の背景

2. 研究の目的

細菌などの単細胞生物は様々な化学物質や、温度、光などの外的環境の変化に応じて、運動の方向を変化させ、より生育に望ましい環境へと自身を移動させる。このためには、細胞内に外的刺激を感知して運動のパターンを変化させる細胞内信号伝達システムが必要不可欠である。その中で真正細菌を中心と

する、広範な生物種に見られる共通のものとして、外来性の化学物質を受容するための化学受容器タンパク質と、CheA や CheY などの Che タンパク質群から構成される二成分制御系（Two Component System）と呼ばれる信号伝達システムがある（図1）。二成分制御系では化学受容器が活性化されると、さらに下流のタンパク質群に情報が伝達され、最終的に細胞の鞭毛の回転方向を変化させて、刺激のもととなる化学物質に対する応答

を行う（走化性）と考えられているが、その機構については不明な点が多い。

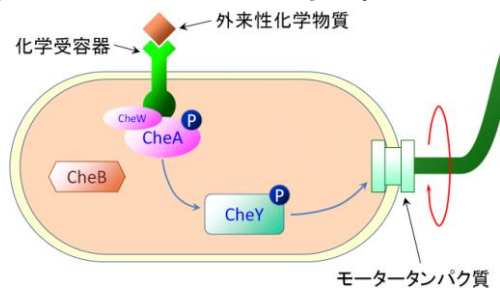


図1 二成分制御系による信号伝達

走化性を示す信号伝達システムの研究が困難である理由の一つに、溶液を混合するなどして実験を行う必要があるため、時間分解能が低く、速い反応素過程の観察が不可能であるということが挙げられる。これに対し、近年注目を浴びているのが細胞の光に対する応答（走光性）をもたらす光受容器である微生物型ロドプシンであり、中でもよく知られているのが *Halobacterium salinarum* などの古細菌の持つセンサリーロドプシンタンパク質である。センサリーロドプシンには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) があり、前者は可視光に対する正の走光性と、紫外光に対する負の走光性、後者は青緑光に対する負の走光性を担っている。これらのタンパク質は細胞膜中でトランスデューサーと呼ばれる別の膜タンパク質と複合体を形成し、活性化された SRI および SRII はそれぞれのトランスデューサーへと信号を伝達する。このトランスデューサーの細胞内側部分は化学受容器のものと非常に相同性が高く、同様の機構で Che タンパク質群へと信号を伝達すると考えられている。これらの系は光で反応のトリガーをかけることが出来ることから、パルスレーザーを使った分光学的手法を用いることで細菌や古細菌で広範に見られる信号伝達のメカニズムを高い時間分解能で調べることが出来ると期待されている。

3. 研究の方法

本研究では Sensory rhodopsin I の光反応ダイナミクスをフラッシュフォトリシス法、過渡回折格子法を用いて調べた。過渡回折格子法 (TG) 法は図 2 のように 2 本の励起レーザーの作る干渉縞に沿った、分子の反応変化に伴う試料の屈折率変化を回折光の強度を元に測定する手法である。

TG 法では屈折率の時間変化からタンパク質分子の拡散定数や、エネルギー変化、体積変化などを求めることが出来る。

また試料には真正細菌 *Salinibacter ruber* 由来の Sensory rhodopsin I (*SrSRI*) とトランスデューサータンパク質との融合タンパク質を

用いた。*SrSRI* は可溶化状態でも安定であり、試料が引き起こす光の散乱が少なく、分光測定に適している。また *SrSRI* はタンパク質内部に塩化物イオン (Cl^-) を結合することが知られており、塩のない条件においても非常に安定に存在するため、 Cl^- の結合/解離に伴う *SrSRI* の反応ダイナミクスの変化についても調べる事が可能であり、試料として最適である。

