

バイオスーパーコンピューティング名古屋2015
平成27年1月22日 名古屋

光応答性タンパク質の実験研究者が 計算科学に期待すること

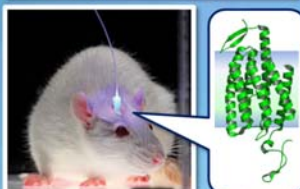
神取 秀樹

(名古屋工業大学 大学院工学研究科 未来材料創成工学専攻
& オプトバイオテクノロジー研究センター)

生物は光をどのように利用しているか？

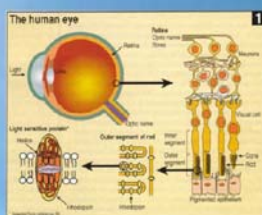
神取研究室

光はいのちの源
Light is mother of life



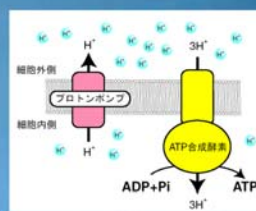
最先端バイオ
テクノロジー

光は生物の中で情報やエネルギーになる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質



高等動物のロドプシン
視覚のセンサー

→ 医療



微生物のロドプシン
イオンポンプ

→ エネルギー

生命現象の不思議を光を使って解明する

☆ヒトはどうやって色を見分けているの？

☆濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？

☆傷ついたDNAをどうやって直すの？

生物は光をどのように利用しているか？

発表内容

光は生物の中で情報やエネルギーになる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質

光ははじめに: 計算科学への期待
Light is mother of life

- 1) 色を見分けるしくみ
- 2) 光駆動プロトンポンプのしくみ
- 3) 様々なイオン輸送性ロドプシン

まとめ: 計算科学への期待

最先端バイオテクノロジー

高等動物のロドプシン → 医療
微生物のロドプシン → エネルギー

★ヒトはどうやって色を見分けているの？
★濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？
★傷ついたDNAをどうやって直すの？

生物は光をどのように利用しているか？

はじめに: 計算科学への期待

光は生物の中で情報やエネルギーになる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質

私たちは、ロドプシンなど光応答性タンパク質が
光を吸収するとなぜ機能を発現できるのか
という問題に対して、
分光光学を中心とした実験研究により挑み続けている。
計算科学には大きな期待がある一方、
「ロドプシンについて理論家の言うことは
信用しなくていいから」と
いつも学生に言っていることも事実である。
計算科学の大いなる発展の中、
このような実験研究者の立場から話題提供したい。

★傷ついたDNAをどうやって直すの？

視覚の化学 神取秀樹

Chemistry & Industry (London) 1995

The chemistry of vision: turning light into sight

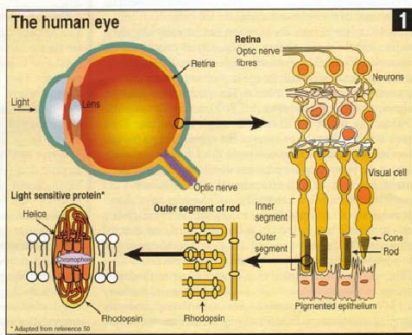
HIDEKI KANDORI

Behind our sight lies a rapid chemical reaction, but how exactly does a group of cells lining the eye turn light into colour vision?

Various senses, vision is the most important. The eye is the primary transducer to our visual world. Light focused by the lens onto the retina is detected by light sensitive cells (see Figure 1). There are two types of these cells: rods, which are designed for night vision, and cones, which are designed for day vision and colour. Thus, the owl, whose visual needs are for night vision, has a vast number of rods, while the human, who needs vision for day, has a vast number of cones, and, in the owl's case, no cones.

Cells contain photoreceptor proteins. Excitation involves a chemical reaction occurring in these photoreceptor cells in the eye and in the brain (see Figure 1). When the signal reaches the brain, the signal is processed in the visual cortex.

Cells contain photoreceptor proteins. Excitation involves a chemical reaction occurring in these photoreceptor cells in the eye and in the brain (see Figure 1). When the signal reaches the brain, the signal is processed in the visual cortex.



Cells contain photoreceptor proteins. Excitation involves a chemical reaction occurring in these photoreceptor cells in the eye and in the brain (see Figure 1). When the signal reaches the brain, the signal is processed in the visual cortex.

我々の視覚には
明暗視と色覚がある



明暗視には1種類の光センサー
(ロドプシン=視紅)がはたらく

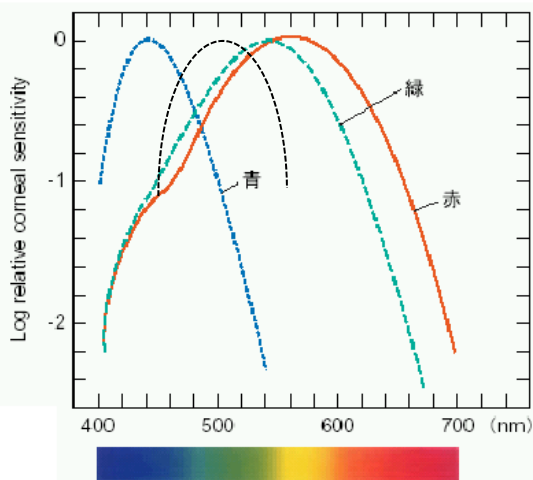


色覚には3種類の光センサー
がはたらく

視覚の化学 神取秀樹

Chemistry & Industry (London) 1995

The chemistry of vision: turning light into sight



我々の視覚には
明暗視と色覚がある

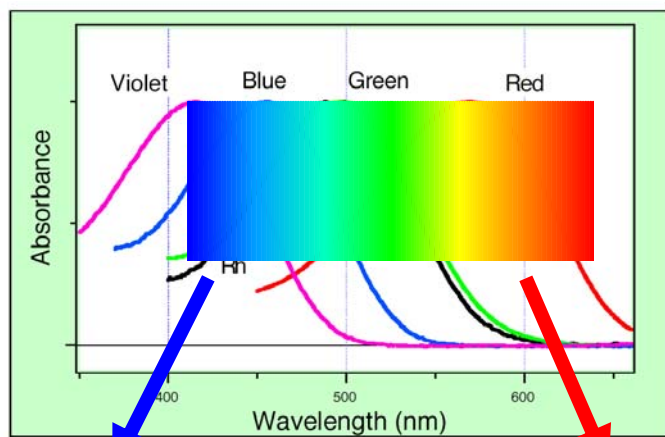


明暗視には1種類の光センサー
(ロドプシン=視紅)がはたらく



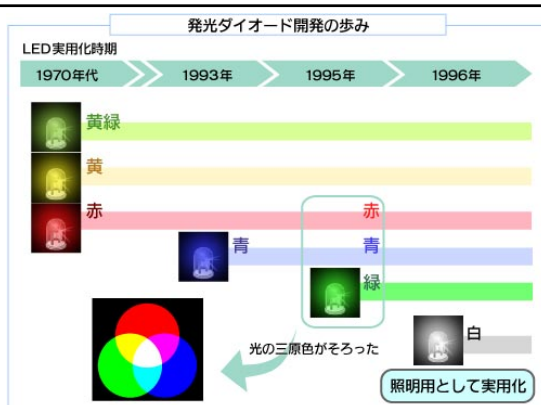
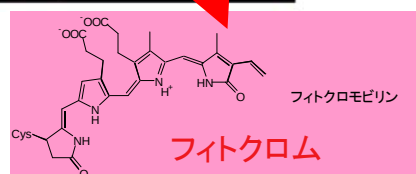
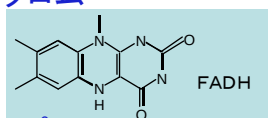
色覚には3種類の光センサー
がはたらく

