

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560069

研究課題名(和文)構造変化遅延化色素蛋白質を用いた可視化教材の開発

研究課題名(英文)Visualization of conformational changes of a chromoprotein.

## 研究代表者

富岡 寛顕 (TOMIOKA, Hiroaki)

埼玉大学・教育学研究科・教授

研究者番号：50212072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生命活動に置いて重要な役割を担う蛋白質が作用するときにはその形(構造)を変化させる。通常蛋白質の多くは無色であり、且つその形の変化は極めて速いため、肉眼で見ることにはできない。しかしこれが可能になると蛋白質が機能するという事について実感を伴いながらの理解に繋がる。バクテリオロドプシンという色素蛋白質に部位特異的アミノ酸置換を導入した変異蛋白質を作製し、ある条件下に置くと光誘起の構造変化速度が約千倍遅延化し、肉眼でも構造変化に伴う色の変化を見ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Proteins change their structures when they function. The rate of the structural changes are too fast to see. A cycle of conformational changes of a purple-colored chromoprotein, bacteriorhodopsin(bR) occurs rapidly in 10 ms. This structural transition accompanys a series of intermediates with distinctive colors. A mutation on bR with single amino acid substitution made the cyclic changes slower enough to see by our eyes.

研究分野：蛋白質化学

キーワード：蛋白質 構造変化 色素蛋白質 可視化 遅延化 教材化

## 1. 研究開始当初の背景

生物体において水以外で含量が最も多いのが蛋白質であり、蛋白質を理解することは生命の理解においても極めて重要である。蛋白質が作用するとき、例えば、酵素であれば基質酵素複合体形成時には誘導適合によりその形を変えることは1960年代から知られているが、半世紀以上過ぎているにもかかわらず、現在の高校と大学の教育では静的な面のみを教えることが多く、実験などでもその動的な面に焦点を当てるものはほとんど無い。動的な性質を測定するための装置は高価であるために保有数が少なく、なお且つ装置のメンテナンスと測定時には一定水準以上の技術が必要であり、先端的研究レベルでのみ用いられる。このような蛋白質の動的な性質を高価な装置無しで可視化できれば蛋白質の魅力、延いては生命のすばらしさを多くの場所で多くの人に伝えることが可能となる。しかしながらこのようなことは極めて難しく最近までは挑戦しようとさえ思えなかった。

高度好塩菌という古細菌が作る光感受性の色素蛋白質(細菌型レチナール蛋白質)は、高等動物のレチナール蛋白質のように光照射すると蛋白質部分と補欠分子のレチナール(ビタミンAアルデヒド)とに分解することなく、繰り返し光励起が可能であり極めて安定性が高い。細菌型レチナール蛋白質は種類によっては大量に得られるものもあり、教材とするには有力な候補であるが、光励起後に起こる構造変化はフェムト秒( $10^{-15}$  秒)~ミリ秒( $10^{-3}$  秒)の時間領域で起こり終了してしまう。そのために極短パルス光照射装置を伴う高価な時間分解分光光度計でなければ検出できず、肉眼で見ることにはできない。1990年頃から、細菌型レチナール蛋白質の機能解析のために高度好塩菌や大腸菌での発現が行われるようになり、米独でアミノ酸置換の細菌型口

ドブシンが作製されるようになったが、当初は得られる試料の量が少なくとても教材にできるようなものでは無かった。1997年に新たな大量発現系が作製され、アミノ酸置換蛋白質の大量調製も夢ではなくなってきた。申請者は米独に先駆けて新規の細菌型レチナール蛋白質を1985年に発見命名し、単離法を確立するなど長年細菌型レチナール蛋白質の研究を行い、2008年以降は大腸菌や高度好塩菌を用いた発現系を導入し、安定に細菌型レチナール蛋白質を大量に得られるようになってきた。培養から精製の装置、さらにレーザ光励起の時間分解分光光度計や通常の定常状態の分光光度計の整備も進み、色素蛋白質の性質を分光学的に調べる体制はほぼ整った。

細菌型レチナール蛋白質機能解明という先端的な研究と共に教育学部着任以来、光と色素に関する教材研究も進めている。細菌型レチナール蛋白質研究で作製されたアミノ酸置換変異蛋白質の内いくつか構造変化を遅くできる可能性を示しているため、それらを用いて細菌型レチナール蛋白質の構造変化の可視化教材作製に挑戦している状況であった。

