古　谷　祐　詞（准教授）（2009 年 3 月 1 日着任）

A-1) 専門領域：生物物理学 , 生体分子科学

A-2) 研究課題：

a) 全反射赤外分光法による膜タンパク質とイオンとの相互作用の研究

b) 時間分解赤外分光法によるバクテリオロドプシンおよびハロロドプシンのタンパク質内水素結合変化の実時間計測

c) 急速溶液混合法と時間分解赤外分光法を組み合わせた膜タンパク質の構造変化解析法の開発

d) 表面増強赤外分光法による膜タンパク質の構造変化計測系の構築

e) 赤・緑視物質の波長制御機構および視物質ロドプシンの熱雑音発生機構に関する研究

A-3) 研究活動の概略と主な成果

a) 膜タンパク質は，細胞膜に存在し，細胞外と細胞内とを橋渡しする重要な役割を担っている。特にイオン輸送タンパク質は，電気信号の発生，電気化学ポテンシャルの形成など生体にとって非常に重要な役割を担っている。膜タンパク質分子とイオンとの相互作用を，タンパク質の分子振動変化として観測するのに，全反射（ATR）赤外分光法は有効である。9 回反射型 ATR 結晶に 5 μL（タンパク質濃度は 1 mg/ml 程度）を滴下し，乾燥後に任意の緩衝液を流すことで，様々な膜タンパク質のイオン交換誘起赤外差スペクトルの計測を実現している。現在，カリウムイオンチャネル KcsA や ATP 駆動型 Na^+ 輸送タンパク質（V-ATPase）について論文準備中である。

b) ロドプシンは発色団レチナールを結合し，その光異性化反応によりタンパク質の構造を変化させ，光情報を伝達したり，プロトンやイオンを輸送したりする機能を持つ。分子科学研究所に赴任した際に，新規に Bruker 社製 VERTEX80 を導入し，試料室や試料ホルダーを改造することで，レーザー光誘起の時間分解赤外分光計測系を立ち上げた。最初のプロトン移動が起きる M 中間体だけでなく，これまで情報の乏しい最終中間体 O についても，水素結合変化の詳細な情報が得られるものと期待している。また，塩化物イオンポンプであるハロロドプシンについても同様の計測を行い，プロトンと塩化物イオンの輸送機構の違いについて研究を進めている。

c) 助教の木村哲就氏が 2009 年 12 月に赴任し，a) の課題をさらに発展させるべく，急速溶液混合法（ストップトフロー法および連続混合法）と赤外分光法を組み合わせた新規計測法の開発を行っている。膜タンパク質のイオン結合に伴う構造変化を実時間で捉える挑戦的な試みである。現在，急速溶液混合法の組込方法について議論し，試作品を用いた予備実験を行い，装置の設計に本格的に取りかかっている段階である。

d) 全反射赤外分光用のシリコン結晶表面に 20 nm 程度の金薄膜を真空蒸着法により形成し，Ni-NTA で表面処理を行い，His-tag をもつ膜タンパク質を表面に固定化することで単一分子層からの赤外吸収スペクトルを計測することが可能となる。さらに界面活性剤を脂質と置き換えることで，膜タンパク質が脂質二重膜一層に埋め込まれた状況での計測が可能となる。現在，様々な金薄膜を調製し，膜タンパク質の構造変化計測に最適な条件を検討している段階である。

e) 名古屋工業大学の神取秀樹教授および京都大学霊長類研究所今井啓雄准教授との共同研究である色覚ではたらく緑および赤視物質の波長制御機構の研究に協力した（Katayama *et al., Angew. Chem., Int. Ed.*）。また，視物質ロドプシンのレチナール近傍に存在する Thr118 の H/D 交換反応を赤外分光法で追跡することを提案し，熱揺らぎの熱力学パラメーターの解析および熱雑音の発生機構を明らかにすることに貢献した（V. A. Lorentz-Fonfria *et al., J. Am. Chem. Soc.*）。

B-1) 学術論文

K. KATAYAMA, Y. FURUTANI, H. IMAI and H. KANDORI, "An FTIR Study of Monkey Green- and Red-Sensitive Visual Pigments," *Angew. Chem., Int. Ed.* **49**, 891–894 (2010).

K. HASHIMOTO, A. R. CHOI, Y. FURUTANI, K.-H. JUNG and H. 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**, 3343–3350 (2010).

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).

K. KATAYAMA, Y. FURUTANI and H. KANDORI, "An FTIR Study of the Photoreaction of Bovine Rhodopsin in the Presence of Hydroxylamine," *J. Phys. Chem. B* **114**, 9039–9046 (2010).

S. NEYA, M. SUZUKI, T. HOSHINO, H. ODE, K. IMAI, T. KOMATSU, A. IKEZAKI, M. NAKAMURA, Y. FURUTANI and H. KANDORI, "Molecular Insight into Intrinsic Heme Distortion in Ligand Binding in Hemoprotein," *Biochemistry* **49**, 5642–5650 (2010).