視覚の不思議: 植物は別々の発色団により青色と赤色を感知する



クリプトクロム

フォトトロピン



発光ダイオードも
別々の材料により
異なった色を出す

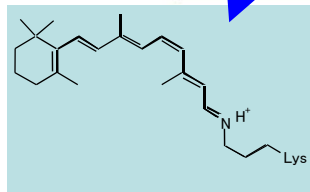
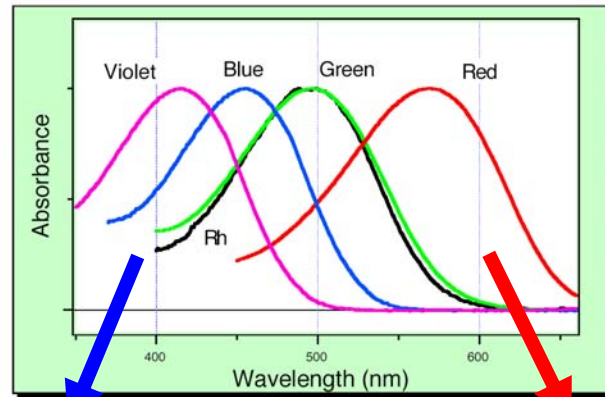


窒化ガリウム
(GaN) - 青

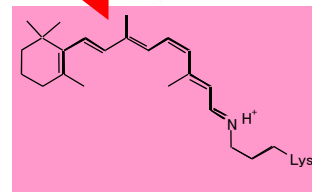
アルミニウムインジウムガリウムリン
(AlGaInP) - 黄

ガリウムヒ素リン
(GaAsP) - 赤

視覚の不思議:我々は単一の発色団により色を認識できる

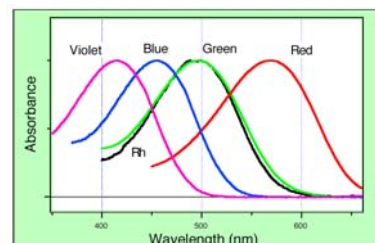
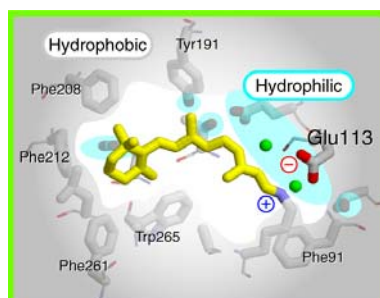


レチナールを囲む
蛋白質部分が
色を決める



**「ロドプシンについて理論家の言うことは信用なくていいから」
と私が学生に言う理由**

明暗視のロドプシンは 2000年に
結晶構造が解明されたが
色覚視物質の構造は皆無



ロドプシンの結晶構造からホモロジーモデリング+電子状態計算で
赤、緑や青視物質の吸収を再現したという計算科学の論文は
たくさんある(= **答えのわかっている問題を正しく解いた**)。

生物は光をどのように利用しているか？

発表内容 光は生物の中で情報やエネルギーになる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質

神取研究室

光ははじめに: 計算科学への期待
Light is mother of life

1) 色を見分けるしくみ

2) 光駆動プロトンポンプのしくみ

3) 様々なイオン輸送性ロドプシン

まとめ: 計算科学への期待

最先端バイオテクノロジー

高等動物のロドプシン → 医療
微生物のロドプシン → エネルギー

細胞外側
細胞内側
プロトンポンプ
ATP合成酵素
ADP+Pi
ATP

組織を光を使って解明する
☆ヒトはどうやって色を見分けているの？
☆濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？
☆傷ついたDNAをどうやって直すの？

色覚視物質研究における3つの困難さ

ウシの目玉 100 個から 100 mg のロドプシンが得られる一方、
ウシは色覚視物質を発現しない。
培養細胞を用いた発現も行われているが、
培養皿 100 枚から 0.1 mg の赤視物質、0.01 mg の青視物質しか得られない。

(1) 試料調製の困難さ、(2) 退色の問題、(3) 構造解析手法の問題



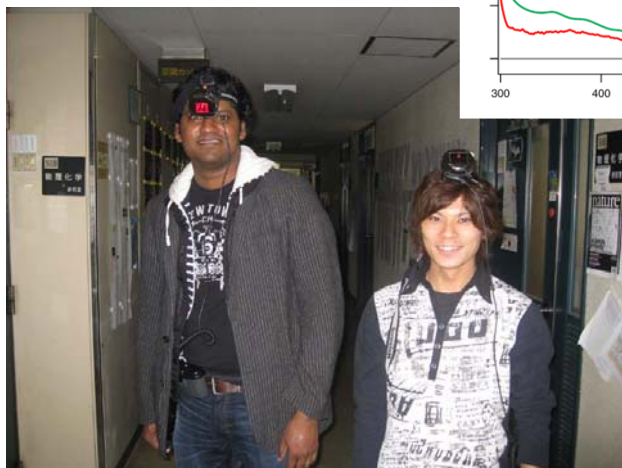
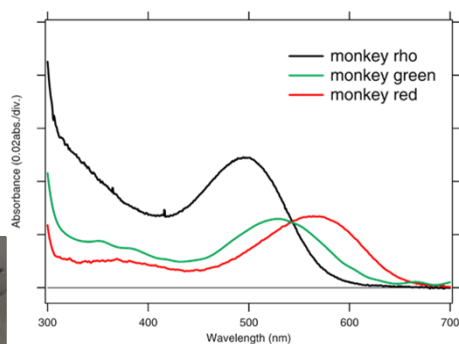
明暗視のロドプシンは原子レベルでの解析が進んでいる



色覚視物質の構造研究はほとんど進んでいない

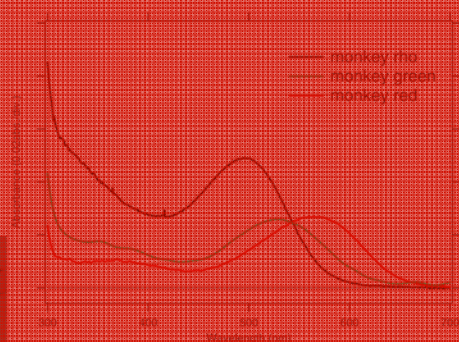
視物質研究の問題点: 光退色

ロドプシンの実験には
赤ランプを使う

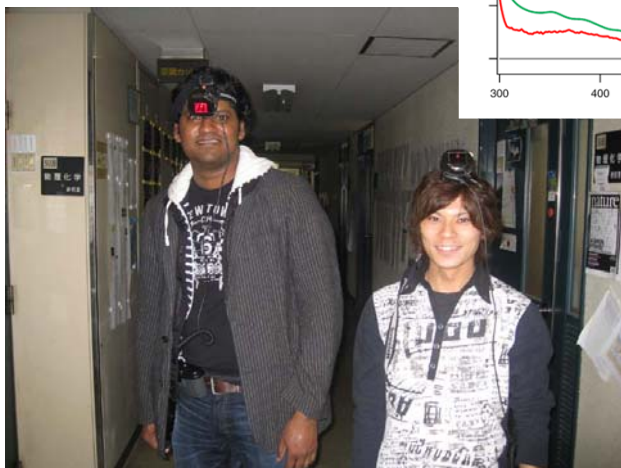
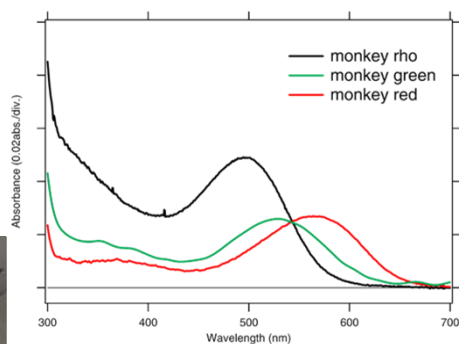


