

## 生体分子情報研究部門

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) チャンネルロドプシンの光誘起構造変化に関する赤外分光解析
- b) 脊椎動物と無脊椎動物の「非視覚」の光受容を担うタンパク質の解析
- c) 哺乳動物カリウムイオンチャンネルタンパク質の機能制御メカニズムの解析
- d) 耐熱性ロドプシン TR が起こす光反応の分子機構，およびその特異性の解明
- e) 急速溶液交換法を用いた新規赤外分光計測系の構築
- f) ウシ由来オプシンへの匂い物質結合の赤外分光解析

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) チャンネルロドプシンは光で開閉するイオンチャンネルであり，神経細胞などでの生体電気信号を調節する光遺伝学（オプトジェネティクス）と呼ばれる研究手法で用いられている。本研究では，2種類のチャンネルロドプシン1および2の光応答特性の違いを明らかにするため，両者のキメラタンパク質の赤外分光解析を行なった。カルボン酸のプロトン化状態の変化の違いについて部位特異的の変異体を用いた解析も行なった。その結果，キメラタンパク質がチャンネルロドプシン2と異なる構造変化を起こすことや，Glu129（チャンネルロドプシン2ではGlu90）の脱プロトン化がチャンネルの脱感作にはたらいていることを示唆する結果を得た。研究成果は *J. Biol. Chem.* 誌に発表した。
- b) 多くの動物は，視覚以外にも概日時計の調節などの用途に光情報を用いている。このような「非視覚」の光受容を担うタンパク質は，視覚を担う光受容タンパク質とは異なる分子特性を持つと考えられる。今年度は，哺乳類の非視覚の光受容機能を担うメラノプシンが，自発的に光受容能を失う特性を持つことで，活動環境からの強い光入力にも細胞応答が飽和しないようにはたらくことを示唆する結果を得て，その成果を *J. Biol. Chem.* 誌に発表した。また，無脊椎動物では，脳内にエンセファロプシンという光受容タンパク質が存在し，それらが非視覚の光受容を担うと考えられている。そこで種々の無脊椎動物のエンセファロプシンの分子特性を解析し，動物種ごとに，吸収する光の波長が大きく異なることを見出した。
- c) 細胞が機能するためには，カリウムイオンを選択的に透過するイオンチャンネル（カリウムチャンネル）が重要である。カリウムチャンネルには，様々な種類のものが存在し，その中でも TWIK-1 というチャンネルは，外部環境に応じて，カリウムイオン選択性が「緩く」なる。赤外分光解析を用いて，イオン選択性を生み出す選択フィルタ部位と種々のイオンとの相互作用が，「普通」のカリウムチャンネルとは異なることを明らかにし，フィルタ部位にある2つの特異なアミノ酸残基によってもたらされるという結果を得た。また，生化学的解析から，細胞外領域のイオン出入り口付近の残基が，糖鎖修飾されていることも見出した。すなわちフィルタ部位と共に細胞外領域の糖鎖修飾が，TWIK-1 の環境依存的なイオン透過制御に関わる可能性が示唆された。
- d) Thermophilic Rhodopsin (TR) は好熱菌から発見された初めてのロドプシンであり，その熱安定性の分子機構に興味を持たれている。このTRの光反応を様々な温度で時間分解赤外分光法により調べた。その結果，TRの光反応中で起こるプロトン移動と骨格構造変化のタイミングが温度により変わることが分かり，速度定数の変化とは別に，TR

の反応機構自体が変化することを見出した。また、部位特異的変異体での結果から、プロトン移動に関わる残基の特定もできている。得られた反応中間体間の時定数の温度依存性から、各ステップにおける活性化エネルギーも決定することができた。本研究は岡山大学薬学部の須藤雄気教授、塚本卓助教との共同研究として進めている。

- e) 圧縮ガスで動作するシリンジポンプによる急速溶液交換装置の測定条件の改良を試みた。この実験系は以前に立ち上げたものであるが、溶液交換直後の赤外吸収の時間変化に反応とは関係のない物理的な要因による吸収変化が乗ってしまい、時間変化の解析の妨げになっていた。ガス圧や試料セル流路の種類を選択などでいくつかの検討を行ったところ、溶液の交換量を増加させることで上記の変化をなくすことができた。
- f) ウシ由来ロドプシンは G タンパク質共役受容体 (GPCR) と呼ばれる膜タンパク質ファミリーの 1 種であるため、同じく GPCR に属する嗅覚を司る受容体のモデルになる可能性がある。そこで発色団を排除したロドプシン(オプシン)への匂い物質の結合を全反射赤外分光法 (ATR) で調べた。その結果、匂い物質結合に伴うカルボン酸やタンパク質骨格由来の吸収変化の信号を得ることができた。また、部位特異的変異体の計測から、匂い物質結合時に相互作用するグルタミン酸残基を特定することもできた。本研究はカナダのトロント大学医学部の Oliver P. Ernst 教授、森住威文研究員との共同研究として進めている。

#### B-1) 学術論文

**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**, 11623–11634 (2015).

**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,” *Biophys. Physicobiol.* **12**, 37–45 (2015).

**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).

**H. TSUKAMOTO, Y. KUBO, D. L. FARRENS, M. KOYANAGI, A. TERAOKA and Y. FURUTANI**, “Retinal Attachment Instability is Diversified Among Mammalian Melanopsins,” *J. Biol. Chem.* **290**, 27176–27187 (2015).

