

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23750015

研究課題名(和文) タンパク質機能を決定する動的挙動因子の解明

研究課題名(英文) Experimental elucidation of dynamic behaviors to facilitate protein functions

研究代表者

水野 操 (Mizuno, Misao)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10464257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：時間分解共鳴ラマン分光法をもちいて、光駆動イオンポンプおよび光センサーとして働く各種の微生物型ロドプシンの構造ダイナミクスを観測した。ピコ秒領域で起こる発色団異性化に対するタンパク質応答を調べた。芳香族アミノ酸側鎖に由来する紫外共鳴ラマンバンドをプローブとして、発色団異性化に対するタンパク質応答は機能によらず同様の応答時間を示すことを明らかにした。ナノ秒以降段階的に変化する発色団構造変化の過程を、可視共鳴ラマン分光法をもちいて調べた。とくにイオンポンプでは、発色団近傍の水素結合ネットワークが変化する過程を連続して追跡したことにより、ポンプ機構に重要な発色団周辺の構造変化を提案することができた。

研究成果の概要(英文)：Microbial rhodopsins function as either light-driven ion pumps or photosensors. In this study, structural dynamics of microbial rhodopsins were revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy. First, protein responses to photoisomerization of the retinal chromophore in the picosecond regime were investigated. Spectral changes in the ultraviolet resonance Raman bands due to the tryptophan and tyrosine residues in the vicinity of the chromophore were observed. It was found that the rates of primary protein response to the chromophore isomerization are similar among the rhodopsins. Second, temporal evolutions of the chromophore structure after nanoseconds were investigated by visible resonance Raman spectroscopy. For ion pumps, we revealed the structural changes of the hydrogen-bond network around the retinal chromophore which facilitate the ion pumping.

研究分野：時間分解振動分光学

キーワード：共鳴ラマン分光法 時間分解分光法 微生物型ロドプシン タンパク質ダイナミクス 光異性化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能は、構造変化により生み出される。機能発現機構を明らかにするには、どのようにタンパク質の構造が変化するかを、変化の段階ごとに動的に理解する必要がある。しかし、これまでタンパク質部分で起こる構造ダイナミクスを調べる適切な方法は十分に確立していなかった。これに対し、時間分解共鳴ラマン分光法は、タンパク質内の部位特異的なダイナミクス観測に対してきわめて有効である。紫外光励起による共鳴ラマンスペクトルには、アミノ酸残基の芳香族側鎖およびペプチド結合に由来する振動バンドが高感度に検出される。時間分解測定すれば、タンパク質の高次構造ダイナミクスを詳しく調べられる。申請者はこれを実現するため、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法のシステム開発し、この方法がタンパク質ダイナミクス観測に適切であることを実証した(水野ら、*レーザー研究*, 2009 など)。次段階として、構造ダイナミクスと機能がどのように関連するのかを直接結びつけることが急務であった。

微生物型ロドプシンは、イオンポンプや光センサーとして働く。これらの機能の発現スイッチは、光受容体であるレチナル発色団の光異性化である。レチナル結合部位では、共通のアミノ酸残基が多く保存され、機能に深く関与している。また、その構造は類似する。申請者は、代表的な微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン(BR)について、発色団の構造変化に連動したレチナル近傍の芳香族アミノ酸(トリプトファン・チロシン)残基の構造ダイナミクスを観測することに成功した(Mizuno et al., *J. Phys. Chem. B* 2009)。さらに、センサリロドプシンII(SRII)については、発色団近傍にある機能に重要なチロシン残基の初期応答を見出した(Mizuno, et al., *Biochemistry* 2011)。これらの結果から、タンパク質機能の発現トリガーであるレチナルの異性化に連動したタンパク質応答が、機能とどのように関連するかを調べ、微生物型ロドプシンのタンパク質機能を決定する動的挙動因子を明らかにすることを考えた。

2. 研究の目的

タンパク質の構造ダイナミクスと機能の相関を直接結びつけるような研究例はない。これを実現するために、第一段階として、立体構造および機能が既知のタンパク質について、構造ダイナミクスを比較することが必要である。共通の立体構造および光反応を示しながら、異なる機能を発現する微生物型ロドプシンは、その研究対象として最適である。