## 2. 研究の目的

生命活動に置いて重要な役割を担う蛋白質が作用するときにはその形(構造)を変化させる。通常蛋白質の多くは無色であり、且つその形の変化は極めて速いために、肉眼で見ることにはできない。しかしこれが可能になると蛋白質が機能するという点について実感を伴いながらの理解に繋がる。自身が色を持ち構造変化に伴い色を変える光感受性の蛋白質にアミノ酸置換の変異を導入し構造変化を遅くすることができれば、高価な装置無しで広く用いることのできる教材作製が可能となる。そういう蛋白質分子の構造変化の可視化教材作製を本研究の

目的とした。

### 3. 研究の方法

蛋白質分子の構造変化可視化のための最有力候補は高度好塩菌の光感受性色素蛋白質である。その蛋白質中の特定のアミノ酸残基を他の残基に置換した変異蛋白質を作製する。用いる蛋白質の発現系としては高度好塩菌と大腸菌の2つを試し、得られた変異蛋白質が光照射時に起こす構造変化を分光学的に測定し、フォトサイクルの中間体の寿命が元々の野生型のものより遅く肉眼で見て変化が分かり易い時間範囲である1 - 10秒になるようなものを目指して変異体を作製する。安定性や発現量なども検討し、必要な条件を満たすものが得られたならば、教材として取り扱い易いサンプルの形状や容器さらに観察条件についても種々試す。

研究対象となる光感受性の色素蛋白質であるレチナル蛋白質はオプシンと呼ばれる蛋白部分と補欠分子レチナルとから成る。高度好塩菌のレチナル蛋白質としては4種類が知られている。光駆動のプロトンポンプであるバクテリオロドプシン(bR)、光駆動の塩素イオンポンプであるハロロドプシン(hR)、赤色光に集まる正の走光性の光受容体であるセンサーロドプシン(sR)と青色光から逃げる負の走光性の光受容体であるフォボロドプシン(pR)である。これらの色素蛋白質のフォトサイクルの中間体の寿命が遅いものを得るためには、遺伝子操作を用いて特定のアミノ酸を別なアミノ酸に置換した変異蛋白質を作製するというアプローチがある。変異蛋白質を得るためには蛋白質の発現系が必要であるが、高度好塩菌のレチナル蛋白質の発現系としては大きく2つのものが知られている。好塩菌それ自身で行うものと大腸菌を用い

るものであり、それぞれに長所短所がある。大腸菌の発現系は変異体作成が容易(キットが市販)、発現に関する知見も多く、世代時間が短いので培養に要する時間が短いという長所がある反面、発現蛋白質の細胞からの精製に用いる可溶化剤が高価であり、手順が煩雑という短所も有る。大腸菌発現系を用いている研究室は日本国内に複数あり、種々の知見も多く蓄積しているという点は長所である。一方、高度好塩菌の発現系は変異体作成がやや難しく、発現に関する知見も少なく、世代時間が長い(約8時間)ので、培養に時間を要するなどの短所が多いが、細胞からの発現蛋白質の精製が比較的安価で容易である。日本国内には安定した発現系を有する研究室が無く、米独に有る。1990年以降MITのコラーナ研やMPIのオスターヘルト研やUCIのラニー研で行われたbRのアミノ酸の置換体の研究により機能解析がアミノ酸レベルで進んだ。1997年に大腸菌を用いた極めて安定性の高い大量発現系が北大の加茂研で開発され世界中の多くの研究室で利用されている。申請者の研究室でも大腸菌と高度好塩菌の両方の系を導入した。それらを用いて作製した特定のアミノ酸を置換したbRの変異蛋白質のフォトサイクルの中間体の一つであるM中間体(次頁のフォトサイクルの図参照)の寿命が野生型に比べて長くなることが解ったので、そこを足がかりにして研究を始めた。室温で少なくとも数日間安定でなければ教材としては不十分なのでそういう点からも検討を加えた。さらに、取り扱いやすさや試料調製の量についての検討も行った。

### 4. 研究成果

初年度に有望な変異蛋白質を得たので、大量調製を行い種々の性質を天然型蛋白質と

比較しながら調べた。その結果バクテリオロ  
ドプシンという色素蛋白質に部位特異的ア  
ミノ酸置換を導入した変異蛋白質をある条  
件下に置くと光誘起の構造変化速度が約千  
倍遅延化し、肉眼でも構造変化に伴う色の  
変化を見ること、つまり可視化に成功した。現  
在試料の安定性の最適化と実際に教材とす  
るときに有効な提供法について検討を進め  
ている。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

富岡寛顕 (TOMIOKA, Hiroaki)  
埼玉大学・教育学研究科・教授  
研究者番号：50212072

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：