

## 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) 時間分解赤外分光法による古細菌型ロドプシンの光誘起構造変化の解明
- b) 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
- c) 全反射赤外分光法による  $Mg^{2+}$  輸送体 MgtE のイオン選択機構の解明
- d) 低収量生体試料の効率的な時間分解計測を可能にするマイクロ流体ミキサーの開発
- e) 体内時計の調節に関わる光受容タンパク質メラノプシンの機能発現機構の解明
- f) 各種イオンチャネルタンパク質の解析に向けた大量発現系の構築

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 古細菌型ロドプシンは光駆動プロトンポンプとして機能するバクテリオロドプシンや塩化物イオンポンプであるハロロドプシンなどがあり, 最近ではオプトジェネティクス分野で利用が進んでいる光開閉チャネルであるチャンネルロドプシンなど, 細胞膜のイオン透過に重要な役割を果たすものが知られている。一方, これらのイオン輸送過程の分子機構はバクテリオロドプシン以外ではあまりよく分かっていないのが現状である。時間分解赤外分光計測を適用することでタンパク質の構造変化を解明することを目指した研究を進めている。今年度は, ハロロドプシンについて解析が進んでおり, 光反応中間体での構造変化をタンパク質骨格の amide A (N-H 伸縮) から明らかにした研究について論文執筆中である。
- b) 金ナノ粒子や金薄膜などを利用した表面増強分光法が近年着目を集めている。全反射赤外分光計測用のシリコンブリズム表面に ~10 nm 程度の厚みで金薄膜を形成させ, 膜タンパク質であるハロロドプシンの表面増強赤外分光計測を試みている。これまでに測定に最適な厚みが ~10 nm 程度であることを確認し, 金薄膜上へのハロロドプシンの固定を His タグと Ni-NTA との錯体形成を利用することで実現している。N 末および C 末に His タグを導入したハロロドプシンや  $\beta$  シート構造を欠落した変異体などを用いて増強赤外吸収バンドの帰属を進めている。
- c) MgtE は, 細胞内  $Mg^{2+}$  イオン濃度の恒常性維持に関わる膜輸送蛋白質であり,  $Mg^{2+}$  濃度依存的なゲート開閉により輸送活性調節を行っている。  $Mg^{2+}$  に対する MgtE の高いイオン選択性の分子機構を明らかにすることを目的として, 脂質二重膜に再構成した MgtE に対して,  $Mg^{2+}$  もしくは  $Ca^{2+}$  を含んだ緩衝液を交換することでイオン交換誘起赤外差スペクトルを全反射赤外分光法 (ATR-FTIR) を用いて測定を行っている。また, 変異体についても同様の測定を行うことで  $Mg^{2+}$  結合サイトの同定も行い, 加えて野生型に滴定実験を行うことで, 膜貫通ドメインに存在する  $Mg^{2+}$  結合サイトにおいては  $Mg^{2+}$  の方が  $Ca^{2+}$  よりも約 30 倍高い親和性を持っていることを明らかにした。
- d) 生体分子の分子機構を明らかにするためには, 刻一刻と変化するコンフォメーションを実時間観察することが重要である。しかし, 溶液の混合によって反応を開始する既存の方法では大量の試料を必要とするために対象にできる生体試料が限定されてしまう。そこで新規のマイクロ流体連続フローミキサーを装置開発室と共に開発し, 顕微分光法と組み合わせることによって, 試料の消費量を抑制した新規の計測系を構築している。現在, 蛍光分子が高效率で混合されていることを蛍光顕微鏡で確認しており, 蛍光標識した低収量生体試料 (特に膜蛋白質) の機能発現に伴うダイナミクスあるいは自己組織化の実時間観察へと展開していく予定である。
- e) 動物は外界の光情報を, 視覚のみならず体内時計の調節にも用いている。近年, メラノプシンという光受容タンパク質が, ヒトやマウスにおける体内時計の光による調節に関わることが明らかになった。しかし試料調製の困難さから

