

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：13903

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型（計画研究））

研究期間：2008～2012

課題番号：20108014

研究課題名（和文）分光学的手法による生体 π 空間の制御機構解明と新機能の開拓研究課題名（英文）Bio- π -space in photoreceptive proteins: Spectroscopic investigation and creation of new functions

研究代表者

神取 秀樹（KANDORI HI DEKI）

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：70202033

研究成果の概要（和文）：生体分子は進化の中で最適化された π 空間の制御系であり、蛋白質などのナノ反応場が精緻な制御を可能にしている。本研究では、光受容蛋白質における蛋白質反応場の特異な制御機構の解明を目指した。遺伝子工学と赤外分光学などの分光学的手法を組み合わせることで、波長制御、反応制御、機能制御をもたらすメカニズムを明らかにすることができた。特筆すべき事項として、世界初となる霊長類色覚視物質の構造解析、プロトンポンプに結合した内部結合水と機能との相関関係、内向きプロトンポンプの創成などを挙げるができる。

研究成果の概要（英文）：Highly elaborated π -space can be seen in biomolecules such as proteins, where specific chemical reactions occur in protein environment. In this study, we aimed at revealing the mechanism of such specific chemical reactions in photoreceptive proteins. By combining genetic engineering and various spectroscopic methods, we revealed the mechanism of color tuning and chemical reactions. Of particular notice is the structural study of primate color visual pigments, and the discovery of the positive correlation between hydrogen-bonding strength of internal water molecules and proton pump function. We also attempted to create new function in bio- π -space, and achieved a protein performing an inward proton transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2011年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2012年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
総計	68,400,000	20,520,000	88,920,000

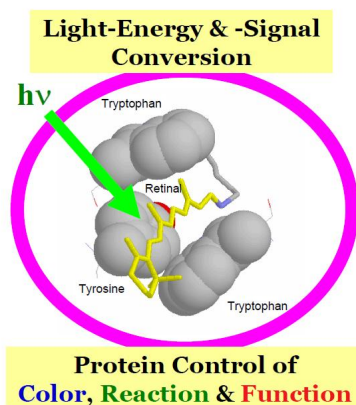
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード： π 空間、生体分子、発色団、赤外分光、アミノ酸変異

1. 研究開始当初の背景

生体系は進化の中で最適化された π 空間の制御系を数多く含む。そこでは蛋白質などのナノ反応場が精緻な制御を実現しており、ボトムアップ型の高次 π 空間を創製するにあたってのゴールとみなすことができる。その中でも光をエネルギーや情報へと変換する光受容蛋白質は、可視光を吸収するためのクロモフォア分子を内部に結合している。



レチナル、フラビンなど π 電子系の性質は、蛋白質内部で特異性を示すことが知られており、機能のために最適化されていると考えられている。その特異性として、(1) 波長の制御、(2) 化学反応の制御、(3) 機能の制御を挙げることができる。例えば、ヒトは 11 シス型レチナルという同一のクロモフォア分子を使いながら、吸収波長の異なる 3 種類の蛋白質によって多彩な色を見分けることができるが、視物質の波長制御機構は未だに解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、レチナル、フラビンなどをクロモフォアとする光受容蛋白質における特異な (1) 波長制御、(2) 反応制御、(3) 機能制御に着目し、原子レベルでの構造をもとにそのメカニズムを解明することを目指した。具体的には、遺伝子改変によって変異を導入した光受容蛋白質に対して、我々が世界をリードする赤外分光法などの分光学的手法を駆使した実験研究を行った。

(1) に関しては、視物質や微生物型ロドプシンにおける波長制御のメカニズムを研究した。例えば、我々がどのように色を識別するかという問題は物理・化学・生物から医学や心理学にまで関わるが、明暗を識別するロドプシンと違って試料の調製が困難であることから、構造研究は世界中で全く行われていなかった。我々は培養細胞を用いた大量の試料調製と低温赤外分光を組み合わせることで、世界初となる霊長類色覚視物質の構造解析に挑戦した。また微生物型ロドプシン

