

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012-2013

課題番号：23657096

研究課題名（和文） 高感度光誘起膜電位センサ膜タンパク質の創製

研究課題名（英文） Development of Light-induced Membrane Proteins as a High-sensitive Membrane Potential Sensor

研究代表者

出村 誠 (DEMURA MAKOTO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70188704

研究成果の概要（和文）：

光を感じるタンパク質ははたらく代表的な器官はヒトの眼である。眼の中には光の色を識別できるロドプシンと呼ばれるセンサータンパク質がある。一方、一部の微生物にもヒトにそっくりなロドプシンが発見され、眼とは異なる機能（光でイオンを運ぶ）に注目されており、世界中でロドプシンの立体構造や分子機能の研究が盛んである。この研究では、微生物ロドプシンの光応答機能をさらにアップし、神経細胞の「光治療」に応用するために必要な改良型ロドプシンを作る研究成果がようやくまとまってきた。

研究成果の概要（英文）：

Human eye has a light-sensitive membrane protein. This sensor protein called rhodopsin that can identify the color of the light. Contrary, a rhodopsin-like proteins were found in some microorganisms, which have a light-driven ion transport (membrane potential) features different from the eyes. In this study, in order to improve the light-driven ion transport of microbial rhodopsin, the modified rhodopsins were prepared and visible absorption spectra in equilibrium and transient states, and the trimeric structure of modified rhodopsins were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ハロロドプシン、オプトジェネティクス、光遺伝学、膜タンパク質、光生物学

## 1. 研究開始当初の背景

脳の神経回路研究は、ニューロン細胞情報処理機能を知ることだけでなく、新しいバイオコンピューターやロボットを作る工学的機能応用、精神神経疾患治療など、いずれも社会的ニーズの高い分野として注目されており、多様な分野への展開が期待されている。神経回路研究の新しい潮流としてオプトジ

ェネティクス（光遺伝学）による全く新しい手法が2007年に発表された。

光誘起膜電位発生膜タンパク質ハロロドプシン（HR, イオン輸送体）などを細胞種選択的に発現する技術で、青色や黄色の光波長応答を使い分けることで、ミリ秒オーダーの正確さで特定のニューロンを選択的に活性化したり抑制したりすることができる。これまで神経科学で用いられてきた電極による

電気刺激や薬物による活性化・不活性化法の非選択的な問題点を克服する革命的な手法であると期待されていた。

我々は 2002 年頃からハロロドプシン (NpHR) とその類縁体の変異体基礎実験から光駆動 Cl<sup>-</sup>ポンプ機構解明および構造生物学的研究成果をさきがけて発表してきた。我々の知見から、オプトジェネティクス新手法の萌芽的研究として、2 つの課題：脳細胞組織深部への光刺激効率の向上と、ハロロドプシン 3 量体安定化と機能変調を解明することが必要であると予測された。

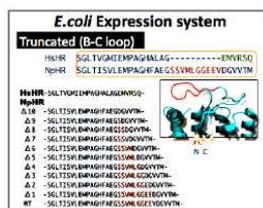
## 2. 研究の目的

本研究では、(1)脳細胞組織深部への光刺激効率の向上に向けたハロロドプシン NpHR 変異体の極大吸収波長 ( $\lambda_{max}$ ) の系統的解析、さらに (2)ハロロドプシン 3 量体安定化と機能変調を解明することを目的とした。系統的な変異体作製で得られた HR 試料の分光学的特性と光誘起膜電位活性を観測し、オプトジェネティクス法に最適な高感度ハロロドプシンのデザインを提案する。

## 3. 研究の方法

細胞組織深部への光刺激効率を上げるため、極大吸収波長がより赤色方向シフトした高感度ハロロドプシンの変異体を系統的な実験からデザインする。このため、平成 23 年度はハロロドプシン変異体について、極大吸収波長の系統的解析を実施した。平成 24 年度は、静的構造安定性評価と構造ダイナミクス解析を実施した。

