

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22247024

研究課題名(和文) 光に応答しない膜機能分子の赤外分光測定

研究課題名(英文) FTIR spectroscopy of non-photoreceptive membrane proteins

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) 32,900,000円

研究成果の概要(和文)：振動分光法は一般に構造生物学の解析ツールとして認識されていないが、機能発現のための構造変化をモニターする解析ツールとして高い可能性をもつことを我々は光受容タンパク質の研究で明らかにしてきた。本研究では、この手法を光に応答しない膜機能分子に拡張し、原子レベルでの構造変化を解明するための解析ツールとして確立することを目指した。具体的には、エバネッセント波を利用して溶液中での計測が可能な全反射赤外分光法を利用した差スペクトル測定系を最適化し、イオンチャネル、回転モーターなど種々の膜機能分子に対する測定を行ったところ、新たな構造情報が得られた。得られた成果はNatureなどに論文発表した。

研究成果の概要(英文)：In general, vibrational spectroscopy has never been recognized as one of structural biology tools, but we have shown that light-induced difference FTIR spectroscopy is a powerful tool for the analysis of structural changes in photoreceptive proteins for function. This project aims at establishing difference FTIR spectroscopy as a tool of similar analysis for non-photoreceptive membrane proteins. We optimized the experimental setup using attenuated total reflection (ATR) FTIR spectroscopy, which enabled to obtain difference FTIR spectra upon various stimuli in solution. We obtained structural information of ion-channels (potassium, sodium, proton and water channels), ion-pumps that specifically bind sodium and chloride ions, rotary motors such as V-type ATPase, GPCRs such as taste-receptor, and transporters such as POT. We reported more than 70 articles in Nature, Nature Commun., Nature Nanotech., 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：赤外分光 膜タンパク質 イオン チャネル レセプター

1. 研究開始当初の背景

振動分光法は X 線結晶構造解析や NMR と違って、それ自身で原子の位置情報を与えないため、一般に構造生物学の解析ツールとはみなされていない。特に、赤外分光法は、タンパク質の溶媒である水の大きな吸収があるため、生命科学の研究ツールとしてほとんど使われていないのが現状である。しかしながら、私はロドプシンなどの光受容タンパク質が光によって機能発現を制御できることから、赤外分光法が構造機能相関の研究において強力な実験解析ツールであることを明らかにしてきた。

それではこの方法はいかに一般のタンパク質に適用できるだろうか？ 本計測手法は外部刺激による構造変化を赤外差スペクトルの形で得る **stimulus-induced difference FTIR spectroscopy** の一種であり、論理的にはあらゆる生体分子に対して同様の計測が可能である。しかしながら、現実的には光という優れた外部刺激と同等の刺激は不可能であるというのが共通の認識であった。赤外分光のもつ優れた性質を光に応答しないタンパク質にも一般化できないか、というのは生体分子の赤外分光において世界をリードする私が常に考え続けてきた課題であった。

2. 研究の目的

本研究では赤外差スペクトル法を用いた構造変化の解析を、光受容タンパク質以外の系にも拡張する。特に、結晶化が困難なため構造情報が不十分な膜タンパク質を主要な研究対象とし、「膜機能分子の構造機能相関」解明のための一般的な解析ツールとして確立することを目指す。具体的には、エバネッセント波を利用して溶液中で計測が可能な全反射赤外分光法 (**Attenuated Total Reflection Fourier-transform infrared spectroscopy; ATR-FTIR spectroscopy**) を用いることで、イオンやリガンド結合などの外部刺激に応答したスペクトル変化を測定する系を構築する。

ここで強調できるのは、本手法が水溶性のタンパク質よりは膜タンパク質の計測に向いているという点である。全反射赤外セルに吸着させた水溶性タンパク質や界面活性剤で可溶化した膜タンパク質はバッファー溶液を流すことによってセルから剥がれるが、脂質中の膜タンパク質であれば剥がれない。従って、基板に特異的に吸着させることなく、自然な状態で膜タンパク質を赤外セルに吸着できる。さらに強調できるのは、測定に必要なサンプル量であり、予備的な実験によれば、わずか **0.005 mg** の膜タンパク質試料で計測が可能である。十分な量の試料が得難い「膜機能分子の構造機能相関」の解析に、大きな可能性をもった測定手法である。

