

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26708002

研究課題名(和文)膜タンパク質の分子機構解明に資する新規赤外分光計測法の開発

研究課題名(英文)Development of a new infrared spectroscopic technique for elucidating molecular mechanisms of membrane proteins

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) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：イオンチャネルやトランスポーター等の膜タンパク質が機能する分子機構を解明するため、イオンや基質との相互作用や機能発現過程での構造変化を定量的もしくは時分割で計測することを可能とする新規赤外分光計測法の開発に取り組んだ。全反射型赤外分光装置に低速溶液交換法および急速溶液交換法を適用する実験系を構築した。カリウムチャネルの高いカリウムイオン選択性に関わるイオン選択フィルターについて、その分子指紋となる赤外吸収バンドの特定に成功したり、カリウムイオン結合に伴う構造変化を反映する赤外吸収バンドの変化を時分割で計測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：For elucidating molecular mechanisms underlying functions of membrane proteins such as ion channels and transporters, I engaged in development of a new infrared spectroscopic technique which enables quantitative measurement of interactions between protein and ion or substrate and time-resolved measurement of structural changes of protein upon their functioning. Slow or fast buffer-exchange system was incorporated in an infrared spectrometer with a configuration of attenuated total reflection. I succeeded to identify an infrared absorption band as "molecular fingerprint" for the ion selectivity filter which realizes high selectivity for potassium ions in potassium channel, and to measure changes of the infrared band reflecting structural changes of the selectivity filter upon binding of potassium ions in time-resolved manner.

研究分野：生物物理化学

キーワード：赤外分光法 イオンチャネル カリウムチャネル 膜タンパク質 イオン-タンパク質相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞の脂質二重膜に存在するイオンチャネル、トランスポーター、ポンプなどの膜タンパク質は、イオンや生体関連化合物などを能動的および受動的に輸送することで、情報伝達や生体エネルギー生産など様々な役割を果たしている。

膜タンパク質の動作機構の解明には、原子レベルでの構造情報をもたらす X 線結晶構造解析が重要な役割を果たしてきた。例えば、カリウムイオンチャネル KcsA の結晶構造解析により、イオン透過孔の一部に形成されたイオン選択フィルタと呼ばれる領域で、Na⁺と K⁺イオンが識別されるという巧みな分子機構が明らかにされた。また、G タンパク質受容体 (GPCR) と G タンパク質との複合体の結晶構造解析による活性化機構の解明などもある。一方で、X 線結晶構造解析では、タンパク質とイオンおよび基質との相互作用の強さを表す解離定数や、機能発現過程での動的な構造変化に関する情報の取得に限界があることも認識されている。また、アスパラギン酸やグルタミン酸などのカルボキシル基のプロトン化状態など、X 線結晶構造解析では水素原子の構造情報を得ることが難しい。

このように研究開始当初は、膜タンパク質とイオン・基質との相互作用を定量的に解析したり、タンパク質の構造変化を時分割で解析する新たな実験手法が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質のイオン・基質の認識機構や機能発現に関わる構造変化に関する研究を行う。そのために試料が水溶液中で浸された状態で計測することが可能な全反射型赤外分光(ATR-IR)計測を用いる。イオンや基質の結合部位を構成するアミノ酸残基の振動バンドを計測し、濃度依存的な計測により解離定数などを求めるなど、定量的な解析を行う。さらには、研究開始前から開発中の急速溶液交換法を駆使することにより、イオンや基質の結合・解離に伴うタンパク質の構造変化など動的な構造情報を得る。

X 線結晶構造解析などで得られる静的な構造情報を基礎としつつも、膜タンパク質の分子機構の解明の鍵となるイオン・タンパク質間相互作用や動的な構造変化などの情報を得ることを可能とする赤外分光計測手法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

低速および急速溶液交換法を備えた ATR-IR 装置により、イオン交換赤外差スペクトルを計測する(図 1)。低速溶液交換法は既に手法が確立しているが、急速溶液交換法は本研究で改良を検討した。

(1) イオン・基質透過経路でのイオン・基質との相互作用解析 (低速溶液交換法)

