

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640047

研究課題名(和文)膜電位存在下での膜タンパク質の赤外分光解析系の開発

研究課題名(英文)Development of an analysis system of infrared spectroscopy for membrane proteins under existence of membrane potential

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質の構造や動態への膜電位の影響を明らかにすることは、神経細胞での生体電気信号の発生の分子機構などを解明するために重要である。本研究では、赤外分光解析系を開発することで膜タンパク質の機能発現過程での構造変化や水素結合変化を赤外スペクトルの変化から明らかにすることを試みた。表面増強効果、脂質二重膜への再構成法等の条件検討を行い、カリウムチャンネルや光受容タンパク質について膜電位存在下での赤外分光解析を行う基礎的な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Effect of membrane potential on the structure and dynamics of membrane proteins must be important for elucidating their molecular mechanisms such as generation of action potential in a nerve cell. In this study, we aimed to develop a new technique of infrared spectroscopy for analyzing changes in a protein structure and its internal hydrogen bonds under the membrane potential. Surface-enhancement of infrared absorption and reconstitution of membrane proteins have been examined. We obtained several results useful for conducting infrared spectroscopy on membrane proteins under existence of the membrane potential in future.

研究分野：生物物理学

キーワード：膜タンパク質 膜電位 赤外分光法 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

視覚、嗅覚、味覚、聴覚、触覚等の五感においては、光、匂い分子、味物質、音、物理的刺激など、それぞれの刺激を受容する膜タンパク質がはたらいっている。また、受容した情報は生体電気信号として神経繊維を通じて、脳へと伝達されている。生体電気信号の源は細胞膜に存在するイオンチャンネルと呼ばれる膜タンパク質のはたらきによる。細胞の生理応答を理解する上で、このような膜タンパク質の動作機構を解明することは重要である。

そのため、目的とする膜タンパク質を大量発現し、可溶化・精製後に、様々な物理化学的手法により構造や物性を解析する方法が試みられている。特にX線結晶構造解析は詳細な立体構造情報を原子レベルで与える手法であるため、タンパク質の分子機構を解明する切り札のような手法として捉えられてきた。しかしながら、タンパク質は揺らいでおり、外部刺激に対する構造変化など、動的な側面が機能発現に重要であることも知られている。

また、細胞には膜内外のイオン組成や濃度(主にカリウムイオン)の違いから、外部電位を0とした場合に $-60\sim-80$ mV程度の静止膜電位が常時存在する。さらに、神経細胞などではナトリウムイオンを透過するチャンネルが開くことで、脱分極応答時には $+50\sim+80$ mV程度まで瞬時に変動する(図1)。脂質二重膜の両側の電位勾配は約 10^5 V/cmにもなり、非常に大きな勾配である。このような膜電位の存在が膜タンパク質の構造やその動態にどのような影響を及ぼしているのかについては不明な点が多く、タンパク質を結晶状態で扱うX線結晶構造解析では膜電位の効果を解析することは原理的に困難である。

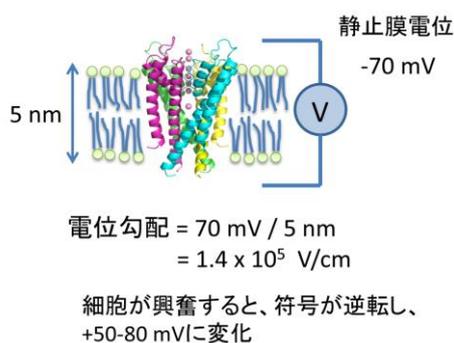


図1 膜タンパク質にかかる膜電位

2. 研究の目的

膜タンパク質は、細胞外の環境情報を細胞内に伝達するなどの重要な役割を果たし、静的な立体構造についてはX線結晶構造解析によって原子レベルでの解明がなされている。しかしながら、膜電位がどのように構造や動態に影響するのかなど不明な点が多い。一方、パッチクランプ法などの電気生理解析では、

