

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23687019

研究課題名(和文) 光情報伝達のサブ・ピコ秒分解能での全経路詳細解析

研究課題名(英文) Investigation of whole photo signal transduction cascade at high spatial and temporal resolutions

研究代表者

須藤 雄気 (Sudo, Yuki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10452202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体中に存在するタンパク質分子は、時々刻々とその形を変化させることで、様々な生理機能を担っている。そのため、タンパク質分子の本質的な理解には、「時々刻々=時間」・「形=空間」の2つの側面からの理解が重要となる。本研究では、光受容体の1種であるレチナールタンパク質による光情報伝達を、様々な「時間」および「空間」分解能で理解することを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Protein molecules are working in organisms with changes in spatial and temporal domains, resulting in a variety of biological functions. Thus it is essential to understand the proteins from the spatial and temporal aspects. In this study, we focused on photo signal transduction mechanism regulated by the photoactive retinal proteins and we investigated it at various spatial and temporal resolutions.

研究分野：生物物理学

キーワード：情報伝達 光 構造変化 レチナールタンパク質 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質分子は、時々刻々とその形を変化させることで、様々な生理機能を担っている。したがって、その本質的な理解には、様々な「時間」・「空間」領域での理解が重要となる。本研究では、ビタミンAを発色団とする光受容膜タンパク質である「レチナールタンパク質」に着目し、研究を行った。

(1) 時間分解測定：これまでにレチナールタンパク質、あるいは膜タンパク質の先端計測対象として、プロトンポンプ型分子であるバクテリオロドプシン (BR：1971年に発見) がよく用いられてきた。一方で、情報伝達型のレチナールタンパク質研究 (センサリーロドプシン, SR：1984年に発見) はこれまでにあまり例がなく、特に様々な時間領域で統合的に解析された例は皆無であった。

(2) 空間分解測定：レチナールタンパク質研究において、そのほとんどは上記 BR を用いた研究であり、情報伝達型のレチナールタンパク質研究はそれほど例が無かった。特に様々な空間領域で統合的に解析された例は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では、主に情報伝達 (光センサー) 型のレチナールタンパク質に着目し、その情報伝達機能の詳細を詳らかにすることを目的とした。

(1) 時間分解測定：分子進化に関わるペタ (10の15乗秒) から、タンパク質が大域的な構造変化を起こすピコ秒 (10の-12乗秒) までの 27 桁におよぶ「時間」分解測定を行い、連続的な分子の変化を活写することで、その分子機能を詳らかにすること。

(2) 空間分解測定：動物個体の応答に関わるセンチメートル (10の-2乗メートル) から、原子レベルが議論できるオングストローム (10の-10乗メートル) における 8 桁の「空間」分解測定を行い、異なる階層間での分子の形とその変化を詳らかにすること。

3. 研究の方法

in vitro 解析においては、大腸菌や好塩菌などの組み換え体を利用して発現・精製したものをを用いた。細胞膜での解析が必要な場合は、フォスファチジルコリンやフォスファチジルグリセロールなどのリン脂質に可溶化試料を再構成した試料を用いた。*in vivo* 解析においては、線形動物・線虫や大腸菌、好塩菌などを材料に、レチナールタンパク質遺伝子を導入した組み換え体を用いて研究を行った。

(1) 時間分解測定：ナノ秒 (10の-9乗秒) からフェムト秒 (10の-15乗秒) における測

定は、チタンサファイアレーザーもしくは Nd:YAG レーザーを励起光および観測光として行った。マイクロ秒 (10の-6乗秒) から分 (60秒) の領域での測定は、ストロボフラッシュフォトリススを用いて行った。それより遅い時間領域の解析は、分子系統樹から推測された祖先型分子の機能・構造解析や、異なる機能を持つ分子間の機能変換の実現により行った。

(2) 空間分解測定：センチメートル (10の-2乗メートル) からマイクロメートル (10の-6乗メートル) の領域での解析は、動物・微生物個体にレチナールタンパク質を導入し、その運動性や形態などの光依存的変化を観測することで行った。マイクロメートルから、ナノメートル (10の-9乗メートル) の解析は、振動分光法 (ラマン分光および赤外分光) や NMR 分光法により行った。それ以下の空間領域 (10の-10~10の-11乗メートル) における解析は、X線結晶構造解析や精密赤外分光測定により行った。