イオン・基質濃度を変えた計測により、イ

オン・基質の解離定数などの値を結合部位の構造情報に関連づけて求める。

(2) 急速溶液交換法によるイオン・基質の結合解離に伴う構造ダイナミクスの解明

イオンや基質濃度を急激に変化させ、タンパク質構造の変化を実時間で追跡する。それによりイオン・基質結合やタンパク質のコンフォメーション変化の速度定数を求める。

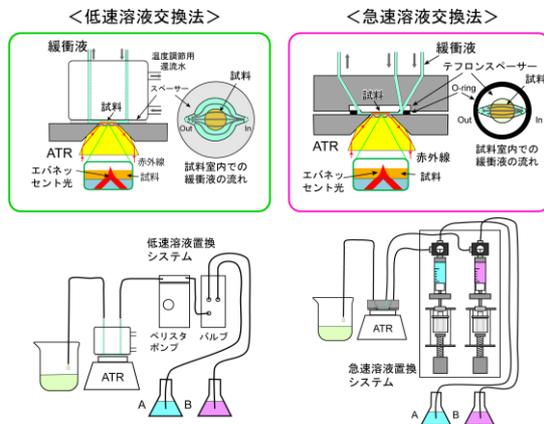


図 1 溶液交換 ATR-IR 法の模式図

(左) 低速溶液交換法 (右) 急速溶液交換法

4. 研究成果

(1) イオン・基質透過経路でのイオン・基質との相互作用解析 (低速溶液交換法)

ほ乳動物由来のカリウムチャネル TWIK1 に関する研究成果[雑誌論文①]

TWIK1 は two-pore 型カリウムチャネル (K2P) のファミリーに属し、イオン選択フィルタを構築するポアドメイン領域が 1 つのポリペプチド鎖に 2 つ含まれている。そのため、2 量体で擬似的な 4 量体を形成して、イオン透過孔を形成する(図 2)。



図 2 TWIK1 のポアドメイン

一般的なカリウムチャネルは 4 量体でイオン透過孔を形成するため、その透過孔を対称軸とする 4 回回転対称性(C₄)であるが、K2P チャネルでは 2 つのポアドメインの配列が異なるため、2 回回転対称性(C₂)である。特に TWIK1 はポアドメインの 1 つのアミノ酸残基が Thr(118 番目)にあるので Thr118 表記)であり、条件によっては Na⁺を透過するという性質がある興味深いカリウムチャネルである。しかしながら、TWIK1 の結晶構造ではイオン選択フィルタは他の一般的なカリウムチャネルと同様に K⁺を配位しており、どのような構造的要因で K⁺選択性が低下しているのか分かっていなかった。

低速溶液交換法でのイオン交換に誘起される赤外線吸収スペクトルの変化から、TWIK1 の K^+ と Na^+ との相互作用の違いを明らかにした。その結果、 K^+ を配位している際に振動数(波数)で 1680 cm^{-1} (波長では $5.952\text{ }\mu\text{m}$ に相当)の赤外線を吸収することが分かった。さらにポアドメインの Thr118 を Ile に変異したもの(T118I 変異体)や別のポアドメインにある Leu228 を Phe に変異したものも計測した。別の実験により、これらの K^+ 選択性は野生型(WT)よりも高く、T118I>L228F>WT の順になっていることも確認した。

興味深いことに、 1680 cm^{-1} の赤外吸収を指標にして見積もった K^+ との結合の親和性は同様に T118I>L228F>WT (図 3)となっていた(試料中のチャンネル分子の半数が K^+ を結合する濃度 half-maximal value は、T118I が $3.8 \pm 0.4\text{ mM}$ 、L228F が $7.7 \pm 1.1\text{ mM}$ 、WT が $39.6 \pm 19.8\text{ mM}$ であった)。つまり、 K^+ の透過における K^+ 選択性は K^+ の透過孔への結合しやすさと関連しているということを示唆しているものと思われる。

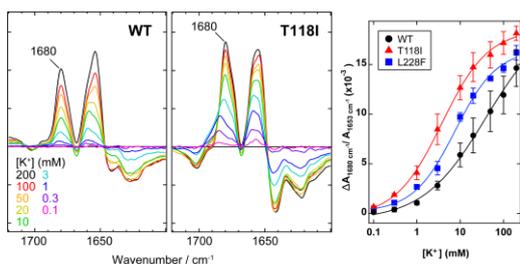


図 3 K^+ 濃度依存的なイオン交換赤外差スペクトルと 1680 cm^{-1} のバンド強度変化

また、他のアルカリ金属イオン Rb^+ 、 Cs^+ 等との赤外差スペクトルでは、WT には見られなかったが、T118I および L228F 変異体では 1690 cm^{-1} へと高波数シフトすることが確認された。このことは、バクテリア由来の KcsA チャンネルでも見られており[雑誌論文②, ⑬]、 K^+ 選択性の高いカリウムチャンネルに共通して見られるイオン選択フィルタの構造特性と思われる。

