

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02439

研究課題名(和文)光駆動型イオンポンプの分子動画像解析とその応用

研究課題名(英文)Time-resolved X-ray crystallography of light-driven ion pumps and their applications

研究代表者

南後 恵理子(Nango, Eriko)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90376947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：微生物由来のレチナルタンパク質(ロドプシン)は、光により機能を発揮する膜タンパク質である。代表的な機能は、光受容により一方向にイオンを能動輸送する機能であり、様々なイオンを輸送するロドプシンが知られている。その基本構造は類似しており、構造の類似性にも関わらず電荷の異なるイオンを同一方向に輸送する仕組みに興味を持たれてきた。本課題では、数種のイオンポンプロドプシンの発現、結晶化を行い、実際にX線自由電子レーザーを用いた時分割実験により、動的構造を取得するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までに、部位特異的変異導入及びその活性測定やクライオトラップ法による中間体X線結晶構造解析などが行われてきたが、イオンの選択性やイオン輸送機構の全容は明らかではなかった。本課題では、X線自由電子レーザーにより、光反応の過程をリアルタイム且つ原子レベルで可視化することが可能なことから、従来の課題を克服し新たな知見を見出すことが期待される。また、本ターゲットはその光応答性を利用して細胞の光制御を可能とするオプトジェネティクスに利用されるなど応用面でも注目されており、分子設計への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinal proteins (rhodopsin) from microorganisms are membrane proteins that perform their functions by light. A typical function is the active transport of ions in one direction by photoexcitation, transporting a variety of ions. There has been interest in the mechanism by which they transport ions with different charges unidirectionally despite their structural similarity. In this project, we have expressed and crystallized several ion-pump rhodopsins, and obtained their dynamic structures by time-resolved serial crystallography using an X-ray free electron laser.

研究分野：構造生物学

キーワード：ロドプシン X線自由電子レーザー X線結晶解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物由来レチナルタンパク質(ロドプシン)は、光を受容して機能を発揮する7回膜貫通型膜タンパク質である。発色団として all-trans 型レチナルを持ち、光異性化により 13-cis 型レチナルに変化する。また、光受容を起点に極大吸収波長の異なる複数の中間体を生成して、基底状態に戻る (photocycle)。ロドプシンは、古くから光応答タンパク質の良いモデルとして分光法や構造解析のターゲットとなってきた。また最近では、その光応答性を利用して細胞の光制御を可能とするオプトジェネティクスに利用されるなど応用面でも注目されている。

微生物由来レチナルタンパク質の最も代表的な機能としては、細胞内外のイオンを能動的に輸送するイオンポンプが挙げられる。例えば、バクテリオロドプシンは細胞質から細胞外へとプロトンを送り、他にもハロロドプシンなどのハライドイオンを送るアニオンポンプや KR2 のようにナトリウムイオンを送るカチオンポンプも知られている。これらのイオンポンプ機能を持つロドプシンは、互いに構造が類似していることが知られている。構造の類似性にも関わらず電荷の異なるイオンを同一方向に輸送するのは大変興味深く、比較検討が行われてきた。例えば、アミノ酸配列の比較から、レチナル周辺の3つのアミノ酸残基が反応に関与する鍵部分と推測されている。バクテリオロドプシンでは、DTD モチーフであるが、クロライドポンプ (NM-R3) の相当する部分は NTQ であり、同じクロライドイオンを送るハロロドプシン (HR) では TSA モチーフを持つ。また、KR2 では NDQ となっている。これらのモチーフを入れ替えるなどの変異実験が行われているが、それだけでは活性を変えることができない場合も多いことがわかっている (Inoue, K. et al. *J. Biol. Chem.*, 2016 など)。この他の部分についても、部位特異的変異実験により活性に必要な残基の特定が行われてきたが、どのイオンを送るか、またどのようにイオンを送るのかについてその全容は明らかではなかった。

