

# 研究報告書

## 「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」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 古谷 祐詞

### 1. 研究のねらい

光エネルギーを有効に利用する系として、自然界においては植物の光合成や微生物型ロドプシン類の光駆動イオン輸送と共役した ATP 合成、人工系としては二酸化チタンや遷移金属錯体による光触媒などがある。これらに共通することとして、系に含まれる水分子の光化学反応への様々な形での関わりがある。代表的には、基質として酸化・還元されることや、プロトンやイオンの移動を効率的に行うための水素結合ネットワークの形成に関与するなどが挙げられる。本研究では、これらの光エネルギー変換系における水分子の構造変化とその機能発現との関係を明らかにするために、新規赤外分光計測法の開発を行う。具体的には、光受容タンパク質の光照射に伴うタンパク質の構造変化や内部の水分子の動態を光誘起赤外差分分光計測によって明らかにする。さらには、高度に配向した試料を作製し、時間分解偏光赤外分光法を適用する。反応に関与する水分子の OH(重水では OD)伸縮振動の振動数とその遷移双極子モーメントの角度の時間変化を得ることで、光化学反応の進行に伴って時々刻々と変化する水分子の構造を解析し、その機能との関係を明らかにする。それにより光触媒および光受容タンパク質において、水分子が関与する光化学反応の高効率化に必要な分子構造設計への指針を提供する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光駆動イオンポンプとしてはたらく膜タンパク質であるバクテリオロドプシンやハロロドプシンは、光受容部位としてレチナルを結合している。all-trans 型から 13-cis 型への光異性化により、タンパク質の構造が変化し、一連の中間状態を経由して、もとに戻る光反応サイクルを示す。このサイクル中に、プロトンや塩化物イオンを一方向に細胞膜の内外へと輸送する。これにより、細胞膜には電気化学勾配が形成され、この電気化学ポテンシャルを利用して、ATP 合成酵素が ADP を ATP へと変換し、生体エネルギーとして利用されている。このようにバクテリオロドプシンおよびハロロドプシンに代表される微生物型ロドプシンは生物のイオンポンプのモデルとしての研究対象として最適である。

本研究では、時間分解赤外分光法により、これらのタンパク質の構造変化や内部の水分子の動態を実時間で捉えることに成功した。さらに、タンパク質や水分子の振動モードの振動数変化だけでなく、それらの角度変化についての情報を得るため、時間分解偏光赤外分光計測系を構築した。また、タンパク質や有機分子の金薄膜表面での表面増強赤外吸収スペクトルを計測するのに最適な金薄膜の作製を、真空蒸着法により簡便に行う方法を確立した。

## (2) 詳細

本さがけ研究では、主に時間分解偏光赤外分光計測系を構築して、様々な光エネルギー変換系での水分子の変化を捉えることを目標とした。当初の目標であったバクテリオロドプシンについては計測を実現した。また、偏光計測にまでは至らなかったが、ハロロドプシンや新規微生物型ロドプシンMRのタンパク質構造の変化についても時間分解赤外分光計測に成功した(Y. Furutani et al. J. Phys. Chem. Lett. 2012、Y. Furutani et al. J. Phys. Chem. B 2013)。

### 研究テーマ「時間分解偏光赤外分光計測系の構築」

時間分解偏光赤外分光計測では、測定光の赤外光として、試料の回転軸に対して垂直(S)もしくは平行(P)な偏光を入射し、試料の回転角度に依存した時間分解赤外差スペクトルを計測する。これにより水分子のOH(もしくはOD)伸縮振動の振動数だけでなく遷移双極子モーメントの角度の変化も解析することが可能になる。

