

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19370067

研究課題名（和文）新しく発見された古細菌型ロドプシンの赤外分光

研究課題名（英文）Infrared Spectroscopy of Newly Discovered Archaeal-type Rhodopsins

研究代表者

神取 秀樹（KANDORI HIDEKI）

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70202033

研究成果の概要（和文）：本研究では近年、新たに発見された古細菌型ロドプシンに対して系統的な赤外分光を行い、光がどのようにエネルギーや情報へと変換されるのか、そのメカニズムを明らかにすることを目指した。既知の古細菌ロドプシンとの比較を徹底的に行った結果、プロトンポンプ活性のあるロドプシンには強い水素結合を形成した水分子が必ず存在するという構造と機能を結びわめて重要な結論を得ることができた。わずか1個の水分子がプロトンポンプ機能を決定する可能性を見出したのである。

研究成果の概要（英文）：Archaeal-type rhodopsins were found in Archaea, but the recent genome sequencing projects have revealed that archaeal rhodopsins also exist in Eukarya and Eubacteria. In this grant project, we investigated molecular mechanism of light-energy and light-signal conversions in newly discovered archaeal-type rhodopsins. Comprehensive Fourier-transform infrared (FTIR) analysis led to a finding that proton-pumping rhodopsins possess strongly hydrogen-bonded water molecules, suggesting that such an internal water is the functional determinant of light-driven proton pump.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：光生物、生体分子、レチナール、水素結合、ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

好塩性のバクテリアには有名なバクテリオロドプシン (BR) など4種類が知られており、光駆動ポンプとして光をエネルギーに変換するか、光センサーとして光を情報に変換する。このようなロドプシンはこれまで、特殊な古細菌にのみ存在すると考えられてきた。しかしながら、近年のゲノム科学の進展により、古細菌型のロドプシンが海洋性バクテリアやラン藻などの真正細菌にも、カビ類などの真核生物にも存在することが明らかになった。

例えば、海洋性バクテリアには千種類を超えるロドプシンが存在し、プロトンポンプとして光合成を行っている (BR のような光駆動プロトンポンプは特殊なものではなく、電子移動を伴わない光合成として生物が普遍に利用している可能性がある)。ラン藻のロドプシンは光センサーとして機能しているようだが、その伝達蛋白質はセンサーロドプシンのように膜貫通型ではなく水溶性であることが明らかになった。膜内ではなく細胞質側で情報伝達するという意味では、視物質ロドプシンと類似のシステムである。さらに、カビ類で発見された2種類のロドプシンはお互いに高い相同性を示すにも関わらず、一方だけがプロトンポンプ活性をもつことが知られている。これらに加えて、ポンプではなくチャンネルの機能をもったロドプシンも発見され、神経生物学への応用が活発に行われている。

2. 研究の目的

近年、新たに発見された古細菌型ロドプシンに対して系統的な赤外分光を行い、光がどのようにエネルギーや情報へと変換されるのか、そのメカニズムを明らかにする。特に、我々が世界をリードしてきた既知の古細菌ロドプシン (ポンプのバクテリオロドプシン、ハロロドプシン、センサーのフォボロドプシンなど) の赤外分光との比較を徹底的に行い、ロドプシンが機能する際の構造変化について統一的な原理を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

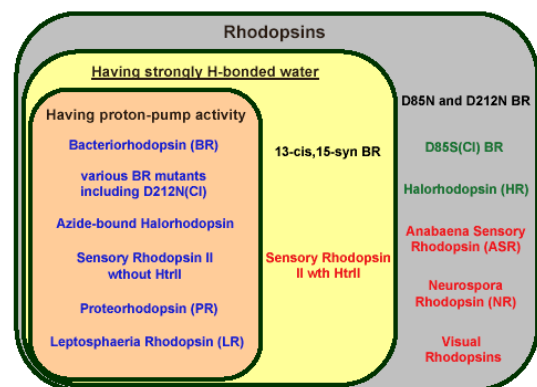
対象となる古細菌型ロドプシンとしては、真正細菌に見出された Proteorhodopsin (PR), Gloeobacter Rhodopsin (GR), Anabaena Sensory Rhodopsin (ASR)、真核生物に見出された Leptosphaeria Rhodopsin (LR), Neurospora Rhodopsin (NR) を考えた。これらの新規古細菌

型ロドプシンに対して系統的な赤外分光を行って機能発現の際の構造変化の情報を得るとともに、機能を転換させた変異蛋白質を設計し、これらに対しても赤外分光計測を行うことを計画した。そして既知の古細菌ロドプシンの実験結果と比較することにより、光駆動ポンプや光センサーに必須の構造変化を見出すことを目指した。