2. 研究の目的

2010年代より革新的な光源である X線自由電子レーザー (XFEL) 施設の供用が開始され、XFEL の利用が可能となっている。XFEL は、その強力で非常に短い (数十フェムト秒程度) X線パルスによって、照射後に試料は崩壊する一方で、放射線損傷が顕在化するより短い時間で回折現象が完結する。そのため、化学変化など物質の極めて速い動きを原子分解能で解析できると期待されている。研究代表者の南後は、2013年より日本の XFEL 施設 SACLA において、XFEL を用いたタンパク質の構造解析に取り組み、シリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) をベースとした測定技術や装置の開発を行ってきた。SFX は、タンパク質微結晶を緩衝液などと共に XFEL 照射領域に連続的に輸送して、多数の結晶からの回折像を収集して構造を得る方法である。「タンパク質が素早く反応・構造変化を起こす様子を捉える」ための時分割 SFX 実験装置・技術開発にも取り組み、2016年には光で励起しプロトン輸送を行う膜タンパク質であるバクテリオロドプシンを用いて、ナノ秒からミリ秒にかけての13点のタイムポイントで試料が光照射によって構造変化し、プロトンを送る様子を観測することに成功した。この実験は、ナノ秒からミリ秒の長いタイムスケールにおけるタンパク質や水分子が移動する様子を原子分解能で詳細に捉えるという「分子動画」として、世界に先駆けた成果となった。

そこで、本課題では、クロライドイオン輸送ロドプシンについて、XFEL を用いた時分割 SFX 構造解析により動的構造を明らかにすることを目的とする。反応途中の詳細な構造変化を特定できると、その動的構造情報を基に、輸送可能なイオンの変換や高効率化などを目指した合理的設計への道が拓ける。また、ターゲットの一つである *Natronomonas pharaonis* 由来ハロロドプシンは、光応答によって細胞内にクロライドイオンを流入させて過分極を引き起こし、活動電位を生じさせにくくすることから、実際にオプトジェネティクスで使用されている。よって動的構造に基づく合理的設計は、オプトジェネティクスにおいても資すると期待される。

3. 研究の方法

クロライドイオン輸送ロドプシンとしては、モチーフが異なる数種をターゲットとし、X線自由電子レーザーを用いた時分割 SFX による分子動画解析を行い、得られた動的構造情報から機能改変などの応用を目指す。試料調製方法としては、研究分担者の保坂が持つ大腸菌無細胞合成の技術を用いて調製し、結晶化を行う。必要に応じて、遺伝子組み換えによる発現を検討する。解析方法としては、先に述べた XFEL を用いた時分割 SFX 実験を行う。バクテリオロドプシンではクライオトラップ法で捉えた中間体構造が多数報告されているが、分光的に同じ中間体であっても同一の構造はなく、放射線損傷の影響や真の時間依存の反応を捉えてない点で議論となっていた。本課題で用いる XFEL による時分割解析は放射線損傷が顕在化する前の構造であり、室温で測定することから真の反応途中を観察することができる。また、バクテリオロドプシンや KR2 などの時分割データと比較することで、イオン輸送の仕組みの詳細が知ることができると期待される。