光駆動プロトンポンプとしてはたらくバクテリオロドプシンは天然状態で二次元結晶を形成しており、赤外用基板上で乾燥させるだけで配向した試料を得ることができる。このような試料をZ軸回転試料台に設置し、PおよびS偏光させた赤外測定光により角度依存性的な計測を行った。理想的な配向試料においては、赤外基板の法線方向は膜タンパク質が存在する脂質二重膜平面の法線と一致しており、P偏光させた赤外線を用いて赤外吸収スペクトルを計測すると、タンパク質骨格のamide Iおよびamide IIバンドに顕著な角度依存性が現れる。バクテリオロドプシンは $\alpha$ ヘリックスが7回膜を貫通した構造であり、それぞれの

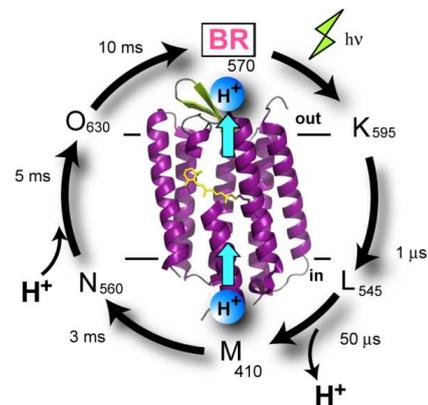


図1 バクテリオロドプシン

$\alpha$ ヘリックスはほぼ膜法線方向に沿って配置されている(図1)。amide Iモードは主鎖のC=O基の伸縮振動によるものであり、 $\alpha$ ヘリックスにおいてはヘリックスの方向と一致した方向に伸縮振動する。一方、amide IIモードはN-H基の変角振動によるものであり、膜法線とは直角方向に振動する。このようなことから、高度に配向したバクテリオロドプシン試料を用いると、P偏光の赤外線において、試料の角度が0°であるときには、amide Iよりもamide IIの方が少し強度が大きくなるほどである。試料の角度が大きくなるとamide Iの強度が増大し、amide IIは減少することになる。一方、S偏光させた赤外線では吸収強度にはほとんど変化が現れない(図2)。本装置で計測した結果、バクテリオロドプシンのamide Iモードは平均して膜法線に対して32°、amide IIは67°傾いていると見積もられた。

フーリエ変換赤外分光装置に回転試料台を設置し、バクテリオロドプシンの配向試料の赤外吸収スペクトルに現れるamide Iおよびamide IIバンドの角度依存性を確認し、さらには光誘起時間分解赤外分光計測で得られる時分割赤外差スペクトルの角度依存性を計測することに成功した(未発表)。

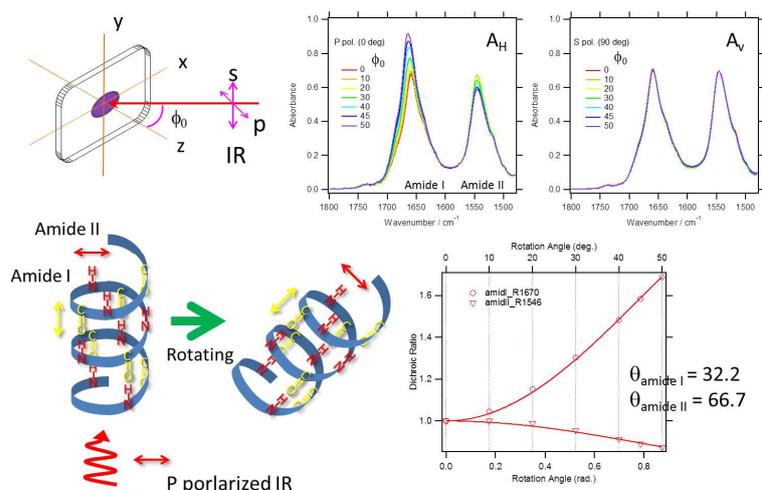


図2 バクテリオロドプシン試料に対する偏光赤外スペクトル解析

#### 研究テーマ「光受容蛋白質の配向試料調製法の確立」

赤外分光法で光反応に関与する水分子の構造情報を得るには、系に含まれる余分な水分をできるだけ必要最小限に抑える必要がある。現在、ロドプシンで適用されている方法は、リポソーム再構成試料を乾燥させてフィルム化し、計測時に適度に水和させる手法である。フィルム試料を密封させる際に近傍に水滴を置くという単純な方法であるが、水滴に10~30%程度のグリセロールを含ませることで飽和水蒸気圧を調節し、最適な水和量とすることが可能であることが知られている。本研究でも、バクテリオロドプシンやハロロドプシンについて、同様の水和条件において、タンパク質内部の水分子のO-H伸縮振動が計測可能であることを確認した。

