

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01184

研究課題名(和文) 複数の機能単位を連動させる分子機能の科学

研究課題名(英文) Science of molecular function by interlocking multiple functional units

研究代表者

水谷 泰久 (Mizutani, Yasuhisa)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60270469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：PASタンパク質およびロドプシンタンパク質について、機能発現のトリガーとなる変化からそのキーステップに至る過程において、複数の機能部位に起きる構造変化を多面的に観測し、複数の機能部位間の連動性を明らかにした。並行して、明らかになった連動的な構造変化とタンパク質の機能活性の相関を定量的に調べ、どのような構造変化がタンパク質機能を生み出す鍵であるのかを同定した。さらに、鍵となる構造変化の同定に基づき、新規機能をもった人工タンパク質の創成を行うことで、分子機能を生み出す連動性機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学の進展によって、化学者はある機能を持った分子を設計し、それを実際に合成することができるようになった。しかし、複数の機能単位を組み合わせ、互いに連動する、より高度な機能分子を創ることはいまだに困難である。それは合成の技術的な難しさのためではなく、連動させる原理がわからないためであり、原理がわからなければ設計のしようがないためである。タンパク質は高度な連動性機構を持っており、本研究で得られた成果は連動性をもった機能分子を設計する重要な知見を与える。

研究成果の概要(英文)：For PAS and rhodopsin proteins, we observed the structural changes taking place at multiple functional sites in the process from the triggering change to the key step of biological function, and clarified the linkage between the multiple functional sites by using time-resolved resonance Raman spectroscopy. We also quantitatively examined the correlations between the clarified coupled conformational changes and the functional activity of the proteins. The observed correlations identified which conformational changes are key to the protein functions. Furthermore, based on the identification of key structural changes, the creation of chimeric proteins with novel functions has elucidated the interlocking mechanisms that produce molecular functions.

研究分野：生物物理化学

キーワード：アロステリー 振動分光

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能は、分子内に含まれる複数の機能部位が互いに連動的に働くことによって生み出される。例えば、光駆動型イオン輸送タンパク質では、光吸収によって発色団が構造変化すると、タンパク質構造に逐次的に変化が起き、この動きによってイオン結合部位の親和性が変わり、イオンがタンパク質内を輸送される。また、ガスセンサータンパク質では、ガス分子がタンパク質に結合すると、結合部位に構造変化が生じ、その変化が触媒部位の構造を変化させ酵素活性の制御がなされる。このような複数の機能部位が連動している性質はアロステリーとよばれるもので、そこではタンパク質の構造変化が本質的に重要な役割を果たす。

化学の進展によって、化学者はある機能を持った分子を設計し、それを実際に合成することができるようになった。しかし、複数の機能単位を組み合わせ、互いに連動する、より高度な機能分子を創ることはまだに困難である。それは合成の技術的な難しさのためではなく、連動させる原理がわからないためであり、原理がわからなければ設計のしようがないためである。

タンパク質のアロステリー機構が理解できれば、それは連動性をもった機能分子を設計する重要な知見を与えるはずである。物理化学はこれまで比較的小さな分子を対象に発展してきた。しかし、タンパク質にみられる連動性は、小さな分子の研究だけではわからない分子の新しい特質を教えてくれる。このように、連動機構の理解は分子機能にとって本質的な問題であり、タンパク質の理解のみに留まらず、広く分子の科学として重要な研究課題である。

2. 研究の目的

タンパク質の物理化学研究の難しさは、タンパク質の構造と機能の多様性にあり、普遍的な原理を見つけにくい点にある。そこで、本研究ではタンパク質の共通構造に着目した。タンパク質の機能は多彩な機能が共通の立体構造から生まれる例が多くみられる。例えば、細胞に含まれるセンサータンパク質は、光、ガス分子、膜電位など多彩な外部刺激を感知するが、その多くはPASモチーフと呼ばれる共通した立体構造をもつ。また、ロドプシンタンパク質は共通の立体構造を基盤としてイオン輸送、光センサー、チャネルなど多彩な機能を発現する。これらの事実は、連動性に重要な基本構造の存在を強く示唆する。そこで本研究では、機能発現のトリガーとなる変化からそのキーステップに至る過程において、複数の機能部位に起きる構造変化を多面的に観測し、複数の機能部位間の連動性を明らかにした。次に、明らかになった連動的な構造変化とタンパク質の機能活性の相関を定量的に調べ、どのような構造変化がタンパク質機能を生み出す鍵であるのかを同定した。さらに、鍵となる構造変化の同定に基づき、新規機能をもった人工タンパク質の創成を行うことで、分子機能を生み出す連動性の本質を明らかにした。