を対象とした様々な実験により、色を決定するメカニズムの解明を目指した。

(2) に関しては、様々な光応答性蛋白質の機能発現過程における反応制御を研究した。その過程は、フェムト秒で起こる異性化などの光化学初期過程からミリ秒や秒といった遅い時間領域でのプロトン移動などの化学反応、蛋白質の構造変化などが含まれる。蛋白質場においては選択的な化学反応が精巧かつ効率的に起こるのが特徴である。例えば、視物質ロドプシンにおいては量子収率 0.7 という高い効率の異性化反応が起こる一方、バクテリオロドプシンにおいては方向性をもったプロトン移動反応が実現する。このような反応の制御が蛋白質場のどのようなはたらきによって実現するのか、変異の導入と精巧な分光学を組み合わせることで明らかにすることを目指した。

(3) に関して、生体 π 空間の最大の魅力は蛋白質場での化学反応の連鎖によりエネルギー変換や情報変換といった生物機能が産み出されるところにある。本研究では、蛋白質の機能がアミノ酸の変異によりどのように影響するのかといった観点での実験研究を推進するとともに、アミノ酸の置換により新しい機能をもった蛋白質を創製するという視点での研究も行った。

3. 研究の方法

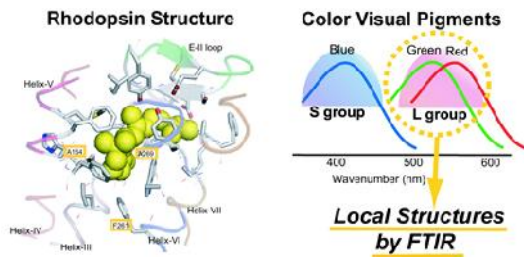
対象となる試料は、レチナルを発色団とする色覚視物質やウシロドプシンなどの視物質ロドプシン、様々な微生物型ロドプシン、フラビンを発色団とする LOV ドメイン、BLUF ドメイン、クリプトクロム、DNA 光回復酵素などである。多くの試料は大腸菌で発現することが可能である一方、色覚視物質は培養細胞を用いて発現させた。遺伝子改変を導入することでアミノ酸の置換を行うとともに、振動バンドの帰属のため同位体標識試料も作製した。

実験においては、我々が世界をリードしてきた低温赤外分光法を中核に位置付け、光に応答した構造変化を振動解析によって捉えた。我々はこれまでにロドプシン試料を重水中で水和量を制御することにより、すべての振動数領域の水（重水）の伸縮振動を測定することに成功した。本研究ではこの手法を様々なロドプシンに適用し、水分子の水素結合に関する研究を徹底的に遂行した。また低温法だけでなく、時間分解赤外分光法や全反射赤外分光法を組み合わせることでさらに重要な構造情報を得た。赤外分光以外にも過渡吸収法や過渡回折法を用いることで機能発現におけるダイナミクスや構造変化を捉えることを試みた。

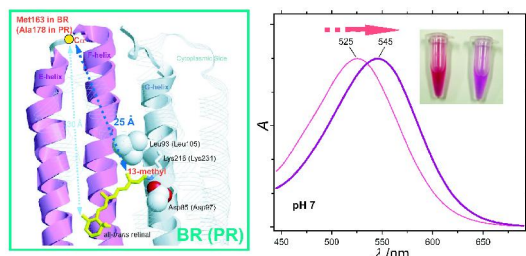
4. 研究成果

(1) 生体 π 空間の波長制御

我々が色を識別する視物質の構造解析を世界で初めて実現した。具体的には、サルが赤と緑を識別する蛋白質を培養細胞で発現し、精度の高い低温赤外分光を用いて 77 K でのスペクトル変化を捉えることに成功したのである。その結果、我々が赤と緑を識別する構造要因を明らかにすることができた。さらにサルが赤と緑感受性視物質に対する D_2O と $D_2^{18}O$ 中の差スペクトルの比較により、全波数の領域で水の信号を帰属することに成功し、水の振動数と吸収波長に相関があることが明らかになった。