本研究では、種々の微生物型ロドプシンについて、特定部位(トリプトファン・チロシン残基)の構造変化をプローブとして、時間分解紫外共鳴ラマン分光法により構造ダイナミクスを実時間観測する。研究対象の微生物

型ロドプシンは、プロトンポンプであるBR、光センサーであるSRII以外に、塩化物イオンポンプとして働くハロロドプシン(HR)、光センサーとして働くセンサリロドプシンI(SRI)およびアナベナセンサリロドプシン(ASR)である。構造ダイナミクスについて、同じ機能を示すタンパク質との間では類似点を、異なる機能を示すタンパク質の間では相違点を探す。ここから、構造ダイナミクスと種々の機能との相関を系統的に調べ、タンパク質機能を決定する動的挙動因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) レチナル発色団異性化に対するタンパク質応答の観測

波長 230 nm 付近の紫外光をラマン散乱の励起光にもちいると、トリプトファンおよびチロシン側鎖の共鳴ラマンバンドが選択的に観測される。レチナル発色団近傍にあるトリプトファンおよびチロシン残基は、発色団の異性化にともなうタンパク質応答により、水素結合強度や疎水性環境が変化する。タンパク質応答のプローブとして、これらの残基の共鳴ラマンバンドのスペクトル変化をピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法により観測した。実験は室温の溶液中で行い、生理環境に近い状態での実時間観測を実現した。タンパク質の構造ダイナミクスと機能の相関を結びつけるデータを得るために、これまで研究を行ったBR、SRIIの他に、SRI、ASRおよびHRについて実験を行い、異性化直後のタンパク質応答の類似点・相違点を調べた。

(2) レチナル発色団構造の時間発展観測

微生物型ロドプシンの機能を決定する動的挙動因子を明らかにするためには、発色団の異性化直後のタンパク質応答を追跡するのみでは不十分で、発色団構造がどのように時間発展していくのかを観測する必要がある。可視光をラマン散乱の励起光にもちいると、レチナル発色団に由来する振動バンドが選択的に観測される。BRについては、光反応中間体の発色団構造を含め、共鳴ラマン分光法をもちいた観測研究が多く行われている。しかし、他の微生物型ロドプシンについては、発色団構造の時間発展を光サイクル反応の順を追って研究した例はない。本研究では、イオンポンプタンパク質であるHRおよびグロイオバクターロドプシン(GR)について、ナノ秒からミリ秒までの時間領域で、時間分解可視共鳴ラマン分光法により、発色団構造が変化していく過程を連続して追跡した。はじめに、レチナル発色団の構造ダイナミクス観測のため、ナノ秒からミリ秒の時間領域を連続して測定可能な時間分解ラマン分光システムの構築を行った。また、得られた結果をもとに、発色団周辺構造変化の過程がポンプ機構にどのように関わるのかを調べた。

4. 研究成果

(1) ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法による発色団異性化に対するタンパク質応答の観測

① センサリーロドプシン I (SRI)

SRI は細胞の光誘引・忌避応答のセンサーである。本研究では、真正細菌から発見された SRI について、発色団の光異性化にともなうタンパク質初期応答を観測した。その結果、10 ピコ秒程度の速度で起こるタンパク質応答過程があることを見出した。これは、同じ光センサーの SRII と同等であった。また、発色団近傍に存在する塩化物イオンによる効果を調べた結果、発色団が異性化した K 中間体の生成に続く過程においてトリプトファン残基の構造変化の過程に違いがあることがわかった。この成果は、*J. Phys. Chem. B* 誌に掲載された。

② アナベナセンサリーロドプシン (ASR)

真正細菌であるアナベナから発見された微生物型ロドプシンの ASR は、他の微生物型ロドプシンとは異なり、光定常状態において、全トランス形と 13 シス形のレチナール発色団が安定に存在し、相互に光異性化するフォトクロミックな性質を示す。本研究では、全トランス形および 13 シス形から開始する光サイクル反応において、発色団の異性化に対するタンパク質応答を調べた。この結果、異性化の方向に、発色団周辺の初期タンパク質応答は影響を受けないことがわかった。この成果は、*Chem. Phys.* 誌に掲載された。

③ ハロロドプシン (HR)

