

赤外分光法による膜タンパク質の動作機構研究

(分子研¹, 総研大², JST さきがけ³) ○古谷 祐詞^{1,2,3}

Molecular mechanisms of membrane proteins studied by infrared spectroscopy

(Institute for Molecular Science¹, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI)², JST PRESTO³)○Yuji Furutani^{1,2,3}

【序】 細胞膜にはイオンチャネル、イオンポンプ、受容体などの様々な膜タンパク質が存在し、細胞内外における物質や情報のやり取りに活躍している。これらの膜タンパク質が動作する分子機構を明らかにするためには、X線結晶構造解析などで得られる原子レベルでの3次元構造情報だけでなく、それらが動作する過程での構造変化を明らかにする必要がある。赤外分光法は分子の振動に基づく赤外吸収スペクトルにより、分子の構造や周辺環境に関する情報が得られる手法である。タンパク質の赤外吸収スペクトルから α -ヘリックスや β -シートなど二次構造に関する情報が得られる。さらに、光や電位などの物理的刺激やタンパク質に結合する化合物などの化学的刺激を与え、刺激前後の差スペクトルを計算することで、タンパク質の主鎖や側鎖の構造変化を明らかにすることが可能である。本講演では、赤外分光法を用いて様々な膜タンパク質の動作機構の解明にどのように取り組んできたのかを紹介する。

1. 光受容タンパク質ロドプシン

ロドプシンなどの光受容タンパク質に対しては、パルスレーザー等の光を用いることで、フェムト秒から分に至る様々な時間領域での構造変化が様々な分光学的手法により明らかにされてきた。また、液体窒素温度等の低温下においても、光照射により反応を開始できるため、様々な中間体を安定化することで詳細な解析を行うことも可能である。これまで光誘起の赤外差分分光法を駆使することにより、バクテリオロドプシンなどのプロトンポンプ機構において、水分子が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた[1]。また、塩化物イオンポンプであるハロロドプシンに対する時間分解赤外分光計測を行い、イオン輸送過程での水分子のO-H伸縮振動のダイナミクスを観測することに成功した[2]。その結果、水素結合を形成していないフリーなO-H基を持つ水分子がイオンの放出と取り込みの過程で大きく変化していることを明らかにした。疎水的なタンパク質内部の環境でイオンが出入りする際に水分子もその安定化に寄与していることを示唆する結果である。

2. ATP駆動型ナトリウムポンプ (V型ATPase)

V型ATPaseは分子量70万以上の巨大膜タンパク質複合体であり、ATPの加水分解エネルギーを利用して、 Na^+ を輸送する。V型ATPaseの Na^+ や Li^+ の結合に伴う赤外差スペクトルを計測し、 Na^+ 結合部位に関する詳細な構造情報を得た。このことにより、 Na^+ が疎水的な環境下で安定化さ

れるために Glu139 が脱プロトン化して正電荷を中和していることを明らかにした[3]。

3. カリウムイオンチャネル (KcsA)

カリウムイオンチャネル KcsA を、 K^+ もしくは Na^+ を含む緩衝液に浸し、その赤外差スペクトルを計測した。タンパク質主鎖のカルボニル基によるアミド I バンドの領域にバンドが複数観測され、それらがイオン選択フィルターに由来することを明らかにした[4]。また、 K^+ 存在下では振動数が高く、 Na^+ 存在下では低いことから、 K^+ の方がカルボニル基と弱い相互作用をしていることが示唆された。おそらく K^+ はカルボニル基によって八配位された構造にあるために振動数が高くなり、 Na^+ は四配位された構造であるために低くなっているものと考えられる。また、カリウムイオン濃度を変化させ、アミド I バンドの強度変化からイオン選択フィルターにおけるカリウムイオンの解離定数を求め、振動数の異なる二種類のアミド I バンドから 9 mM および 18 mM の値を得た。このことからイオン選択フィルターの部位によってカリウムイオンとの親和性が異なることが示唆された。

4. 高速溶液交換装置による時間分解赤外分光計測

イオンチャネル、輸送体、受容体などでは、基質やイオンなどの結合に伴う構造変化を解析する手法が求められている。ストップフロー法を改良することで、ATR 結晶上の溶液を高速に置換する高速溶液交換装置を開発した。ステップスキャン法による時間分解全反射赤外分光計測を適用することで、硝酸イオンや塩化物イオンがハロロドプシンに結合する過程をミリ秒の時間分解能で計測することに成功した[5]。計測には $\sim 1 \mu\text{g}$ 程度の試料しか必要とせず、様々なイオンチャネルや輸送体、受容体などの構造変化解析にも有効と思われる。

【謝辞】本研究では様々な共同研究者の協力の下で行われました。特に、名古屋工業大学の神取秀樹教授、岡山大学薬学部の須藤雄気教授、理化学研究所の木村哲就博士、北海道大学大学院理学研究院の出村誠教授、菊川峰志講師、福井大学医学部の老木成稔教授、清水啓史講師、千葉大学大学院理学研究科の村田武士准教授に感謝いたします。

【参考文献】

1. Y. Furutani, M. Shibata and H. Kandori, “Strongly Hydrogen-Bonded Water Molecules in the Schiff Base Region of Rhodopsins”, *Photochem. Photobiol. Sci.* **4**, 661-6 (2005)
2. Y. Furutani, K. Fujiwara, T. Kimura; T. Kikukawa, M. Demura, H. Kandori, “Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation”, *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 2964-9 (2012)
3. 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**, 2860-3 (2011)
4. 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**, 3806-10 (2012)
5. Y. Furutani, T. Kimura, and K. Okamoto, “Development of a Rapid Buffer-Exchange System for Time-Resolved ATR-FTIR Spectroscopy with the Step-Scan Mode”, *BIOPHYSICS* **9**, 123-129 (2013) (第 1 回 BIOPHYSICS Editors' Choice Award)