また、振動モードの角度情報を得るには試料を配向させる必要がある。バクテリオロドプシンは、脂質二重膜中に二次元結晶として存在する膜タンパク質であり、懸濁液を乾燥させるだけで配向したフィルム試料が得られる特異な試料である。おそらく二次元結晶が積層するために配向性が得られるものと考えられる。しかしながら、ハロロドプシンについて、配向した試料を作製するために、透析やバイオビーズなどを用いてリポソームへの再構成条件を検討したが、研究期間内に配向試料を得ることはできなかった。

一方、ハロロドプシンを金薄膜表面へと固定して、表面増強赤外吸収スペクトルを計測する条件の確立には成功した。表面増強赤外分光法はナノサイズの縞状構造をもつ金薄膜表面において、赤外吸収が10~1000倍程度増強する効果を利用する手法である。金表面の法線方向に振動する振動モードが選択的に増強するため、振動モードの角度情報を得ることも可能である。本研究では、真空蒸着装置にて金薄膜の膜厚を調節することで、簡便に膜タンパク質の赤外吸収スペクトルが計測できる条件を確立した(H. Guo et al. Chem. Phys. 2013)。

#### 研究テーマ「光触媒系への発展」

時間分解赤外分光法を光触媒系へと適用することで、水分子がどのようにして光酸化・還元されるのか、触媒中の水分子がどのような構造であるのかが解明され、触媒の設計に有用

な情報を与えることが期待される。

さきがけ領域内での共同研究を通じて、時間分解赤外分光計測により、水分子の O-H 伸縮振動の変化を捉えることを試みたが、非常に微弱な信号のために有意な結果は得られなかった。

本さきがけ研究期間中に論文発表した研究成果の概要

- 1, Yuji Furutani, Kuniyo Fujiwara, Tetsunari Kimura, Takashi Kikukawa, Makoto Demura and Hideki Kandori, “Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation”, *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 2964–9, 2012

ハロロドプシンは光エネルギーを利用して塩化物イオンを輸送する膜タンパク質である。光受容部位としてレチナールを結合しており、その光異性化によってタンパク質の構造が変化し、一連の光反応中間体を形成することで、一方向のイオン輸送を実現している。本論文では、時間分解赤外分光法を適用することで、タンパク質の構造変化だけでなく、内部の水分子の変化も捉えることに成功した。特にイオン輸送に重要な中間体形成に伴って、水素結合を形成していない水分子の変化が大きくなることを見だし、その機能発現との関連に興味を持たれる結果であった。

- 2, Yuji Furutani, Takashi Okitsu, Louisa Reissig, Misao Mizuno, Michio Homma, Akimori Wada, Yasuhisa Mizutani, and Yuki Sudo, “Large Spectral Change Due to Amide Modes of a  $\beta$ -Sheet upon the Formation of an Early Photointermediate of Middle Rhodopsin”, *J. Phys. Chem. B*, 117 (13), 3449–58, 2013

新規の微生物型ロドプシンであるミドルロドプシン(MR)は、微生物型ロドプシンが通常結合している all-*trans* 型レチナールだけでなく、11-*cis* 型のレチナールも結合することが可能なため、その機能や光反応機構に興味を持たれている。本論文では、時間分解赤外分光計測を適用し、光誘起の構造変化に  $\beta$  シート領域の変化も含まれることを明らかにした。このような構造変化はこれまでの微生物型ロドプシンでは見られたことのない変化であり、MR がイオン輸送とも光情報変換とも異なる機能を果たしている可能性を示唆する結果であった。