NpHR 変異候補	
Y39A	F150A/Y/W
R57Q	D156N/E
R63Q	C160A/I/S
K65A/R	R176K/H/Q/
H100A/R	W179A
M120E/Q/Y/A	C184A/T/F
R123X	N212D
T126D/E/N/R	K215Q/R
T126E-A137D	T218V
T126E-T244E	E234D/Q/
S130A/C/T	P240T
A137/D	T244E
K148A/R	D252E/N



## 4. 研究成果

(1) ハロロドプシン NpHR 変異体の極大吸収波長 ( $\lambda_{max}$ ) の系統的解析

2 種類のハロロドプシン NpHR, HsHR のアラインメント相同性比較および NpHR, HsHR 結晶構造座標データから、HR 機能に重要な残基を推定した。この構造科学的予測から NpHR 変異体 (25 アミノ酸残基点変異, 2 ループ領域の部分削除体) を大腸菌発現系により作製した。機能型タンパク質として得られる試料について、可視光波長領域の吸収スペクトル

観測を行い、吸収極大波長  $\lambda_{max}$  の変化を解析することができた。特にループ領域の変異体試料データの系統的解析によって、 $\lambda_{max}$  シフトが反転する異常シフトを発見した。

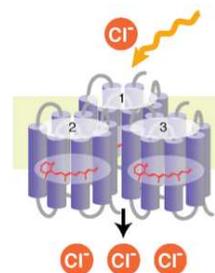
(2) HR 変異体の静的構造安定性評価

実験 (1) で得られた試料から  $\lambda_{max}$  シフトを示す候補について Cl<sup>-</sup> 解離定数の決定、可視 CD 測定による 3 量体形成能の測定、退色速度から構造安定性実験を実施した。特にループ領域の系統的部分削除体の  $\lambda_{max}$  シフトが反転する異常シフトは、ループ長の構造安定性とも強い相関があることが解明された。さらに本研究で作製された試料についてフラッシュフォトリスによる可視光レーザーパルスによる過渡的吸収変化のフォトアクティビティ解明し、静的構造安定性との関係解明が課題として絞り込まれた。

(3) 計画を超えた成果と課題

古細菌由来の天然型 HR (可視吸収極大吸収波長が 578nm) の系統的な変異体の作製により、極大吸収波長シフトに効果がある特定アミノ酸残基を特定し、最大 10nm のシフトが起こることが発見された。本研究では 7 回膜貫通ヘリックスのループ領域をターゲットとしたが、他の領域をさらに検討することで、波長シフト幅やシフト方向を最適化する研究が今後重要である。

一方、HR 分子同士には 3 量体形成能があり、この 4 次構造形成によって HR 分子の構造安定化や光誘起反応への機能変調のオリジン研究展開が期待できた。そのためシアノバクテリア *Gloeobacter* のロドプシンを対照区とし、古細菌 HR の 3 量体形成能とは異なるリバーストリマーを新規に証明した。以上の成果は学術論文および海外国際会議で発表し、今後、新規 HR などの解析による高感度化に向けたさらなる研究展開が期待できた。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

(1) S. Hayashi, J. Tamogami, T. Kikukawa, H. Okamoto, K. Shimono, S. Miyauchi, M. Demura, T. Nara, N. Kamo, Thermodynamic Parameters of Anion Binding to Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis* by Isothermal Titration Calorimetry, *Biophysical Chemistry*, 査読有, 172, 2013, 61-67  
DOI: 10.1016/j.bpc.2013.01.001

(2) T. Tsukamoto, T. Kikukawa, T. Kurata, K.H. Jung, N. Kamo, M. Demura, Salt Bridge in the Conserved His-Asp Cluster in *Gloeobacter Rhodopsin* Contributes to Trimer Formation, *FEBS Lett.*, 査読有, 587, 2013, 322-327  
DOI: 10.1016/j.febslet.2012.12.022

(3) J. Tamogami, T. Kikukawa, T. Nara, K. Shimono, M. Demura, N. Kamo, Naoki, The Photo-induced Proton Release in *Proteorhodopsin* at Low pH: The Possibility of the pKa Decrease of Asp227, *Biochemistry*, 査読有, 51, 2012, 9290-9301  
DOI: 10.1021/bi300940p