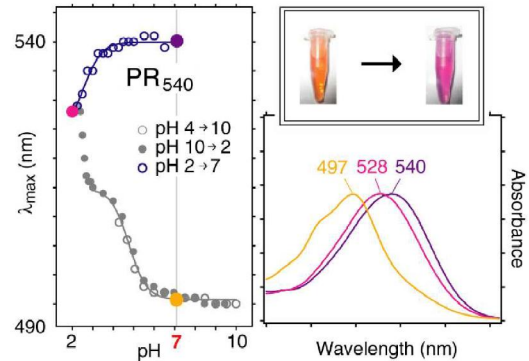


一方、海洋性バクテリアには千種類以上のプロテオロドプシン (PR) が存在し、プロトンポンプとして光エネルギー変換を行うと考えられている。このようなさまざまな PR は環境に応じて吸収する光の波長を最適化しているはずであるが、我々はレチナルから遠隔部位のアミノ酸変異が色を変えるというこれまでの常識に完全に反した現象を発見した。具体的には green PR の E-F ループに存在する Ala178 を Arg に変異したところ、20 nm もの長波長シフトが起こったのである。このような変異の効果は BR には見られず PR に特有であること、178 位の部位に特異的であること、さらにこの部位はレチナル結合部位とリンクして構造転移を起こすことを見出した。また 20 種類全てのアミノ酸を導入した実験結果から、体積が波長制御に関わることを明らかにした。



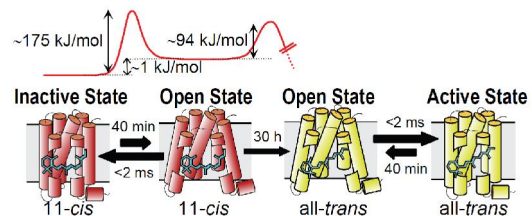
海洋性バクテリア由来の PR からは、pH を変化させるだけで色を不可逆的に変えるという驚くべき性質を見出すことにも成功した。通常、pH 滴定は可逆的に起こるわけ

あるが、ある種類の blue PR は pH を 2 に下げた後、上昇させると不可逆的に長波長シフトすることがわかった。この事実は低い pH で不可逆的な構造転移が起こることを意味しており、その結果、単なる pH 変化で blue PR を green PR に変換させることに成功した。



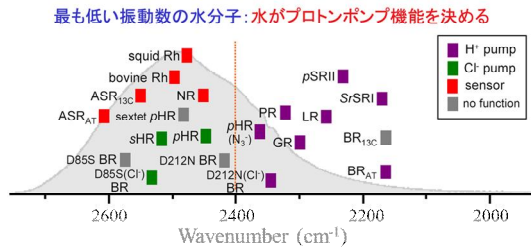
(2) 生体 π 空間の反応制御

レチナルを発色団とする種々のロドプシン類について、赤外分光法を用いて反応制御機構を詳細に検討した。例えば、視物質ロドプシンの低温赤外分光と重水置換とを組み合わせた実験からは、疎水領域に存在する Thr の O-H 基が高い温度でのみ重水置換することを見出し、蛋白質の構造揺らぎが重水置換をもたらすモデルを提案した。本成果が重要だったのは、視覚研究のミステリーであった熱異性化反応の活性化障壁が低い理由を構造揺らぎの立場から説明できた点にある。



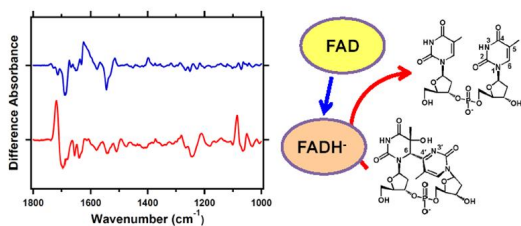
我々はこれまでに低温赤外分光の測定系を最適化することにより、中赤外の全波数領域における差スペクトル測定を実現している。その結果、BR において水の伸縮振動としては「異常に」低い振動数 (重水中で 2400 cm^{-1} 以下の O-D 伸縮振動をもつ) をもった水を観測し、これがレチナルシッフ塩基と Asp85 をブリッジする水に由来することを示した。同様の解析を BR の変異体や新規を含む種々のロドプシンに対して行う中で、プロトンポンプ活性をもつロドプシンには必ず強い水素結合を形成した水分子が存在することを明らかにした。具体的には、強い水素結合を形成した水分子はプロトンポンプ活性のある PR, GR, LR, D212N(Cl) BR, HR(N₃), SRII などには存在し、プロトンポンプ活性の

ない ASR, NR, D85S(Cl), HR, visual rhodopsin などには存在しなかったのである。これらの実験事実は、蛋白質に結合した水分子がプロトンポンプの機能を決定することを示唆するものである。



またロドプシンに対しては、時間分解赤外分光法、過渡吸収分光法、過渡回折分光法、高速原子間力顕微鏡観察なども駆使して光誘起反応のメカニズムを解析した。時間分解赤外分光を用いたバクテリオロドプシンの研究では、内部結合水の水素結合変化を室温で捉えることに成功した。一方、高速原子間力顕微鏡を用いてプロトンポンプにおける構造変化を捉えることに成功した実験は、実時間・実空間で蛋白質のダイナミクスを捉えた仕事として歴史に残るものと評価されている。これ以外にも、11 シス型をもった微生物型ロドプシンを発見するとともに、センサーロドプシンに含まれるクロライド結合部位やトランスデューサー認識部位の構造解析を行った。

フラビン蛋白質に関しては、転写制御に関わる BLUF ドメインの活性化に伴いチロシンが異常な水素結合構造を形成することを明らかにした。また DNA 光回復酵素の活性化や修復反応に伴う構造変化の測定を実現し、CPD や(6-4)光産物を修復する反応メカニ



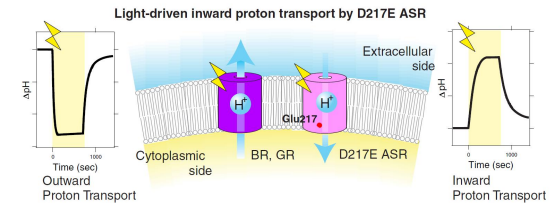
ムを解明する道筋を示すことができた。

(3) 生体 π 空間の機能制御

本研究では、アミノ酸置換などを用いて新しい機能をもった蛋白質を創成することも目指した。

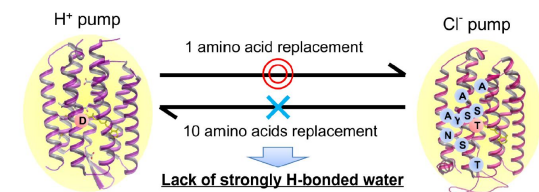
バクテリアからヒトまですべての生命において、ATP の合成は細胞の外側から内側へプロトンが流れる力を利用して起こる。従って、自然には多くの外向きプロトンポンプが存在するが、逆向きのポンプは天然には全く存在せず、人工的にも逆方向へのプロトン輸

送を実現した例はなかった。我々は、プロトンポンプ活性がないとされていた ASR の性質を研究する過程で、細胞内側へのプロトン輸送を行う蛋白質を創成することに成功した。この蛋白質は、わずか1個のアミノ酸を(217番目のアスパラギン酸をグルタミン酸に)変異させることで、細胞内側へのプロトン輸送を世界で初めて実現したことになる。このような新しい膜蛋白質装置の設計は、生命がどのようにして水素イオンの濃度勾配を創り出しているのかといったメカニズムに関する基礎研究の発展を約束するものである。



さらに微生物型ロドプシンを鋳型として視物質ロドプシンのループをもったキメラを作製したところ、G 蛋白質を活性化することができた。この事実は、視物質ロドプシンと微生物型ロドプシンとの間に共通の活性化メカニズムが存在することを示唆している。またごく最近には光駆動のナトリウムポンプが自然界に存在することも見出している。内向きプロトンポンプや G 蛋白質を活性化する微生物型ロドプシン、光駆動ナトリウムポンプなど新しい機能をもった蛋白質は、近年、注目を集めている **Optogenetics** (光遺伝学) のツールとしても期待されており、将来の医学・生理学分野への貢献を約束するものである。

また我々は 1995 年にバクテリオロドプシンに対するわずか1アミノ酸の置換でプロトンポンプがクロライドポンプに機能転換することを示したが、逆方向の機能転換はこれまで全く実現していなかった。本研究において我々はクロライドポンプであるハロロドプシンに 10 個の変異を導入したものの、やはりプロトンポンプには機能転換しなかった。しかしながら詳細な赤外分光解析により、機能転換が非対称になる原因が蛋白質に結合した水分子の水素結合強度にあることを明らかにした。ロドプシン分野における永年の謎を、水分子の水素結合によって説明することができたのである。