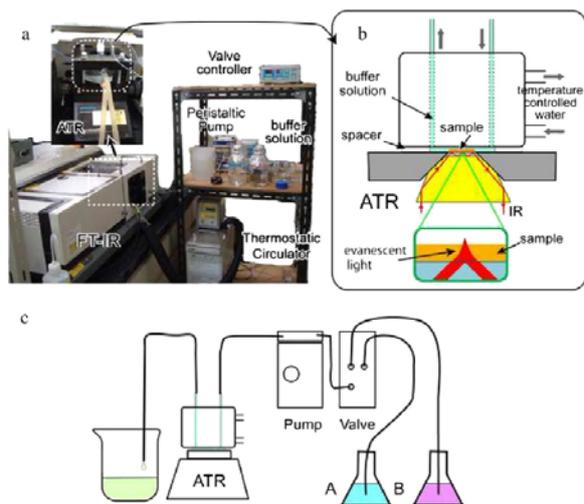
このような測定系を用いて、構造機能相関がブラックボックスである膜機能分子、例えば、イオンチャネルや回転モーターにおける

イオン結合はどの部位で、イオンがどのような相互作用により結合するのか、さらにそれがどのような構造変化を誘起する結果、機能につながるのか、といった問題を実験的に明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

エバネッセント波を利用して溶液中で計測が可能な全反射赤外分光法 (**ATR-FTIR spectroscopy**) を膜機能分子の測定に対して最適化する。目標は光受容タンパク質に対して我々が実現したレベル (水分子 1 個を捉える世界最高峰の計測) である。

その上で、イオンチャネル、回転モーター、G タンパク質共役型受容体などの測定を行い、イオン結合やリガンド結合による官能基の構造変化やタンパク質の構造変化を捉える。これらの測定により、構造機能相関の理解が遅れている膜機能分子の動作機構を解明する。神取研 2 台、古谷研 1 台の赤外分光装置が使用可能であり、試料は優れた共同研究者から提供されると同時に神取研でも調製が可能である。



4. 研究成果

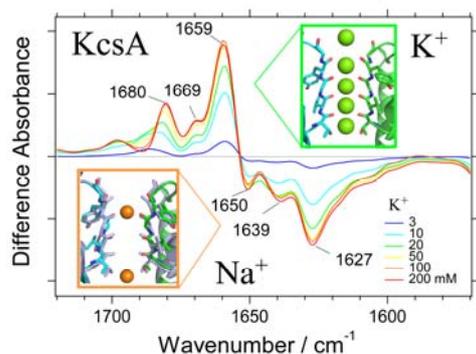
(1) チャネルタンパク質の全反射赤外分光

15 年以上前に K^+ チャネル (KcsA) の結晶構造が報告されてから、チャネル研究は劇的に変化した。より小さな Na^+ より 3 桁以上、効率よく K^+ を輸送できるしくみを物理化学の言葉で説明することが可能になったのである。特に、主鎖の $C=O$ 基がイオン選択性フィルターを構成していたことは研究者にとって驚きであり、分子生物学的な実験からその知見を得ることは不可能であった。さらに KcsA は酸性になると開くチャネルであり、選択性フィルターの反対側に pH 依存性ゲートが存在することがわかっている。現在、 K^+ の効率的な輸送機構について、多くの理論科学者も参入して活発な議論が繰り広げられているが、選択性フィルターのイオン認識メカニズムに関する構造情報は X 線結晶構造

しかなかった。さらに機能構造である開いた状態のX線構造はなく、最も理解の進んだチャンネルといえども、十分な理解は得られていない。

このような現状のもと、私は全反射赤外分光計測を用いた解析が新たな構造情報をもたらすことができると考え、福井大医の老木成稔博士との共同研究を開始した。特に関心があったのは、アミド I という振動バンド（主鎖の C=O 伸縮）はふつうタンパク質の二次構造（ α ヘリックス、 β シートなど）を反映するだけであるが、チャンネルは主鎖の C=O 基をイオン認識のために直接、利用しており、イオン認識という機能構造がダイレクトにアミド I 振動に反映するという稀有な例である。

全反射赤外分光を用いて KcsA の K^+ 結合型と Na^+ 結合型の差スペクトルを測定することに成功した。アミド I の信号はイオン認識を直接、反映した信号であり、本データはチャンネルのイオン認識という機能過程に伴う振動の変化を捉えた世界で最初の例である (Furutani et al. J. Phys. Chem. Lett. 2012)。注意すべきなのは、単結晶が得られタンパク質構造をモデル化したら終了となる X 線結晶構造解析と異なり、図の差スペクトルが得られた、というのは構造機能相関解明の出発点であるということである。どの部位でどんな構造変化が起こっているのかを明らかにするため、基盤研究の期間は終了したが、アミノ酸変異や同位体標識を用いた研究が進行中である。