(4) L. Reissig, T. Iwata, T. Kikukawa, M. Demura, N. Kamo, H. Kandori, Y. Sudo, Influence of halide binding on the hydrogen bonding network in the active site of *Salinibacter* sensory rhodopsin I, *Biochemistry*, 査読有, 51, 2012, 8802-8813  
DOI: 10.1021/bi3009592

(5) Y. Furutani, K. Fujiwara, T. Kimura, T. Kikukawa, M. Demura, H. Kandori, Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation, *J. Phys. Chem. Lett.*, 査読有, 3, 2012, 2964-2969  
DOI: 10.1021/jz301287n

(6) K. Muroda, K. Nakashima, M. Shibata, M. Demura, H. Kandori, Protein-Bound Water as the Determinant of Asymmetric Functional Conversion between Light-Driven Proton and Chloride Pumps, *Biochemistry*, 査読有, 51, 2012, 4677-4684  
DOI: 10.1021/bi300485r

(7) T. Tsukamoto, T. Sasaki, K. J. Fujimoto, T. Kikukawa, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, N. Kamo, M. Demura, Homo-trimer

Formation and Dissociation of *pharaonis* Halorhodopsin in Detergent System, *Biophysical J.*, 査読有, 102, 2012, 2906-2915  
DOI: 10.1016/j.bpj.2012.05.008

(8) J. Tamogami, T. Kikukawa, Y. Ikeda, M. Demura, T. Nara, N. Kamo, Photo-induced Bleaching of Sensory Rhodopsin II (Phoborhodopsin) from *Halobacterium salinarum* by Hydroxylamine: Identification of the Responsible Intermediates, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 査読有, 106, 2012, 87-94  
DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.10.009

(9) T. Asakura, H. Nishi, A. Nagano, A. Yoshida, Y. Nakazawa, M. Kamiya, M. Demura, NMR analysis of the fibronectin cell-adhesive sequence, Arg-Gly-Asp, in a recombinant silk-like protein and a model peptide, *Biomacromolecules*, 査読有, 12, 2011, 3910-3916  
DOI: 10.1021/bm2011196

(10) Y. Yamashita, T. Kikukawa, T. Tsukamoto, M. Kamiya, T. Aizawa, K. Kawano, S. Miyauchi, N. Kamo, M. Demura, Expression of *salinarum* halorhodopsin in *Escherichia coli* cells: solubilization in the presence of retinal yields the natural state, *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有, 1808, 2011, 2905-2912  
DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.08.035

(11) G. Dai, Y. Zhang, J. Tamogami, M. Demura, N. Kamo, H. Kandori, T. Iwasa, An amino acid residue (S201) in the retinal binding pocket regulates the photoreaction pathway of phoborhodopsin, *Biochemistry*, 査読有, 50, 2011, 7177-7183  
DOI: 10.1021/bi200598r

[学会発表] (計 43 件)

(1) 田巻 初、江川 文子、神谷 昌克、菊川 峰志、相沢 智康、河野 敬一、藤原 敏道、出村 誠、三次元固体 NMR 法による膜タンパク質ハロロドプシンの研究、日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日~22日、名古屋国際会議場(名古屋市)

(2) 菊川 峰志、小久保 麻美、塚本 卓、橋本 革、井原 邦夫、加茂 直樹、出村 誠、ハロロドプシンの光反応サイクル中に起こるカロテノイドの吸光度変化、日本蛋白質科学会年会、2012年6月20日~22日、名古屋

屋国際会議場（名古屋市）

(3) Demura Makoto, Structure and Molecular Function of Halorhodopsin, 日本生物物理学会年会（招待講演）, 2012年09月22日～24日, 名古屋大学東山キャンパス（名古屋市）