- 3, Hao Guo, Tetsunari Kimura, Yuji Furutani, “Distortion of the Amide-I and -II Bands of an  $\alpha$ -helical Membrane Protein, *pharaonis* Halorhodopsin, Depends on Thickness of Gold Films Utilized for Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy”, *Chem. Phys.* 419, 8–16, 2013

表面増強赤外分光計測は、ナノサイズの微細な金粒子からなる薄膜上において、赤外吸収強度が著しく増強する効果を利用した計測法である。本論文では、真空蒸着法により金薄膜を形成し、その厚みに応じて、表面に吸着させた膜タンパク質(ハロロドプシン)の赤外吸収スペクトルに歪みが生じる効果について検討を行った。その結果、金薄膜の厚みを 7–11 nm

程度と制御することで、適切な計測が行えることを明らかにした。

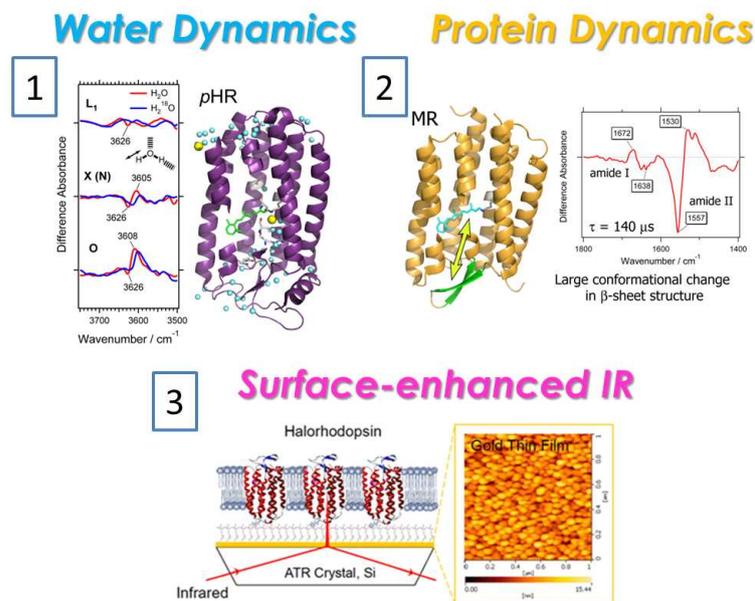


図3 本さがけ研究期間中に論文発表に至った研究成果の概要

- [1] ハロロドプシンのイオン輸送過程での水分子の動態解明 (Y. Furutani et al. J. Phys. Chem. Lett. 2012)
- [2] 新規微生物型ロドプシン MR の光誘起タンパク質構造変化の解明 (Y. Furutani et al. J. Phys. Chem. B 2013)
- [3] ハロロドプシンの表面増強赤外分光計測条件の確立 (H. Guo et al. Chem. Phys. 2013)

### 3. 今後の展開

生物が光エネルギーをどのようにして、効率的に化学的なエネルギーへと変換しているのかを明らかにするためには、X線結晶構造解析による構造情報だけでなく、より精密な構造情報を与える分光学的な手法の開発が重要である。時間分解偏光赤外分光法は、光誘起によるタンパク質や水分子の振動状態や角度変化を時分割で解析することが可能であるため、様々な光反応系に適用されることが期待される。そのためには高い配向性を持った試料の作製方法の確立が鍵になると思われる。また、表面増強赤外分光法など、振動モードの選択性のある計測法との組み合わせも有望である。

### 4. 評価

- (1) 自己評価  
 (研究者)

時間分解偏光赤外分光計測系の構築については、当初の予定通り、達成できたと考えている。バクテリオロドプシンに対して、本手法を適用し、タンパク質や水分子の赤外スペクトル変