4. 研究成果

(1) プロトンポンプ機能を決定する水分子

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、これがレチナールシッフ塩基と 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 には存在し、プロトンポンプ活性のない ASR, NR には存在しなかったのである。新規ロドプシン以外でも、強い水素結合を形成した水分子はプロトンをポンプする D212N(Cl⁻) BR, HR(N₃), SRII には見つかった一方、プロトンポンプ活性のない D85S(Cl⁻), HR, visual rhodopsin などには見出されなかったのである。

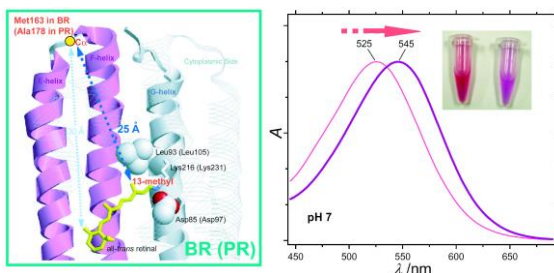


こうして、ロドプシンのプロトンポンプ活性と内部結合水の水素結合強度の間には強い相関があることがわかった。ロドプシンのプロトンポンプ活性は1個の水の水素結合によって決まることが示唆された。

(2) PR の色を変える特異なアミノ酸の変異

海洋性バクテリアには千種類以上の 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、我々はレチナー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。

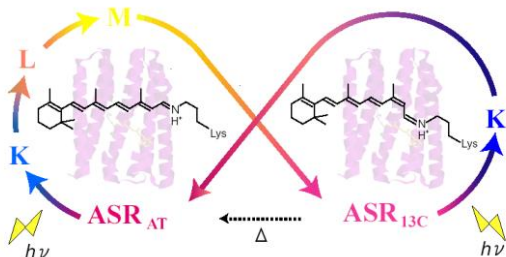
具体的には green PR の E-F ループに存在する Ala178 を Arg に変異したところ、20 nm もの長波長シフトが起こったのである。このような変異の効果は BR には見られず、PR に特有であることを、さらには 178 位の部位に特異的であることを見出した。この部位はレチナール結合部位とリンクして構造転移を起こすことが示唆された。



(3) ASR の特殊な光反応の性質

ASR はフォトクロミズムセンサーとして光情報変換をすることが示唆されていた。しかしながら、BR などプロトンポンプのロドプシンは 1 回の光反応により 1 個のプロトンを細胞質側から細胞外側にポンプするのでサイクル反応をとるのが最適であり、実際に光反応は 100 % のサイクル反応を示す。光化学の立場から本当にフォトクロミズム反応が起こるのかどうか疑問であった。我々は ASR の光反応を低温可視分光法により詳細に検討した結果、この蛋白質が 100 % のフォトクロミズム反応が実現していることがわかった。

興味深いことに、ASR と BR には相同性が 60 % 程度あり、その X 線結晶構造を比較すると、蛋白骨格は両者ともほぼ同じような構造をしていることである。レチナールシッフ塩基近傍の構造もよく似ているが、シッフ塩基近傍の水素結合構造が ASR と BR とで変化していることが我々の赤外分光測定において明らかになっており、このようなわずかな違



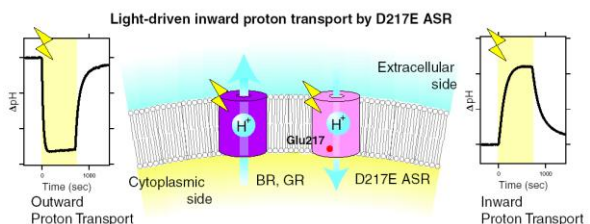
いがフォトクロミズムとサイクル反応という、光反応の違いをもたらしているものと考えられる。プロトンポンプを行うロドプシンは 100 % の光サイクル反応に、フォトクロミックセンサーであるロドプシンには 100 % のフォトクロミズム反応に、おそらく進化の過程で最適化されたのであろう。

(4) 内向きプロトン輸送を行う蛋白質の創成

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だけでなく、以下のような医学・生理学分野への応用が期待できる。

近年、マウスの脳神経細胞にイオン輸送性のロドプシンを発現し、光でナトリウムやクロライドの輸送を行うことで神経活動を制御しようという試みが活発に行われている。陽イオンの輸送は青い光 (チャンネルロドプシン)、クロライドの輸送は赤い光 (HR) で制御されるのに対し、今回、我々が創り出した内向きのプロトン輸送は緑色の光で制御されるため、RGB の 3 色を駆使した神経活動制御のツールとして応用される可能性がある。



なお、本研究成果は平成 21 年 9 月に新聞 3 紙に掲載されている。

本研究成果は 2007-2009 の 3 年間で、43 件の原著論文として発表することができた。また、38 件の招待講演を含む 140 件の学会発表を行った。このうち海外で開催された国際会議の招待講演が 17 件あり、この数字が我々の成果に対する高い評価を反映している。

