

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) 赤外分光法によるチャンネルロドプシンの光誘起構造変化の解明
- d) 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
- e) 哺乳動物カリウムチャンネルタンパク質の赤外分光解析
- f) 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
- g) 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

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 古細菌型ロドプシンの一種であるハロロドプシンは光駆動型塩化物イオンポンプである。今年度は光誘起の赤外差スペクトルを時分割計測し、各中間体形成時における水の O-H 伸縮振動の帰属に成功した。タンパク質内部で水素結合の相手がない水分子の “dangling bond” の強度変化から、塩化物イオンの取込みと放出の際に、そのような水分子が増えることを明らかにした (Y. Furutani *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 2964–2969 (2012))。負電荷を持ったイオンがタンパク質内部で安定化される際に水分子が積極的に関与していることを示唆する結果である。
- b) 表面増強赤外分光計測を膜タンパク質に適用するため、金薄膜の厚みの違いによる赤外吸収への影響を調べた。対象にはハロロドプシン試料を選び、タンパク質骨格の吸収を反映する amide I および amide II を観測した。その結果、厚みが 3~7 nm 程度では通常の吸収スペクトルが観測され、9~11 nm ではスペクトルに歪みが現れ、~20 nm においては正負が逆転したスペクトルを観測した。偏光子を用いた計測により、スペクトル形状の変化は s 偏光による影響であることを明らかにした (H. Guo *et al.*, *Chem. Phys.* in press)。また、光誘起構造変化を観測するため、反応中間体の寿命が 1 sec 程度と長いセンサーロドプシン2を用いた実験を行い 活性中間体形成に伴う赤外スペクトル変化の計測にも成功した。
- c) チャンネルロドプシンは、緑藻類に由来する光駆動型イオンチャンネルである。本課題は、野生型チャンネルロドプシン、ChR-1 及び ChR-2 から作成されたキメラチャンネルロドプシン (ChR-Wide Receive (ChRWR) と ChR-Fast Receive (ChRFR)) の分子機構を明らかにすることを目的とする。哺乳培養細胞で発現させた ChRWR 及び ChRFR を精製し、脂質二重膜に再構成した上で、全反射フーリエ変換赤外分光法を用いて、光定常状態での構造変化を解析した。ChRWR 及び ChRFR の赤外差スペクトルは非常によく似ているが、ChR-2 とはいくつかの点で異なることが分かった。ChR-1 部分が多く含まれるキメラタンパク質であるため、ChR-1 の構造変化は ChR-2 とは異なっていることが示唆される。
- d) 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、これまでメラノプシンがどのような分子特性を持つことで体内時計の調節を担っているのかは不明であった。前年度に解析に成功した頭索類ナメジウオのメラノプシンに加えて、今年度はマウスなど哺乳動物のメラノプシンについても哺乳培養細胞を用いて試料を大量調製することに成功した。現在各種メラノプシンについて、分子特性の類似点・相違点を生化学的・分光学的手法を用いて明らかにすることに取り組んでいる。

- e) イオンチャネルは、様々な細胞とりわけ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、個々のチャネルの特徴がどのように生み出されているのかなど、不明な点が残っている。今年度は、哺乳動物が持つ各種カリウムチャネルのうち、20種類程度について哺乳培養細胞を用いた大量発現に取り組み、その内いくつかのチャネルタンパク質について大量調製に成功した。そして調製したイオンチャネルについて、カリウム存在条件とナトリウム存在条件との赤外差吸収スペクトルを測定することに成功した。その結果 既に赤外分光解析が進んでいるカリウムチャネル KcsA の結果 (Y. Furutani *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 3806–3810 (2012)) と類似する振動バンドを見いだした。
- f) 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、また濃度依存的なゲーティング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計測した。その結果、膜貫通ドメインに存在する Mg^{2+} 結合サイト (Mg1) 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おり、またチャネルが開いた状態と閉じた状態で Mg1 サイトに存在するアスパラギン酸の配位状態が異なっていることが明らかになってきた。
- g) 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、顕微蛍光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た。現在、カルシウムと結合すると蛍光強度が増大する分子とカルシウムイオンと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、蛍光相関関数を求めることによって反応時間の規格化を行っている。今後は蛍光標識した低収量生体試料 (特に膜タンパク質) 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たい。

B-1) 学術論文

K. KATAYAMA, Y. FURUTANI, H. IMAI and H. KANDORI, “Protein-Bound Water Molecules in Primate Red- and Green-Sensitive Visual Pigments,” *Biochemistry* **51**, 1126–1133 (2012).

H. ITO, M. SUMII, A. KAWANABE, Y. FAN, Y. FURUTANI, L. S. BROWN and H. KANDORI, “Comparative FTIR Study of a New Fungal Rhodopsin,” *J. Phys. Chem. B* **116**, 11881–11889 (2012).

Y. FURUTANI, K. FUJIWARA, T. KIMURA, T. KIKUKAWA, M. DEMURA and H. KANDORI, “Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation,” *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 2964–2969 (2012).