4 . 研究成果

時分割 SFX 実験で、高い空間分解能の動的構造情報を得るには、良質は微結晶を調製する必要がある。そこで、まずは微生物由来の様々なイオンポンプロドプシンの発現検討を行った。結晶化に必要な量を取得するのに種々の検討が必要であったが、最終的には4つの異なる微生物由来のイオンポンプロドプシンにて発現・単離精製が可能であり、十分量得られることが明らかとなった。また、三種のクロライドポンプロドプシンで高分解能を示す微結晶を得るのに成功した。その内 NM-R3 については、時分割 SFX 実験を実施し、この課題実施期間内に PNAS 誌に受理された。得られた動的構造については、今までに解明されてきた他微生物型ロドプシンの動的構造と比較を行うことにより、イオン輸送の際の構造類似性などを見出し、総説としてまとめ *Curr. Opin. Struct. Biol.* に掲載された。また、ベルトコンベア型装置を開発し、ポンププローブ時分割実験を実施し、微生物型ロドプシン 1 種の構造変化を捉えた。現在、他のクロライドポンプロドプシンについては、放射光と XFEL の両方でデータ測定を行っており、時分割実験に向けた検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nango Eriko, Iwata So	4. 巻 81
2. 論文標題 Recent progress in membrane protein dynamics revealed by X-ray free electron lasers: Molecular movies of microbial rhodopsins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 102629 ~ 102629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2023.102629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gruhl T, Weinert T, Rodrigues M J, Milne C J, Ortolani G, Nass K, Nango E, ...Schertler G, and Panneels V. et al.	4. 巻 615
2. 論文標題 Ultrafast structural changes direct the first molecular events of vision	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 939 ~ 944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-05863-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosaka T, Nomura T, Kubo M, Nakane T, Luo F, ... Nango E, and Shirouzu M. et al. .	4. 巻 119
2. 論文標題 Conformational alterations in unidirectional ion transport of a light-driven chloride pump revealed using X-ray free electron lasers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2117433119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 21件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 Recent activities of biology research fields and requests for facilities (tentative)
3. 学会等名 SACLA User's Meeting 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによるタンパク質分子動画解析
3. 学会等名 2022年度 iBIX-JAXA-KEK物構研-QST合同タンパク質研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 XFELによるタンパク質分子動画解析の現状と今後の展望
3. 学会等名 第36回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによるタンパク質分子動画解析
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 3D Movies of Structural Changes in Proteins Captured by X-ray Free Electron Lasers
3. 学会等名 AsBIC10(10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 高速分子動画計測の現状と今後の課題
3. 学会等名 新学術領域会議（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによる高時空間分解能タンパク質分子動画
3. 学会等名 第8回電子状態理論シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 高速分子動画法で観るタンパク質構造変化
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography of microbial rhodopsins
3. 学会等名 ICRP2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 3D movies of structural changes in proteins captured by X-ray free electron lasers
3. 学会等名 Sendai2022 workshop, An Update on Molecular Machines: Open Challenges and New Perspectives (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 高速分子動画法で観るタンパク質構造変化
3. 学会等名 Agtechセミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを用いた膜タンパク質分子動画解析
3. 学会等名 バイオインタストリー協会「発酵と代謝研究会」第1回勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 百聞は一見に如かず：タンパク質分子動画から見えてくる世界
3. 学会等名 LINK-J x 東北大学次世代放射光イベント (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography of microbial rhodopsins
3. 学会等名 “ The Molecular Movies and beyond ” International Symposium 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 保坂俊彰
2. 発表標題 Structural changes in chloride ion pump rhodopsin by time-resolved crystallography
3. 学会等名 大阪大学蛋白研セミナー Frontier of Dynamic Structural Biology (招待講演) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによるタンパク質分子動画解析
3. 学会等名 日本化学会 東海コンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 原子レベルの動的構造解析が 拓く生体分子機能の理解
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会(BSJ2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 SACLAでの時分割構造解析
3. 学会等名 よこはまNMR研究会 第67回ワークショップ「放射光解析の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 Protein structural;dynamics revealed by molecular movie analysis
3. 学会等名 第35回アメリカ蛋白質科学会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eriko Nango
2. 発表標題 高速分子動画: タンパク質の構造機能相関研究の最先端 Non-equilibrium state molecular movies: a new frontier in structural and functional studies on proteins
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 高速分子動画が捉えるタンパク質構造ダイナミクス Protein structural dynamics captured by molecular movie analysis
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第77回学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南後恵理子
2. 発表標題 X線自由電子レーザーによる分子動画解析
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	保坂 俊彰 (Hosaka Toshiaki) (40462725)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	Paul Scherrer Institute		