4. 研究成果

以下の通り、時間および空間分解測定ともに、当初の計画を上回る成果を得た。

(1) 時間分解測定：誘因光センサーである SRI において、過渡吸収変化およびフランクコンドン状態からの蛍光変化を観測することに成功し、フェムト秒 (10の-15乗秒) におけるレチナール発色団の励起・振動緩和とその時定数を決定することに成功した (雑誌論文：4)。ピコ秒 (10の-12乗秒) 領域では、発色団近傍のトリプトファン残基の特異的な変化を見出した (雑誌論文：4, 14)。ナノ秒 (10の-9乗秒) 領域では、タンパク質骨格のヘリックスやシートなどの二次構造変化の観測に成功した (雑誌論文：8)。マイクロ秒 (10の-6乗秒) からミリ秒 (10の-3乗秒) における発色団、水分子、結合したイオン、およびタンパク質骨格の広域的变化を観測することに成功した (雑誌論文：3, 5, 7)。秒からペタ秒 (10の15乗秒) の領域において、分子がどのように変化し、機能分化してきたかを、機能変換や進化上の過渡的分子の同定・解析を通じて明らかにした (雑誌論文：1, 11, 12)。これらを統合し、発色団の電子励起から、機能発現、さらには機能分化・進化における総合的理解に結びついたと考え、それらについては、複数の総説・解説として発表することができた。

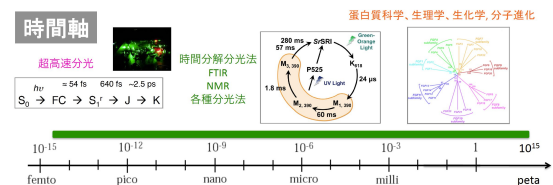


図1. 時間分解測定で得られた成果 (30 桁)

(2) 空間分解測定：センチメートル(10の-2乗メートル)の動物個体で起こる光誘起運動変化を、光学顕微鏡下で観察し、新しい光操作ツールの開発に成功した(雑誌論文：6)。また、マイクロメートル(10の-6乗メートル)領域での微生物の運動制御から、光でタンパク質の増減をコントロール出来る新しい手法の開発に成功した(雑誌論文：10)。さらに、ナノメートル(10の-9乗メートル)での4次構造変化(雑誌論文：2)、水分子やアミノ酸側鎖の水素結合変化(雑誌論文：9, 13)の検出に成功するとともに、さらにオングストローム(10の-10乗メートル)分解での分子構造の決定にも成功した。これらを統合し、原子・分子レベルから、細胞・動物個体までを俯瞰した一連の空間軸における変化を統一的・統合的に理解するモデルを提案し、複数の総説・解説として発表することができた。

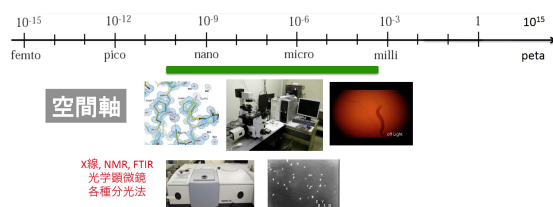


図2. 空間分解測定で得られた成果(8桁)

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16件)

Inoue K., Tsukamoto T., Shimono K., Suzuki Y., Miyauchi S., Hayashi S., Kandori H. & *Sudo Y. Converting a light-driven proton pump into a light-gated proton channel, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, vol. 137, 2015, pp. 3291-3299
DOI: 10.1021/ja511788f

Tsukamoto T., Demura M. & *Sudo Y. Irreversible trimer to monomer transition of thermophilic rhodopsin upon thermal stimulation, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, vol. 118, 2014, pp. 12383-12394
DOI: 10.1021/jp507374q

Yomoda H., Makino Y., Tomonaga Y., Hidaka T., *Kawamura I., Okitsu T., Wada A., *Sudo Y. & *Naito A. Color discriminating retinal configurations of sensory rhodopsin I by photo-irradiation solid state NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, vol. 53, 2014, pp. 6960-6964
DOI: 10.1002/anie.201309258

*Sudo Y., Mizuno M., Wei Z., Takeuchi S.,

*Tahara T. & *Mizutani Y. The early steps in the photocycle of a photosensor protein sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, vol. 118, 2014, pp. 1510-1518
DOI: 10.1021/jp4112662

Tsukamoto T., Inoue K., Kandori H., & *Sudo Y. Thermal and spectroscopic characterization of a proton pumping rhodopsin from an extreme thermophile, *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 288, 2013, pp. 21581-21592
DOI: 10.1074/jbc.M113.479394

*Sudo Y., Okazaki A., Ono H., Yagasaki J., Sugo S., Kamiya M., Reissig L., Inoue K., Ihara K., Kandori H., Takagi S. & Hayashi S. A blue-shifted light-driven proton pump for neural silencing, *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 288, 2013, pp. 20624-20632
DOI: 10.1074/jbc.M113.475533