3. 研究の方法

本研究では、共鳴ラマン分光法がもつ、高い時間分解能で部位選択的な構造情報を与えるという特徴をフルに活用して、タンパク質の構造変化を明らかにした。さらに、イオン輸送活性や酵素活性のデータと併せて、構造変化と機能活性の相関を明らかにした。明らかになった相関に基づいて、新規機能をもった人工タンパク質の創成を行い、理解を検証した。特に、

(1) 共通した立体構造が異なった外部刺激をセンスする連動性の解明

(2) 共通した立体構造が異なったイオンを輸送する連動性の解明

の2つの項目について重点的に研究を行った。

本研究では、タンパク質内の連動的な構造変化を明らかにするために、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、タンパク質中にある複数の機能部位を選択的に観測した。共鳴ラマン分光法は、ラマン散乱の励起に分子の吸収帯に波長を合わせることによって、散乱光強度が 10^4 – 10^6 倍強くなるという現象を利用した振動分光法の一つである。散乱光の強度増大は電子遷移に関わる原子団のみに起きるので、巨大な分子を測定対象としていても、特定の部位の振動スペクトルのみを選択的に観測することができる。例えば、プローブ光の波長が可視領域の場合ヘムやレチナルなどの補欠分子族の振動モードが、220–240 nm付近ではトリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニンの振動モードが、210 nm付近ではポリペプチド骨格のアミド振動が共鳴ラマン効果によって選択的に観測される。本研究では、タンパク質中の複数の部位の構造情報を選択的に得られるという共鳴ラマン分光法の長所を最大限に活かして連動機構の解明を行った。

4. 研究成果

(1) 共通した立体構造が異なった外部刺激をセンスする連動性の解明

酸素依存的なリン酸化酵素であるFixLを主な対象として研究を行った。FixLはマメ科植物の根粒菌に存在する酸素センサーで、酸素結合部位としてヘムを含む。酸素濃度が高い時にはヘムに酸素が結合し酵素活性が抑制され、酸素濃度が低い時にはヘムから酸素が脱離し酵素活性が上昇する。そこで、ヘムに結合した酸素分子が光解離反応を起こすことを利用して、ヘムから酸素を脱離させ、その後起きる、不活性形→活性形への構造変化を時間分解共鳴ラマン分光法で追跡した。酸素結合部位(ヘム)およびタンパク質部分に着目し、その構造変化を明らかにした。FixLはガス分子センサーであるが、多くのセンサータンパク質が同様のPASモチーフと呼ばれる共通した立体構造をもっている。そこで、光センサーとガスセンサーにみられる構造変化の共通点を、スペクトル変化を基にして明らかにした。

① FixLおよびその変異体タンパク質を用いた研究

FixL について、ヘムに結合した酸素分子の脱離に伴うタンパク質の構造ダイナミクスを調べた。野生型と変異体の結果との比較から残基単位でのナノ秒からマイクロ秒にわたる変化の時定数を求めた。得られた時定数は二つのドメインをまたがって近い値を持つこと、またヘムを含むドメインだけでは構造変化の速度が一桁速いことから、二つのドメインが互いに連動することによって構造変化を効率的に伝えていることが示唆された。以下にこの成果を詳しく説明する。

センサードメインに含まれる Tyr201 残基のスペクトル変化は、装置応答時間 (約 50 ns) 内の強度変化と、時定数 $5.2 \pm 0.4 \mu\text{s}$ の指数関数的変化でよく表された。時間分解可視共鳴ラマン分光法で観測されたヘム由来のラマンバンド強度の変化では、センサードメインのみの場合、時定数 $0.2\text{--}0.3 \mu\text{s}$ 、リン酸化ドメインも含む場合、時定数 $1\text{--}3 \mu\text{s}$ の変化が観測されている。ヘムと Tyr201 のスペクトル変化の時定数がよく似ていることから、ヘムと Tyr201 残基周辺の構造変化が連動していることが示唆された。この他に、センサードメインに含まれる Tyr190 残基、リン酸化ドメインに含まれる Tyr297、Tyr379、Tyr496 残基の成分を同様に解析したところ、いずれも一成分の指数関数的変化を示した。