視物質研究の問題点: 光退色

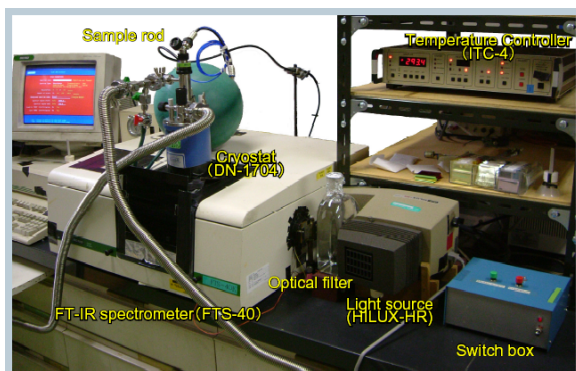
ロドプシンの実験には
赤ランプを使う



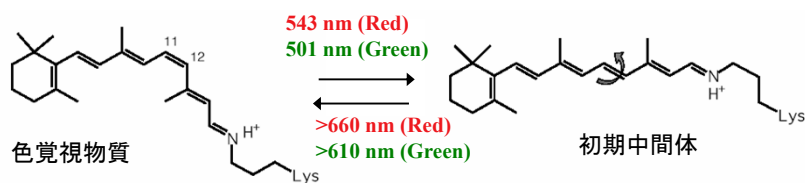
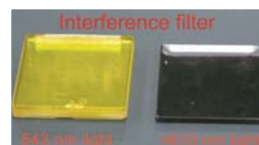
赤感受性タンパク質の
実験には
赤ランプは使えない



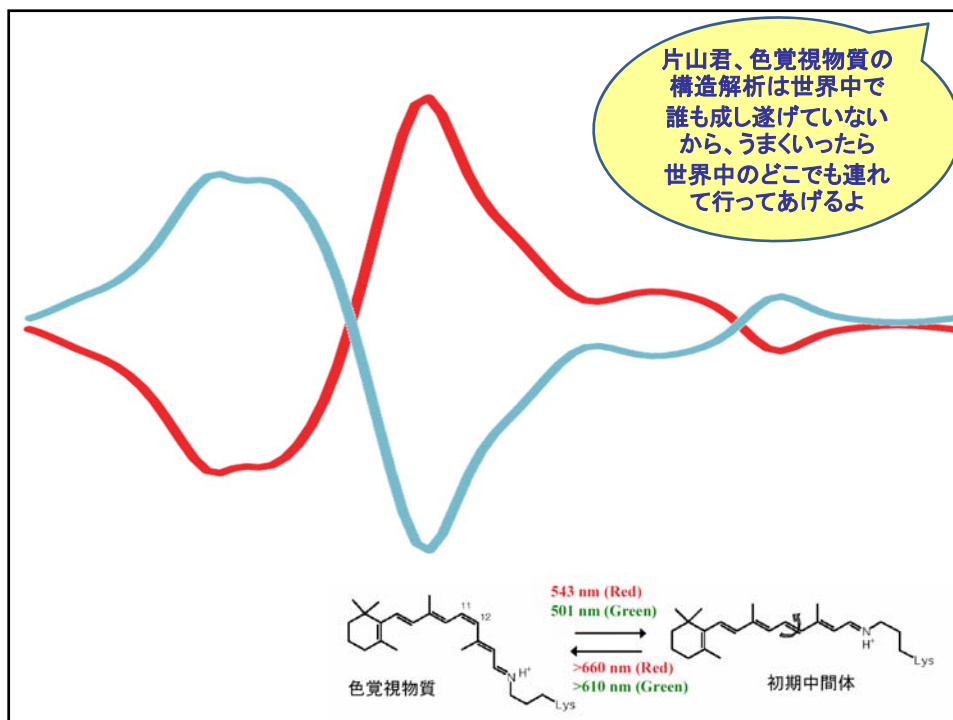
限られた試料に対する構造解析: エレガントな低温赤外分光計測

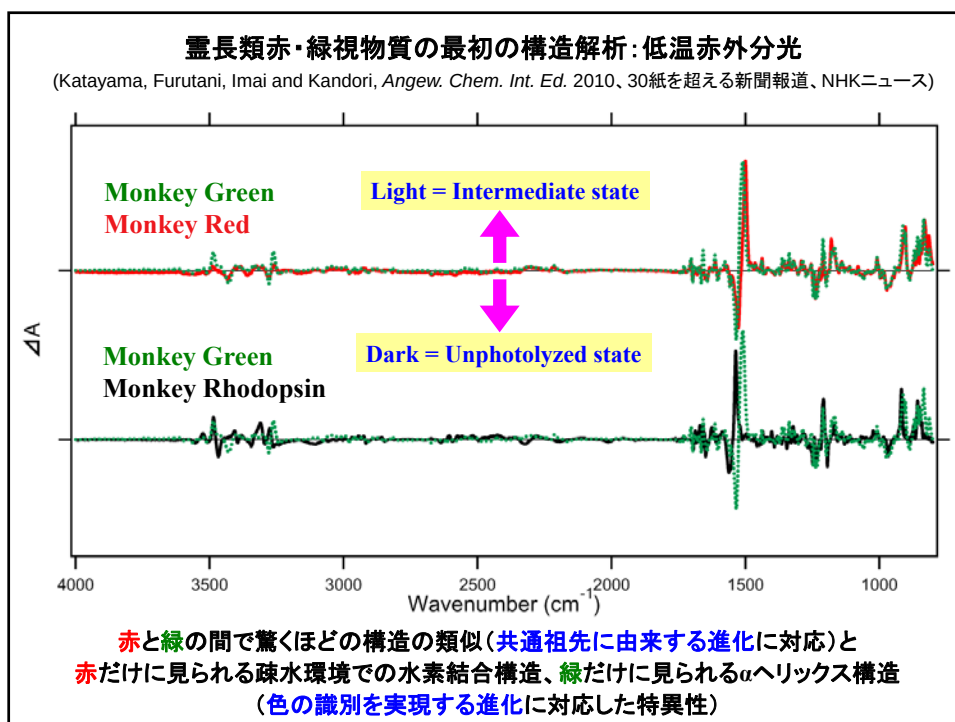
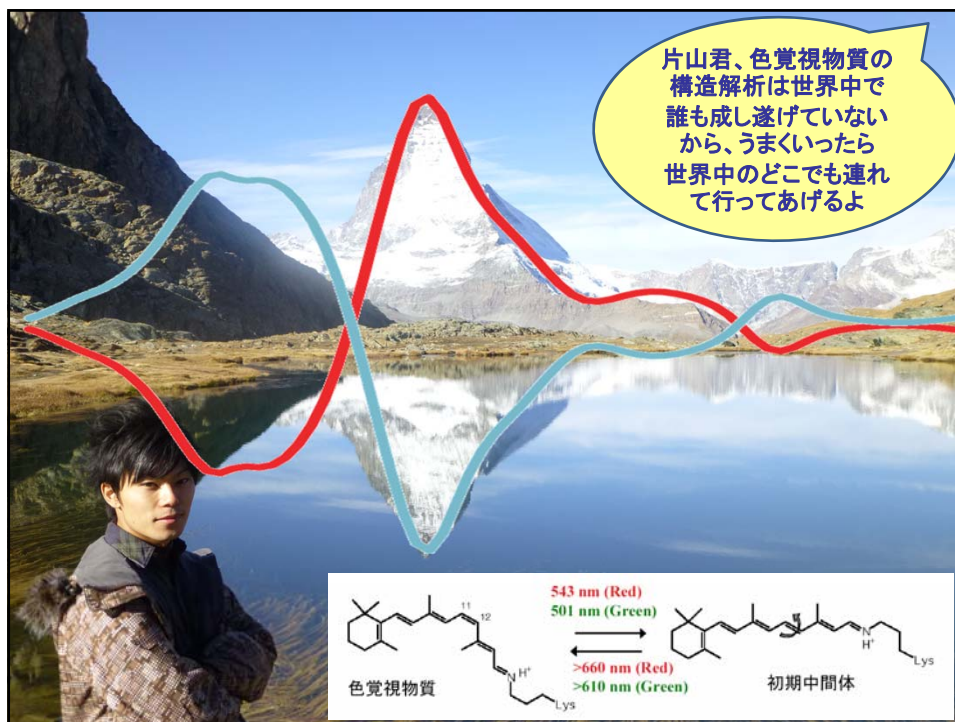