様々な膜電位におけるイオンチャンネルなどの機能解析が可能であるが、構造に関する情報を得ることは困難である。

本研究では、赤外吸収スペクトルを高感度に計測する顕微赤外分光計測法を開発し、膜電位存在下での膜タンパク質の動的構造変化の計測系を構築することを目的としている。

本研究の対象とする膜タンパク質の一例として、細胞外情報を受容・伝達するイオンチャンネルやGタンパク質共役型受容体(GPCR)等の膜受容体を挙げる。本研究では、分子の基準振動に基づく赤外吸収スペクトルから、膜タンパク質の微細な構造変化および水素結合変化を解析し、機能発現過程でのタンパク質の構造変化を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

以下の2つの研究項目を中心に研究を進めた。

(1) 高感度顕微赤外分光計測法の開発

膜タンパク質の構造への膜電位の影響を明らかにするためには、①膜タンパク質を、活性を保ったまま、脂質二重膜に再構成し、②それらの電気生理的な応答を確認しながら、③赤外吸収スペクトルの計測を行う必要がある。

① 膜タンパク質(カリウムチャンネル、光感受性ロドプシン類など)をCOS-1培養細胞に発現し、界面活性剤(n-Dodecyl- β -D-maltoside; DDM)により可溶化後、His-tagもしくは抗体タグにより精製を行った。界面活性剤を含む脂質懸濁液に混合後、透析もしくはバイオビーズにより界面活性剤を除去することで、脂質二重膜に再構成を行った。② テフロンシートに100 μm 程度の貫通孔をパンチにより作成し、デカンに溶かした脂質溶液を塗布することで平面脂質二重膜を形成させ、カリウムチャンネル分子を取り込ませた。パッチクランプ増幅器により膜電位を固定することでチャンネル電流の計測を行った。平面脂質二重膜法では福井大学の老木成稔教授に協力いただいた。

また、カリウムチャンネルの活性確認では以下の手法も適用した。まず、プロトン感受性蛍光色素 ACMA を含む高濃度カリウム溶液中でリポソームに再構成させ、低カリウム濃度の緩衝液に希釈した。その後、プロトン透過試薬 CCCP を加えると、リポソーム内からカリウムイオンがチャンネルを介して流出するに伴って CCCP によりプロトンが内部に流入する。カリウムイオンの流出を、プロトンの流入による ACMA の蛍光強度の減少から計測した(A. N. Miller and S. B. Long, Science 2012)。

③ 赤外吸収スペクトルの計測を実現するために、全反射赤外分光用シリコン結晶の表面に金薄膜を形成させることで表面増強効果をもたらす条件の検討が必要となる。真空蒸

着装置により金ワイヤを蒸発させ、シリコン結晶上に蒸着することで金薄膜を形成させた。

(2) 膜タンパク質の分子機構解明に向けた研究

イオンチャンネルに加えて、GPCR等の膜受容体の環境情報感知に伴う構造変化を解析し、イオン透過機構や情報伝達機構の解明を目指した。具体的に取り組む膜タンパク質として、カリウムチャンネル、光開閉チャンネルロドプシン、視物質ロドプシンやメラノプシン (GPCRの一種)などを対象とした。

4. 研究成果

(1) 高感度顕微赤外分光計測法の開発

① 表面増強赤外分光計測に適した金薄膜の形成条件を確認した。それに関連して、GroELタンパク質の構造転移に関する共著論文の発表に寄与した (J. Chen et al. Sci. Rep. 2014)。

② 表面増強赤外分光計測により、カリウムイオンやナトリウムイオンを選択的に吸着するクラウンエーテルのイオン包摂に伴う赤外吸収スペクトル解析の結果を共著論文として発表した (Y. Inokuchi et al. New J. Chem. 2015)。

③ タイのチュラロンコン大学との共同研究として、PDMS (dimethyl-polysiloxane) によるマイクロ流路を作成し、顕微赤外分光法によりフェリシアン化カリのアスコルビン酸による還元反応を追跡した (M. Srisa-Art and Y. Furutani, Bull. Chem. Soc. Jpn. 2016)。さらにインターンシップ生とともに、電気化学計測に用いるポテンシオスタットをマイクロ流路に組み込まれた電極に接続し、フェリシアン化カリやシトクロムcなどの酸化還元に伴う赤外吸収スペクトルの変化を赤外顕微鏡で計測した。