(2) 急速溶液交換法によるイオン・基質の結合解離に伴う構造ダイナミクスの解明

ATR-IR で計測する試料は、ATR-IR 用の光学結晶の表面に試料を張り付けているため、溶液置換を急速に起こすことで試料の状態が変化する過程を時間分解計測することが可能であることを既に示している[雑誌論文⑬,⑭の総説参照]。本研究では、ATR-IR 用の結晶により小さいものを利用するなどして、実験条件の最適化を図った。

3 回反射型の ATR-IR 用結晶において、溶液の交換速度が向上するかどうかを検討した。直径が 4 mm の 9 回反射型に比べて、直径が 2 mm の 3 回反射型は交換する溶液の量が少ないので、より高速に交換できる可能性

があると思われた。分子科学研究所装置開発室にて流路を規定するテフロンパーツの製作などを行い、最適な計測条件を検討したが、溶液の交換速度は数十ミリ秒程度とそれほど変化が見られなかった。しかしながら、交換する液量を $120\text{ }\mu\text{L}$ から $320\text{ }\mu\text{L}$ に増加させると、立ち上がり後の溶液濃度が安定することが分かった。交換後の溶液組成を一定に保つことは、タンパク質へのリガンドやイオン等の結合を時間分解計測するのに重要なことであるため、参考になる知見が得られたものと考えている。

急速溶液交換法については、以下の膜タンパク質に適用した。メリビオース輸送タンパク質、カリウムチャンネル TWIK1 (図 4)、光駆動ナトリウムイオンポンプ KR2 である。それぞれイオン交換による時間分解赤外分光データが得られたが、研究期間の中で論文として取りまとめるには至らなかった。

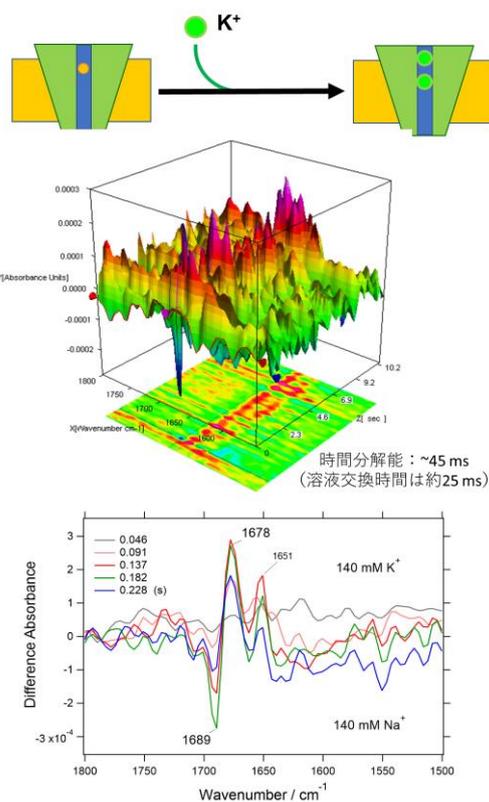


図 4 急速溶液交換法による TWIK1(T118I 変異体)の構造変化解析

また、分子科学研究所の藤グループとの共同研究として、チャープパルス上方変換による新規 ATR-IR 計測系に急速溶液交換法を適用することに成功した[雑誌論文⑱]。本手法はチャープパルス上方変換により赤外光を可視光に変換することで、高価で性能の低い赤外検出器ではなく、安価で高性能な可視検出器を用いることを可能とするものである。1 回反射のダイヤモンド ATR を用い、水とアセトンの交換反応をテスト実験として試みた結果、 $10\text{ }\mu\text{s}$ 程度での交換が行われていることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