センサードメインに含まれる Tyr190 および Tyr201 残基、リン酸化ドメインに含まれる Tyr297 および Tyr379 残基の変化の時定数はどれもマイクロ秒のオーダーであった。上に述べたようにヘムの構造変化は時定数 $1\text{--}3 \mu\text{s}$ の成分を持つことから、FixL において、酸素の脱離に伴って、ヘム、センサードメインおよびリン酸化ドメインの一部 (Tyr297 と Tyr379 残基の周辺構造) は、ほぼ一体となって構造変化を起こすことが示唆された。これは、リン酸化ドメインの有無によってセンサードメインの構造変化の速さが影響を受けることも一致する。一方、Tyr496 残基が 10 マイクロ秒のオーダーで変化していることから、ヘムの構造変化と連動したタンパク質構造の変化ののち、リン酸化ドメインにはさらに構造変化が起きることがわかった。

以上のように、各 Tyr 残基に由来するスペクトルの成分を求めることで、ドメイン間に互いに連動した構造変化があることが明らかになった。このようなドメイン間の連動した構造変化は FixL の機能制御に重要な役割を果たしていると考えられる。以下の②に示すキメラタンパク質の研究では、ドメイン間の連動性が保存されているかを確認するために、FixL の連動的な構造変化を基準とした。

② キメラタンパク質を用いた研究

ドメイン間の連動性が PAS キナーゼタンパク質一般に共通して見られる性質であるかを調べるために、PAS モチーフをもつ他のセンサータンパク質とでドメイン交換したキメラタンパク質を新たに作製した。酸化還元センサータンパク質のセンサードメインを FixL の酵素ドメインと融合したタンパク質では、酸化還元依存して酵素活性を制御することに成功した。さらに、FixL とこの融合タンパク質では、酸素分子の脱着あるいは電子の授受に対して類似の構造変化を示すことを明らかにした。この成果はタンパク質の連動性に共通した機構があることを示す重要な知見である。以下にこの成果を詳しく説明する。

本研究では、酸化還元センサータンパク質 DOS、一酸化炭素センサータンパク質 NPAS2、金属イオン依存的ヒスチジンキナーゼ PhoQ、芳香族受容タンパク質 AhR、クエン酸依存的ヒスチジンキナーゼ、リンゴ酸/フマル酸依存的ヒスチジンキナーゼ DcuS、 C_4 -ジカルボン酸センサータンパク質 DctB の 8 種類の PAS ドメインタンパク質とのキメラタンパク質の作製を試みた。そのうち、5 種類のキメラタンパク質の発現に成功した。

芳香族受容タンパク質 AhR と FixL キナーゼドメインのキメラタンパク質を作製し、芳香族分子の結合によりリン酸化活性を制御するキメラタンパク質の作製を目指した。これまで使用していた FixL 遺伝子がコードされたプラスミドのセンサードメインに相当する部位に芳香族受容タンパク質 AhR の遺伝子を挿入した。この核酸をタンパク質発現用のプラスミドに組み、さらにこのプラスミドを用いて目的キメラタンパク質を大腸菌発現によって得た。得られた精製キメラタンパク質が、芳香族分子によってリン酸化活性を制御するかを調べた。AhR は、インディゴとよばれる芳香族分子をリガンドとして取り込むことが知られている。キメラタンパク質溶液とインディゴを混合し、混合しない溶液との活性比較を行った。リン酸化活性は Phos-tag SDS-PAGE によって測定した。芳香族の添加によってリン酸化活性が制御されるかを調べた結果、インディゴを添加したキメラタンパク質と、添加していないものとの両方で同程度のリン酸化活性があり、活性の制御は観られなかった。また、FixL と異なり、SDS-PAGE 条件下で二量体を形成していることがわかった。サブユニット間相互作用に影響が加わった可能性がある。

NPAS2 とのキメラタンパク質、DcuS とのキメラタンパク質についてはタンパク質の発現には成功したものの、ヘムの挿入が正しくできないなど、立体構造として安定なタンパク質を得ることができなかった。新たなドメイン間相互作用が立体構造の不安定化をもたらしたと考えられる。

青色光受容タンパク質 PYP と FixL キナーゼドメインのキメラタンパク質を作製し、青色光照射によりリン酸化活性を制御するキメラタンパク質の作製を目指した。PYP の Met100 残基の変異体を作製し、シグナリング状態である pB 状態の寿命を 1000 倍のオーダーで長くすることができた。今後、光照射による活性制御について調べていく予定である。

酸化還元センサータンパク質 DOS と FixL キナーゼドメインのキメラタンパク質を作製し、酸化還元状態の変化によりリン酸化活性を制御するキメラタンパク質 (以下、DOSFixL と表記