これまでメラノプシンがどのように光情報を受容し・伝達するのかが不明であった。今年度は比較的試料調製が容易な頭索類ナメクジウオのメラノプシンに対して、さらに試料調製を容易にするため、様々な変異を導入して発現量を上げる試みを行った。その結果、野生型と比べて10倍近くにまで発現量を上げることに成功した。現在、その変異体を用いて赤外分光解析に取り組むと共に、同じ変異をヒトやマウスのメラノプシンにも導入することを試みている。

- f) イオンチャネルは、様々な細胞特に神経細胞が機能するために重要な役割を果たす膜タンパク質である。近年様々なイオンチャネルの構造解析が爆発的に進展しているが、解析が進んでいないチャネルや詳細がわかっていないメカニズムが残されている。今年度は、各種哺乳培養細胞を用いて様々なイオンチャネルタンパク質の大量発現系を構築する試みを行った。その結果、光を受容してチャネルが開閉するチャネルロドプシンの各種変異体の中で、よく発現するものを見出すことに成功した。また、その機能不全が不整脈などにかかわるイオンチャネル KCNQ の発現系の構築にも現在取り組んでいる。

#### B-1) 学術論文

**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).

**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).

**J. SASAKI, H. TAKAHASHI, Y. FURUTANI, H. KANDORI and J. L. SPUDICH**, “Sensory Rhodopsin-I as a Bidirectional Switch: Opposite Conformational Changes from the Same Photoisomerization,” *Biophys. J.* **100**, 2178–2183 (2011).

**T. KONUMA, T. KIMURA, S. MATSUMOTO, Y. GOTO, T. FUJISAWA, A. R. FERSHT and S. TAKAHASHI**, “Time-Resolved Small-Angle X-Ray Scattering Study of the Folding Dynamics of Barnase,” *J. Mol. Biol.* **405**, 1284–1294 (2011).

**X. ZHANG, V. Q. LAM, Y. MOU, T. KIMURA, J. CHUNG, S. CHANDRASEKAR, J. R. WINKLER, S. L. MAYO and S. O. SHAN**, “Direct Visualization Reveals Dynamics of a Transient Intermediate during Protein Assembly,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6450–6455 (2011).

#### B-3) 総説, 著書

**A. KAWANABE, Y. FURUTANI, K.-H. JUNG and H. KANDORI**, “An inward proton transport using Anabaena sensory rhodopsin,” *J. Microbiol.* **49**, 1–6 (2011).

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**, 694–695 (2011).

**S. TAKAHASHI and T. KIMURA**, “Watching Dynamics of Events in Protein Folding in the Time Domain from Submilliseconds to Seconds: Continuous-Flow Rapid-Mixing Infrared Spectroscopy,” in *Protein Folding and Misfolding: Shining Light by Infrared Spectroscopy*, 91–116 (2011).

#### B-4) 招待講演

**Y. FURUTANI**, “FTIR Studies of Membrane Proteins,” The Winter School of Sokendai/Asian CORE Program “Frontiers of Molecular Science—Life, Material, Energy, and Space,” Okazaki Conference Center, Okazaki, August 2011.

**Y. FURUTANI**, “Ion-binding-induced Structural Changes in Membrane Proteins Studied by ATR-FTIR Spectroscopy,” Third Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: —Experiments and Simulations, Lotte Hotel Jeju, Jeju (Korea), February 2011.

古谷祐詞,「イオン輸送タンパク質の分子科学」分子科学研究所 - 豊田中央研究所研究交流会, 豊田中央研究所, 長久手, 2011年6月.

古谷祐詞,「膜タンパク質のエネルギー変換および情報変換の分子機構」自然科学研究機構教育研究評議会(第28回)自然科学研究機構, 東京, 2011年6月.

**Y. FURUTANI**, “Ion-protein interactions studied by ATR-FTIR spectroscopy,” 14th Asian Chemical Congress, Bangkok (Thailand), August 2011.