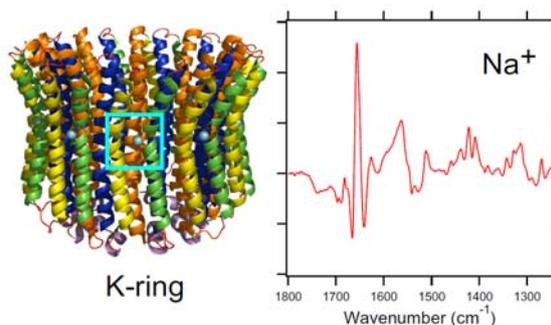


KcsA において大きな手応えを得ることができたため、スイスの Li 博士との共同研究で Na^+ チャンネル、岡村博士（阪大医）との共同研究でプロトンチャンネル、安井博士（慶応大医）との共同研究で水チャンネルの研究を行っており、系統的なイオンチャンネルの赤外分光により、輸送されるイオンの特異的な結合メカニズムを解明したいと考えている。

(2) 回転モータータンパク質の全反射赤外分光

千葉大の村田武士博士らは、V 型 ATPase の膜内ローターを結晶化することに成功した。ATP の加水分解エネルギーを利用して Na^+ を能動輸送するこの膜タンパク質は、有

名な F_0F_1 -ATPase と同様、膜内部分の回転運動が加水分解とイオン輸送を仲立ちしていると理解されているが、膜内部位だけの結晶構造からは機能と結びつけた議論は困難である。そこで我々は、ATR-FTIR を用いて、 Na^+ の有無における差スペクトルの測定を試みた。分子量 70 万という巨大なタンパク質複合体であるが、差スペクトルを測定することに成功した (Furutani et al. J. Am. Chem. Soc. 2011)。さらに赤外分光計測の後に ATPase の活性が保たれていたことを確認した。本計測手法は、脂質中の膜タンパク質を非特異的に赤外セルに吸着させて実験しており、きわめて天然の環境に近いと考えていたが、それを証明する結果となった。さらに、V 型 ATPase の全長試料の調製は容易なことではないが、0.005 mg の試料で測定が可能はこの手法の特長を顕著に示している。興味深いことに、全長の構造変化は回転モーターのみの構造変化とほとんど一致していた (Furutani et al. J. Am. Chem. Soc. 2011)。この事実は、 Na^+ の結合解離により大きな構造変化が起こらない

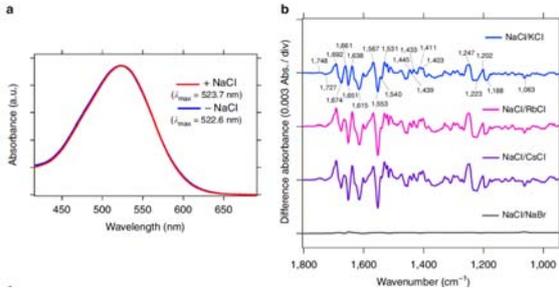


ことを示しており、この回転モーターのメカニズムに対して重要な情報を提供することができた。なお私は古谷博士、村田博士とともに X 線結晶構造解析と赤外分光から得られた知見をまとめて invited review として発表したが、新しい視点での総説として評価を得ている (Kandori et al. Biochim. Biophys. Acta 2015)。