B-3) 総説, 著書

H. KANDORI, Y. SUDO and Y. FURUTANI, "Protein–Protein Interaction Changes in an Archaeal Light-Signal Transduction," *J. Biomed. Biotech. Article* ID 424760, 14 pages (2010).

B-4) 招待講演

古谷祐詞,「X–H, X–D 伸縮振動領域の赤外分光法から何が分かるか?」, 分子研研究会「拡がるロドプシンの仲間から" 何が分かるか "" 何をもたらすか "」, 岡崎コンファレンスセンター , 岡崎, 2010 年 3 月.

Y. FURUTANI, "Interaction between Membrane Proteins and Ions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy: A Potential Tool for Drug Screening," BIT's 1st Annual International Conference of Medichem-2010, Beijing International Convention Center, Beijing (China), May 2010.

古谷祐詞,「赤外分光法によるイオン輸送蛋白質の構造変化解析」, アドバンス生命理学特論 : 世話人 ; 須藤雄気 准教授 (名大・院理), 名古屋大学, 名古屋, 2010 年 7 月.

古谷祐詞,「ロドプシン-KcsA 融合蛋白質の発現と FTIR による構造変化解析」, 特定領域研究「高次系分子科学」第 9 回ミニ公開シンポジウム, サギセミナーセンター , 広島県三原市, 2010 年 8 月.

T. KIMURA, "In vitro protein folding dynamics in the microsecond to millisecond timescale," The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Advanced Insight into Protein Motions; in silico, in vitro and in vivo Studies, Tohoku University, Sendai (Japan), September 2010.

Y. FURUTANI, "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), September 2010.

B-6) 受賞，表彰

古谷祐詞, 平成19年度名古屋工業大学職員褒賞優秀賞 (2007).

B-7) 学会および社会的活動

学会誌編集委員

生物物理中部地区編集委員 (2007, 2010).

B-10) 競争的資金

科研費若手研究(スタートアップ),「ATR-FTIR 分光法によるロドプシンのタンパク質間相互作用の解析」, 古谷祐詞 (2006年).

科研費特定領域研究「革新的ナノバイオ」(公募研究),「光駆動プロトンポンプの動作機構の解明」, 古谷祐詞 (2007年–2008年).

科研費特定領域研究「細胞感覚」(公募研究),「古細菌型ロドプシンの新奇情報伝達機構の解明」, 古谷祐詞 (2007年–2008年).

科研費特定領域研究「高次系分子科学」(公募研究),「孤立ナノ空間に形成された水クラスターの水素結合ダイナミクス解析」, 古谷祐詞 (2008年–2009年).

科研費特定領域研究「革新的ナノバイオ」(公募研究),「光駆動イオン輸送蛋白質の動作機構の解明」, 古谷祐詞 (2009年–2010年).

科研費特定領域研究「細胞感覚」(公募研究),「古細菌型ロドプシンの新奇情報伝達機構の解明と光応答性カリウムチャネルの開発」, 古谷祐詞 (2009年–2010年).

科研費特定領域研究「高次系分子科学」(公募研究),「孤立ナノ空間を有する有機金属錯体での特異な光化学反応の分光解析」, 古谷祐詞 (2010年–2011年).

科研費若手研究(B),「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」, 古谷祐詞 (2010年–2011年).

科研費研究活動スタート支援,「時間分解赤外分光法を用いた膜蛋白質フォールディング機構の解明」, 木村哲就 (2010年–2011年).

C) 研究活動の課題と展望

タンパク質の機能発現に関係する構造変化を赤外分光法で捉える手法は，光を反応のトリガーとして使える光受容タンパク質において発展してきた。これまでロドプシンを中心として，光反応中間体を低温で安定化することで，精密な光誘起赤外差スペクトルを計測し，4000–1800 cm^{-1} の領域に現れる水素結合ドナー（N–H やO–H 基）の伸縮振動の情報から，様々な機能発現に重要な構造変化を見いだしてきた。今後，これらの手法を時間分解計測に発展させることで，低温で安定化できない過渡的な中間体の水素結合変化の情報を得ることを目指す。また，光に応答しないタンパク質についても，液中での計測が容易な全反射法（ATR 法）を利用することで，イオンや化合物の結合による赤外スペクトル変化を計測し，様々な膜タンパク質における機能発現機構を明らかにすることを目指す。特に急速溶液混合法と赤外分光法を組み合わせた手法を発展させることで，微細な赤外吸収スペクトル変化（0.001程度以下の吸光度変化）を実時間で計測し，膜タンパク質が機能する過程でダイナミックに変化する姿を捉えたいと考えている。さらに，表面増強赤外分光法により，一層の脂質二重膜中での膜タンパク質の構造変化を時間分解計測する研究にも発展させたい。