

## 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24年 6月 4日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770159

研究課題名（和文）赤外差スペクトル法によるイオン輸送蛋白質の分子機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of ion-transporter proteins by using difference infrared spectroscopy

研究代表者

古谷 祐詞 (FURUTANI YUJI)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・准教授

研究者番号：80432285

研究成果の概要（和文）：細胞膜には、イオン輸送タンパク質、イオンチャネル、受容体などの膜タンパク質が存在し、生体エネルギーの生産、生体電気信号の発生、外界からの刺激の受容などにはたっている。これらの膜タンパク質の機能発現の分子機構を調べるため、分子の構造情報が得られる赤外差スペクトル法を活用した。微生物型ロドプシン、V型ATPase、カリウムイオンチャネルKcsA等の構造変化を明らかにし、その分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Ion-transporter proteins, ion channels, and receptors in cell membrane work for production of biological energy, generation of bioelectric signal, and reception of external stimuli, respectively. To investigate the molecular mechanisms of these membrane proteins, we applied several methods of difference infrared spectroscopy on them, which provide structural information of biomolecules in action. The molecular mechanisms of microbial rhodopsins, V-type ATPase, and a potassium ion channel, KcsA, were partly elucidated based on the structural changes detected by our methods.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2011年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：生体膜・受容体・チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

界面を隔てた物質輸送・情報伝達を担う膜タンパク質は、方向性を持った構造変化を行うことで機能を発現している。しかしながら、計測手法の未整備から、それら膜タンパク質の構造変化の実態や、機能の発現との関連については不明な点が多い。

本研究で主に対象とする膜タンパク質は、光駆動イオン輸送タンパク質である微生物

型ロドプシン類、K<sup>+</sup>イオンチャネルであるKcsA、Na<sup>+</sup>イオンポンプであるV型ATPaseである。これらのタンパク質について、研究開始当初の背景を順に記す。

(1) 微生物型ロドプシンは、光駆動のイオンポンプや光受容体としてはたらき、最初に発見された古細菌だけでなく、近年では菌類などの真核生物、海洋性バクテリアなどの真正細菌からも見つかっている。その中でも光

駆動プロトンポンプ機能を有するバクテリオロドプシンは、最も研究が進んでいるポンプ蛋白質である。研究代表者は、低温赤外差スペクトル法を活用することで、光駆動プロトンポンプ機能と強い水素結合を形成した水分子の存在との相関を明らかにした。しかしながら、室温におけるバクテリオロドプシン内部の水分子の水素結合ダイナミクスの情報は、水素結合強度の弱い水分子に関するものに限られてきた。四面体配位など比較的強い水素結合構造をもつ水分子はプロトン移動にも重要な役割を果たしていると考えられるが、その構造とダイナミクスに関する情報はほとんど得られていない。また、様々な微生物型ロドプシンについては、光反応中間体の構造情報はバクテリオロドプシンに比べて少なく、研究が遅れている。

(2)  $K^+$ イオンチャネルである *KcsA* は、1998年に結晶構造が R. MacKinnon によって解かれ、様々な電気生理学実験が行われており、イオンチャネルを代表する分子である。カリウムイオンとナトリウムイオンを識別する分子機構について実験および理論的な解析により、詳細な研究が行われている。しかしながら、結晶構造で明らかにされたイオン選択フィルターを構成するカルボニル基とイオンとの相互作用についての実験的な情報は少なく、分子動力学計算等の手法に頼っているのが現状である。また、pH 依存的なゲーティングの分子機構についてはさらによく分かっていない。本研究を開始した当初は、*KcsA* の結晶構造は閉状態のみであり、開状態に関しては、他のカリウムイオンチャネルの構造を参考にしていた。ゲーティング機構を詳細に検討するには、開および閉状態での構造の違いや、両者をつなぐ中間状態の構造を明らかにする実験手法が求められている。