する)の作製に成功した。FixLではF α ヘリックスに位置するTyr201とH β シートに位置するGlu234とが水素結合を形成している。水素結合強度を減少させるためにGlu234残基をアスパラギン酸やイソロイシンに置換するとリン酸化活性が失活した。DOSでも同様の位置にAsp84残基が水素結合を形成しており、水素結合強度を減少させるような置換を加えると、FixLと同様にリン酸化活性が失活すると予想される。DOSFixLのAsp84残基をアラニンに置換するとリン酸化活性の失活が起きた。このことから、F α ヘリックス-H β シート間の水素結合がFixL、DOSFixLで共通して活性に関わっていることが示唆された。次に、DOSFixLのキナーゼドメインの構造変化がFixLと共通するかどうかを紫外共鳴ラマンスペクトル測定によって観測した。DOSFixLのヘムの還元に伴う、キナーゼドメインのTyr残基の構造変化を調べるため、ヘムの還元に伴うスペクトル変化をWTと変異体で計算し、さらにWTから変異体のスペクトルを引くことで、置換したTyr残基の寄与を計算した。キナーゼドメインにある3つのTyr残基のうち、Tyr297、Tyr379残基はFixLと同様のスペクトル変化を示していた。このことから、残るTyr496残基についてはわからないものの、Tyr297、Tyr379周辺の構造変化がDOSFixLとFixLで共通していることが示唆された。Tyr496残基は、Pheに置換することでセンサードメインのスペクトル変化がなくなったことから、センサードメインに意図しない影響を与えたと考えられる。そこでFixLのTyr496変異体でも詳細な実験を行ったところ、この位置の変異が一酸化炭素によって活性を抑制する機能を生み出すことが分かった。観測された現象は異なるものの、DOSFixLでもFixLでも、Tyr496残基の置換はセンサードメインに影響を与えた点で共通であった。以上から、PASタンパク質はセンサードメインを入れ替えても活性制御が起こること、および、センサードメインのF α ヘリックス-H β シート間の水素結合が活性に関わる構造変化であること、キナーゼドメインの構造変化が共通していることが実証された。

(1)の研究では、PASタンパク質が機能するメカニズムを理解するために、単に構造変化を調べることに加えて、機能に関わる構造変化を明らかにした。また、ドメイン間がどのように連動して外部刺激の情報を伝達しているのかを時間分解測定により調べ、2つのドメインが一体となって構造変化することで情報を伝達することを明らかにした。天然のPASタンパク質FixLを手掛かりに、そのメカニズムを明らかにし、そのメカニズムを基にしたPASタンパク質を創って、実証することで、PASタンパク質に共通するメカニズムをより深く理解することができた。

(2) 共通した立体構造が異なったイオンを輸送する連動性の解明

ロドプシタンパク質は共通の立体構造を基盤として、イオン輸送、光センサー、チャネルなど多彩な機能を発現する。また、イオン輸送機能についてみても、輸送されるイオンにはタンパク質ごとに電荷の符号や大きさに多彩さがある。そこで、イオン輸送を可能にする連動性を解明するために、まず時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、イオン輸送タンパク質の光吸収に伴う発色団およびタンパク質部分の構造変化を明らかにした。

① ナトリウムイオン輸送とプロトン輸送の比較研究

Krokinobacter rhodopsin 2 (KR2)は、細胞内で光駆動型ナトリウムイオンポンプとして機能する。KR2によるナトリウムイオン輸送は、レチナル発色団の光異性を反応トリガーとした一連のタンパク質構造変化(光サイクル)によって達成される。KR2では光サイクルの最後の中間体であるO中間体の生成と消滅が、それぞれナトリウムイオンのタンパク質内部への取り込みおよび放出に関与している。本研究では、KR2中の芳香族アミノ酸残基の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを初めて観測し、O中間体におけるタンパク質構造を明らかにした。さらに変異体の測定から、構造変化を示した部位を同定し、ナトリウムイオンの輸送に重要なヘリックスの構造変化を明らかにした。

野生型KR2の紫外共鳴ラマンスペクトルには、それぞれWとYで示されるトリプトファン残基由来およびチロシン残基由来のバンドが観測された。時間分解差スペクトルには、W16、W18バンドの位置に光反応により強度減少したことを示す負のバンドが観測された。これらの負のバンド強度は0.5msで最大となり、その後回復した。また全ての遅延時間において、W3、Y9aバンドの位置に波数シフトが起きたことを示す微分形のバンドが観測された。スペクトル変化を示したアミノ酸残基を決定するために、レチナル発色団近傍に位置するTrp215およびTyr222残基をそれぞれフェニルアラニンに置換したW215FおよびY222F変異体で同様の測定を行った。これらの変異体では、W16、W18バンドの強度変化は小さく、W3バンドのシフトは観測されなかった。また、Y9aバンドにおけるスペクトル変化は小さかった。これらの結果からWTで観測されたスペクトル変化には、Trp215およびTyr222残基の寄与が含まれることがわかった。