**M. KOYANAGI, S. WADA, E. KAWNO-YAMASHITA, Y. HARA, S. KURAKU, S. KOSAKA, K. KAWAKAMI, S. TAMOTSU, H. TSUKAMOTO, Y. SHICHIDA and A. TERAOKA**, “Diversification of Non-Visual Photopigment Parapinopsin in Spectral Sensitivity for Diverse Pineal Functions,” *BMC Biol.* **13**, 73 (2015).

**E. KAWNO-YAMASHITA, M. KOYANAGI, S. WADA, H. TSUKAMOTO, T. NAGATA and A. TERAOKA**, “Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates,” *PLoS One* **10**, e0141280 (2015).

**K. KUROKI, K. OKAJIMA, M. IKEUCHI, S. TOKUTOMI, T. KAMIYAMA and M. TERAOKA**, “Pressure-Sensitive Reaction Yield of the TePixD Blue-Light Sensor Protein,” *J. Phys. Chem. B* **119**, 2897–2907 (2015).

#### B-3) 総説, 著書

**H. KANDORI, Y. FURUTANI and T. MURATA**, “Infrared Spectroscopic Studies on the V-ATPase,” *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1847**, 134–141 (2015).

Y. FURUTANI, “Molecular Mechanisms for Ion Transportation of Microbial Rhodopsins Studied by Light-Induced Difference FTIR Spectroscopy,” in *Optogenetics—Light-Sensing Proteins and Their Applications—*, Y. Hiromu, H. Kandori and K. Amame, Eds., 63–76 (2015).

黒井邦巧, 寺嶋正秀, 「タンパク質の反応と揺らぎ」*生物物理* 55, 235–241 (2015).

#### B-4) 招待講演

古谷祐詞, 塚本寿夫, 「赤外差分分光法によるイオンチャ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」生理学研究所, 岡崎, 2015年3月.

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, 日本大学理工学部, 船橋, 2015年3月.

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

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, Okazaki Conference Center, Okazaki (Japan), August 2015.

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, 首都大学東京, 八王子, 2015年9月.

黒井邦巧, 「光センサータンパク質 TePixD の反応過程における過渡的揺らぎ」第53回日本生物物理学会年会若手招待講演, 金沢, 2015年9月.

黒井邦巧, 「過渡回折格子法への圧力条件適用によるタンパク質の揺らぎ検出」第56回高压討論会生命科学シンポジウム, 広島, 2015年11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).

古谷祐詞, 平成24年度分子科学研究奨励森野基金 (2012).

古谷祐詞, 第6回(2013年度)分子科学会奨励賞 (2013).

古谷祐詞, 木村哲就, 岡本基土, 第1回BIOPHYSICS Editor’s Choice Award (2014).

塚本寿夫, 平成24年度日本生物物理学会中部支部講演会優秀発表者 (2013).

#### 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), 理事 (2015–2016).

日本生物物理学会分野別専門委員 (2010, 2011, 2012, 2013, 2015).

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, 2013–2014).

分子科学会顕彰委員会委員 (2014–2015).

日本分光学会中部支部幹事 (2012–2015).

## 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(2012–2014), 座長(2014).

## 学会誌編集委員

日本生物物理学会中部地区編集委員(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, 「構造生体分子科学」2015年12月3日–4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).

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物理・化学刺激によるゲート開閉の分子機構解明」古谷祐詞(2013年).

科研費挑戦的萌芽研究, 「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」古谷祐詞(2014年–2016年).

科研費若手研究(A)「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」古谷祐詞(2014年–2017年).

総合研究大学院大学学融合推進センター公募型研究事業事業枠II「学融合共同研究」動物が「見えない光」を受容するメカニズム——化学と生理学を融合したアプローチ——」古谷祐詞(2015年–2016年).

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).

科研費若手研究(B),「哺乳動物が環境光を感知するためのメラノプシンの分子特性の解明」塚本寿夫(2013年-2014年).  
上原記念生命科学財団研究奨励金,「メラノプシンを用いたカルシウムシグナリングの光制御」塚本寿夫(2015年).  
科研費研究活動スタート支援,「温度圧力条件下の赤外分光法による耐熱性ロドプシンの光反応機構の解明」黒井邦巧(2015年-2016年).

C) 研究活動の課題と展望

昨年度に引き続き,様々な共同研究の成果を論文として発表することができた。塚本助教が中心となって進めていたメラノプシンの研究成果を発表し,プレスリリースも行なった。ほ乳動物イオンチャネルについても論文にまとめるべく研究を継続している。2015年4月から黒井博士がIMS フェローとしてグループに加わり,圧力という新たな軸を時間分解赤外分光計測に導入することで,タンパク質の動的な構造変化における圧力効果を解明することを目指している。具体的には耐熱性ロドプシン(TR)を研究対象とし,ダイヤモンドアンビルセル,加圧装置を導入して,TRの光反応を様々な圧力および温度条件下で測定し,TRの反応機構や構造安定性を熱力学的に検討していく予定である。また,オプシンへの匂い物質結合研究も共同研究先と連携を取りながら成果として取りまとめる予定である。本年度,急速溶液交換装置の計測条件の最適化を行なったので,来年度からメリピオース輸送体を用いて基質の結合や解離過程に伴う構造変化の時間分解計測に再び取り組む(スペインのEsteve Padrós 教授および Víctor A. Lórenz-Fonfría 博士との共同研究)。一方,タイのチュラロンコン大からのインターンシップ生(Monpichar Srisa-Art 博士や Akkapol Suea-Ngam ら)とは,マイクロ流路と電気化学計測および分光計測を組み合わせた計測系の構築を行っており,さらに発展させることを期待している。