Mori A., Yagasaki J., Homma M., Reissig L. & *Sudo Y. Investigation of the chromophore binding cavity in the 11-cis acceptable microbial rhodopsin MR, *Chem. Phys.*, 査読有, vol. 419, 2013, pp. 23-29
DOI: 10.1016/j.chemphys.2012.11.020

*Furutani Y., Okitsu T., Reissig L., Mizuno M., Homma M., Wada A., Mizutani Y. & *Sudo Y. Large spectral change due to amide modes of a β -sheet upon the formation of an early photointermediate of middle rhodopsin, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, vol. 117, 2013, pp. 3449-3458
DOI: 10.1021/jp308765t

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

Irieda H., Morita T., Maki K., Homma M., Aiba H. & *Sudo Y. Photo-induced regulation of the chromatic adaptive gene expression by *Anabaena* sensory rhodopsin, *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 287, 2012, pp. 32485-32493
DOI: 10.1074/jbc.M112.390864

Inoue K., Reissig L., Sakai M., Kobayashi S., Homma M., Fujii M., Kandori H. & *Sudo Y. Absorption spectra and photochemical reactions in a unique photoactive protein,

middle rhodopsin MR, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, vol. 116, 2012, pp. 5888-5899
DOI: 10.1021/jp302357m

*Sudo Y., Yuasa Y., Shibata J., Suzuki D. & Homma M. Spectral tuning in sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*, *J. Biol. Chem.*, 査読有, vol. 286, 2011, pp. 11328-11336
DOI: 10.1074/jbc.M110.187948

Irieda H., Reissig L., Kawanabe A., Homma M., Kandori H. & *Sudo Y. Structural characteristics around the β -ionone ring of the retinal chromophore in *Salinibacter* sensory rhodopsin I, *Biochemistry*, 査読有, vol. 50, 2011, pp. 4912-4922
DOI: 10.1021/bi200284s

+Mizuno M., +Sudo Y., Homma M. & *Mizutani Y. (+These authors contributed equally to this work) Direct observation of the structural change of Tyr174 in the primary reactions of sensory rhodopsin II, *Biochemistry*, 査読有, vol. 50, 2011, pp. 3170-3180
DOI: 10.1021/bi101817y

[学会発表](計25件)

須藤雄気, 光受容レチナルタンパク質の構造・機能解析: 光 + タンパク質 = 薬!?, 日本薬学会第135年会・シンポジウム「受容体とトランスポーターの構造薬理学」, 2015年3月27日, 神戸学院大学(兵庫県神戸市).

須藤雄気, レチナルタンパク質が拓くフォトクロミックバイオマテリアル, 第3回日本バイオマテリアル学会中四国シンポジウム, 2015年1月28日, 岡山大学鹿田キャンパス(岡山県岡山市).

須藤雄気, 高い安定性を示す新規レチナルタンパク質 TR の機能・構造と光操作への展開, 新学術領域研究「柔らかな分子系」第8回ワークショップ, 2015年1月25日, 岡山いこいの村(岡山県瀬戸内市).

須藤雄気, レチナルタンパク質による光合成モドキが世界を救う!?, 自然科学研究機構分間連携ワークショップ, 2014年10月24日, 三谷温泉松風園(愛知県蒲郡市).

Sudo Y., Molecular-based rational design and engineering of microbial retinal proteins for optogenetics, The 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014年10月9日, 長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市(日本)).

須藤雄気, Converting a Light-driven Proton Pump into a Light-gated Ion Channel, 第52回日本生物物理学学会年会, 2014年9月26日,

札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

Sudo Y., Rational Design and Engineering of Photoactive Retinal Proteins, The 2nd Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications, 2014年6月17日, 淡路夢舞台(兵庫県淡路市(日本)).

Sudo Y., Photobiophysical chemistry: What should we learn from retinal proteins?, iCeMS Symposium on Mesoscopic Chemical Biology: Integrated Chemical-Physical Systems Towards Cell Control, 2014年2月2日, 京都大学(京都府京都市(日本)).

須藤雄気, 微生物型レチナルタンパク質の非常識で未来を拓く, 分子科学研究所研究会「ロドプシン研究の故きを温ねて新しきを知る」, 2013年11月19日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市).

須藤雄気, 光受容レチナルタンパク質の常識と非常識, 東京工業大学第1回生体分子専攻・若手コロキウム, 2013年8月29日, 東京工業大学(神奈川県横浜市).

須藤雄気, ロドプシンの、ロドプシンによる、ロドプシンのための蛋白質科学, 大阪大学蛋白研セミナー, 2013年4月20日, 大阪大学(大阪府吹田市).

須藤雄気, 光操作技術の基盤となるロドプシン分子の多様性と可能性, 第7回・NIBB バイオイメーキングフォーラム, 2012年11月26日, 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市).