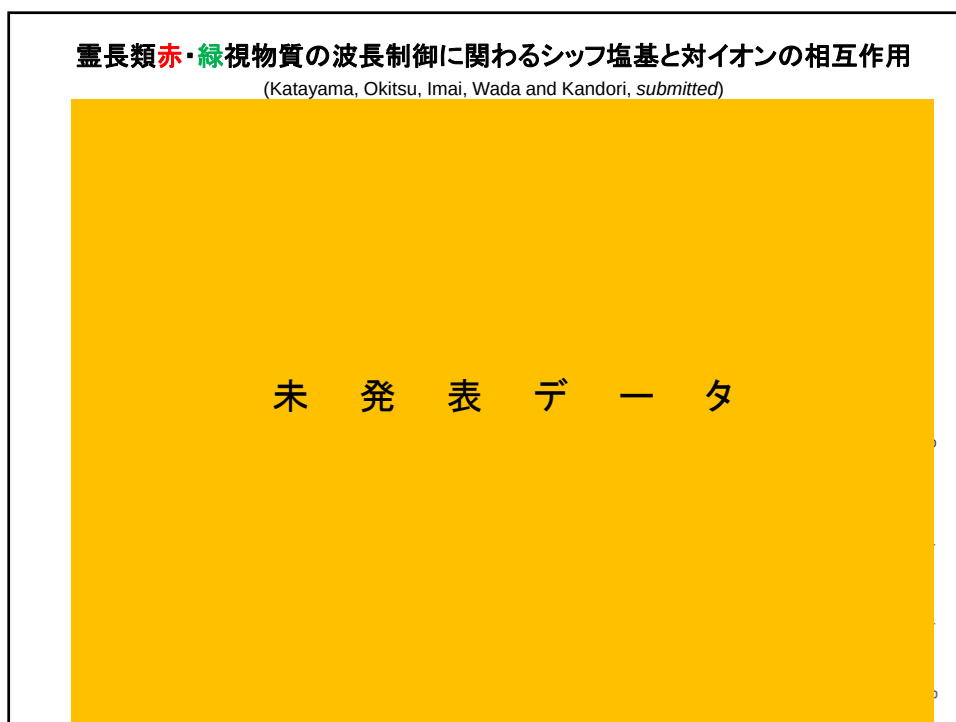
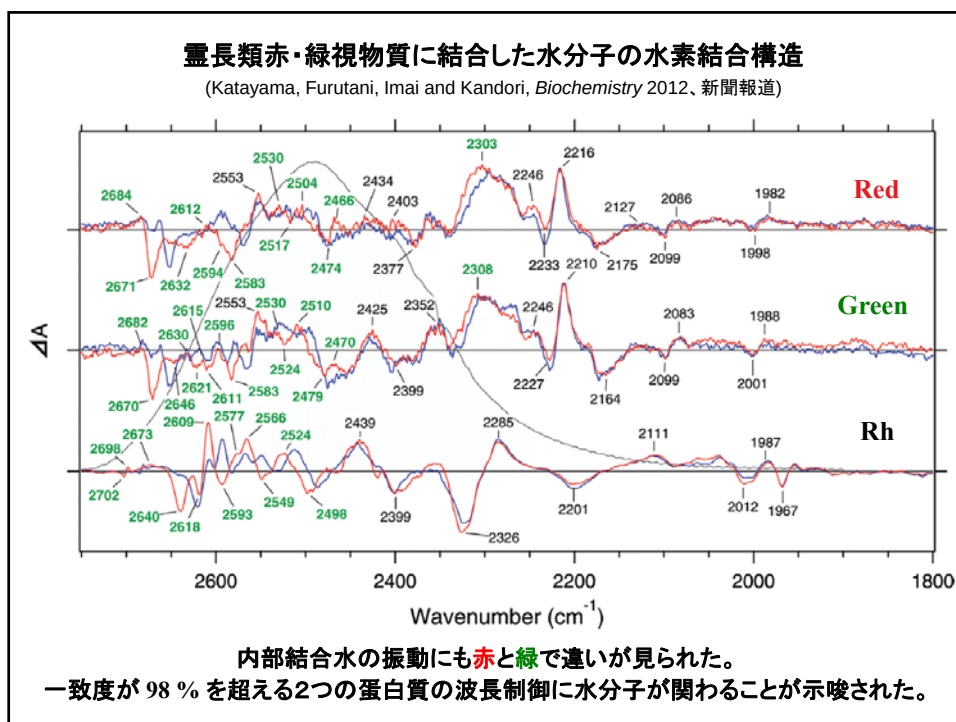
片山耕大君



77 K でのフォトクロミックな性質を使って退色の問題を克服、データを積算







赤外分光法を用いた霊長類色覚視物質の構造解析



片山耕大 (H25年度学位取得、
日本学術振興会育志賞)