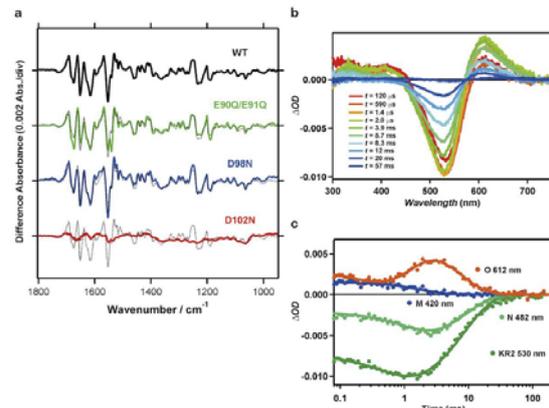
(3) ロドプシンに対するイオン結合の全反射赤外分光

本研究の課題は「光に応答しない膜タンパク質」を対象とした赤外分光であるが、研究期間内に興味深いロドプシンが見つかった。光駆動ポンプとして光エネルギー変換を担うロドプシンは H^+ ポンプと Cl^- ポンプしかありえないというのが分野の常識だった。というのは、活性中心に存在するレチナルシッフ塩基がプロトン化して正電荷を持つため Na^+ などの陽イオンは近傍に結合できず、結合できないのであればポンプできないと考えられたためである。しかしながら、我々は光駆動 Na^+ ポンプを発見して世界を驚かせた (Inoue et al. Nature Commun. 2013)。本論文の作成にあたって、(これまでの予想通り) この Na^+ ポンプは Na^+ を無くしても色が変わらず、 Na^+ 結合部位を持つかどうかは可視吸収

スペクトルからは判定できなかった。このときに切り札となったのが全反射赤外分光であった。Cl⁻とBr⁻では差のないスペクトルが得られたのに対し、Na⁺とK⁺では有意な信号が得られ、変異体を用いた解析も合わせてNa⁺結合部位は細胞外側表面に存在することを証明した。



その後、光駆動 Na⁺ポンプの結晶構造解析が世界中の競争となったが、我々は東大・濡木グループとの共同研究により構造決定に成功した。ただし分解能の関係もあって Na⁺結合部位を帰属できず、このときにも活躍したのが反射赤外分光であった。得られた結晶構造をもとに変異体の機能解析と全反射赤外分光解析を組み合わせることで、細胞外側表面の結合部位に関する知見を得ることができた。



なおこの論文は構造解析と機能解析、光遺伝学応用と自然界に存在しない光駆動 K⁺ポンプの創成を実現し、すべてをまとめた重厚な論文として Nature 誌に Article として発表した (Kato et al. Nature 2015)。

全反射赤外分光を用いた最高精度の測定系の構築には光駆動 Cl⁻ポンプであるハロロドプシンを利用した。我々はタンパク質に結合した1個の水分子の振動を光誘起赤外差スペクトル分光法で検出できることを明らかにしてきたが、ここで取り組んだのは光誘起系ではなく全反射赤外分光によってそれを実現できるか、という課題であった。我々は測定系を最適化することにより、ハロロドプシンへの Cl⁻結合に伴い水分子の水素結合変化を溶液中で測定することに成功した (Fukuda et al. BIOPHYSICS 2013)。

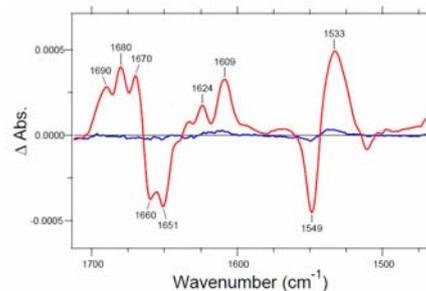


(4) イオン結合ではなくリガンド結合に対する全反射赤外分光

これまでに紹介した研究対象は、すべてイオンの結合に由来する構造変化の解析である。それ自身が振動をもたない Na⁺や Cl⁻などのイオン結合に由来する全反射赤外分光計測と比較して、内部振動をもった低分子化合物の結合による差スペクトルを測定することはより難しい実験となる。しかしながら、Gタンパク質共役型受容体の構造解析などに取り組むためには、リガンド結合による差スペクトル測定を実現するのは必須である。そこで研究期間の5年間において、イオン結合だけでなく受容体や輸送体に対するリガンド結合に伴う全反射差スペクトルの測定を試みた。具体的には、Gタンパク質共役型受容体としてヒトの苦味に対する味覚受容体、輸送体としてはペプチド輸送体を選び、前者は京大霊長研の今井グループ、後者は東大・濡木グループとの共同研究として行った。

苦味受容体については、視物質と同様の抗体カラムを用いた試料の精製を試み、ある程度の純度をもった精製試料を調製して全反射赤外分光測定を試みてきたが、現段階で論文文化できるようなデータを得るには至っていない。今後、さらに条件を検討することでGタンパク質共役型受容体に対するリガンド結合の差スペクトル測定を実現したいと考えている。

一方、ジペプチド輸送体については濡木グループが立体構造を決定した試料を膜に再構成し、Ala-Alaのジペプチド結合に伴うスペクトル測定に成功した (Doki et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013)。興味深いことに、ジペプチドの結合によりαヘリックス構造が歪むことがわかった。