④ 膜タンパク質試料の脂質二重膜中での赤外分光計測について、ほ乳動物由来のカリウムチャンネルの一種である TWIK-1 で条件検討を進め、チャンネル活性が確認された脂質系 POPE/POPG (モル比 3:1) で計測を行うことが重要であることが分かった。今後、膜電位存在下での計測を適用するにあたっても参考になる知見である

(2) 膜タンパク質の分子機構解明に向けた研究

① ほ乳動物由来のカリウムチャンネルの一種である TWIK-1 に関して、全反射赤外分光計測によって得られたアルカリ金属イオンとの相互作用の解析データについて、結晶構造解析との比較などから、特異な相互作用に関する知見を得た。

② GPCRの一種であり視物質ロドプシンと近縁なメラノプシンの分子特性に関する結果を共著論文として発表した (H. Tsukamoto et al. J. Biol. Chem. 2015)。ほ乳動物由来のメラノプシンの熱安定性が3つのアミノ酸残基の変異で説明できるという結果であり、

メラノプシンの分子機構を解析する際に重要となる熱安定性の問題の解決について参考となる知見である。

③ 光開閉チャンネルロドプシンの全反射赤外分光計測を行い、チャンネルが閉じる (脱感作) 際に Glu129 のプロトン化状態が関与していることを明らかにした (A. Inaguma et al. J. Biol. Chem. 2015)。

④ ATP受容体である P2X チャンネルの核酸塩基認識機構に関する結果を共著論文として発表した (G. Kasuya et al. Sci. Rep. 2017)。ATP と CTP の結合と解離について全反射赤外分光計測で解析し、P2X タンパク質は、CTP よりも ATP を強く結合することを明らかにした。X 線結晶構造解析や電気生理学解析と組み合わせることで ATP の結合には T189 の側鎖の OH 基が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

本研究期間の間に膜電位を制御した状態での計測を実現することはできなかったが、表面増強効果をもたらす金薄膜の形成条件や膜タンパク質を再構成させる際の脂質分子の重要性など今後につながる知見が得られた。PDMS によるマイクロ流路形成や電気化学計測は、表面増強赤外分光法と組み合わせることで電位依存的な赤外吸収変化を計測するための予備的な実験となった。また、個別の膜タンパク質の分子機構研究においては、静止膜電位の形成に関与していると考えられるカリウムチャンネル TWIK-1 の分子機構研究を開始することができた。今後、本研究を発展させることで膜電位と膜タンパク質の機能発現との関係について明らかにしたい。

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 12 件)

全て査読有り 責任著者に*

① G. Kasuya, Y. Fujiwara, H. Tsukamoto, S. Morinaga, S. Ryu, K. Touhara, R. Ishitani, Y. Furutani, M. Hattori, and O. Nureki, "Structural insights into the nucleotide base specificity of P2X receptors", Sci. Rep. 7, 45208, 2017 (DOI:10.1038/srep45208)

② A. Sakamoto*, T. Tsukamoto, Y. Furutani, Y. Sudo, K. Shimada, A. Tomita, H. Kiyoi, T. Kato and T. Funatsu, "Live-cell single-molecule imaging of the cytokine receptor MPL for analysis of dynamic dimerization", *J. Mol. Cell Biol.* 8 (6), 553-555, 2016 (DOI: 10.1093/jmcb/mjw027)

③ M. Srisa-Art* and Y. Furutani*, "Simple and Rapid Fabrication of PDMS Microfluidic Devices Compatible with FTIR Microspectroscopy",

Bull. Chem. Soc. Jpn. 89, 195-202, 2016

(DOI:10.1246/bcsj.20150357).