- ① Hisao Tsukamoto, (他 7 名) and Yuji Furutani, “Structural properties determining low K⁺ affinity of the selectivity filter in the TWIK1 K⁺ channel”, *J. Biol. Chem.* Vol. 293, No. 18, pp. 6969-6984, 2018. 査読有 (DOI: 10.1074/jbc.RA118.001817)
- ② Yuji Furutani, “Ion-protein interactions of a potassium ion channel studied by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy”, *Biophys. Rev.* Vol. 10, pp. 235-239, 2018. 査読有 (DOI:10.1007/s12551-017-0337-8)
- ③ Akkapol Suea-Ngam, Monpichar Srisa-Art, and Yuji Furutani, “PDMS-Based Microfluidic Device for Infrared-Transmission Spectro-electrochemistry”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 91, pp. 728-734, 2018. 査読有 (DOI: 10.1246/bcsj.20170430)
- ④ Kota Katayama, Yuji Furutani, (他 4 名), ““In situ” Observation of Role of Chloride Ion Binding to Monkey Green Sensitive Visual Pigment by ATR-FTIR Spectroscopy”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 3381-3387, 2018. 査読有 (DOI: 10.1039/C7CP07277E)
- ⑤ Setsiri Haesuwannakij, Tetsunari Kimura, Yuji Furutani, (他 6 名), “The Impact of the Polymer Chain Length on the Catalytic Activity of Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-supported Gold Nanoclusters”, *Sci. Rep.* Vol. 7, pp. 9579, 2017. 査読有 (DOI: 10.1038/s41598-017-10165-9)
- ⑥ Hisao Tsukamoto, I-Shan Chen, Yoshihiro Kubo, and Yuji Furutani, “A Ciliary Opsin in the Brain of a Marine Annelid Zooplankton is Ultraviolet-Sensitive, and the Sensitivity is Tuned by a Single Amino Acid Residue”, *J. Biol. Chem.* Vol. 292, No. 31, pp. 12971-12980, 2017. 査読有 (DOI: 10.1074/jbc.M117.793539)
- ⑦ Go Kasuya, (他 6 名), Yuji Furutani, Motoyuki Hattori, and Osamu Nureki, “Structural insights into the nucleotide base specificity of P2X receptors”, *Sci. Rep.* Vol. 7, pp. 45208, 2017. 査読有 (DOI: 10.1038/srep45208)
- ⑧ Akihiko Sakamoto, Takashi Tsukamoto, Yuji Furutani, (他 6 名), “Live-cell single-molecule imaging of the cytokine receptor MPL for analysis of dynamic dimerization”, *J. Mol. Cell Biol.* Vol. 8, No. 6, pp. 553-555, 2016. 査読有 (DOI: 10.1093/jmcb/mjw027)
- ⑨ Monpichar Srisa-Art and Yuji Furutani, “Simple and Rapid Fabrication of PDMS Microfluidic Devices Compatible with FTIR Microspectroscopy”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 89, pp. 195-202, 2016. 査読有 (DOI: 10.1246/bcsj.20150357).
- ⑩ 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, 2015. 査読有 (DOI: 10.2530/jslsm.jslsm-36_0040)
- ⑪ Hisao Tsukamoto, (他 4 名) and Yuji Furutani, “Retinal Attachment Instability is Diversified Among Mammalian Melanopsins”, *J. Biol. Chem.* Vol. 290, No. 45, pp. 27176-27187, 2015. 査読有 (DOI: 10.1074/jbc.M115.666305).
- ⑫ Yoshiya Inokuchi, (他 5 名) and Yuji Furutani, “New Insights into Metal Ion-Crown Ether Complexes Revealed by SEIRA Spectroscopy”, *New J. Chem.* Vol. 39, pp. 8673-8680, 2015. 査読有 (DOI: 10.1039/c5nj01787d).
- ⑬ Yuji Furutani, (他 4 名), “Specific interactions between alkali metal cations and the KcsA channel studied using ATR-FTIR spectroscopy”, *Biophys. Physicobiol.* Vol. 12, pp. 37-45, 2015. 査読有 (DOI: 10.2142/biophysico.12.0_37)
- ⑭ Asumi Inaguma, (他 7 名) and Yuji Furutani, “Chimeras of channelrhodopsin-1 and -2 from *Chlamydomonas reinhardtii* exhibit distinctive light-induced structural changes from channelrhodopsin-2”, *J. Biol. Chem.* Vol. 290, No. 18, pp. 11623-11634, 2015. 査読有 (DOI: 10.1074/jbc.M115.642256)
- ⑮ Hideki Kandori, Yuji Furutani and Takeshi Murata, “Infrared spectroscopic studies on the V-ATPase”, *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1847, No. 1, pp. 134-141, 2015. 査読有 (DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.07.020)
- ⑯ 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* Vol. 8, No. 1, pp. A0067, 2014. 査読有 (DOI: 10.3175/molsci.8.A0067)
- ⑰ 古谷祐詞, 木村哲就, 岡本基土 「急速緩衝液交換法による時間分解全反射赤外分光法の開発」, *生物物理* Vol. 54, No. 5, pp. 272-275, 2014. 査読有 (DOI: 10.2142/biophys.54.272)
- ⑱ Yuji Furutani and Hideki Kandori, “Hydrogen-bonding changes of internal water molecules upon the actions of microbial rhodopsins studied by FTIR spectroscopy”, *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1837, No. 5, pp. 598-605, 2014. 査読有 (DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.09.004)
- ⑲ Hideto Shirai, Constance Duchesne, Yuji Furutani, and Takao Fuji, “Attenuated total reflectance spectroscopy with chirped-pulse upconversion”, *Opt. Express* Vol. 22, No. 24, pp. 29611-29616, 2014. 査読有 (DOI: 10.1364/OE.22.029611)
- ⑳ Jin Chen, Hisashi Yagi, Yuji Furutani, (他 5 名), “Self-assembly of the chaperonin