(3) ATP 駆動型  $Na^+$ イオンポンプである V 型 ATPase は分子量 70 万にも及ぶ巨大蛋白質複合体である。ATP の加水分解により、細胞膜中に埋め込まれた 10 量体からなる K リングを回転させ、 $Na^+$ イオンを一方向に輸送する。K リング単体での結晶構造は既に報告されているが、 $Na^+$ イオンの輸送機構の解明には複合体全てを含んだ状態での構造情報が求められている。特に K リングとイオン透過経路を形成すると考えられている I サブユニットとの界面で行われるイオン輸送過程での構造変化に興味を持たれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子構造の変化を鋭敏に反映する赤外差スペクトル法をイオン輸送タンパク質やイオンチャネルに適用することで、これらの膜タンパク質の機能発現に重要な構造変化を明らかにすることを目的とした。

以下にそれぞれの研究項目に分けて、具体的な研究目的を記す。

(1) バクテリオロドプシンについては、四面体配位の水素結合を形成した水の O-H、O-D 伸縮振動領域を含めた時間分解赤外分光計測により、内部結合水の構造とダイナミクスの全容を明らかにする。プロトン輸送過程での水の水素結合変化がどのように機能に結び付くかが明らかになるものと期待される。

また、他の微生物型ロドプシンである光駆動塩化物イオンポンプであるハロロドプシン、光駆動プロトンポンプである *Gloeobacter rhodopsin* や *Archaeorhodopsin* などの光誘起構造変化も明らかにし、分子機構の違いを明らかにする。

(2) *KcsA* については、生理的条件に近い液中での計測が可能な全反射赤外分光計測により、イオン選択フィルターを構成するカルボニル基とイオンとの相互作用やチャネルの開閉に重要な役割を果たすアミノ酸残基を明らかにする。これにより *KcsA* の選択的イオン透過やゲーティングの分子機構が明らかになる。

(3) V 型 ATPase についても、全反射赤外分光計測により、 $Na^+$ イオンの輸送に重要なアミノ酸残基の同定、ATP の加水分解反応による構造変化への影響を調べる。V 型 ATPase が  $Na^+$ イオンの結合と解離をどのように制御して、一方向の  $Na^+$ イオン輸送を行っているかが明らかになるものと期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、時間分解赤外分光装置や全反射赤外分光装置を活用し、光受容タンパク質だけでなく、一般のチャネルやポンプなどの機能発現過程での構造変化を解析することを主な研究方法とした。

具体的には以下の研究課題を提案した。

- (1) 微生物型ロドプシンの内部結合水の水素結合変化やタンパク質の構造変化の計測
- (2) *KcsA* のアルカリ金属イオンとイオン選択フィルターの相互作用解析と pH 依存的なチャネル開閉の分子機構
- (3) V 型 ATPase の  $Na^+$ イオン輸送機構

(1) においては、光誘起時間分解赤外分光装置により、強い水素結合を形成した水分子の水素結合変化やタンパク質の構造変化を実時間で観測する。

(2)、(3) においては、全反射赤外分光 (ATR-FTIR) 装置を活用し、様々なイオン存在下での赤外差スペクトルを計測する。さらには、ストップフロー法で利用されるシ

リンジポンプを組み込むことで急速な液交換を実現し、10 ミリ秒程度の時間分解計測を目指す。それにより、KcsA のゲーティング機構や V 型 ATPase の ATP 加水分解反応と Na<sup>+</sup> イオン輸送を実現する分子機構を解明する。