**Y. FURUTANI and T. KIMURA**, “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), September 2011.

**Y. FURUTANI**, “Stimulus-induced difference infrared spectroscopy for receptor and transporter proteins in cell membrane,” Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing (China), October 2011.

**Y. FURUTANI**, “Stimulus-induced difference infrared spectroscopy for receptor and transporter proteins in cell membrane,” Henan University, Kaifeng (China), October 2011.

**Y. FURUTANI**, “Stimulus-induced difference infrared spectroscopy for receptor and transporter proteins in cell membrane,” 河南省物理学会第9次会員代表大会, Kaifeng (China), October 2011.

**Y. FURUTANI**, “Stimulus-induced difference infrared spectroscopy for receptor and transporter proteins in cell membrane,” College of Life Sciences Henan Normal University, Xinxiang (China), October 2011.

古谷祐詞,「偏光時間分解赤外分光法による高次分子システムではたらく水分子の構造変化解析への挑戦」特定領域研究「高次系分子科学」第12回ミニ公開シンポジウム, 松風園三谷温泉, 蒲郡, 2011年10月.

古谷祐詞,「赤外線でタンパク質内部の水素結合構造を語る」平成23年度生物構造学研究会「蛋白質中の水素・水分子の役割 - 中性子構造生物学の展望 -」テクノ交流館リコティ, 東海村, 2011年12月.

古谷祐詞,「赤外分光計測によるタンパク質研究の現状と未来」生物物理化学研究会シンポジウム「光といのち」名古屋工業大学, 名古屋, 2011年12月.

塚本寿夫,「光受容タンパク質ロドプシンの機能調節メカニズム」生化学若い研究者の会名古屋支部セミナー, 名古屋大学, 2011年8月.

#### 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

##### 学協会役員等

日本生物物理学会委員 (2010-2011).

日本生物物理学会分野別専門委員 (2010, 2011).

日本物理学会領域12運営委員 生物物理 (2011-2012).

日本化学会東海支部代議員 (2011).

##### 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).

自然科学研究機構平成22年度「若手研究者による分野間連携研究プロジェクト」「膜輸送蛋白質によるイオン選択・透過・輸送の分子科学」古谷祐詞(2010年).

自然科学研究機構平成23年度「若手研究者による分野間連携研究プロジェクト」「イオンチャネル蛋白質のイオン認識および開閉制御の分子機構解明」古谷祐詞(2011年).

科学技術振興機構さきがけ研究「様々な光エネルギー変換系における水分子の構造・機能相関解明」古谷祐詞(2011年-2014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).

科研費若手研究(A)「低収量生体分子の時間分解計測を目指したマイクロ流体ミキサーの開発」木村哲就(2011年-2013年).

## C) 研究活動の課題と展望

イオン輸送タンパク質や受容体などの膜タンパク質の機能発現の分子機構解明を赤外分光法などの各種分光法によって解明することを目的に研究を進めている。本年度から特任助教の塚本博士が加わり、培養細胞を用いることでGタンパク質共役型受容体(GPCR)の一種であるメラノプシンの機能的発現系の構築に成功しつつある。また、イオンチャネルについても生理研の久保義弘教授らとの共同研究を進めている。助教の木村博士も若手研究(A)の支援を受けて、低収量生体試料の効率的な時間分解計測を可能にするマイクロ流体ミキサーの開発を本格化させている。来年度は、バクテリオロドプシンやハロロドプシンの時間分解赤外分光計測やMg輸送タンパク質MgtEのイオン結合部位の赤外分光解析などの結果を原著論文にまとめる。大学院生の郭浩が博士論文研究として進めている金薄膜による表面増強効果によるハロロドプシンの赤外分光解析についても研究結果をまとめる予定である。今後の課題としては、ストップフロー法による時間分解赤外分光計測系の最適化、顕微赤外イメージングによる生細胞の動態観察などがある。