観測した時間領域では、ナトリウムイオンの取り込みおよび放出が起きる。W16、W18バンドのラマン散乱強度は、233nmのプローブ光で測定したときTrp残基の疎水性相互作用が減少した場合に減少することが知られている。また、W3バンドの振動数はTrp側鎖の配向を敏感に反映する。このことから、O中間体においてTrp215残基が親水的な環境にさらされていること、またその側鎖の向きが変化していることが示唆された。Y9aバンドの振動数は、Tyr残基のヒドロキシ基の配向に依存することが知られている。これより、ナトリウムイオンの輸送に伴い、Tyr222残基のヒドロキシ基の配向を変えるような構造変化が生じていることが明らかとなった。

O中間体においてナトリウムイオンが輸送されるためには、タンパク質内部と細胞内外をつなぐ過渡的なチャネルが形成される必要がある。Trp215とTyr222残基はともに同一のヘリックス(Fヘリックス)上に位置する。観測された時間領域において、Trp215およびTyr222残基の構造変化が生じたことから、イオン輸送のためのチャネル形成によって、Fヘリックスの構造が

大きく変化することが示唆された。これらの結果に基づき、KR2によるナトリウムイオン輸送機構を議論した。

プロトンポンプ条件においても、Trp215残基に由来するスペクトル変化が時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルに観測された。このことから、プロトンポンプとして機能する場合でもFヘリックスの相対位置の変位があることがわかる。Fヘリックスの変位は、最もよく研究されているプロトンポンプであるバクテリオロドプシンでも観測されている。以上のことから、ナトリウムイオン輸送とプロトン輸送に共通するヘリックスの動きが明らかになった。

KR2の3つの残基を置換した変異体 (F72G、D102N、D116T) ではナトリウムイオン輸送活性が消失し、代わって塩化物イオン輸送活性を示すことが報告されている。発色団構造を比較すると、この塩化物イオンポンプ型変異体では、野生型KR2で観測された発色団の捻れが解消されていることがわかった。発色団の捻れは発色団からカウンターイオンであるD116残基へのプロトン移動に重要であることがわれわれの研究から示唆されていたが、輸送イオンの変化に伴う発色団構造の違いことから、ナトリウムイオン輸送における捻れの重要性がはっきりした。

② 塩化物イオン輸送とプロトン輸送との比較研究

Fulvamarinarhodopsin (FR) は光駆動塩化物イオン輸送タンパク質である。FRは全トランス形レチナールを発色団としてもち、その光異性化がイオン輸送のトリガーとなる。最近、FRのアミノ酸残基のうち3つを置換した変異体 (N110D、Q121E、S255F) がプロトン輸送活性を示すことが報告された。野生型とプロトンポンプ型変異体はほとんど同じ配列を持ちつつ機能だけが異なることから、輸送するイオンを決定する要所のみには違いがあると考えられる。その候補のひとつである発色団構造を比較することで塩化物イオン輸送とプロトン輸送の機能発現の仕組みが明らかになると期待できる。そこで、これらのタンパク質の始状態、反応初期中間体における発色団構造を時間分解共鳴ラマン分光法によって調べ、両者の特徴を比較した。

時間分解共鳴ラマンスペクトルの1600–1660 cm^{-1} の領域には発色団に含まれるプロトン化シッフ塩基のC=N伸縮振動バンドが観測された。軽水中の野生型のスペクトルにおいて、始状態では1629 cm^{-1} に、中間体では1645 cm^{-1} にバンドが観測された。これらのバンドは重水中ではそれぞれ13 cm^{-1} 、26 cm^{-1} の低波数シフトを示した。また、バンドの幅について解析したところ、始状態、中間体ともに軽水中–重水中間で有意な差はなかった。次にプロトンポンプ型変異体の共鳴ラマンスペクトルを図1Bに示す。変異体のC=N伸縮振動バンドは、始状態では1641 cm^{-1} 、中間体では1657 cm^{-1} にみられた。重水中でのバンドはそれぞれ19 cm^{-1} 、39 cm^{-1} の低波数シフトを示した。野生型とは異なり、変異体では始状態におけるバンド幅が重水中よりも軽水中の方が広がった。一方、中間体ではほとんどバンド幅に違いはみられなかった。