- ④ 古谷祐詞 「光誘起赤外差分分光法による微生物型ロドプシンのイオン輸送機構の研究」日本レーザー医学会誌, 第36巻, 第4号, 460-465頁, 2016 (総説)
- ⑤ H. Tsukamoto*, Y. Kubo, D. L. Farrens, M. Koyanagi, A. Terakita, and Y. Furutani, “Retinal Attachment Instability is Diversified Among Mammalian Melanopsins”, *J. Biol. Chem.* 290, 27176-27187, 2015 (DOI: 10.1074/jbc.M115.666305).
- ⑥ Y. Inokuchi*, T. Ebata, T. Ikeda, T. Haino, T. Kimura, H. Guo, and Y. Furutani, “New Insights into Metal Ion-Crown Ether Complexes Revealed by SEIRA Spectroscopy”, *New J. Chem.* 39, 8673-8680, 2015 (DOI: 10.1039/c5nj01787d)
- ⑦ Y. Furutani*, H. Shimizu, Y. Asai, S. Oiki* and H. Kandori*, “Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy”, *Biophysics and Physicobiology* 12, 37-45, 2015 (DOI: 10.2142/biophysico.12.0_37)
- ⑧ A. Inaguma, H. Tsukamoto, H. E. Kato, T. Kimura, T. Ishizuka, S. Oishi, H. Yawo, O. Nureki and Y. Furutani*, “Chimeras of channelrhodopsin-1 and -2 from *Chlamydomonas reinhardtii* exhibit distinctive light-induced structural changes from channelrhodopsin-2”, *J. Biol. Chem.* 290 (18), 11623-11634, 2015 (DOI: 10.1074/jbc.M115.642256)
- ⑨ H. Kandori, Y. Furutani and T. Murata, “Infrared spectroscopic studies on the V-ATPase”, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (1), 134-141, 2015 (総説) (DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.07.020)
- ⑩ J. Chen*, H. Yagi, Y. Furutani, T. Nakamura, A. Inaguma, H. Guo, Y. Kong, Y. Goto, “Self-assembly of the chaperonin GroEL nanocage induced at submicellar detergent”, *Sci. Rep.* 4:5614, 2014 (DOI:10.1038/srep05614)
- ⑪ 古谷祐詞 「赤外分光法による膜タンパク質の分子機構研究」, *Molecular Science* 8, A0067, 2014 (総説)
- ⑫ Y. Furutani and H. Kandori, “Hydrogen-bonding changes of internal water molecules upon the actions of microbial rhodopsins studied by FTIR spectroscopy”, *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (5), 598-605, 2014 (総説) (DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.09.004)

[学会発表] (計 18 件)

- ① Y. Furutani, “The molecular mechanisms of ion channel proteins studied by stimulus-induced difference FT-IR spectroscopy”, *Pure and Applied*

Chemistry International Conference (PCCON) 2016, The 4th CU-IMS Symposium, Feb. 9-11 (Presentation on 10th Feb.), 2016, BITEC, Bangkok (Thailand)

② Y. Furutani, “Ion-Protein Interactions between a Potassium Channel and Alkali Metal Cations Studied by ATR-FTIR Spectroscopy”, 60th Annual Meeting of Biophysical Society, Feb. 27-Mar. 2, 2016, Los Angeles (USA)

③ Y. Furutani, “Molecular Mechanisms of Retinal Proteins with Involvement of Water Molecules Studied by Light-Induced Difference Infrared Spectroscopy”, 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry, Apr. 3-8, 2016 (Presentation on 5th Apr.), Osaka City Central Public Hall (Osaka Pref., Osaka)

④ 古谷祐詞 「赤外分光計測によるカリウムチャンネルのイオン選択機構の研究」、第1回イオンチャンネル研究会～チャンネルどんたく～、2016年7月7, 8日 (発表日7日)、福岡大学病院 (福岡県福岡市)

⑤ 古谷祐詞 「オプトジェネティクスで活躍する微生物型ロドプシンの分子機構研究」、生化学若い研究者の会 第56回生命科学夏の学校 (ワークショップ 2A 「光が照らす生命科学の未来」)、2016年8月26日、旅館かつら (宮城県白石市)

⑥ 古谷祐詞、Akkapol Suea-Ngam 「PDMS マイクロ流路を用いた電気化学計測と可視・赤外分光法の融合的アプローチ」、第10回分子科学討論会、2016年9月13-15日 (発表日15日)、神戸ファッションマート (兵庫県神戸市)