塩化物イオンポンプである HR は、さまざまなアニオンが発色団近傍に結合することができる。レチナール発色団の電子状態は、光定常状態においてさえも結合アニオンの影響を受けることが知られている。本研究では、さまざまなイオンと結合した HR のピコ秒領域で起こる発色団異性化にともなうタンパク質応答を調べ、応答速度が結合するアニオンの種類には依存しないことを見出した。本成果は、現在、論文として投稿準備中である。

④ 異性化に対するタンパク質応答

微生物型ロドプシンでは、発色団周辺のアミノ酸残基の多くが、種を通じてよく保存されている。これには Trp や Tyr 残基も含まれる。このため、これらの Trp や Tyr 残基は、高速ダイナミクス観測のためのプローブ分子になると考えられる。これまで観測した微生物型ロドプシンについて、ピコ秒タンパク質ダイナミクスを比較した。その結果、どのロドプシンについても、ピコ秒領域で、レチナールの異性化およびそれに続く構造緩和に連動したタンパク質応答が同様の速度を持つことがわかった。このような発色団周辺のプロセスが、微生物型ロドプシンの高速ダイナミクスの特徴であることを見出した。

(2) ナノ秒–ミリ秒時間分解可視共鳴ラマン分光法による発色団構造変化の観測

① ハロロドプシン (HR)

HR の光サイクル反応において、発色団構造がどのように変化するかを、ナノ秒からミリ秒にわたり広い時間スケールで連続的に観測することに成功した。これまでの共鳴ラマン分光の研究では、代表的なプロトンポンプである BR についての研究は多く行われているが、それ以外の微生物型ロドプシンにおいて、発色団構造変化の時間発展に関する研究はほとんどなかった。本研究では、特に発色団の近傍を塩化物イオンが移動する過程における発色団の構造変化の過程を観測した。その結果、レチナール発色団の光異性化により、発色団のポリエーテル鎖の平面さが歪み、プロトン化シッフ塩基における水素結合が弱まることを見出した。その後、ポリエーテル鎖は平面構造になることがわかった。また、水素結合のプロトンアクセプターが置換するのに伴い、タンパク質構造が変化し、強い水素結合が新たに形成されることがわかった。このようなタンパク質の動きが、塩化物イオンの反応初期の移動を促進すると考えられる。また、アニオンがタンパク質内部を移動する過程では、発色団近傍に結合するアニオンの種類が反応速度、およびタンパク質機能に影響を与えることがわかった。本成果は、現在、論文として投稿準備中である。

② グロイオバクターロドプシン (GR)

シアノバクテリアの一種であるグロイオバクターから発見された GR は、プロトンポンプとして働く。本研究において、光サイクル反応を追跡した過渡吸収測定では分離することのできなかつた 2 つの L 中間体を観測することに成功した。L 中間体は、プロトンポンプに重要なレチナール発色団の脱プロトン化の前駆状態として存在する。初期に現れる L 中間体では、プロトン化シッフ塩基の水素結合が弱くなることがわかった。その後、タンパク質構造の変化により、強い水素結合をもつ後期 L 中間体が現れることがわかった。実験結果をもとに、L 中間体における水素結合強度の変化の過程を経て、プロトン移動のエネルギー障壁が低くなり、シッフ塩基のプロトンがアクセプターであるカウンターイオンへ移動することを提案した。本成果は、現在、論文として投稿準備中である。

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 3 件)

- ① Yuji Furutani, Takashi Okitsu, Louisa Reissig, Misao Mizuno, Michio Homma, Akimori Wada, Yasuhisa Mizutani, and Yuki Sudo, "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* **117**, 3449-3458 (2013). (査読有)
DOI: 10.1021/jp308765t

- ② Seisuke Inada, Misao Mizuno, Yoshitaka Kato, Akira Kawanabe, Hideki Kandori, Zhengrong Wei, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara, and Yasuhisa Mizutani, “Primary Structural Response in Tryptophan Residues of *Anabaena* Sensory Rhodopsin to Photochromic Reactions of the Retinal Chromophore”, *Chem. Phys.* **419**, 65-73 (2013). (査読有)
DOI: 10.1016/j.chemphys.2013.01.031
- ③ Yuki Sudo, Misao Mizuno, Zhengrong Wei, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara, and Yasuhisa Mizutani, “The early steps in the photocycle of a photosensor protein sensory rhodopsin I from *Salinibacter ruber*”, *J. Phys. Chem. B* **118**, 1510-1518 (2014). (査読有)
DOI: 10.1021/jp4112662