須藤雄気, 分子からのボトムアップ研究で拓く光細胞・個体操作, 「細胞を創る」研究会5.0, 2012年11月21日, 東京工業大学(神奈川県横浜市).

須藤雄気, 微生物の光利用と光制御ツール開発, 「次世代の光の利用と物質材料・生命機能」研究会, 2012年10月20日, 早稲田大学(東京都新宿区).

Sudo Y., Functional diversity of sensory rhodopsins from microbes, The 15th International Conference on Retinal Proteins, 2012年9月30日, Ascona (Switzerland).

須藤雄気, 「Simple is the first?」: 微生物由来レチナル蛋白質の分子進化と多様性, 第14回日本進化学会年会シンポジウム, 2012年8月21日, 首都大学東京(東京都八王子市).

須藤雄気, 微生物型光受容タンパク質の解析と光制御ツール開発, 第17回日本光生物学協会年会, 2012年8月18日, 大阪大学(大阪府吹田市).

須藤雄気, 光生物物理学-基礎研究のススメ. 渴望される薬学部生, 北海道大学薬学部第19回「先輩と語る」講演会, 2012年7月2日, 北海道大学(北海道札幌市).

須藤雄気, 色付きタンパク質の生物学的・化学的・物理学的研究の「面白さ」と

奥深さ, 第1回超異分野学会, 2012年3月17日, お茶の水大学(東京都文京区).

須藤雄気, 微生物型ロドプシタンパク質の利用を考える, NINS「若手研究者による分野間連携研究プロジェクト」冬の会議, 2012年1月13日, 箱根宿泊所四季の湯強羅静雲荘(神奈川県箱根町).

- ⑳ 須藤雄気, 分子科学研究にとっての光受容タンパク質, 特定領域研究「高次系分子科学」第12回ミニ公開シンポジウム, 2011年10月26日, 三谷温泉松風園(愛知県蒲郡市).
- ㉑ Sudo Y. et al., Molecular and evolutionary aspects of microbial sensory rhodopsin, The 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology (AOCP), 2011年9月31日, 奈良市民ホール(奈良県奈良市(日本)).
- ㉒ 須藤雄気 他, What should we learn from sensory rhodopsins? : Signal transfer mechanism and its application for protein expression, 第49回日本生物物理学会年会シンポジウム, 2011年9月17日, 兵庫県立大学(兵庫県姫路市).
- ㉓ 須藤雄気 他, 微生物型ロドプシタンパク質における特異な光反応, 生理学研究所研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える-静止画から動画へ-」, 2011年9月9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市).
- ㉔ 須藤雄気, 7回膜貫通型色素結合タンパク質(ロドプシン)の調製法, 第11回・日本蛋白質科学会年会「蛋白質科学会アーカイブワークショップ」, 2011年6月9日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市).

[図書](計11件)

Katayama K., Sekharan S. & *Sudo Y., Color tuning in retinylidene proteins, *Optogenetics*, Chapter 7, in press

塚本卓, 須藤雄気, 好熱性細菌のレチナルタンパク質, *生物物理*, vol. 55, 2015, 92-94.

土井聡子, 須藤雄気, ビタミンAアルデヒドを発色団とするレチナルタンパク質の多様性と可能性, *ビタミン*, vol. 89, 2015, 83-86.

須藤雄気, 神取秀樹, オプトジェネティクス(光遺伝学)の原理と基礎, *ファルマシア*, vol. 50, 2014, 958-962.

須藤雄気, 塚本卓, 膜タンパク質の可溶化(抽出)(2), *蛋白質科学会・アーカイブ*, 7, 2014, e079.

Inoue K., Tsukamoto T. & *Sudo Y., Molecular and evolutionary aspects of

microbial sensory rhodopsins, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1837, 2014, 562-577.

Tsukamoto T. & *Sudo Y., Sensory rhodopsins, In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester., 2014, DOI: 10.1002/9780470015902.a0022838

須藤雄気, ロドプシンの波長制御と光情報変換機構, *オプトジェネティクス~光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線~*, 第2章4節, 2013, pp.79-91.

Sudo Y., Transport and sensory rhodopsins in microorganisms, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, the 3rd edition, CRC Press, Boca Raton, 2012, pp. 1173-1193.

須藤雄気 他, 光受容タンパク質による微生物の光センシングの理解とその利用, *薬学雑誌* vol. 132, 2012, 407-416.

須藤雄気 他, 高度好塩性微生物の“目”: センサリーロドプシンへのCl⁻イオン結合の役割, *極限環境微生物学会誌*, vol. 10, 2011, 23-29.

[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

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/bukkka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 雄気 (SUDO, Yuki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号: 10452202

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

塚本 卓 (TSUKAMOTO, Takashi)