⑦ Y. Furutani and H. Tsukamoto, “Amide I vibrations could be fingerprints of ion-protein interactions of potassium ion channels with alkali metal cations”, The 9th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, Nov. 14-16, 2016 (Presentation on 16th Nov.), Gyeongju (Republic of Korea)

⑧ 古谷祐詞、塚本寿夫、 「赤外差分分光法によるイオンチャンネルタンパク質の分子機構研究」、自然科学研究機構プロジェクト 合同シンポジウム 「脳神経情報の階層的研究」 「機能生命科学における揺らぎと決定」、2015年3月11日、生理学研究所 (愛知県岡崎市)

⑨ Y. Furutani, “Structural Changes of Bacteriorhodopsin Studied by Time-Resolved Polarized FTIR Spectroscopy”, 第3回研究成果報告会 さきがけ「光エネルギーと物質変換」領域、2015年3月26日、日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉県船橋市)

⑩ 古谷祐詞、 「イオンチャンネルの分子機構解明への赤外分光解析による挑戦」、分子研究会 「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」、2015年4月20日、岡崎コンファレン

スセンター(愛知県岡崎市)

⑪ Y. Furutani, “Infrared Difference Spectroscopy is a Key Technique for Deciphering the Molecular Mechanisms of Ion Pump and Channel Proteins”, OIIB (Okazaki Institute for Integrative Bioscience) Summer School 2015, Aug. 13, 2015, Okazaki Conference Center (Aichi Pref., Okazaki)

⑫ 古谷祐詞「赤外分光法によるレチナルタンパク質の機能発現機構の解明」、第29回カロテノイド研究談話会、2015年9月4日、首都大学東京(東京都八王子市)

⑬ Y. Furutani, “Protein-ion interactions of membrane proteins studied by Fourier-transform infrared spectroscopy”, 18th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, May 19-21, 2014, Busan (Republic of Korea)

⑭ 古谷祐詞、「赤外分光法による膜タンパク質の動作機構研究」、大阪大学生命機能研究科 FBS コロキウム、2014年6月18日、大阪大学(大阪府吹田市)

⑮ 古谷祐詞、「赤外分光法による膜タンパク質研究」、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 第3回生体物理化学セミナー、2014年9月19日、岡山大学(岡山県岡山市)

⑯ 古谷祐詞、「赤外分光法による膜タンパク質の動作機構研究」、第8回分子科学討論会奨励賞受賞講演、2014年9月24日、広島大学(広島県東広島市)

⑰ H. Tsukamoto, K. Nakajo, Y. Kubo, Y. Furutani, ATR-FTIR spectroscopic analyses of interaction modes underlying unique ion selectivity of a two-pore domain potassium channel TWIK-1, The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (BSJ2014), Sep. 25-27, 2014, Sapporo Convention Center (Hokkaido Pref., Sapporo)

⑱ Y. Furutani, “Structural Changes of Membrane Proteins Studied by Difference FTIR Spectroscopy; Microbial Rhodopsins and Potassium Ion Channels”, 16th International Conference on Retinal Proteins, Oct. 5-10, 2014, Nagahama Royal Hotel (Shiga Pref., Nagahama)

[図書] (計 2件)

① 古谷祐詞 「75 菌類のロドプシン」、第3章光の情報利用 3.1 光環境応答、光と生命の事典(日本光生物学協会「光と生命の事典」編集委員会 編)(朝倉書店)、2016年2月25日

② Yuji Furutani, Chapter 5 “Molecular Mechanisms for Ion Transportation of Microbial Rhodopsins Studied by Light-Induced Difference FTIR Spectroscopy”, Optogenetics - Light-Sensing Proteins and Their Applications - 63-76, (Eds.: Yawo, Hiromu, Kandori, Hideki,

Koizumi, Amane), 2015, Springer (DOI 10.1007/978-4-431-55516-2, ISBN 978-4-431-55515-5)

[その他]

ホームページ等

https://groups.ims.ac.jp/organization/furutani_g/

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

(2) 研究協力者

高田 紀子 (TAKADA, Noriko)、青山 正樹 (AOYAMA, Masaki)、水谷 伸雄 (MIZUTANI, Nobuo)、近藤 聖彦 (KONDO, Takuhiko)
分子科学研究所・装置開発室