プロトン化シッフ塩基のC=N伸縮振動バンドの重水中における低波数シフトの大きさは、プロトン化シッフ塩基がつくる水素結合強度に依存することが知られている。未反応状態ではこのシフトの大きさは、野生型の13 cm^{-1} と比較して変異体では19 cm^{-1} と大きかった。このことは、変異体のプロトン化シッフ塩基が、野生型よりも強い水素結合を形成していることを示唆する。また、重水中と比べたときの軽水中でのC=N伸縮振動バンド幅の広がり、プロトン化シッフ塩基が水分子と水素結合を形成していることを示すマーカーである。野生型では軽水中と重水中のC=N伸縮振動バンドの幅の違いはみられなかったが、プロトンポンプ型変異体では軽水中の方が幅広がった。このことは、始状態において、野生型ではプロトン化シッフ塩基と水素結合している水分子が存在しないのに対し、プロトンポンプ型変異体ではプロトン化シッフ塩基と水素結合する水分子が存在することを示唆する。

次に、光反応後数マイクロ秒で生成するL中間体のC=N伸縮振動バンドでは、重水素化シフトの大きさから、プロトン化シッフ塩基の形成する水素結合はL中間体においても野生型よりプロトンポンプ型変異体の方が強いことが明らかになった。一方で、野生型と変異体の両方で、始状態よりもL中間体の方が強い水素結合を形成していることを示唆する。また、C=N伸縮振動バンド幅の軽水中–重水中間の違いが野生型、変異体ともにみられなかったことから、L中間体におけるPSBは水分子との水素結合を形成していないと考えられる。

以上の議論から、野生型のプロトン化シッフ塩基は弱い水素結合を水以外の化学種(塩化物イオンの可能性が高い)と形成しているのに対し、プロトンポンプ型変異体のプロトン化シッフ塩基は水分子と強い水素結合を形成していることが明らかになった。天然のプロトンポンプのプロトン化シッフ塩基は、始状態で強い水素結合を形成しており、水分子と相互作用していることが報告されている。この特徴はFRのプロトンポンプ型変異体にも観測された。共通した特徴が見られることは、水分子と強い水素結合を形成することがプロトンの輸送を実現する必要条件であることを意味する。さらに、カチオンポンプとアニオンポンプを比較することによって、タンパク質の構造変化に伴って生じる電荷の局所的な偏りを補正するようにイオンが移動するという共通原理が見いだされた。

(2)の研究では、ロドプシンタンパク質がイオンを輸送するメカニズムを理解するために、輸送イオンが異なる変異体の構造変化を比較することによって、イオン輸送に必要な構造変化およびイオン選択に必要な構造変化を明らかにした。これらの知見からイオン輸送タンパク質に必要なメカニズムをより深く理解することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizutani Yasuhisa	4. 巻 90
2. 論文標題 Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy and Application to Studies on Ultrafast Protein Dynamics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1344 ~ 1371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20170218	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 Shanyan Chang, Misao Mizuno, Haruto Ishikawa and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 20
2. 論文標題 Tertiary dynamics of human adult hemoglobin fixed in R and T quaternary structures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phys. Chem. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 3363-3372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CP06287G	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 Mizuno Misao, Nakajima Ayumi, Kandori Hideki, Mizutani Yasuhisa	4. 巻 122
2. 論文標題 Structural Evolution of a Retinal Chromophore in the Photocycle of Halorhodopsin from Natronobacterium pharaonis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. A	6. 最初と最後の頁 2411 ~ 2423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.7b12332	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 Sato Keita, Yamashita Takahiro, Ohuchi Hideyo, Takeuchi Atsuko, Gotoh Hitoshi, Ono Katsuhiko, Mizuno Misao, Mizutani Yasuhisa, Tomonari Sayuri, Sakai Kazumi, Imamoto Yasushi, Wada Akimori, Shichida Yoshinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03603-3	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 Akihiro Otomo, Misao Mizuno, Keiichi Inoue, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 59
2. 論文標題 Allosteric Communication with the Retinal Chromophore upon Ion Binding in a Light-Driven Sodium Ion-Pumping Rhodopsin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 520-529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.9b01062	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 Nao Nishimura, Misao Mizuno, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 123
2. 論文標題 Distortion and a Strong Hydrogen Bond in the Retinal Chromophore Enable Sodium Ion Transport by the Sodium Ion Pump KR2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 3430-3440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.9b00928	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 Avijit Ghosh, Manabu Yoshida, Koji Suemori, Hiroaki Isago, Nagao Kobayashi, Yasuhisa Mizutani, Yuki Kurashige, Izuru Kawamura, Masami Nirei, Osamu Yamamuro, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata, Akinori Saeki, Kazuhiko Nagura, Shinsuke Ishihara, and Takashi Nakanishi	4. 巻 10
2. 論文標題 Soft-chromophore featured liquid porphyrins and their utilization toward liquid-electret applications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Commun.	6. 最初と最後の頁 4210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12249-8	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 -