以上の研究成果は2010.4.-2015.3.の5年間で、74報の学術論文、399件の学会発表、9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

(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 74 件)

- ① 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
- ② K. Inoue, Y. Kato and H. Kandori: "Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria" *Trends Microbiol.* 23, 91-98 (2015). 査読有
- ③ K. Inoue, F. H. Koua, Y. Kato, R. Abe-Yoshizumi and H. Kandori: "Spectroscopic study of a light-driven chloride ion pump from marine bacteria" *J. Phys. Chem. B* 118, 11190-11199 (2014). 査読有
- ④ J. Sasaki, H. Takahashi, Y. Furutani, O. A. Sineshchekov, J. L. Spudich and H. Kandori: "His166 is the Schiff base proton acceptor in attractant phototaxis receptor sensory rhodopsin I" *Biochemistry* 53, 5923-5929 (2014). 査読有
- ⑤ S. Ito, H. E. Kato, R. Taniguchi, T. Iwata, O. Nureki and H. Kandori: "Water-containing hydrogen-bonding network in the active center of channelrhodopsin" *J. Am. Chem. Soc.* 136, 3475-3482 (2014). 査読有
- ⑥ O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown and H. Kandori: "Microbial and animal rhodopsins: Structure, functions, and molecular mechanisms" *Chem. Rev.* 114, 126-163 (2014). 査読有
- ⑦ T. Fukuda, K. Muroda and H. Kandori: "Detection of a protein-bound water vibration of halorhodopsin in aqueous solution" *BIOPHYSICS* 9, 167-172 (2013). 査読有
- ⑧ T. Tsukamoto, K. Inoue, H. Kandori and Y. Sudo: "Thermal and spectroscopic characterization of a proton pumping rhodopsin from an extreme thermophile" *J. Biol. Chem.* 288, 21581-21592 (2013). 査読有
- ⑨ S. Doki, H. E. Kato, N. Solcan, M. Iwaki, M. Koyama, M. Hattori, N. Iwase, T. Tsukazaki, Y. Sugita, H. Kandori, S. Newstead, R. Ishitani and O. Nureki: "Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT" *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 11343-11348 (2013). 査読有
- ⑩ K. Inoue, H. Ono, R. Abe-Yoshizumi, S. Yoshizawa, H. Ito, K. Kogure and H. Kandori: "A light-driven sodium ion pump in marine bacteria" *Nature Commun.* 4, 1678 (2013). 査読有
- ⑪ Y. Furutani, H. Shimizu, Y. Asai, T. Fukuda, S. Oiki, and H. Kandori: "ATR-FTIR spectroscopy revealing the different vibrational modes of the selectivity filter interacting with K⁺ and Na⁺ in the open and collapsed conformations of the KcsA potassium channel" *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 3806-3810(2012). 査読有
- ⑫ Y. Furutani, K. Fujiwara, T. Kimura, T. Kikukawa, M. Demura and H. Kandori: "Dynamics of dangling bonds of water molecules in *pharaonis* halorhodopsin during chloride ion transportation" *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 2964-2969 (2012). 査読有
- ⑬ H. Ito, M. Sumii, A. Kawanabe, Y. Fan, Y. Furutani, L. S. Brown and H. Kandori: "Comparative FTIR study of a new fungal rhodopsin" *J. Phys. Chem. B* 116, 11881-11889 (2012). 査読有
- ⑭ K. Katayama, Y. Furutani, H. Imai and H. Kandori: "Protein-bound water molecules in primate red- and green-sensitive visual pigments" *Biochemistry* 51, 1126-1133 (2012). 査読有
- ⑮ J. Sasaki, H. Takahashi, Y. Furutani, H. Kandori and J. L. Spudich: "Sensory rhodopsin-I as a flip-flop: Opposite conformational changes from the same photoisomerization" *Biophys. J.* 100, 2178-2183 (2011). 査読有
- ⑯ M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori and T. Ando: "Structural changes in bacteriorhodopsin in response to alternate illumination observed by high-speed atomic force microscopy" *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 4410-4413 (2011). 査読有
- ⑰ A. Nakatsuma, T. Yamashita, K. Sasaki, A. Kawanabe, K. Inoue, Y. Furutani, Y. Shichida and H. Kandori: "Chimeric microbial rhodopsins containing the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin" *Biophys. J.* 100, 1874-1882 (2011). 査読有
- ⑱ Y. Furutani, T. Murata and H. Kandori: "Sodium or lithium ion-binding-induced structural changes in the K-ring of V-ATPase from *Enterococcus hirae* revealed by ATR-FTIR spectroscopy" *J. Am. Chem. Soc.* 133, 2860-2863 (2011). 査読有
- ⑲ V. A. Lorenz-Fonfria, Y. Furutani, T. Ota, K. Ido and 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
- ⑳ M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori and T. Ando: "High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin" *Nature Nanotech.* 5, 208-212 (2010). 査読有