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 20 件)

- ① A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung and H. Kandori, "Engineering an Inward Proton Transport from a Bacterial Sensor Rhodopsin" *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16439-16444 (2009). 査読有
- ② K. Nakashima, T. Nakamura, S. Takeuchi, M. Shibata, M. Demura, T. Tahara and H. Kandori, "Property of Anion Binding Site of *pharaonis* Halorhodopsin Studied by Ultrafast Pump-Probe Spectroscopy and Low-Temperature FTIR Spectroscopy" *J. Phys. Chem. B* 113, 8429-8434 (2009). 査読有
- ③ M. Yoshitsugu, J. Yamada and H. Kandori, "Color-Changing Mutation in the E-F Loop of Propeorhodopsin" *Biochemistry* 48, 4324-4330 (2009). 査読有
- ④ V. A. Lorenz-Fonfria and 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
- ⑤ Y. Kitade, Y. Furutani, N. Kamo and H. Kandori, "Proton Release Group of *pharaonis* Phoborhodopsin Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy" *Biochemistry* 48, 1596-1603 (2009). 査読有
- ⑥ A. Kawanabe and H. Kandori, "Photoreactions and Structural Changes of *Anabaena* Sensory Rhodopsin" *Sensors* 9, 9544-9607 (2009). 査読有
- ⑦ D. Suzuki, Y. Sudo, Y. Furutani, H. Takahashi, M. Homma and H. Kandori, "Structural Changes of *Salinibacter* Sensory Rhodopsin I upon Formation of the K and M Photointermediates" *Biochemistry* 47, 12750-12759 (2008). 査読有
- ⑧ A. Kawanabe, Y. Furutani, S. R. Yoon, K.-H. Jung, and H. Kandori, "FTIR Study of the L Intermediate of *Anabaena* Sensory Rhodopsin: Structural Changes in the Cytoplasmic Region" *Biochemistry* 47, 10033-10040 (2008). 査読有
- ⑨ M. Ito, Y. Sudo, Y. Furutani, T. Okitsu, A. Wada, M. Homma, J.L. Spudich and H. Kandori, "Steric Constraint in the Primary Photoproduct of Sensory Rhodopsin II Is a prerequisite for Light-Signal Transfer to HtrII" *Biochemistry* 47, 6208-6215 (2008). 査読有
- ⑩ V. A. Lorenz-Fonfria, Y. Furutani and H. Kandori, "Active Internal Waters in the Bacteriorhodopsin Photocycle. A Comparative Study of the L and M Intermediates at Room and Cryogenic Temperatures by Infrared Spectroscopy"

Biochemistry 47, 4071-4081 (2008). 査読有

- ⑪ M. Yoshitugu, M. Shibata, D. Ikeda, Y. Furutani and 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
- ⑫ Y. Furutani, M. Ito, Y. Sudo, N. Kamo and H. Kandori, "Protein-Protein Interaction of a *pharaonis* Halorhodopsin Mutant Forming a Complex with *pharaonis* Halobacterial Transducer Protein II Detected by Fourier Transform Infrared Spectroscopy" *Photochem. Photobiol.* 84, 874-879 (2008). 査読有
- ⑬ Y. Sudo, Y. Furutani, M. Iwamoto, N. Kamo and H. Kandori, "Structural Changes in the O-decay Accelerated Mutants of *pharaonis* Phoborhodopsin" *Biochemistry* 47, 2866-2874 (2008). 査読有
- ⑭ Y. Furutani, H. Takahashi, J. Sasaki, Y. Sudo, J. L. Spudich, and H. Kandori, "Structural Changes of Sensory Rhodopsin I and its Transducer Protein Are Dependent on the Protonated State of Asp76" *Biochemistry* 47, 2875-2883 (2008). 査読有
- ⑮ A. Kawanabe, Y. Furutani, K.-H. Jung and H. Kandori, "Photochromism of *Anabaena* Sensory Rhodopsin" *J. Am. Chem. Soc.* 129, 8644-8649 (2007). 査読有
- ⑯ M. Shibata, M. Yoshitsugu, N. Mizuide, K. Ihara and H. Kandori, "Halide Binding by the D212N Mutant of Bacteriorhodopsin Affects Hydrogen Bonding of Water in the Active Site." *Biochemistry* 46, 7525-35 (2007). 査読有
- ⑰ V. A. Lorenz-Fonfria and H. Kandori, "Bayesian Maximum Entropy (Two-Dimensional) Lifetime Distribution Reconstruction from Time-Resolved Spectroscopic Data" *Appl. Spectrosc.* 61, 428-43 (2007). 査読有
- ⑱ D. Ikeda, Y. Furutani and H. Kandori, "FTIR Study of the Retinal Schiff Base and Internal Water Molecules of Proteorhodopsin" *Biochemistry* 46, 5365-73 (2007). 査読有
- ⑲ Y. Sudo, Y. Furutani, J.L. Spudich and H. Kandori, "Early Photocycle Structural Changes in a Bacteriorhodopsin Mutant Engineered to Transmit Photosensory Signals" *J. Biol. Chem.* 282, 15550-15558 (2007). 査読有
- ⑳ V. A. Lorenz-Fonfria and H. Kandori, "Practical Aspects of the Maximum Entropy Inversion of the Laplace Transform for Quantitative Analysis of Multi-Exponential Data" *Appl. Spectrosc.* 61, 74-84 (2007). 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

① H. Kandori, "Bio- π -space in Photoreceptive Proteins"

The 47th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Symposium "Bio- π -space: Mechanistic investigation and creation of new functions", October 31 2009, Tokushima, Japan

② H. Kandori, "Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecule as the Determinant of Proton-Pump Function of Rhodopsins"

Horiba-ISSP International Symposium (ISSP-11) on "Hydrogen and Water in Condensed Matter Physics", October 13 2009, Chiba, Japan

③ H. Kandori, "Light & Life, Light Sensor Protein"

An International Conference on "Biotechnology for a Sustainable Future", September 16 2009, Bali, Indonesia

④ 神取秀樹、古谷祐詞「光に応答しない膜機能分子の赤外分光測定」

生理学研究所研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉える：静止画から動画へ」、2009年9月3日、岡崎

⑤ H. Kandori, "Structural Changes Accompanying Retinal Photoisomerization in Rhodopsins"

XXIV International Conference on Photochemistry, July 21 2009, Toledo, Spain

⑥ H. Kandori, "FTIR Study of Rhodopsins in Action" 15th International Congress on Photobiology, June 22 2009, Dusseldorf, Germany

⑦ H. Kandori, "The Determinant of Light-Energy and Light-Signal Conversion in Rhodopsins"

2008 Korea-Japan Frontier Photoscience (KJFP) Symposium, September 27 2008, Jeju, Korea

⑧ V. A. Lorenz Fonfria, Y. Furutani and H. Kandori, "Water Dynamics in Bacteriorhodopsin: FTIR Study at Low- and Room-Temperatures"

The 13th International Conference on Retinal Proteins, June 16 2008, Barcelona, Spain

⑨ H. Kandori, "The Determinant of Light-Energy and Light-Signal Conversion in Rhodopsins"

10th International Symposium on Biotechnology, Metal Complexes, and Catalysis, May 13 2008, Zhengzhou, China

⑩ H. Kandori, "Water Dynamics in Bacteriorhodopsin: Low- and Room-Temperature FTIR Study"

5th Japan-China Crossover Science Symposium, February 28, 2008, Mito, Japan

⑪ H. Kandori, "The Determinants of Light-Energy and Light-Signal Conversion in Rhodopsins"

Gordon Research Conference on 'Photosensory Receptors & Signal Transduction', January 27 2008, Ventura, USA

⑫ 神取秀樹「分子ポンプを考える」

日本生物物理学会第45回年会シンポジウム、2007年12月21日、横浜

⑬ 神取秀樹「水分子の水素結合強度が決めるロドプシンの機能」

赤外ラマン分光部会シンポジウム、2007年12月6日、豊中

⑭ H. Kandori, "The Determinants of Light-Energy and Light-Signal Conversion in Rhodopsins"

Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function, November 10, 2007, Okazaki, Japan

⑮ H. Kandori, "The Determinant of Light-Energy and Light-Signal Conversion in Rhodopsins"

International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering, September 25, 2007, Corf, Greece

⑯ H. Kandori, "Determinants of Light-Energy and Light-Signal Conversions in Rhodopsins"

International Symposium on "Retinal Proteins: Experiments and Theory", September 23, 2007, Bremen, Germany

⑰ H. Kandori, "FTIR Study of Photoreceptive Proteins in Action"

International Workshop of the Collaborative Research Center on "Protein-Cofactor Interactions in Biological Processes", September 16, 2007, Berlin, Germany

⑱ 神取秀樹「膜蛋白質におけるプロトン伝導」

生理学研究所研究会「膜機能分子ダイナミクスの分子機構解明に向けて」、2007年7月19日、岡崎

⑲ H. Kandori, "FTIR study of rhodopsins in action"

LALS 2007, International Conference on Laser Applications in Life Sciences, June 2007, Moscow, Russia

⑳ 神取秀樹「ロドプシンの赤外分光法：より生理的な測定を目指して」

分子科学研究所研究会「生細胞の分子科学」、2007年5月22日、岡崎

〔その他〕

ホームページ

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・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70202033