1. 著者名 Misao Mizuno, Yumi Shimoo, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 6
2. 論文標題 Effect of a bound anion on the structure and dynamics of halorhodopsin from Natronomonas pharaonis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 54703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5125621	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 -

1. 著者名 Riho Takayama, Akimasa Kaneko, Takashi Okitsu, Satoshi P. Tsunoda, Kazumi Shimono, Misao Mizuno, Keiichi Kojima, Takashi Tsukamoto, Hideki Kandori, Yasuhisa Mizutani, Akimori Wada and Yuki Sudo	4. 巻 9
2. 論文標題 Production of a Light-gated Proton Channel by Replacing the Retinal Chromophore with Its Synthetic Vinylene Derivative	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 2857-2862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.8b00879	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 Tomomi Shionoya, Misao Mizuno, Takashi Tsukamoto, Kento Ikeda, Hayato Seki, Keiichi Kojima, Mikihiro Shibata, Izuru Kawamura, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani	4. 巻 122
2. 論文標題 High Thermal Stability of Oligomeric Assemblies of Thermophilic Rhodopsin in a Lipid Environment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 6945-6953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.8b04894	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 Akihiro Otomo, Misao Mizuno, Manish Singh, Wataru Shihoya, Keiichi Inoue, Osamu Nureki, Oded Beja, Hideki Kandori	4. 巻 9
2. 論文標題 Resonance Raman Investigation of the Chromophore Structure of Heliorhodopsins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 6431-6436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.8b02741	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 Tsubasa Okamoto, Hideyuki Takahashi, Eiji Ohmichi, Haruto Ishikawa, Yasuhisa Mizutani, Hitoshi Ohta	4. 巻 113
2. 論文標題 Force Detection of High-Frequency Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy of Microliter Solution Sample	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Appl. Phys. Lett.	6. 最初と最後の頁 223702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5055743	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 -

[学会発表] 計36件(うち招待講演 17件/うち国際学会 12件)