低温赤外分光計測や全反射赤外分光計測の一部については名古屋工業大学大学院工学研究科の神取秀樹教授との共同研究として行った。

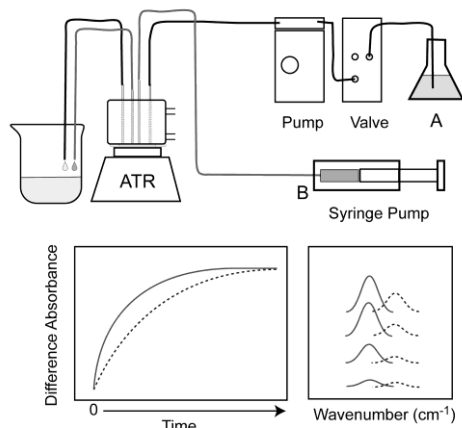


図1 急速溶液置換 ATR-FTIR 法概念図

B に ATP 等の基質やイオンを含む緩衝液、A にはそれらを含まない緩衝液を入れ、A で試料を平衡化した後、シリンジポンプで急速に溶液交換を行い、ATP 加水分解反応やイオン結合に伴う時間分解赤外差スペクトルを計測する。

#### 4. 研究成果

研究項目 (1) ~ (3) の研究成果について順に記す。

(1) バクテリオロドプシンを 20% Glycerol(OD)を含む D<sub>2</sub>O および D<sub>2</sub><sup>18</sup>O で水和することにより、X-H、X-D 伸縮振動領域での赤外吸収を飽和させることなく、時間分解赤外分光計測することに成功した。両者のスペクトルを比較することで、タンパク質内部の水分子の O-D 伸縮振動の変化を 12.5 μsec ~ 25 msec の時間領域で明らかにした。光異性化後に形成される KL 中間体から、L 中間体を経て、最初のプロトン移動が生じる M 中間体、さらに N および O 中間体を経て、元の BR へと戻る過程での水素結合変化の全容を明らかにした (論文準備中)。

光駆動プロトンポンプである古細菌型ロドプシン *Gloeobacter Rhodopsin* (GR) に対して低温赤外分光計測を行った。光誘起構造変化および内部結合水を含む蛋白質内部の水素結合ネットワークの変化を明らかにし、古細菌型ロドプシンのプロトンポンプ活性と正の相関のある 2400 cm<sup>-1</sup> 以下の強い水素結合を形成した水分子が GR にも存在することがわかった (Hashimoto et al. *Biochemistry*,

2010)。

塩化物イオンポンプである pHR については、時間分解赤外分光法により、L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, N, O 中間体への遷移に伴う赤外差スペクトルを得た。タンパク質主鎖の N-H 伸縮振動である Amide A バンドにアニオン種依存性が見られ、イオン輸送過程での段階的なタンパク質のコンフォメーション変化を明らかにした (論文準備中)。

光駆動プロトンポンプとして機能する古細菌型ロドプシンとして、プロトンの放出と取り込みの順序が異なる *Archaeorhodopsin1* (放出; 後、取込; 先) と *Archaeorhodopsin2* (放出; 先、取込; 後) を比較解析した。その結果、amide I 領域で両者に異なる構造変化が見られた (論文準備中)。

霊長類の色覚を担う光受容体である緑および赤錐体視物質の低温赤外分光計測により、光異性化によるタンパク質構造の変化の違い (Katayama et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010) やレチナール周辺の水分子の水素結合構造の解析を行った (Katayama et al., *Biochemistry*, 2012.)。

(2) KcsA のイオン選択フィルターと K<sup>+</sup> および Na<sup>+</sup> イオンとの相互作用について分子振動の情報から明らかにすることを試みた。

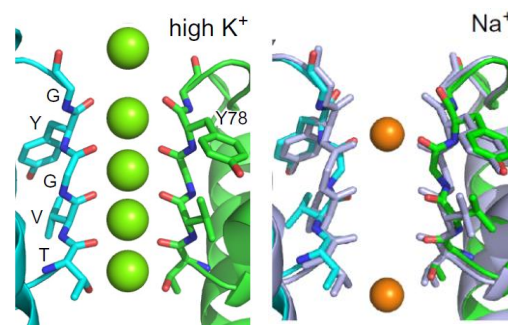


図2 KcsA のイオン選択フィルターの結晶構造

(左図: K<sup>+</sup> イオン存在下、右図: Na<sup>+</sup> イオン存在下)