(4) 長谷見 崇俊、菊川 峰志、神谷 昌克、相沢 智康、河野 敬一、Kwang-Hwan Jung、加茂 直樹、出村 誠, Photo-induced proton transfer of Anabaena sensory rhodopsin, 日本生物物理学会, 2012年9月21日～24日, 名古屋大学東山キャンパス（名古屋市）

(5) 塚本 卓、菊川 峰志、神谷 昌克、相沢 智康、河野 敬一、Jung Kwang-Hwan、加茂 直樹、出村 誠, Homo-trimeric assembly of a cyanobacterial ion-pump Gloeobacter rhodopsin グロエオバクターロドプシンの三量体形成に関する研究, 日本生物物理学会, 2012年9月21日～24日, 名古屋大学東山キャンパス（名古屋市）

(6) Takashi Tsukamoto, Takashi Kikukawa, Masakatsu Kamiya, Tomoyasu Aizawa, Keiichi Kawano, Kwang-Hwan Jung, Naoki Kamo and Makoto Demura, Homo-trimeric structure of Gloeobacter rhodopsin is regulated by the protonation state of Asp121, a counterion of the protonated Schiff base, 15th Int Conf. Retinal Proteins, 2012年09月30日～10月05日, Monte Verità, Ascona, (Switzerland)

(7) Takatoshi Hasemi, Takashi Kikukawa, Masakatsu Kamiya, Tomoyasu Aizawa, Keiichi Kawano, K.-H. Jung, Naoki Kamo and Makoto Demura, When does halorhodopsin capture and release Cl<sup>-</sup> during photocycle? Examination by spectrum changes of an intrinsic voltage-sensitive dye, Bacterioruberin, 15th Int Conf. Retinal Proteins, 2012年09月30日～10月05日, Monte Verità, Ascona, (Switzerland)

(8) 田巻 初、江川 文子、神谷 昌克、菊川 峰志、相沢 智康、河野 敬一、藤原 敏道、出村 誠, 固体 NMR におけるタンパク質連鎖帰属への GFT NMR 法の応用, NMR 討論会, 2012年11月8日～10日, ウィンクあいち(名古屋市)

(9) Kousuke Shibasaki, Takashi Kikukawa, Masakatsu Kamiya, Tomoyasu Aizawa, Keichi Kawano, Naoki Kamo,

Makoto Demura, Volume change during the Cl<sup>-</sup> transport of Natronomonas pharaonis halorhodopsin, 日本生物物理学会年会, 2011年9月16日～18日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス（兵庫県）

(10) 高梨 善彦、神谷 昌克、熊木 康裕、菊川 峰志、相沢 智康、河野 敬一、出村 誠, 膜蛋白質・ハロロドプシンの第一細胞外ループペプチドの発現・精製と NMR 解析, ペプチド討論会, 2011年9月27日～29日, 札幌コンベンションセンター（札幌市）

(11) Hajime Tamaki, Marika Higuchi, Ayako Egawa, Masakatsu Kamiya, Takashi Kikukawa, Tomoyasu Aizawa, Keiichi Kawano, Toshimichi Fujiwara, Makoto Demura, Three Dimensional Solid-state NMR study of 7TM-Halorhodopsin, ISNMR2011, The 50th Annual Meeting of the NMR Society of Japan, 2011年11月15日～18日, 大さん橋ホール（横浜市）

〔図書〕（計2件）

(1) 出村 誠（共著）, エヌ・ティー・エス、ハロロドプシンの構造と分子機能解析『オプトジェネティクス（光遺伝学）-光工学と遺伝子による行動制御技術の最前線-』, 2013, 24-33

(2) 出村 誠（分担）, コロナ社, 広がる NMR の世界-40 人の研究者からの熱いメッセージ-（朝倉哲郎編著）, 2011, 42-45

〔その他〕

ホームページ等

“タンパク質にかくされた” プロテイン・コード”を解く！

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/info/ana/research2.html>

ダイナミクスインフォマティクス「光で動くタンパク質・イオンポンプ」

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/info/ana/topics/2006/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

出村 誠 (DEMURA MAKOTO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70188704

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし