

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02391

研究課題名(和文)光駆動ナトリウムポンプの構造研究

研究課題名(英文)Structural study of light-driven sodium pump

研究代表者

神取 秀樹 (Kandori, Hideki)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70202033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：光駆動ポンプとして機能する微生物型ロドプシンとしては、プロトン以外の陽イオンポンプは存在しないと長年、考えられてきたが、我々は2013年に海洋性細菌から光駆動ナトリウムポンプを発見した。本研究では、この新規ロドプシンのメカニズムを明らかにするため構造解析を試み、東大・濡木研との共同研究により光駆動ナトリウムポンプの結晶構造を決定した。我々の研究室で行った機能解析の実験と組合せることでナトリウムイオンの輸送モデルを提唱した論文をNature誌にArticleとして発表した。また低温法、時間分解法、全反射法を駆使した赤外分光による構造解析でナトリウム結合や詳細な水素結合構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although it was believed that rhodopsins cannot pump non-proton cations, we discovered a light-driven sodium pump rhodopsin in 2013. This project aims at revealing the structure of sodium pump rhodopsins. In collaboration with Nureki Lab of Univ. Tokyo, we successfully crystalized a light-driven sodium pump KR2, and proposed a model of sodium pumping. We also performed light-induced difference FTIR spectroscopy, such as low-temperature, time-resolved, and attenuated total reflection (ATR) methods, to sodium pump rhodopsins, and obtained important structural information. We reported more than 50 articles in Nature, Nature Commun., JACS, Angew., PNAS, JPC Letters and JBC during the project period.

研究分野：生物物理学

キーワード：ロドプシン ナトリウムポンプ 光反応サイクル 結晶構造解析 赤外分光

1. 研究開始当初の背景

微生物型ロドプシンは、1971年に発見されたバクテリオロドプシン(BR)以降、ポンプとして光をエネルギーに変換するものや、センサー・チャンネルとして光を情報に変換するものなど、実に多彩な分子が見出されている。ところが興味深いことに、陰イオンポンプはCl⁻の他にもBr⁻、I⁻、NO₃⁻などを輸送するのに対して、陽イオンポンプはH⁺ポンプしか知られていなかった。光を吸収するレチナルシッフ塩基がプロトン化して正電荷を持っているため、プロトン以外の陽イオンはレチナルの近傍に結合できないし、結合できなければ輸送されないという考えが常識だったのである。

ところが我々は2013年に光駆動ナトリウムポンプとして機能するロドプシンが海洋性細菌の中に存在することを発表、分野を超えて世界を驚かせるに至った(*Nat. Commun.* 2013)。このロドプシンは、Na⁺の他にもLi⁺を輸送する一方、K⁺以上の大きさの陽イオン中ではH⁺ポンプになるというハイブリッド型のポンプであることもわかった。

微生物型ロドプシンは生命科学の中でどちらかというマイナーな存在であったが、脳研究に革新をもたらしている光遺伝学(オプトジェネティクス)のツールとして欠かせないため、最近では大きな注目を集めている。光駆動ナトリウムポンプは光遺伝学のツールとしても大きな期待がある。

最初の論文では、その発見だけに留まらず、光反応中間体の決定からナトリウム結合部位や機能に重要なアミノ酸の同定を発表したが、メカニズムを解明するためには構造情報が不可欠である。科研費がスタートする前年に我々は低温赤外分光の論文を発表していたが(*J. Phys. Chem. B* 2014)、光駆動ナトリウムポンプに関する論文はそれ以外に出ておらず、基礎でも応用でも注目されるこのタンパク質に対して世界をリードする研究展開が期待されていた。一方、構造決定や光遺伝学への応用は激しい国際的な競争が予想された。

2. 研究の目的

光駆動ナトリウムポンプのメカニズムを解明するためには構造情報が不可欠である。本研究では、X線結晶構造解析を用いて立体構造の解明を目指すとともに、我々が世界をリードする赤外差スペクトル分光法を用いて光反応中間体の構造解析を行い、なぜナトリウムイオンが一方向に輸送されるのか明らかにしようと考えた。

研究に当たっては、私たちが報告したタンパク質(*Krokinobacter eikastus* rhodopsin 2; KR2)を第一に考える一方、それ以外にも光駆動ナトリウムポンプは存在することが考えられるので、配列をもとにこれらの機能解析スクリーニングを行い、構造解析に向けた試料調製の最適化を行った。

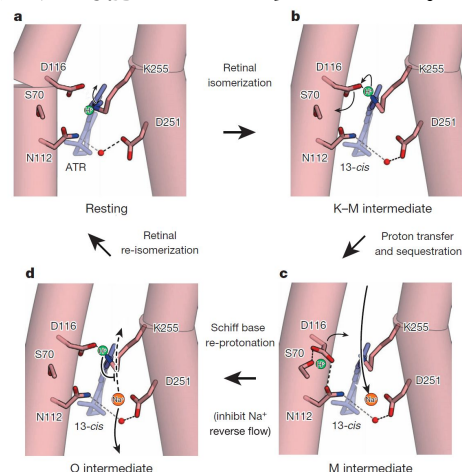
3. 研究の方法

光駆動ナトリウムポンプとして機能するロドプシンの構造情報を得るため、試料調製法を最適化した上で、(1) X線結晶構造解析、(2) 赤外分光解析を行った。既報のKR2以外の光駆動ナトリウムポンプの機能解析を進める一方、結晶化に適した試料調製条件を確立した。結晶化以降の構造解析は濡木グループ(東大院理)との共同研究として進めた。赤外分光に関しては、低温法・時間分解法・全反射法を駆使して光反応中間体において何が起きているのか明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) ナトリウムポンプタンパク質 KR2 の X線結晶構造解析

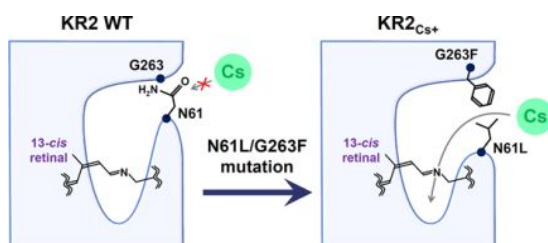
東大・濡木研との共同研究により光駆動ナトリウムポンプの結晶構造を決定することに成功した。まずKR2を酸性条件において結晶化し、構造解析を行った。次に結晶を中性の液に浸したところ色が変化したが、この結晶の構造解析を行ったところ、タンパク質構造はほとんど変化がなかった一方、対イオンとしてはたらくD116の向きが変わったrotamer状態を観察した。酸性ではD116はプロトン化、中性では解離していると考えられるので、我々はこの結果をもとに図のような輸送モデルを提唱した。Resting状態(左上)では、レチナルシッフ塩基とD116がイオン対を形成するのに対して、光反応の過程でM中間体が生成してシッフ塩基からD116にプロトンが移動すると、D116が向きを変えてS70、N112と水素結合を形成する結果、Na⁺の取込みが可能になるというものである。



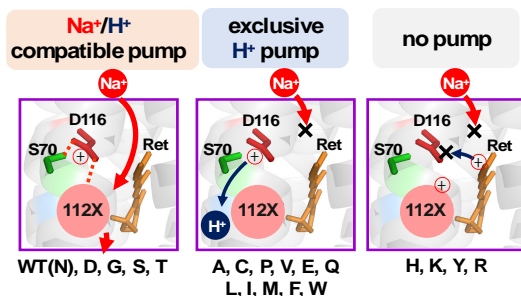
このモデルはいったん取り込んだナトリウムイオンが逆流しないメカニズムを説明できるが、得られた構造は光反応中間体のものではない。しかしながら、変異体の機能解析を行ってみるとS70AとN112AでNa⁺ポンプ活性がなくなり、S70T、N112DではNa⁺をポンプした。水素結合との対応関係はこのモデルの正しさを強く支持する。

本論文を *Nature* 誌に投稿したところ、レフェリーとエディターから構造解析と機能解析だけでは不十分であり、オプトジェネティクス関連のデータを強く求められたため、KR2 が神経抑制ツールとなりうることを示すとともに、構造基盤をもとに変異導入を行って自然界に存在しない光駆動 K⁺ポンプの創成を実現した。その結果、すべてをまとめた重厚な論文として *Nature* 誌に Article として発表することができた (*Nature* 2015)。なお、我々が論文発表した同じ週の *Nat. Struct. Mol. Biol.* 誌にドイツのグループが全く同じ KR2 の構造を発表しており、この事実は予想通りの激しい国際競争を示すものである。

我々はさらに得られた構造基盤をもとに、K⁺ポンプの創成と同じ部位の変異を行い、光駆動 Cs⁺ポンプの創成にも成功した (図) (*J. Phys. Chem. Lett.* 2016)。このタンパク質は世界で初めてセシウムイオンを一方に運ぶことに成功したものであり、放射性セシウムを回収するための新たな技術開発という観点から応用面でも注目され、多数の新聞報道につながった。

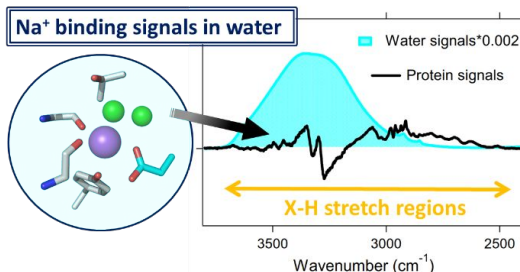


我々が *Nature* 誌で発表したモデルによれば、C ヘリックスに存在する N112 は、暗状態でシッフ塩基の対イオン D116 と相互作用をしない一方、光異性化に伴うシッフ塩基から D116 へのプロトン移動により新たに水素結合を形成する。この水素結合の重要性をより詳しく調べるため、N112 を 19 種類のアミノ酸に変異してポンプ活性を測定した。その結果、吸収波長には大きな影響がなかったにも関わらず、ポンプ活性には大きな影響が見られた。19 種類の中で D, G, S, T 変異体だけが Na⁺ポンプ活性を維持した一方、11 種類は Na⁺ポンプ活性がなくなって H⁺ポンプになり、残る 4 種類はポンプ活性が完全に消失した (図) (*Biochemistry* 2016)。この結果は N112 の重要性を明示するとともに、我々のモデルをさらにサポートするものである。



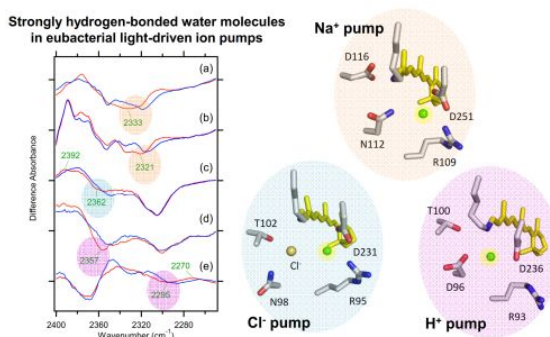
(2) ナトリウムポンプタンパク質 KR2 の赤外分光解析

光駆動ナトリウムポンプ KR2 の結晶構造によれば、構造中に Na⁺は観測されていない。しかしながら、我々は最初の論文において、全反射赤外分光を用いて Na⁺が細胞外側表面に結合することを発表している。このとき測定した振動数領域は通常、行われる 1800-800 cm⁻¹ の領域であった。我々が低温赤外分光で行っているようなより高波数側の振動数領域が測定できれば、X-H 伸縮などの水素結合ドナーの構造情報を得ることができる。そこで測定系を最適化し、室温・水溶液中で中赤外の全波数領域での差スペクトルを初めて測定することに成功した。その結果、KR2 に対する Na⁺の結合に伴い、チロシンの O-H 基が異常に強い水素結合を形成することを見出した (図) (*J. Phys. Chem. B* 2018)。変異体実験からこのチロシンは Y25 と帰属され、このような五量体構造内での特異な水素結合が KR2 の安定化に寄与することがわかった。



赤外分光法を用いた解析は、イオンポンプの機能転換研究にも活かされた。我々は光駆動ナトリウムポンプを含むイオンポンプの機能転換をアミノ酸置換により試みたところ、3 通りの機能転換に成功した。ところが逆方向の 3 通りの機能転換はアミノ酸置換の数を増やしても成功せず、機能転換の非対称性が明らかになった (*J. Biol. Chem.* 2016)。興味深いことに、進化を遡る方向の機能転換は限られた変異で達成された一方、進化に沿った方向の機能転換は変異数を増やしても実現しなかったのである。

機能転換と進化との相関は、進化によって新たな機能を獲得してもそれまでの機能を維持するような構造的要因が存在することを示唆する。その構造的要因に関連して、系統的な赤外分光解析により、ロドプシンの活性中心に存在する強い水素結合を形成した水分子との相関を明らかにした (次ページ図) (*Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018)。このような水分子は H⁺ポンプ機能に必須であることを明らかにしてきたが、Cl⁻ポンプや Na⁺ポンプとして機能するロドプシンが新たな機能を獲得しても水分子の水素結合は保存されていたのである。この事実は、水素結合の強い水分子の存在が機能転換と進化との相関に関わる構造的要因の 1 つであることを強く示唆する。



また赤外分光法は、我々が新規タンパク質として発見した内向きプロトンポンプロドプシンの構造解析においても重要な役割を果たし、外向きプロトンポンプと類似の構造を持つにも関わらず逆方向へポンプするメカニズムを明らかにした (*Nat. Commun.* 2016)。

本研究では、X線結晶構造解析や赤外分光以外にも様々な手法を用いて、光駆動ナトリウムポンプ KR2 の構造と機能に関する研究を行った。

可視吸収分光に関して、理研との共同研究により KR2 の超高速分光を行ったところ、他のロドプシンよりも高速の異性化反応が起こることを明らかにした。この事実、レチナルシッフ塩基の対イオンが通常のロドプシンとは異なる位置に存在するためと考えられる。また陽イオンの取込ダイナミクスを測定し、ナトリウムイオンと水素イオンが競合的に取り込まれること、同濃度であればプロトンポンプとしてはたらくことを明らかにした。さらにラマン散乱法を用いてダイナミクス解析を行った結果を論文発表することができた。

以上の研究成果は 2015.4.-2018.3. の3年間で、54 報の学術論文、295 件の学会発表、4 件の図書として発表し、高い評価を得ることができた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 54 件)

H. Kandori*, K. Inoue, S. P. Tsunoda: "Light-driven sodium-pumping rhodopsin: A new concept of active transport" *Chem. Rev.* in press (2018). 査読有

A. Shigeta, S. Ito, R. Kaneko, S. Tomida, K. Inoue, H. Kandori, I. Kawamura*: "Long-distance perturbation on Schiff base-counterion interaction by His30 and the extracellular Na⁺-binding site in *Krokinobacter* rhodopsin 2" *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 8450-8455 (2018). 査読有

Y. Nomura, S. Ito, M. Teranishi, H. Ono, K. Inoue, H. Kandori*: "Low-temperature FTIR

spectroscopy provides evidence for protein-bound water molecules in eubacterial light-driven ion pumps" *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3165-3171 (2018). 査読有

S. Ito, M. Iwaki, S. Sugita, R. Abe-Yoshizumi, T. Iwata, K. Inoue, H. Kandori*: "Unique hydrogen bonds in membrane protein monitored by whole mid-IR ATR spectroscopy in aqueous solution" *J. Phys. Chem. B* 122, 165-170 (2018). 査読有

S. P. Tsunoda, M. Prigge, R. Abe-Yoshizumi, K. Inoue, Y. Kozaki, T. Ishizuka, H. Yawo, O. Yizhar, H. Kandori*: "Functional characterization of sodium-pumping rhodopsins with different pumping properties" *PLoS One* 12, e0179232 (2017). 査読有

A. Shigeta, S. Ito, K. Inoue, T. Okitsu, A. Wada, H. Kandori, I. Kawamura*: "Solid-state NMR structural study of the retinal-binding pocket in sodium ion pump rhodopsin" *Biochemistry* 56, 543-550 (2017). 査読有

K. Inoue, S. Ito, Y. Kato, Y. Nomura, Shibata M, Uchihashi T, S. P. Tsunoda, H. Kandori*: "Natural light-driven inward proton pump" *Nat. Commun.* 7, 13415 (2016). 査読有

R. Abe-Yoshizumi, K. Inoue, H. E. Kato, O. Nureki, H. Kandori*: "Role of Asn112 in a Light-Driven Sodium Ion-Pumping Rhodopsin" *Biochemistry* 55, 5790-5797 (2016). 査読有

Y. Hontani, K. Inoue, M. Kloz, Y. Kato, H. Kandori, J. T. Kennis*: "The photochemistry of sodium ion pump rhodopsin observed by watermarked femto- to submillisecond stimulated Raman spectroscopy" *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18, 24729-24736 (2016). 査読有

M. Konno, Y. Kato, H. E. Kato, K. Inoue, O. Nureki, H. Kandori*: "Mutant of a light-driven sodium ion pump can transport cesium ions" *J. Phys. Chem. Lett.* 7, 51-55 (2016). 査読有

H. E. Kato*, K. Inoue, H. Kandori, O. Nureki*: "The light-driven sodium ion pump: A new player in rhodopsin research" *Bioessay* 38, 1274-1282 (2016). 査読有

Y. Kato, K. Inoue, H. Kandori*: "Kinetic analysis of H⁺-Na⁺ selectivity in a light-driven Na⁺-pumping rhodopsin" *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 5111-5115 (2015). 査読有

H. E. Kato, K. Inoue, R. Abe-Yoshizumi, Y. Kato, H. Ono, M. Konno, S. Hososhima, T. Ishizuka, M. R. Hoque, H. Kunitomo, J. Ito, S. Yoshizawa, K. Yamashita, M. Takemoto, T. Nishizawa, R. Taniguchi, K. Kogure, A. D. Maturana, Y. Iino, H. Yawo, R. Ishitani, H. Kandori*, and O. Nureki*: "Structural basis for Na⁺ transport mechanism by a light-driven Na⁺ pump" *Nature* 521, 48-53 (2015). 査読有

K. Inoue, M. Konno, R. Abe-Yoshizumi, H. Kandori*: "The role of the NDQ motif in sodium-pumping rhodopsins" *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 294-296 (2015). 査読有

H. Kandori: "Ion-pumping microbial rhodopsins" *Front. Mol. Biosci.* 52, 1-11 (2015).

K. Inoue, Y. Kato, H. Kandori*: "Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria" *Trends Microbiol.* 23, 91-98 (2015). 査読有

〔学会発表〕(計 295 件)

H. Kandori: "Spectroscopic study of photoreceptive proteins" (Award Lecture), AOCF 2017, Seoul, Korea, November 2017.

H. Kandori: "Soft structure-function relationship revealed by functional conversion of photoreceptive proteins", The 17th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Sendai, Japan, June 2017.

H. Kandori: "Unexpected rhodopsin functions initiated by common retinal photoisomerization", 253rd ACS National Meeting & Exposition "Sunlight-Driven Processes: Exposing the Mechanism Underlying Productive Photoactivities", San Francisco, USA, April 2017.

H. Kandori: "Microbial rhodopsin newcomers after the Koyama era", International Symposium on Physics of Life, Nagoya, Japan, March 2017.

H. Kandori: "Mechanism of light-driven Na⁺ pump rhodopsin", 17th International Conference on Retinal Proteins, Potsdam, Germany, October 2016.

H. Kandori: "Light-induced difference FTIR spectroscopy of photolyase", American Society for Photobiology, Symposium on "Dynamics and Mechanism of DNA Repair by Photolyase: Experiment and Theory", Tampa, USA, May 2016.

H. Kandori: "Light-induced difference FTIR spectroscopy of photoreceptive proteins", IUPAC 2016, Osaka, Japan, April 2016.

H. Kandori: "Structure, function and application of novel bacterial rhodopsins", 7th OCARINA International Symposium, Osaka, Japan, March 2016.

H. Kandori: "Mechanism of active ion-transport by light", Gordon Research Conference on "Photosensory Receptors & Signal Transduction", Galveston, USA, January 2016.

H. Kandori: "Cation-pumping rhodopsin as optogenetic and environmental tools", The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), Honolulu, USA, December 2015.

H. Kandori: "Spectroscopic study of light-driven sodium-pumping rhodopsin", 5th Asian Spectroscopy Conference, Sydney, Australia, September 2015.

H. Kandori: "What do H⁺ pumps transport?", The 53rd Annual Meeting of the Biophysical

Society of Japan, Symposium "Proton permeation mechanism across membrane", Kanazawa, Japan, September 2015.

H. Kandori: "Photochemistry and photobiology in light and life research", Annual Meeting on Photochemistry 2015, Symposium on Photo-Biology, "Photo-Biology: Sensing Light and Manipulation with Light", Osaka, Japan, September 2015.

H. Kandori: "Molecular mechanism of ion-pumping microbial rhodopsins", 2015 International Symposium on Marine Genomics, Seoul, Korea, June 2015.

〔図書〕(計 4 件)

H. Kandori: "History and perspectives of light-sensing proteins" Hiromu Yawo, Hideki Kandori, Amane Koizumi ed., Optogenetics, Part I, Chap. 1, pp. 3-16, Elsevier (2015)

H. Kandori: "Protein-controlled isomerization in rhodopsins" Takeshi Akasaka, Atsuhiko Ohtsuka, Shunichi Fukuzumi, Yoshio Aso, Hideki Kandori ed., Chemical Science of -Electron Systems, Part VIII, Chap. 44, pp. 695-713, Elsevier (2015).

〔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.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

(3) 連携研究者