KcsA 試料を KCl 溶液 (x = 3, 10, 20, 50, 200 mM; NaCl = 200 - x mM) と 200mM NaCl 溶液存在下で赤外スペクトルを計測し、様々な K<sup>+</sup> イオン濃度下でのイオン交換誘起赤外差スペクトルを得た。その結果、amide I 領域に複数のバンドが観測され、Na<sup>+</sup> イオン存在下よりも K<sup>+</sup> イオンが存在する条件において高振動数にシフトすることが分かった。Y78F 変異体において amide I バンドに影響が見られたことから、これらの amide I がイオン選択フィルターの主鎖のカルボニル基に由来するものと結論した (論文投稿中)。

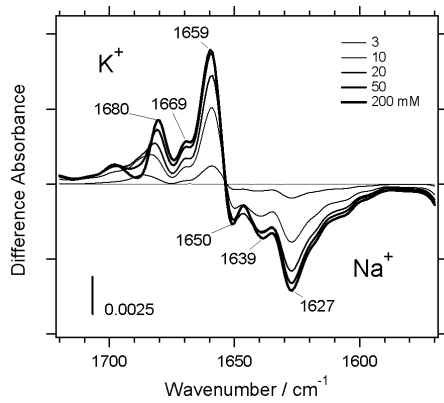


図3 KcsAのK<sup>+</sup>イオンおよびNa<sup>+</sup>イオン存在下との赤外差スペクトル

(3) Na<sup>+</sup>ポンプであるV-ATPaseのKリングにおけるイオン脱着に伴う構造変化を全反射赤外分光法によって明らかにした(Furutani et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011)。ATR用ダイヤモンドプリズム表面にV-ATPaseを吸着させ、Na<sup>+</sup>やLi<sup>+</sup>イオンを含む緩衝液を流すことで、これらのイオンが存在する状態としない状態との赤外差スペクトルを計測することに成功した。その結果、V-ATPaseがNa<sup>+</sup>およびLi<sup>+</sup>イオンを結合するとK ringの139番目のグルタミン酸残基(E139)が脱プロトン化することで負に帯電し、イオン結合部位における電荷バランスを保つことで、疎水的な脂質二重膜を透過するエネルギー障壁を緩和することを明らかにした。

測定前後において、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりタンパク質サブユニットの数と量、V-ATPaseのNa<sup>+</sup>イオン依存的なATPase活性を確認したところ、両者ともほとんど変化していないことが分かった。このことから赤外差スペクトルはV-ATPaseの酵素活性を保った状態で計測されており、液中での計測を可能とするATR-FTIRはV-ATPaseのような超分子複合

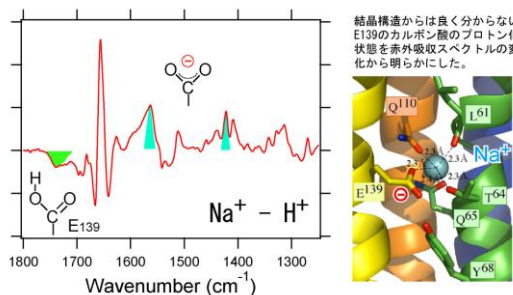


図4 V型ATPaseのNa<sup>+</sup>イオン存在下と非存在下との赤外差スペクトル(左)とKリングのNa<sup>+</sup>イオン結合部位付近の結晶構造(右)