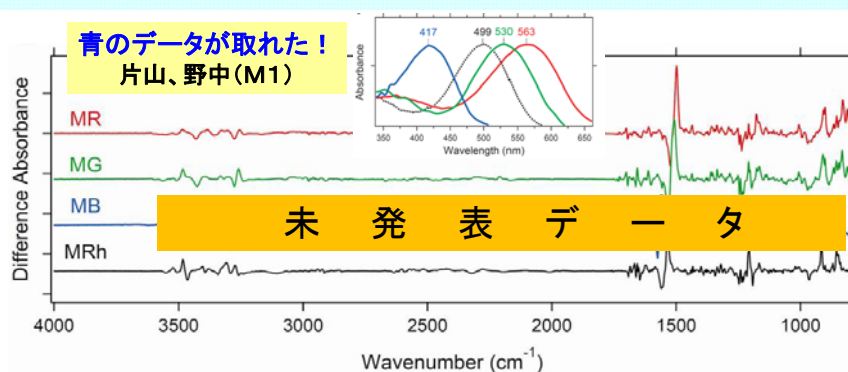
霊長類



哺乳類



「力業」とエレガントな計測の組合せにより、今もって世界で唯一の構造解析が実現



生物は光をどのように利用しているか？

神取研究室 発表内容

光は生物の中で情報やエネルギーになる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質

光ははじめに: 計算科学への期待

Light is mother of life

1) 色を見分けるしくみ

2) 光駆動プロトンポンプのしくみ

3) 様々なイオン輸送性ロドプシン

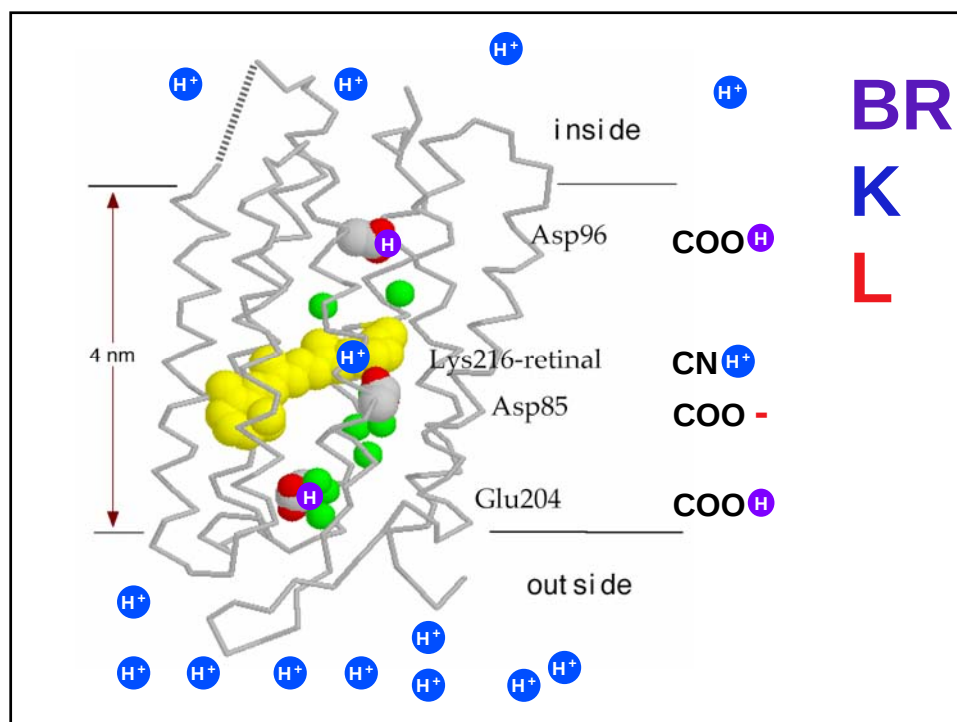
まとめ: 計算科学への期待

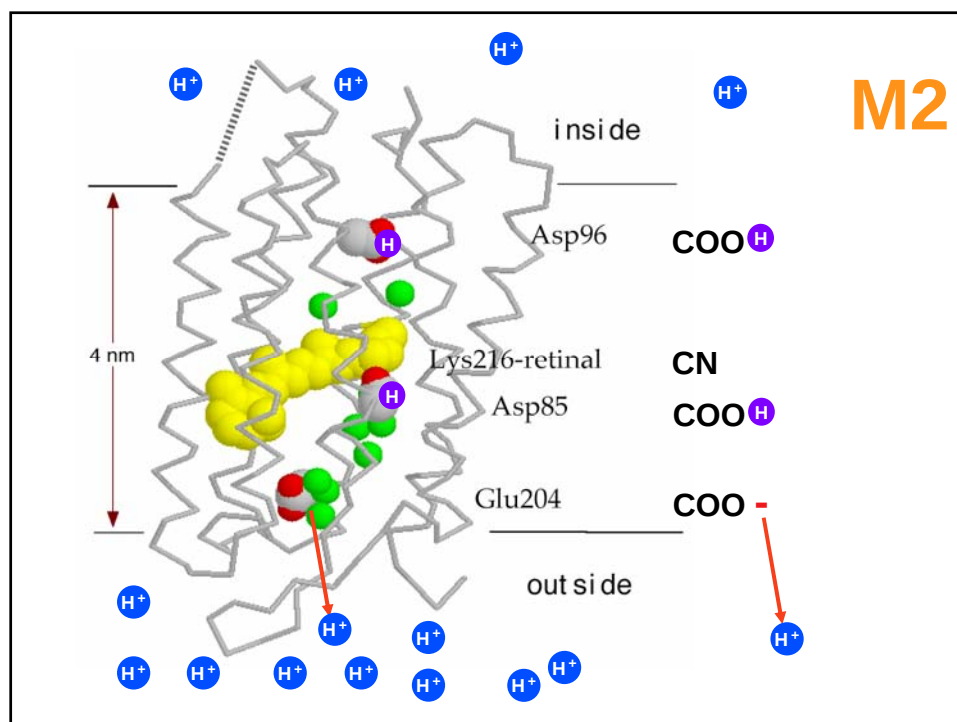
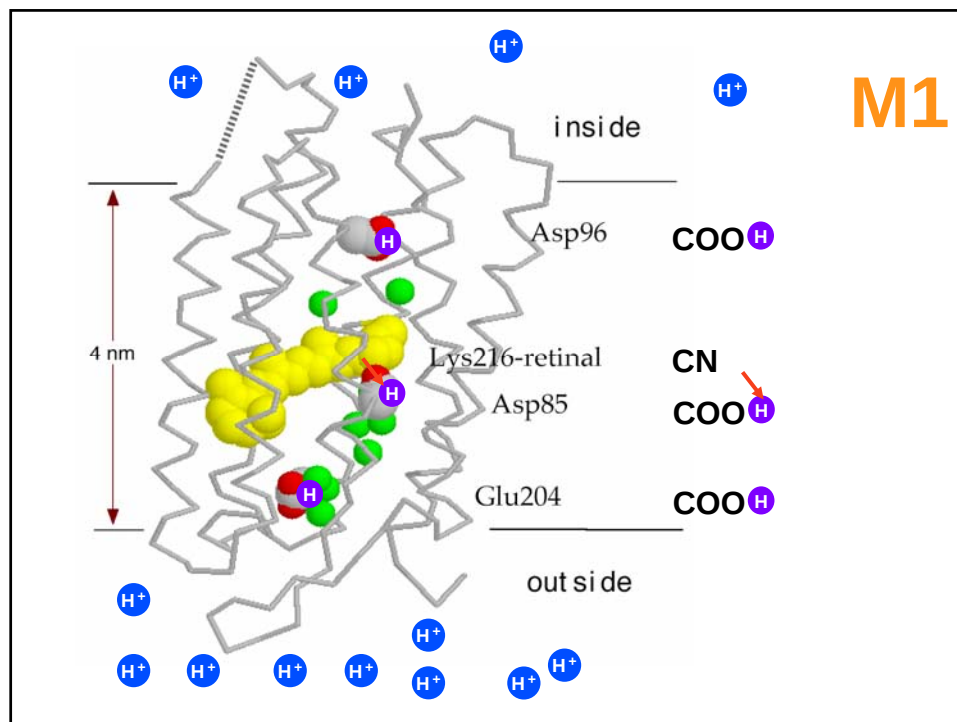
最先端バイオ
テクノロジー

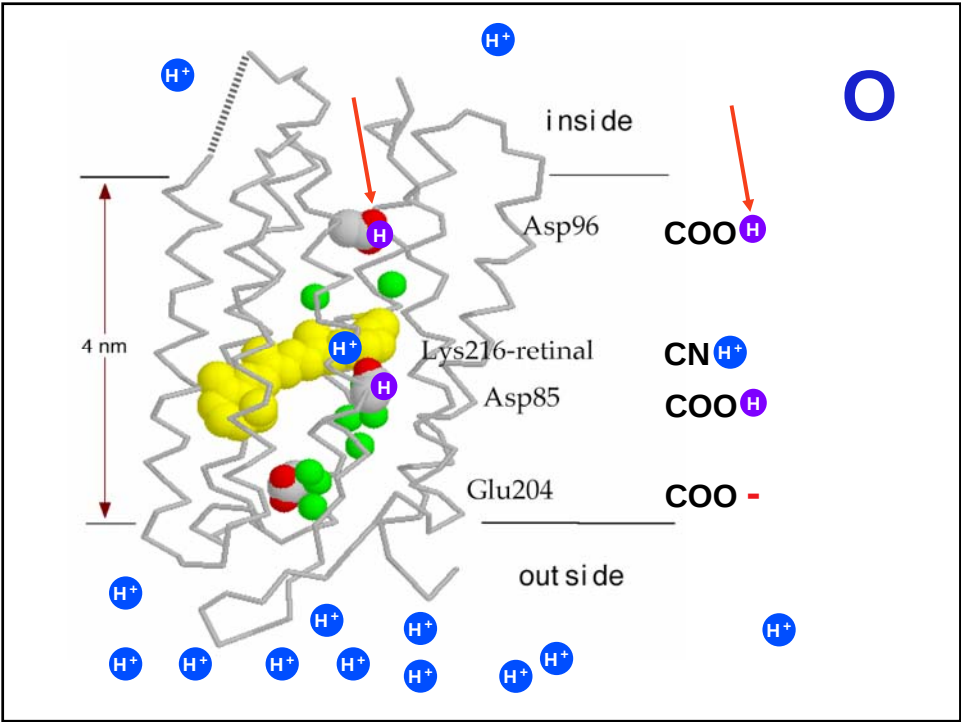
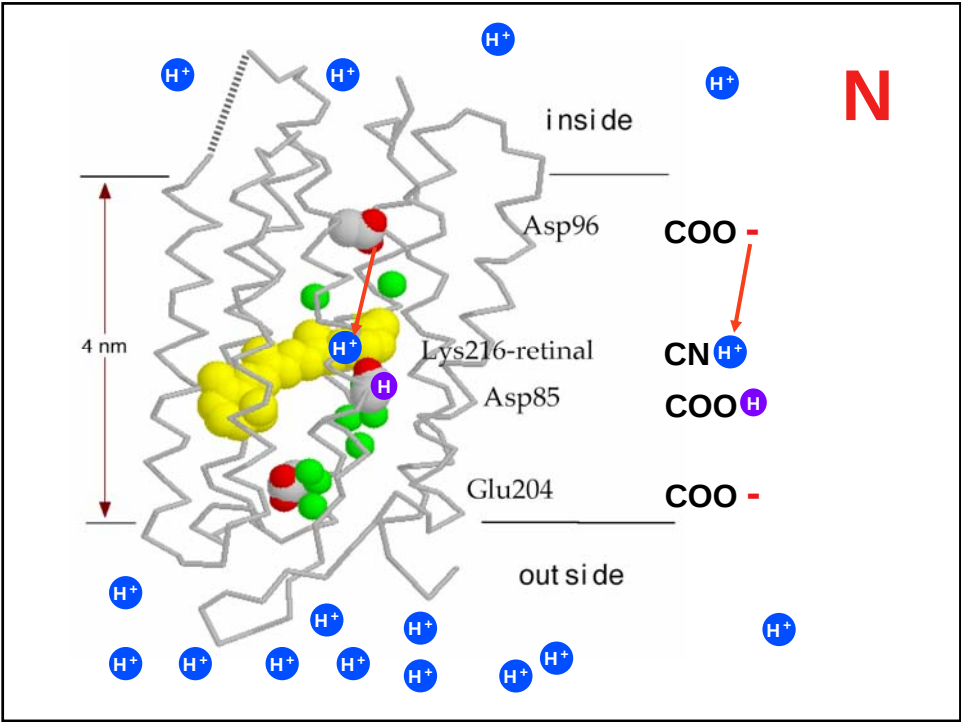
高等動物のロドプシン
⇒ 医療