[学会発表] (計 15 件)

- ① 水野 操, 「紫外共鳴ラマン分光法によるタンパク質の高速ダイナミクス観測」, 先端的レーザー分光技術による分子科学の新展開, 2013年2月13日, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター, 愛知県岡崎市. (招待講演)
- ② Misao Mizuno, Seisuke Inada, Yumi Shimoo, Hideki Kandori, Yuki Sudo, and Yasuhisa Mizutani, “Picosecond protein response to the chromophore isomerization in microbial rhodopsin”, 16th International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy (TRVS2013), 2013年5月19日~24日, 大分県別府市.
- ③ 水野 操, 「時間分解紫外共鳴ラマン分光法でとらえるタンパク質反応ダイナミクス」, 第13回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「タンパク質反応における感応性化学種」, 2013年6月12日, とりぎん文化会館, 鳥取県鳥取市. (招待講演)
- ④ Misao Mizuno, “Observation of protein dynamics by ultraviolet resonance Raman spectroscopy”, 7th International Conference of Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-7), 2013年8月26日, 神戸コンベンションセンター, 兵庫県神戸市. (招待講演)
- ⑤ 水野 操, 水谷 泰久, 「塩化物イオンポンプのタンパク質ダイナミクス」, 平成25年度生理研研究会「膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析」, 2013年9月6日, 生理学研究所, 愛知県岡崎市. (招待講演)
- ⑥ 水野 操, 下尾 祐未, 神取 秀樹, 水谷 泰久, 「ハロロドプシン光反応中間体のタンパク質構造ダイナミクス」, 第7回分子科学討論会, 2013年9月24日~27日, 京都テルサ, 京都府京都市.
- ⑦ Misao Mizuno, “Picosecond protein dynamics revealed by time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy”, 8th Asian conference of ultrafast phenomena, 2014年1月20日, ホテル北野プラザ六甲荘, 兵庫県神戸市. (招待講演)
- ⑧ 水野 操, 「時間分解紫外共鳴ラマン分光法による高速タンパク質ダイナミクス観測」, 高エネ機構フォトンファクトリー第2回先進的観測技術研究会—時間分解計測の最前線—, 2014年2月21日, 高エネルギー加速器研究機構, 茨城県つくば市. (招待講演)
- ⑨ Misao Mizuno, Ayumi Nakajima, Yumi Shimoo, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Evolution of Chromophore Structure in Halorhodopsin Photointermediates”, 24th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2014), 2014年8月10日~15日, Friedrich Schiller University Jena, Germany.
- ⑩ Ayumi Nakajima, Misao Mizuno, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Proton Release and Uptake in Retinal Chromophore of Cyanobacterial Ion-pumping Rhodopsin Revealed by Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy”, 24th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2014), 2014年8月10日~15日, Friedrich Schiller University Jena, Germany.
- ⑪ Misao Mizuno, Ayumi Nakajima, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Time-resolved Resonance Raman Study on Structural Evolution of Chromophore in Halorhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*”, 16th International Conference on Retinal Proteins (ICRP2014), 2014年10月5日~10日, 長浜ロイヤルホテル, 滋賀県長浜市.
- ⑫ 久保田 真司, 水野 操, 神取 秀樹, 水谷 泰久, 「新規塩化物イオンポンプの発

色団水素結合」, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 26 日~29 日, 日本大学理工学部, 千葉県船橋市.

- ⑬ Misao Mizuno, Ayumi Nakajima, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, “Structural evolution of the retinal chromophore in the photocycle of microbial ion pumps”, 17th International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy (TRVS2015), 2015 年 6 月 21 日~26 日, Wisconsin Institute for Discovery, WI, USA. (発表確定)
- ⑭ 水野 操, 「時間分解共鳴ラマン分光法をもちいたレチナルタンパク質におけるレアイベント観測」, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日~15 日, 金沢大学, 石川県金沢市. (招待講演・発表確定)
- ⑮ Misao Mizuno, “Structural evolution of the retinal chromophore in the photocycle of microbial ion pumps”, 5th Asian Spectroscopy Conference, 2015 年 9 月 29 日~10 月 2 日, University of Sydney, Australia. (招待講演・発表確定)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 操 (MIZUNO, Misao)

大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10464257

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：