化を計測することに成功した。一方、配向試料の作成方法の確立については、バクテリオロドプシンと近縁であるハロロドプシンについても困難であった。しかしながら、基板表面にタンパク質を配向する手法として、表面増強赤外分光法に適した金薄膜の蒸着条件が確立できた。また、ハロロドプシンのイオン輸送過程で水分子の動態が追跡できたことも大きな成果と考えている。さらに、さきがけ領域会議の中で新たに設定したテーマである光化学系 II の水の解析についても、必要な装置の開発を進め、既存の方法に比べて効率の良い計測が行えたことは、より詳細な解析を効率よく行うのに重要な進歩であると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

天然の光合成では、水を原料とした酸化還元系が光で駆動される。重要な反応系は基本的にタンパク質が形成する構造体の中に埋め込まれているので、基質となる水分子はタンパク質の構造環境の中で、水のチャンネル構造を通じて反応中心に供給されると推定される。また光駆動による酸化還元に伴い、プロトン放出・移動・プロトン濃度勾配などが誘起され後続の化学過程を導いている。バクテリオロドプシンやハロロドプシンにおけるプロトン移動やイオン移動なども光駆動によるイオンポンプの典型例として極めて重要な研究対象であり、「自然に学び・理解する」視点は人工光合成構築の基本的設計指針の吟味に資するところが極めて大きい。古谷博士は、このようなタンパク質の構造環境中での光駆動によるイオンポンプなどの典型例についてタンパク質の構造変化やそれに伴う水分子の配向変化や水素結合の変化など結合振動構造を時間分解スペクトルとして直接観測しようとする意欲的な研究提案を行い、採択された。研究開始後、極めて順調に時間分解偏光赤外分光測定系を構築しバクテリオロドプシンの構造変化、水分子の赤外吸収スペクトル変化に成功している。また、ハロロドプシンの光駆動イオン輸送についてもタンパク質内部の水分子の変化の直接観測にも成功している。金薄膜上での表面増強赤外測定系も構築できており、配向した試料が得られればタンパク質環境の変化と内部に取り込まれた水分子の動態、時間分解偏光赤外測定、直接観測を可能としている。さらに進んで、さきがけ領域内で梅名博士との共同研究により光合成の光化学系II(PSII)における水の酸化過程について時間分解偏光赤外測定によりその分子過程に切り込もうとしている。パルス光照射後、PSIIがKok サイクルと呼ばれる循環過程により一定時間後に始状態に戻った状態での回周測定という困難な測定条件を克服できる独自の回転セルを考案・作成にも成功しており、今後の展開が大いに期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yuji Furutani, Kuniyo Fujiwara, Tetsunari Kimura, Takashi Kikukawa, Makoto Demura and Hideki Kandori, "Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation", *J. Phys. Chem. Lett.* 2012, 3,

2964-2969

2. Yuji Furutani, Takashi Okitsu, Louisa Reissig, Misao Mizuno, Michio Homma, Akimori Wada, Yasuhisa Mizutani, and Yuki Sudo, "Large Spectral Change Due to Amide Modes of a  $\beta$ -Sheet upon the Formation of an Early Photointermediate of Middle Rhodopsin", *J. Phys. Chem. B*, 2013, 117 (13), 3449-3458
3. Hao Guo, Tetsunari Kimura, Yuji Furutani, "Distortion of the Amide-I and -II Bands of an  $\alpha$ -helical Membrane Protein, *pharaonis* Halorhodopsin, Depends on Thickness of Gold Films Utilized for Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy", *Chem. Phys.* 419, 8-16, 2013

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

(招待講演)