GroEL nanocage induced at submicellar detergent”, *Sci. Rep.* Vol. 4, pp. 5614, 2014. 査読有 (DOI:10.1038/srep05614)

[学会発表] (計 19 件)
(招待講演)

- ① Yuji Furutani, “Interactions of potassium ion channels with alkali metal cations and their relevance to the K⁺ selectivity studied by infrared spectroscopy”, Mini international workshop “Interhierarchical understanding of materials and life through molecular observation”, 2018.
- ② Yuji Furutani, “Application of infrared spectroscopy to study the ion selectivity of potassium ion channels”, The 6th Asian Spectroscopy Conference (ASC6), 2017.
- ③ Yuji Furutani, “Time-resolved FTIR spectroscopy on microbial rhodopsins and other membrane proteins”, International Symposium on Biophysics of Rhodopsins, 2017.
- ④ Yuji Furutani and Hisao 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, 2016.
- 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, 2016 年.
- ⑥ 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 Yuji Furutani, “Molecular Mechanisms of Retinal Proteins with Involvement of Water Molecules Studied by Light-Induced Difference Infrared Spectroscopy”, 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry, 2016.
- ⑧ Yuji Furutani, “The molecular mechanisms of ion channel proteins studied by stimulus-induced difference FT-IR spectroscopy”, Pure and Applied Chemistry International Conference (PCCON), The 4th CU-IMS Symposium, 2016.
- ⑨ 古谷祐詞, 「赤外分光法によるレチナー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.
- ⑩ Yuji 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.
- ⑪ 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

- ⑫ Yuji Furutani, “Structural Changes of Membrane Proteins Studied by Difference FTIR Spectroscopy; Microbial Rhodopsins and Potassium Ion Channels”, 16th International Conference on Retinal Proteins, 2014.
- ⑬ 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.
- ⑭ 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.
- ⑮ 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.
- ⑯ Yuji Furutani, “Protein-ion interactions of membrane proteins studied by Fourier-transform infrared spectroscopy”, 18th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, 2014.

(一般講演)

- ① 塚本寿夫、中條浩一、久保義弘、古谷祐詞, 「全反射赤外分光法によるカリウムチャンネル TWIK-1 のイオン選択フィルター構造とアルカリ金属イオンとの相互作用解析」, 第 11 回分子科学討論会, 2017 年.
- ② 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.
- ③ Yuji Furutani, “Ion-Protein Interactions between a Potassium Channel and Alkali Metal Cations Studied by ATR-FTIR Spectroscopy”, 60th Annual Meeting of Biophysical Society, 2016.

[図書] (計 2 件)

- ① 古谷祐詞, 朝倉書店, 光と生命の事典 (「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), pp. 154-155, 2016 年
- ② Yuji Furutani, Springer, Optogenetics -Light-Sensing Proteins and Their Applications- (Chapter 5 “Molecular Mechanisms for Ion Transportation of Microbial Rhodopsins Studied by Light-Induced Difference FTIR Spectroscopy”), pp. 63-76, 2015.

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