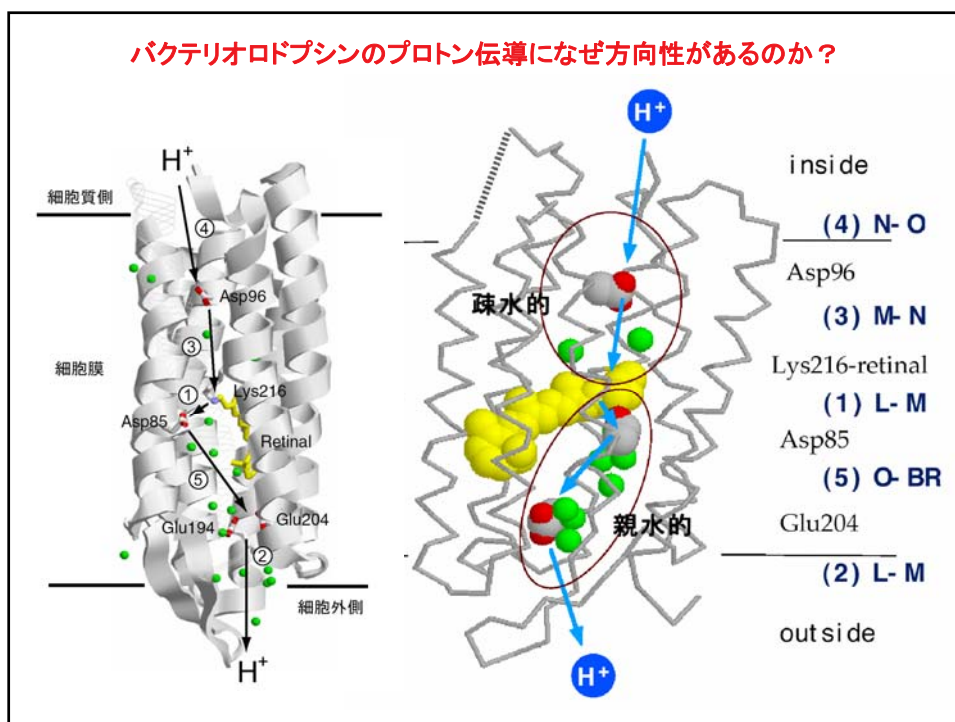
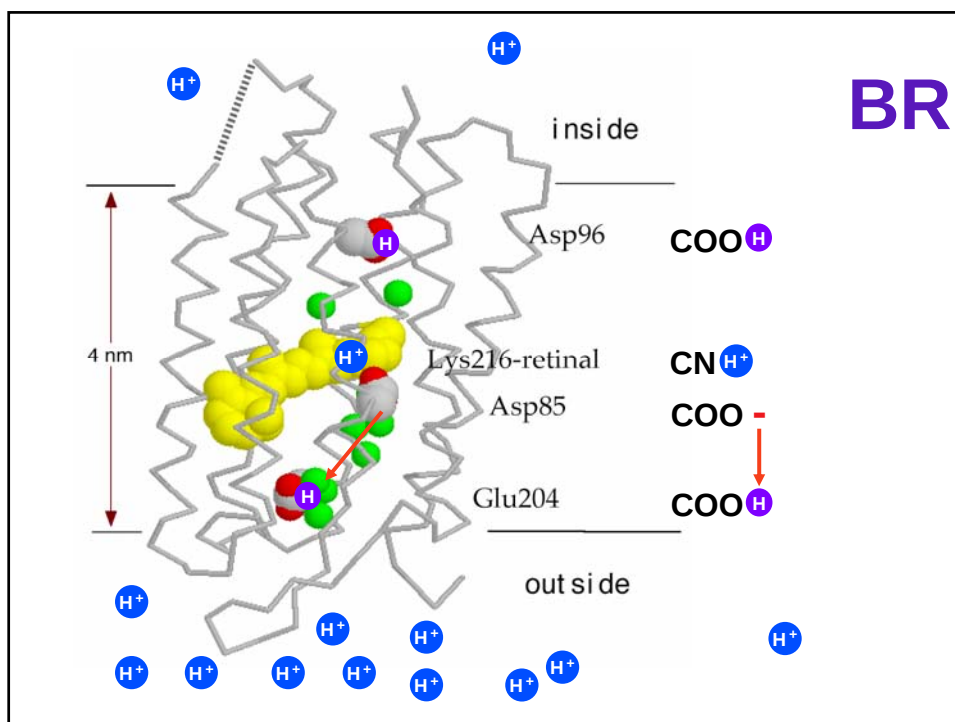
微生物のロドプシン
⇒ エネルギー

光を使って解明する
☆ヒトはどうやって色を見分けているの？
☆濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？
☆傷ついたDNAをどうやって直すの？