1. Yuji Furutani, "Water Molecules and Ions in Membrane Proteins Studied by FTIR Spectroscopy", The 5<sup>th</sup> International Conference as the 2012 OCARINA Annual International Meeting, Mar. 4, 2013, Osaka City Univ. Media Center, Osaka, Japan
2. Yuji Furutani, "Water Molecules and Ions in Membrane Proteins Studied by Stimulus-induced Difference FTIR Spectroscopy", Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Aug. 25-30, Kobe Convention Center, Kobe, Japan
3. Yuji Furutani, "Water Molecules and Ions in Membrane Proteins Studied by FTIR Spectroscopy", Annual Meeting on Photochemistry 2013, Sep. 11-13, 2013, Ehime University, Matsuyama, Japan
4. Yuji Furutani, "Protein-ion interactions of membrane proteins studied by Fourier-transform infrared spectroscopy", 18th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, May 19-21, 2014, Busan, Republic of Korea
5. 古谷祐詞、「赤外分光法による膜タンパク質の動作機構研究」、第8回分子科学討論会 奨励賞受賞講演、2014年9月24日、東広島(広島大学)
6. Yuji Furutani, "Structural Changes of Membrane Proteins Studied by Difference FTIR Spectroscopy; Microbial Rhodopsins and Potassium Ion Channels", 16th International Conference on Retinal Proteins, Oct. 5-10, 2014, Nagahama Royal Hotel, Nagahama, Japan.

(一般講演)

1. 古谷祐詞、Victor A. Lorenz-Fonfria、神取秀樹、「時間分解赤外分光法によるバクテリアオロドプシンのX-D伸縮振動の解析」、第4回分子科学討論会、2010年9月14-17日、豊中(大阪大学)

(ポスター発表)

1. Yuji Furutani, Victor A. Lorenz-Fonfria and Hideki Kandori, "Time-resolved FT-IR measurement of X-D stretching vibrations of Bacteriorhodopsin in micro- to millisecond time range", The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sep. 20-22, 2010, Sendai (Tohoku University).

2. Yuji Furutani, "Time-resolved polarized FT-IR spectroscopy on light-driven proton pumping protein, bacteriorhodopsin", JST-PRESTO International Joint Symposium on Photo-Science Leading to a Sustainable Society: Environment, Energy, Functional Materials, Mar. 27th, 2012, Keio University, Yokohama.
3. Yuji Furutani, Victor Lorenz-Fonfria and Hideki Kandori, "Water hydrogen-bonding dynamics in the function of bacteriorhodopsin studied by time-resolved FTIR spectroscopy", 15<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, Sep. 30-Oct. 5, 2012, Monte Verità, Ascona, Switzerland
4. Yuji Furutani, Hao Guo, Tetsunari Kimura, "Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy for Evaluation of Orientation Control of a Membrane Protein", JST さきがけ「光エネルギーと物質変換」研究領域第2期・第3期採択研究者研究発表会「人工光合成研究の最前線:挑戦する若手研究者」, 2013年3月23日、草津(立命館大学びわこ・くさつキャンパス)
5. Yuji Furutani and Kuniyo Fujiwara, "Dynamics of water molecules in light-driven ion pump proteins studied via Time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy", 2014 International Conference on Artificial Photosynthesis (ICARP2014), Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji City, Hyogo, Japan.

#### 受賞

1. 平成24年度分子科学研究奨励森野基金  
「赤外分光法による膜タンパク質の情報伝達・エネルギー変換およびタンパク質機能を模倣した特異的ナノ反応場の分子機構研究」
2. 第6回(2013年度)分子科学会奨励賞  
「赤外分光法による膜タンパク質の動作機構の解明」

#### 著作物

1. 古谷祐詞 「微生物型ロドプシンの光誘起イオン輸送メカニズムの解明」, オプトジェネティクスー光光学と遺伝学による行動制御技術の最前線ー(NTS), 69-78, 2013
2. Yuji Furutani and Hideki Kandori, "Hydrogen-bonding changes of internal water molecules upon the actions of microbial rhodopsins studied by FTIR spectroscopy", *Biochim. Biophys. Acta* 1837 (5), 598-605 (2014)
3. 古谷祐詞 「赤外分光法による膜タンパク質の分子機構研究」, *Molecular Science* 8, A0067

#### プレスリリース

1. 「イオン輸送タンパク質内部で“ぶらぶら”した水分子の動きを赤外線で解明」(2012年10月)  
[https://www.ims.ac.jp/news/2012/10/09\\_1303.html](https://www.ims.ac.jp/news/2012/10/09_1303.html)