体タンパク質に対しても優しい計測法であることが確認された。

全反射赤外分光法とストップフロー法で使用されるシリンジポンプを組み合わせた急速溶液置換ATR-FTIR装置を株式会社ユニソクの岡本基土氏や分子科学研究所助教の木村哲就博士と共同で作製した。ATRセル上でのNaNO<sub>3</sub>溶液の置換や、光駆動イオン輸送蛋白質pHRとのイオン脱着に伴う構造変化計測の予備的な実験を行った。その結果、150 mMのNaNO<sub>3</sub>溶液と純水との交換を40 msecの時間分解能で計測した結果、それよりも速い時間で液交換が完了していることを確認した。また、pHRのアニオン結合に伴う構造変化を解析し、Cl<sup>-</sup>イオンやNO<sub>3</sub><sup>-</sup>イオン結合に伴う構造変化を40ms程度の時間分解能で計測することが可能であることを確認した。

残念ながらKcsAのゲーティング機構やV型ATPaseのATP加水分解反応に伴うNa<sup>+</sup>イオン輸送機構の研究にまで到達することはできなかったが、今後の課題としたい。

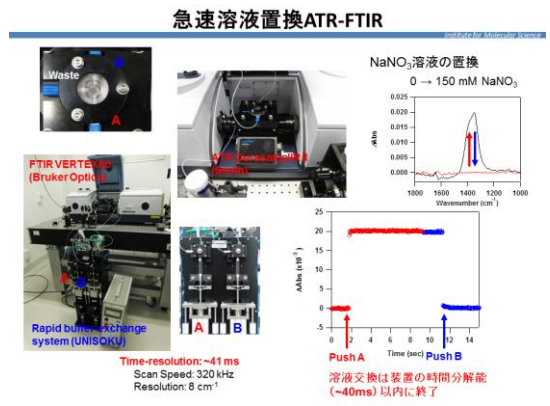


図5 急速溶液置換ATR-FTIR装置

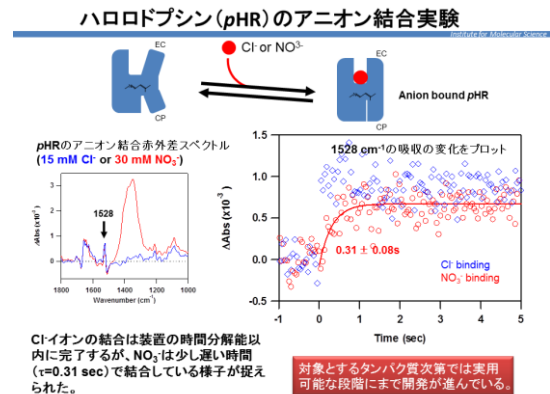


図6 pHRのアニオン結合実験

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 10 件)

④以外は査読有り

- ① Kouta Katayama, Yuji Furutani, Hiroo Imai and Hideki Kandori  
“Protein-bound water molecules in primate red- and green-sensitive visual pigments”  
*Biochemistry* **51** (6), 1126-33 (2012)
- ② Yuji Furutani, Takeshi Murata and Hideki 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** (9), 2860-3 (2011)
- ③ Jun Sasaki, Hazuki Takahashi, Yuji Furutani, Hideki Kandori, and John L. Spudich  
“Sensory rhodopsin-I as a bidirectional switch: opposite conformational changes from the same photoisomerization”  
*Biophys. J.* **100** (9), 2178-83, (2011)
- ④ 古谷祐詞  
「全反射赤外分光法による膜タンパク質の構造機能相関研究の現状と展望」  
化学と工業, 64 巻, 694-695 頁 (2011)
- ⑤ Kouta Katayama, Yuji Furutani, Hiroo Imai and Hideki Kandori  
“An FTIR Study of Monkey Green- and Red-Sensitive Visual Pigments”  
*Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (5), 891-894 (2010).
- ⑥ Kyohei Hashimoto, Ah Reum Choi, Yuji Furutani, Kwang-Hwan Jung and Hideki Kandori  
“Low-Temperature FTIR Study of Gloeobacter Rhodopsin: Presence of Strongly Hydrogen-Bonded Water and Long-Range Structural Protein Perturbation upon Retinal Photoisomerization”  
*Biochemistry* **49** (15), 3343-3350 (2010)
- ⑦ Victor Lorenz Fonfria, Yuji Furutani, Toru Ota, Kazutomo Ido and Hideki Kandori,  
“Protein Fluctuations as the Possible Origin of the Thermal Activation of Rod Photoreceptors in the Dark”