[学会発表] (計 399 件)

スペースの関係で海外で開催された国際会議における招待講演のみを掲載

- ① H. Kandori: "Molecular Mechanism of

Spectral Tuning in Vision" (Keynote Lecture), 16th International Congress on Photobiology (Cordoba, Argentina), 2014, Sep.

②H. Kandori: "Light-Induced Difference FTIR Spectroscopy of Rhodopsins and Flavoproteins", 16th International Congress on Photobiology, Symposium "Spectroscopic Methods for Identification of (Chromo) Proteins" (Cordoba, Argentina), 2014, Sep.

③H. Kandori: "Role of Proton Transfer in a Light-Driven Sodium Ion Pump", Gordon Research Conference on "Protons & Membrane Reactions: Connecting Membrane Protein Functions with Structure" (Ventura, USA), 2014, Feb.

④H. Kandori: "New Microbial Rhodopsins from the Ocean", 15th International Conference on Retinal Proteins (Ascona, Switzerland), 2012, Oct.

⑤H. Kandori: "Light-Induced Difference FTIR Spectroscopy of Photoreceptive Proteins", 244th ACS National Meeting, Symposium on "Photochemistry in Biology" (Philadelphia, USA), 2012, Aug.

⑥H. Kandori: "Structure-Function Relationship in Microbial Rhodopsins", International Symposium on "Biophysics of Microbial Rhodopsins" (Shanghai, China), 2012, May.

⑦H. Kandori: "Role of Protein-Bound Water Molecules in Rhodopsins", TRVS (Time-Resolved Vibrational Spectroscopy) XV (Ascona, Switzerland), 2011, Jun.

⑧ H. Kandori, and K. Katayama: "Role of Protein-Bound Water Molecules in Rhodopsins", Special Seminar in Paul Scherrer Institute (Villigen, Switzerland), 2011, Jun.

⑨ H. Kandori: "FTIR Detection of Protein-Bound Water Molecules in Membrane Proteins", Mini-symposium "Biophysics on functional study of proteins" (Berlin, Germany), 2011, Jun.

⑩H. Kandori: "Mechanism of Light-Driven Ion Pumps", 7th Asian Biophysics Association Symposium (New Delhi, India), 2011, Feb.

⑪H. Kandori: "Active Internal Waters in Visual and Microbial Rhodopsins", Keystone Symposia on "Transmembrane Signaling by GPCRs and Channels" (Taos, USA), 2011, Jan.

⑫H. Kandori: "Mechanism of Light-Driven Ion Pumps", PACIFICHEM 2010, Symposium "Frontiers of Biomolecular Dynamics" (Honolulu, Hawaii), 2010, Dec.

⑬ H. Kandori: "Molecular Mechanism of Rhodopsins in Action", 9th International Conference on Photonics and Imaging in Biology and Medicine (Wuhan, China), 2010, Nov.

⑭H. Kandori: "FTIR study of rhodopsins", The 14th International Conference on Retinal Proteins (Santa Cruz, USA), 2010, Aug.

⑮ H. Kandori: "Spectroscopic Study of

Rhodopsins in Action", International Meeting of the Microbiological Society of Korea (Uljin, Korea), 2010, May.

[図書] (計 9 件)

①神取秀樹: 「オプトジェネティクス」第1編 光受容タンパク質の研究動向～チャンネルロドプシン、ハロロドプシンを中心に～ pp. 3-11 (エヌ・ティー・エス出版) (2013).

②神取秀樹: 「高次 π 空間の創発と機能開発」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発 pp. 217-222 (シーエムシー出版) (2013).

[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 (名古屋工業大学)

研究者番号 : 70202033

(2) 研究分担者

古谷祐詞 (分子科学研究所)

研究者番号 : 80432285

(3) 連携研究者

()