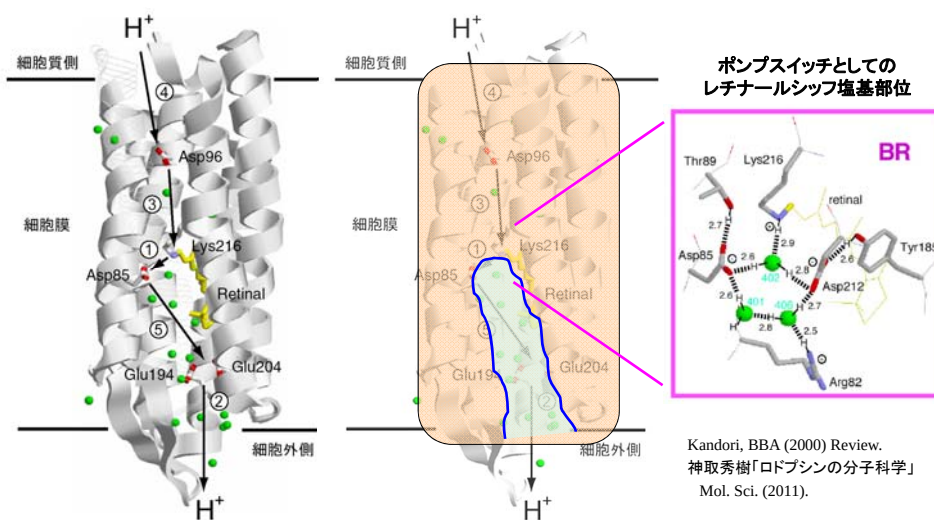






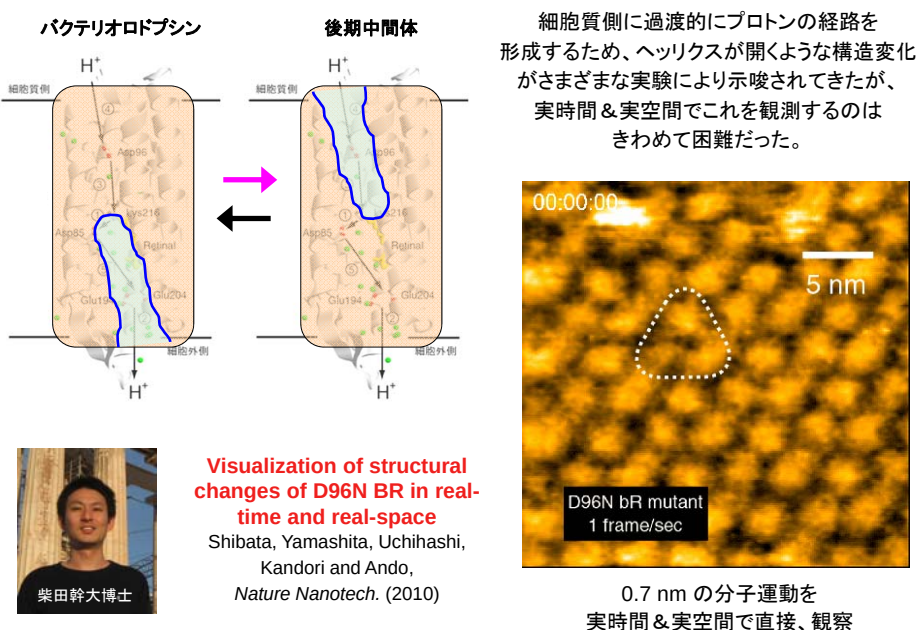


バクテリオロドプシンは非対称の水素結合ネットワークをもつ

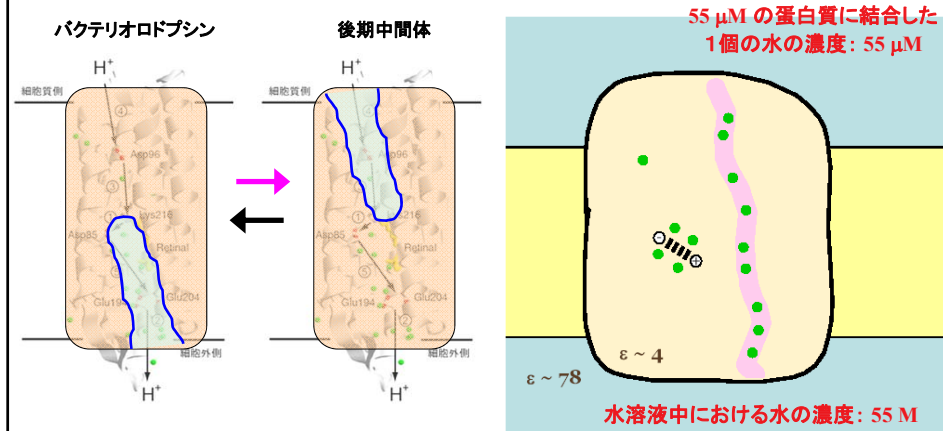


レチナールシフト塩基より細胞外側は水分子を含んだ水素結合ネットワークが存在する一方、細胞質側にはプロトン経路は存在せず、光反応サイクルで過渡的にプロトンの経路が形成される。レチナールシフト塩基部位はスイッチとして両側を隔て、ポンプの逆流を防ぐ。

疎水部にプロトン経路を形成するためのヘリックスの動きをどう捉えるか？



プロトン輸送における水分子の重要性



疎水的なタンパク質内部におけるプロトン輸送を実現するため

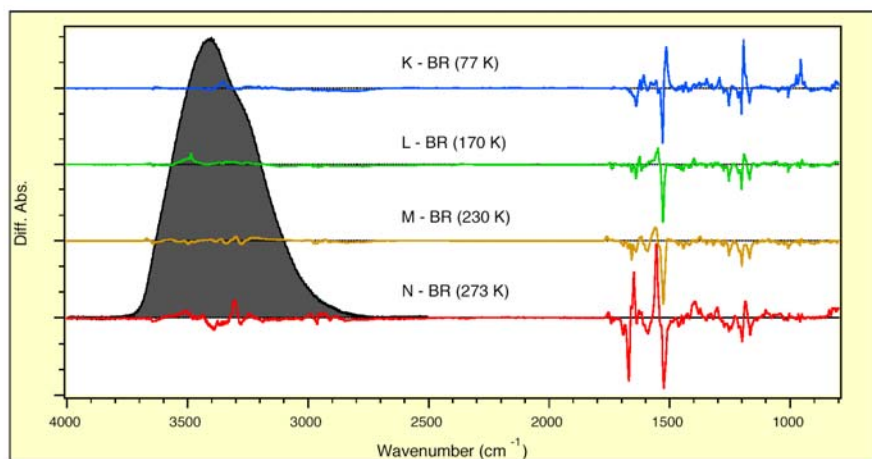
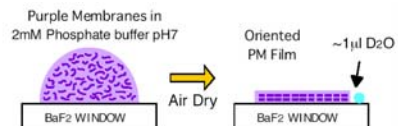
内部結合水が重要なはたらきをしていると考えられてきた。

X線結晶構造解析により水分子の存在が明らかになったが、水の機能との相関は容易ではない。

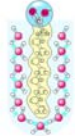
赤外分光法は水分子を捉えるのに優れた手法である。ただし、55 mM の蛋白質に結合した1個の水を捉えようとすると、百万個の中から1個の水の信号を抽出しなければならない。

低温赤外分光法を用いた ロドプシンの内部結合水の観測

- 【1】水和フィルムで本来の構造変化を実現できる
- 【2】光により構造変化を開始できる



試料中の水を自在に制御することで、蛋白質に結合した水分子の計測を実現！



chapter 2

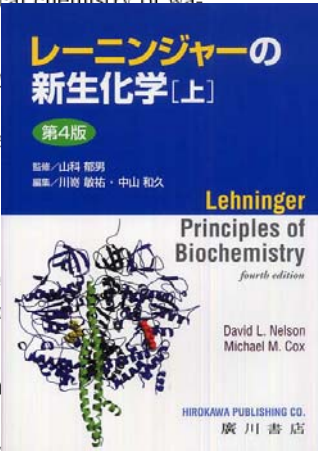
WATER

2.1 Weak Interactions in Aqueous Systems 47
 2.2 Ionization of Water, Weak Acids, and Weak Bases 60
 2.3 Buffering against pH Changes in Biological Systems 65
 2.4 Water as a Reactant 69
 2.5 The Fitness of the Aqueous Environment for Living Organisms 70

I believe that as the methods of structural chemistry are further applied to physiological problems, it will be found that the significance of the hydrogen bond for physiology

and titration curves, and consider how aqueous solutions of weak acids or bases and their salts act as buffers against pH changes in biological systems. The water molecule and its ionization products, H^+ and OH^- , profoundly influence the structure, self-assembly, and properties of all cellular components, including proteins, nucleic acids, and lipids. The noncovalent interactions responsible for the strength and specificity of "recognition" among biomolecules are decisively influenced by the solvent properties of water, including its ability to form hydrogen bonds with itself and with solutes.