*J. Am. Chem. Soc.* **132** (16), 5693-703 (2010)

- ⑧ Kouta Katayama, Yuji Furutani and Hideki Kandori,  
“An FTIR Study of the Photoreaction of Bovine Rhodopsin in the Presence of Hydroxylamine”  
*J. Phys. Chem. B* **114** (27), 9039-9046 (2010)

[学会発表] (計 31 件)

- ① Tetsunari Kimura, Hideki Kandori, Yuji Furutani (Invited)  
“Time-resolved infrared study on the light-driven chloride ion pump protein”  
4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations  
(Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, Japan, Jan. 10, 2012)
- ② 木村哲就、道喜慎太郎、石谷隆一郎、瀧木理、古谷祐詞、「全反射赤外分光法による Mg<sup>2+</sup>輸送体 MgtE のイオン選択機構の解析」、第 37 回日本生体エネルギー研究会討論会、2011 年 12 月 20-22 日、京都 (京都産業大学神山ホール) (口頭)
- ③ Yuji Furutani and Tetsunari Kimura (Invited)  
“Development of stopped-flow attenuated total reflection FTIR spectroscopy for detecting dynamic structural changes in ion transporters”  
The 49th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Symposium)  
(University of Hyogo, Himeji, Japan, Sep. 17, 2011)
- ④ Yuji Furutani (Invited)  
“Ion-protein interactions studied by ATR-FTIR spectroscopy”  
14th Asian Chemical Congress  
(Bangkok, Thailand, Aug. 11, 2011)
- ⑤ 古谷祐詞、村田武士、神取秀樹、「全反射型赤外分光法による V 型 ATPase の Na<sup>+</sup> および Li<sup>+</sup> イオンの結合解離に伴う構造変化解析」、第 38 回生体分子科学討論会、2011 年 6 月 23, 24 日、つくば (筑波大学) (口頭)
- ⑥ Yuji Furutani (Invited)  
“Ion-binding-induced Structural Changes in Membrane Proteins Studied by ATR-FTIR Spectroscopy”  
Third Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: - Experiments and Simulations

- (Jeju, Korea, Feb. 26-Mar. 1, 2011)
- ⑦ Yuji Furutani (Invited)  
“Stimulus-Induced Difference Infrared Spectroscopy for Membrane Proteins: Visual and Archaeal-type Rhodopsins, and Flagella Motor Protein”  
Indo-Japan Joint Workshop on “New Frontiers of Molecular Spectroscopy; from Gas Phase to Proteins  
(HOTEL KITANO PLAZA ROKKOSO, Kobe, Japan, Sep. 26-29, 2010)
- ⑧ Yuji Furutani, Victor A. Lorenz-Fonfria and Hideki Kandori, “Time-resolved FT-IR measurement of X-D stretching vibrations of Bacteriorhodopsin in micro-to mill- second time range”, The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sep. 20-22, 2010, Sendai (Tohoku University).
- ⑨ 古谷祐詞、Victor A. Lorenz-Fonfria、神取秀樹、「時間分解赤外分光法によるバクテリオロドプシンの X-D 伸縮振動の解析」、第 4 回分子科学討論会、2010 年 9 月 14-17 日、豊中 (大阪大学)
- ⑩ Yuji Furutani (Invited)  
“Interaction between Membrane Proteins and Ions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy: A Potential Tool for Drug Screening”  
BIT's 1st Annual International Conference of Medicchem-2010  
(Beijing, China, May 18-20, 2010)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.ac.jp/know/bio/furutani/furutani.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古谷 祐詞 (FURUTANI YUJI)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究  
領域・准教授

研究者番号：80432285