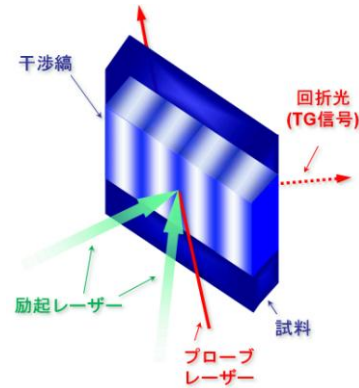


図2 過渡回折格子法原理図

4. 研究成果

(1) TG 法による *SrSRI* の反応ダイナミクスの研究

図 3 に *SrSRI* の TG 信号を示す。

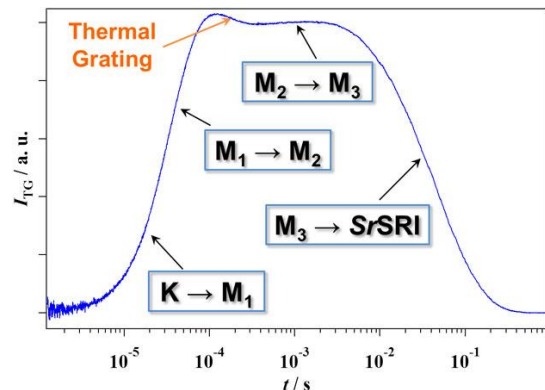


図3 *SrSRI* の TG 信号

光励起後 *SrSRI* は長波長シフトした K 中間体を生成した後、短波長シフトした M 中間体になることが知られている。TG 信号の解析の結果 M 中間体には吸収変化を伴わないが、タンパク質の構造が異なる 3 つの状態があることが分かった。このことは通常の研究で用いられる、フラッシュフォトリシス法によって求められる吸収変化をもとにした中間体の帰属付けでは光受容タンパク質のダイナミクスを調べるのには不十分であることを示す結果である。

(2) *SrSRI* の反応中間体のエンタルピー変化

次にさらに TG 法における熱的参照試料との熱グレーティング信号の強度の比較から、そ

- ⑥ Keiichi Inoue, Masaaki Fujii, Makoto Sakai, Development of a Non-scanning VSFG detected IR Super-resolution Microscope and its Application to Biological Cells, Applied Spectroscopy, 査読有、64、2010、275-281
- ⑦ Jin Yagasaki, Daisuke Suzuki, Kunio Ihara, Keiichi Inoue, Takashi Kikukawa, Makoto Sakai, Masaaki Fujii, Michio Homma, Hideki Kandori, Yuki Sudo, Spectroscopic studies of a sensory rhodopsin I homologue from the archaeon *Haloarcula vallismortis*, Biochemistry, 査読有、49、2010、1183-1190
- ⑧ Nándor Bokor, Keiichi Inoue, Satoshi Kogure, Masaaki Fujii, Makoto Sakai, Visible-super-resolution Infrared Microscopy Using Saturated Transient Fluorescence Detected Infrared Spectroscopy, Optics Communications, 査読有、283、2010、509-514
- ⑨ Yuki Sudo, Akiko Okada, Daisuke Suzuki, Keiichi Inoue, Hiroki Irieda, Makoto Sakai, Masaaki Fujii, Yuji Furutani, Hideki Kandori, Michio Homma, Characterization of a Signaling Complex Composed of Sensory Rhodopsin I and Its Cognate Transducer Protein from the Eubacterium *Salinibacter ruber*, Biochemistry, 査読有、48、2009、10136-10145
- ⑩ Keiichi Inoue, Nándor Bokor, Satoshi Kogure, Masaaki Fujii, Makoto Sakai, Two-point-separation in a Sub-micron Nonscanning IR Super-resolution Microscope Based on Transient Fluorescence Detected IR Spectroscopy, Virtual Journal for Biomedical Optics, 査読有、4、2009
- ⑪ Keiichi Inoue, Nándor Bokor, Satoshi Kogure, Masaaki Fujii, Makoto Sakai, Two-point-separation in a Sub-micron Nonscanning IR Super-resolution Microscope Based on Transient Fluorescence Detected IR Spectroscopy, Optics Express, 査読有、17、2009、12013-12018
- ⑫ Daisuke Suzuki, Yuji Furutani, Keiichi Inoue, Takashi Kikukawa, Makoto Sakai, Masaaki Fujii, Hideki Kandori, Michio Homma, Yuki Sudo, Effects of Chloride Ion Binding on the Photochemical Properties of *Salinibacter* Sensory Rhodopsin I, Journal of Molecular Biology, 査読有、392、2009、48-62

[学会発表] (計21件)

【口頭発表 (招待講演)】

- ① ○ Keiichi Inoue, Dynamic conformational change of sensory rhodopsin II and transducer studied by transient grating method, International Conference on Recent Frontiers in

Applied Spectroscopy (ICORFAS-2010) September, 23, 2010, Tamil Nadu, India

- ② ○ Keiichi Inoue, Transient grating studies on photo-reaction dynamics of archeal rhodopsin, Prof. Mathies Laboratory in University of California Berkeley, August, 6, 2010 Berkeley, USA
- ③ ○ 井上圭一, 2波長レーザー分光法を用いた赤外超解像顕微鏡の開発と細胞の赤外分光測定、日本分光学会先端レーザー分光部会 第5回先端的レーザー分光の若手シンポジウム 2009年12月11日 横浜
- ④ ○ 井上圭一, 寺嶋正秀, HAMPドメインの構造変化ダイナミクス: センサリロードプシンII-トランスデューサータンパク質、第47回日本生物物理学会年会 シンポジウム「膜蛋白質の立体構造ダイナミクス解析の最前線」2009年11月1日 徳島