Y. FURUTANI, H. SHIMIZU, Y. ASAI, T. FUKUDA, S. OIKI and H. KANDORI, “ATR-FTIR Spectroscopy Revealed the Different Vibrational Modes of the Selectivity Filter Interacting with K^+ and Na^+ in the Open and Collapsed Conformations of the KcsA Potassium Channel,” *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 3806–3810 (2012).

B-4) 招待講演

T. KIMURA, H. KANDORI and Y. FURUTANI, “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), January 2012.

T. KIMURA, S. DOUKI, R. ISHITANI, O. NUREKI and Y. FURUTANI, “Ion-selective mechanism of Mg²⁺ transporter MgtE studied by ATR-FTIR spectroscopy,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences, Nara (Japan), January 2012.

古谷祐詞, 「赤外分光法でイオン輸送および情報伝達にはたらく膜タンパク質の構造変化を調べる方法」『難治性疾患・統合創薬プロジェクト第9回セミナー』立命館大学, 草津, 2012年1月.

古谷祐詞, 清水啓史, 浅井祐介, 福田哲也, 老木成稔, 神取秀樹, 「全反射赤外分光法によるK⁺およびNa⁺イオン結合に伴うKcsAイオン選択フィルターの構造変化解析」『特定領域研究「高次系分子科学」第15回ミニ公開シンポジウム「イオンチャネル研究の現状とこれからについて考える」』大阪大学, 吹田, 2012年1月.

古谷祐詞, 「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」『平成23年度「若手研究者による分野間連携プロジェクト」実績報告会』分子科学研究所, 岡崎, 2012年2月.

古谷祐詞, 「膜蛋白質の構造揺らぎと機能連関の解明に資する赤外分光計測法の開発」『自然科学研究機構プロジェクト「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』合同シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, 2012年2月.

古谷祐詞, 「赤外分光法の膜タンパク質への適用～過去・現在・未来～」『分子研研究会「次世代分子科学に向けた複合研究討論会」』分子科学研究所, 岡崎, 2012年3月.

木村哲就, 「生体分子反応の実時間観察を可能にする溶液混合装置の開発と応用例」『2011年度技術課セミナー「フォトリソグラフィ技術の基礎と応用」』分子科学研究所, 岡崎, 2012年3月.

Y. FURUTANI, “Ion-Protein Interactions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy,” The 16th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, National Tsing Hua University, Hsinchu (Taiwan), April 2012.

古谷祐詞, 「タンパク質のまちがいを探し～赤外吸収差スペクトル法とは?～」『大阪市立大学理学研究科セミナーシリーズ』大阪市立大学, 大阪, 2012年4月.

Y. FURUTANI, “Ion-protein Interactions Studied by ATR-FTIR Spectroscopy,” 17th Malaysian Chemical Congress (17MCC) 2012, Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur (Malaysia), October 2012.

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).

古谷祐詞, 平成24年度分子科学研究奨励森野基金 (2012).

木村哲就, 5th International symposium on Nanomedicine, The Best Poster Award (2012).

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, 2012–2013).

日本生物物理学会分野別専門委員 (2010, 2011, 2012).

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 (2011–2012).

日本分光学会中部支部幹事 (2012).

日本生物物理学会分野別専門委員 (2012). (木村哲就)

学会の組織委員等

第15回レチナルタンパク質国際会議実行委員 (2012-2013).

学会誌編集委員

日本生物物理学会生物物理中部地区編集委員 (2007, 2010).

B-8) 大学での講義, 客員

総合研究大学院大学物理科学研究科, 「分子分光学」2012年7月11日.

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).

科研費挑戦的萌芽研究, 「哺乳動物イオンチャネルの機能的発現と分子機構解析」古谷祐詞 (2012年-2013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-2010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).

B-11) 産学連携

ノバルティス科学振興財団研究奨励金, 「部位特異的蛍光標識を用いたGタンパク質共役受容体の動的構造変化の解析」塚本寿夫 (2012年).

C) 研究活動の課題と展望

研究室を主催してから新たに開始した表面増強赤外分光計測に関する最初の論文を発表することができた(印刷中)。現在は、金薄膜に膜タンパク質を吸着させる向きをコントロールし、細胞質側と細胞外側との構造変化を選択的に検出することを試みている。また、今のところ光受容タンパク質に対して適用しているが、将来的には各種イオンチャネルなどにも適用の範囲を広げていきたい。タンパク質内部の水分子の構造変化を時分割計測する回転セルを装置開発室と共同で開発中である。水和量を極限にまで下げる必要があるため、フローセルを使うことはできない。1回の光反応で退色する試料や元の状態に戻るのに時間の掛かる試料に最適な計測系になるものと期待している。株式会社ユニソクと共同で開発した急速溶液混合装置による時分割赤外吸収計測については、進捗に遅れがあるが、来年度から本格的に実験を行う予定である。哺乳動物細胞による膜タンパク質の大量発現系が安定して稼働しており、チャンネルロドプシン、メラノプシン、哺乳動物カリウムチャネルなど様々な挑戦的な研究対象に取り組んでいる。来年度には、それぞれの実験データから機能発現機構に迫る興味深い結論が得られるものと期待している。