1. 発表者名 大友 章裕、水野 操、井上 圭一、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 ナトリウムイオン結合に伴う光駆動型ナトリウムイオンポンプKR2の構造変化観測
3. 学会等名 日本化学会第97春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩谷智巳、水野操、塚本卓、須藤雄気、水谷泰久
2. 発表標題 好熱菌由来光駆動プロトンポンプの発色団構造および多量体安定性に膜環境が与える効果
3. 学会等名 日本化学会第97春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Shionoya, Misao Mizuno, Takashi Tsukamoto, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Subunit-subunit interaction in a light-driven proton pump from a thermophilic bacterium: Effects on hydrogen bond of the chromophore
3. 学会等名 The 6th Asian Spectroscopy Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水野 操、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 ナトリウムイオンポンプの発色団構造と光駆動カチオン輸送機構
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大友 章裕、水野 操、井上 圭一、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 光駆動型ナトリウムイオン輸送タンパク質KR2のイオンに依存した立体構造の違い
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塩谷 智巳、水野 操、塚本 卓、須藤 雄気、水谷 泰久
2. 発表標題 好熱菌由来光駆動プロトンポンプTRのタンパク質環境が発色団構造に及ぼす影響
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Importance of atomic contacts to propagations in protein: functional compactness
3. 学会等名 Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Time-resolved resonance Raman study on roles of hydrogen bonds in light-driven ion-pumping proteins
3. 学会等名 The 6th Asian Spectroscopy Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水谷泰久
2. 発表標題 時間分解共鳴ラマン分光法を研ぐ
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第38回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩谷 智巳、Manish Singh、水野 操、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 新規光駆動内向きプロトン輸送タンパク質SzRのレチナル発色団構造の特徴
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 潤井泰斗、大友 章裕・水野 操、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 新規光受容タンパク質ヘリオロドプシンが持つ長寿命光反応中間体の発色団構造の解明
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠崎 友香、大友 章裕、水野 操、吉住 玲、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 ナトリウムイオン輸送タンパク質KR2の発色団が持つ水素結合様式の特異性
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大友 章裕、水野 操、Manish Singh、志甫谷 涉、井上 圭一、濡木 理、Oded Beja、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 新型光受容タンパク質Heliorhodopsinの発色団構造
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田原 進也、Manish Singh、倉持 光、志甫谷 涉、井上 圭一、濡木 理、Oded Beja、水谷 泰久、神取 秀樹、田原 太平
2. 発表標題 新奇光受容タンパク質ヘリオロドプシンの超高速ダイナミクス
3. 学会等名 2019年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tahara, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Atomic Contacts Drive Structural Changes of Myoglobin
3. 学会等名 Nineteenth International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihito Otomo, Misao Mizuno, Keiichi Inoue, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Time-resolved UV resonance Raman observation of protein dynamics of a light-driven sodium ion-pumping rhodopsin
3. 学会等名 Nineteenth International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野 操、下尾 祐未、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 ハロドブシンのタンパク質ダイナミクスにおけるアニオン依存性の要因
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田原 進也、水野 操、水谷 泰久
2. 発表標題 ミオグロビンの構造変化を駆動する原子間接触
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大友 章裕、水野 操、井上 圭一、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 時間分解紫外共鳴ラマン分光法によるKR2の構造ダイナミクスの観測
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tahara
2. 発表標題 Atomic contacts drive ultrafast helix motions in myoglobin
3. 学会等名 11th Asian Conference on Ultrafast Phenomena (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野操
2. 発表標題 時間分解紫外共鳴ラマン分光法によるタンパク質ダイナミクス観測
3. 学会等名 日本分光学会紫外フロンティア講演会「紫外フロンティア分光研究の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野操
2. 発表標題 時間分解共鳴ラマン分光法でタンパク質の化学反応を観る
3. 学会等名 2019年度日本分光学会年次講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruto Ishikawa
2. 発表標題 Allosteric dynamics of the oxygen sensor protein FixL
3. 学会等名 6th Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications"(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Primary Protein Responses to Chromophore Photoreaction in Photoreceptive Proteins
3. 学会等名 The 5th International Conference on Ultrafast Structural Dynamics(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Protein Dynamics of a Light-Driven Sodium Ion-Pumping Rhodopsin
3. 学会等名 Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷泰久
2. 発表標題 時間分解振動分光法とロドプシン研究
3. 学会等名 ISSPワークショップ「レチナルタンパク質の光機能発現の物理と化学」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Misao Mizuno
2. 発表標題 Structure and Dynamics of the Retinal Chromophore of Microbial Ion Pumps: A Time-Resolved Resonance Raman Study
3. 学会等名 Indo-Japan workshop "Frontiers in Molecular Spectroscopy: From Fundamentals to Applications in Chemistry and Biology" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大友 章裕、水野 操、Manish Singh、志甫谷 涉、井上 圭一、濡木 理、Oded Beja、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 新型光受容タンパク質Heliorhodopsinの発色団構造
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Otomo, Misao Mizuno, Keiichi Inoue, Hideki Kandori, Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 A comparison of the structures in two functional conditions of Krokinobacter rhodopsin 2
3. 学会等名 26th International Conference on Raman Spectroscopy (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 脊椎動物がもつ新規光センサー-Opn5L1の不活性状態の発色団構造
2. 発表標題 水野 操、水谷 泰久、佐藤 恵太、大内 淑代、山下 高廣、酒井 佳寿美、今元 泰、七田 芳則、山野 由美子、和田 昭盛
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大友 章裕、水野 操、井上 圭一、神取 秀樹、水谷 泰久
2. 発表標題 光駆動ナトリウムイオンポンプの多量体安定性に影響を与える因子
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misao Mizuno, Yasuhisa Mizutani, Keita Sato, Hideyo Ohuchi, Takahiro Yamashita, Kazumi Sakai, Yasushi Imamoto, Yoshinori Shichida, Yumiko Yamano, Akimori Wada
2. 発表標題 Chromophore Structure in an Inactive State of a Novel Photosensor Opn5L1 of Vertebrates
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Otomo, Misao Mizuno, Keiichi Inoue, Hideki Kandori, Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Effects of Solubilized Conditions on the Oligomerization of KR2
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomomi Shionoya, Misao Mizuno, Takashi Tsukamoto, Kento Ikeda, Keiichi Kojima, Mikihiro Shibata, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 High Thermal Stability of Oligomeric Assembly of Thermophilic Rhodopsin in Lipid Bilayer
3. 学会等名 18th International Conference on Retinal Proteins (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhisa Mizutani
2. 発表標題 Compactness of Protein Structure Facilitates Vibrational Energy Flow
3. 学会等名 The XXVI International Conference on Raman Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Misao Mizuno
2. 発表標題 Light-driven cation pump mechanism of a sodium ion pump derived by its chromophore structure of photointermediates
3. 学会等名 The XXVI International Conference on Raman Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 生物物理化学研究室
<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----