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 68 件)

- ① 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* 51, 4677-4684 (2012). 査読有
- ② K. Katayama, Y. Furutani, H. Imai, H. Kandori, "Protein-bound water molecules in primate red- and green-sensitive visual pigments", *Biochemistry* 51, 1126-1133 (2012). 査読有
- ③ T. Iwata, A. Watanabe, M. Iseki, M. Watanabe, H. Kandori, "Strong donation of the hydrogen bond of tyrosine during photoactivation of the BLUF domain", *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 1015-1019 (2011). 査読有
- ④ Y. Zhang, T. Iwata, J. Yamamoto, K. Hitomi, S. Iwai, T. Todo, E. D. Getzoff, H. Kandori, "FTIR study of light-dependent activation and DNA repair processes of (6-4) photolyase", *Biochemistry* 50, 3591-3598 (2011). 査読有
- ⑤ V. A. Lorenz-Fonfria, Y. Furutani, T. Ota, K. Ido, H. Kandori, "Protein fluctuations as the possible origin of the thermal activation of rod photoreceptors in the dark", *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5693-5703 (2010). 査読有
- ⑥ M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, T. Ando, "High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin", *Nature Nanotech.* 5, 208-212 (2010). 査読有
- ⑦ K. Katayama, Y. Furutani, H. Imai, H. Kandori, "An FTIR study of monkey green- and red-sensitive visual pigments", *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 891-894 (2010). 査読有
- ⑧ A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung, H. Kandori, "Engineering an inward proton transport from a bacterial sensor rhodopsin", *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16439-16444 (2009). 査読有
- ⑨ V. A. Lorenz-Fonfria, H. Kandori, "Spectroscopic and kinetic evidence on how bacteriorhodopsin accomplishes vectorial proton transport under functional conditions", *J. Am. Chem. Soc.* 131, 5891-5901 (2009). 査読有
- ⑩ M. Yoshitugu, M. Shibata, D. Ikeda, Y. Furutani, H. Kandori, "Color change of proteorhodopsin by a single amino acid

replacement at a distant cytoplasmic loop", *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 3923-3926, (2008). 査読有

[学会発表] (計 398 件)

- ① H. Kandori, "New microbial rhodopsins from the ocean", 15th International Conference on Retinal Proteins, October 3, 2012, Ascona, Switzerland (Invited)
- ② H. Kandori, "Light-induced difference FTIR spectroscopy of photoreceptive proteins", 244th ACS National Meeting, August 22, 2012, Philadelphia, USA (Invited)
- ③ H. Kandori, "Structure-function relationship in microbial rhodopsins", Symposium on Biophysics of Microbial Rhodopsins, May 18, 2012, Shanghai, China (Invited)
- ④ H. Kandori, "Role of protein-bound water molecules in rhodopsins", 15th International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy, June 21, 2011, Ascona, Switzerland (Invited)
- ⑤ H. Kandori, "Role of protein-bound water molecules in rhodopsins", 15th International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy, June 21, 2011, Ascona, Switzerland (Invited)
- ⑥ H. Kandori, "FTIR detection of protein-bound water molecules in membrane proteins", Symposium on "Biophysics on Functional Study of Proteins", June 14, 2011, Berlin, Germany (Invited)
- ⑦ H. Kandori, "Mechanism of light-driven ion pumps", PACIFICHEM 2010, December 20, 2010, Honolulu, USA (Invited).
- ⑧ H. Kandori, "FTIR study of rhodopsins", 14th International Conference on Retinal Proteins, August 5, 2010, Santa Cruz, USA (Invited).
- ⑨ H. Kandori, "Structural changes accompanying retinal photoisomerization in rhodopsins", XXIV International Conference on Photochemistry, July 21, 2009, Toledo, Spain (Invited).
- ⑩ H. Kandori, "FTIR study of rhodopsins in action", 15th International Congress on Photobiology, June 22, 2009, Dusseldorf, Germany (Invited).

[図書] (計 2 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：

神取研究室HP

http://www.ach.nitech.ac.jp/~physchem/kandori/index_j.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

神取 秀樹 (KANDORI HIDEKI)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：70202033

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：