【国際会議における発表】

- ⑤ ○ Keiichi Inoue, Yuki Sudo, Michio Homma, Hideki Kandori, Study on the photo-reaction cycle of *Salinibacter ruber* Sensory rhodopsin I, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), December, 18, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑥ Keiichi Inoue, Satoshi Kogure, Katsuya Kikuchi, Masaaki Fujii, ○ Makoto Sakai, Development of a vibrational sum-frequency generation detected IR super-resolution microscope and its application to cells, The December, 18, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), December, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑦ Satoshi Kogure, Keiichi Inoue, Katsuya Kikuchi, ○ Kana Kitatsugu, Masaaki Fujii, Makoto Sakai, IR imaging of living cells by a vibrational sum-frequency generation detected IR super-resolution microscope, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), December, 19, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑧ ○ Keiichi Inoue, Yuki Sudo, Michio Homma, Hideki Kandori, Spectrally Silent Process and Conformational Change on Activated State of *Salinibacter* Sensory Rhodopsin I, 14th International Conference on Retinal Proteins, August, 6, 2010, Santa Cruz, California, USA

【国内学会における口頭発表】

- ⑨ ○ 井上圭一, Louisa Reissig, 須藤雄気, 本間道夫, 神取秀樹, 全反射赤外分光による *Salinibacter* センサリロードプシンIの塩化物イオン結合サイトの構造研究 日本化学会第91春季年会 2011年3月28日 神奈川

- ⑩○井上圭一、神取秀樹、分光的手法による生体 π 空間の制御機構解明と新機能の開拓 - 過渡回折格子法を用いたダイナミクス研究、新学術領域研究「高次 π 空間の創発と機能開発」第 5 回公開シンポジウム 2011 年 3 月 22 日 吹田
- ⑪○井上圭一 特定領域研究「高次系分子科学」時間分解分光法によるマイクロからマクロにおよぶタンパク質の反応ダイナミクスの理解、第 4 回公開シンポジウム 2010 年 11 月 26 日 仙台
- ⑫○井上圭一、見えないものを見る分光学、名古屋工業大学第 1 回化学公開セミナー 2010 年 11 月 10 日 名古屋
- ⑬○井上圭一、佐々木賢吾、中妻亜弥、山下高廣、七田芳則、神取秀樹、ロドプシン/古細菌型ロドプシンキメラタンパク質を用いた G タンパク質活性化機構の解明、第 4 回分子科学討論会 2010 年 9 月 15 日 大阪
- ⑭○井上圭一、時間分解分光法によるマイクロからマクロにおよぶタンパク質の反応ダイナミクスの理解、特定領域研究「高次系分子科学」第 5 回班会議 2010 年 5 月 26 日 淡路
- ⑮○井上圭一、小暮聡、菊地克也、藤井正明、酒井誠、振動和周波 (VSFG) 赤外超解像顕微鏡の開発と細胞内構造の赤外分光イメージング、第 3 回分子科学討論会 2009 年 9 月 24 日 名古屋

【国内学会等におけるポスター発表】

- ⑯○佐々木賢吾、山下高廣、中妻亜弥、井上圭一、七田芳則、神取秀樹、ウシロドプシンの細胞質側第 3 ループを含む光駆動プロトンポンプの性質、第 48 回日本生物物理学会年会 2010 年 9 月 21 日 仙台
- ⑰○井上圭一、寺嶋正秀、神取秀樹、過渡回折格子法による bacteriorhodopsin の光反応ダイナミクスの研究、第 48 回日本生物物理学会年会 2010 年 9 月 20 日 仙台
- ⑱○近藤正人、井上圭一、佐々木純、John L. Spudich、寺嶋正秀、分子拡散過程で観るアナベナセンサーロドプシンの蛋白質間相互作用ダイナミクス、2010 年光化学討論会 2010 年 9 月 8 日 千葉
- ⑲○井上圭一、小暮聡、菊地克也、藤井正明、酒井誠、振動和周波発生赤外超解像顕微鏡の開発と細胞への応用、第 47 回日本生物物理学会年会 2009 年 10 月 30 日 徳島
- ⑳○小暮聡、井上圭一、菊地克也、藤井正明、酒井誠、VSFG 検出赤外超解像顕微鏡を用いた生きた細胞の赤外イメージング、第 47 回日本生物物理学会年会 2009 年 10 月 30 日 徳島
- ㉑○小暮聡、井上圭一、菊地克也、藤井正明、酒井誠、振動和周波赤外超解像顕微鏡を用

いた生細胞の赤外分光イメージング、第 3 回分子科学討論会 2009 年 9 月 22 日 名古屋

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ach.nitech.ac.jp/~physchem/kandori/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 圭一 (INOUE KEIICHI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：90467001

(2) 研究分担者

研究分担者なし

(3) 連携研究者

連携研究者なし

(4) 研究協力者

須藤 雄気 (SUDO YUKI)

名古屋大学・理学研究科・准教授
研究者番号：10452202