2.1 Weak Interactions in Aqueous Systems
 Hydrogen bonds between water molecules provide the



レーニンジャーの
 新生化学[上]
 第4版
 監修/山科 聡男
 編纂/川崎 敏祐・中山 和久
 Lehninger
 Principles of Biochemistry
 fourth edition
 David L. Nelson
 Michael M. Cox
 HIROKAWA PUBLISHING CO.
 廣川書店

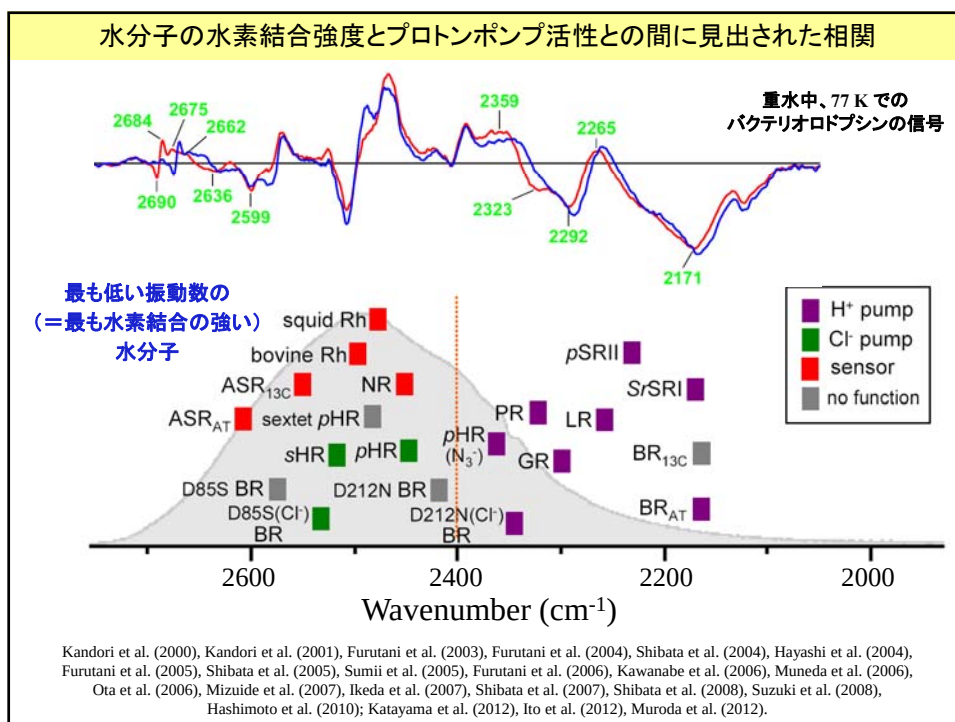
teins. *The Biochemist* **19** (3), 18–21.

A brief discussion of protein-bound water as detected by crystallography and NMR.

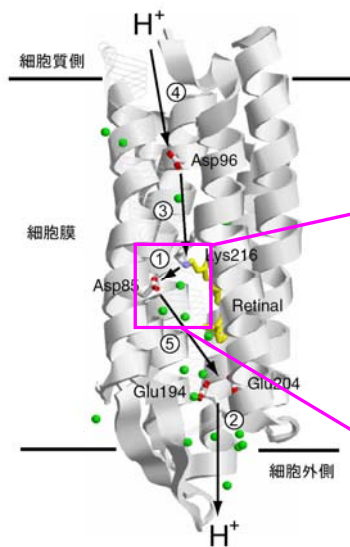
Kandori, H. (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 177–191.

Intermediate-level review of the role of an internal chain of water molecules in proton movement through this protein.

Kornblatt, J. & Kornblatt, J. (1997) The role of water in recognition and catalysis by enzymes. *The Biochemist* **19** (3), 14–17.



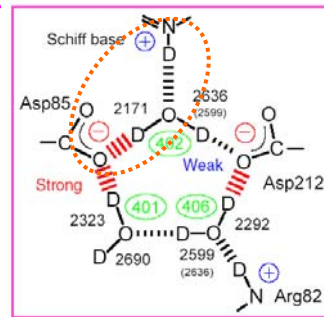
水分子の水素結合が微生物型ロドプシンのプロトンポンプ機能を決定する



水分子を含む水素結合ネットワーク

活性中心での構造安定化

光励起後の不安定化による
エネルギーの取込と構造変化



系統的な赤外分光解析により「プロトンポンプ活性のあるロドプシンには必ず強い水素結合を形成した水分子が存在する」ことがわかった。プロトンポンプが水を含む水素結合ネットワークを構造安定化に用いるとともに、光励起により不安定化した水素結合エネルギーをポンプに利用していることが示唆された。

生物は光をどのように利用しているか？

神取研究室 発表内容

光は生物の中で情報やエネルギーになる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質

光ははじめに: 計算科学への期待

Light is mother of life

1) 色を見分けるしくみ

2) 光駆動プロトンポンプのしくみ

3) 様々なイオン輸送性ロドプシン

まとめ: 計算科学への期待

最先端バイオ
テクノロジー

高等動物のロドプシン

微生物のロドプシン

⇒ 医療

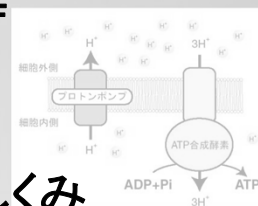
⇒ エネルギー

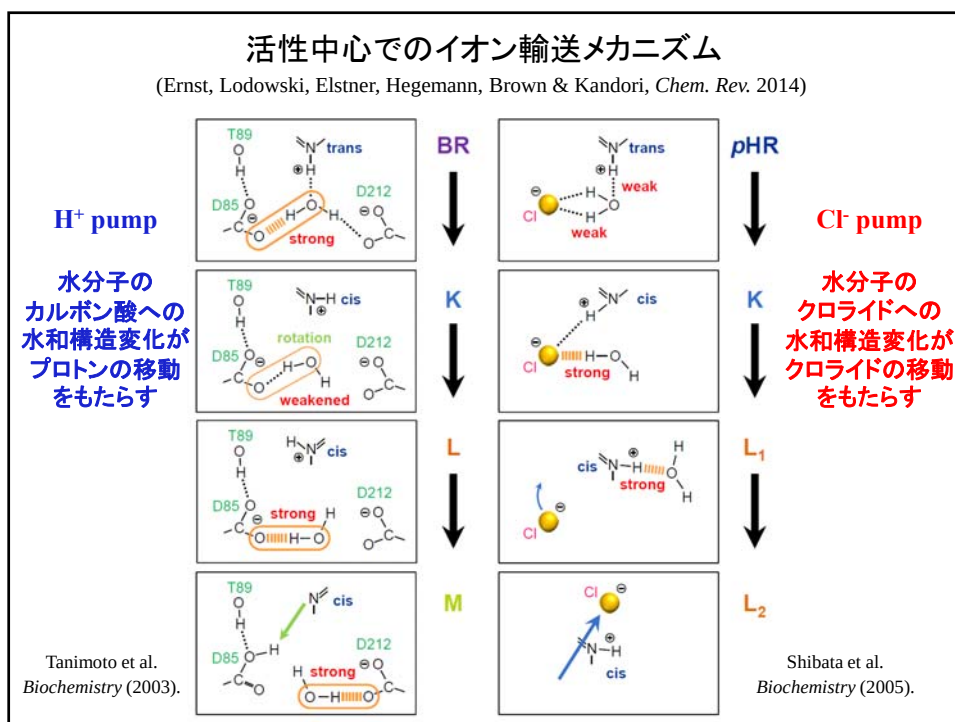
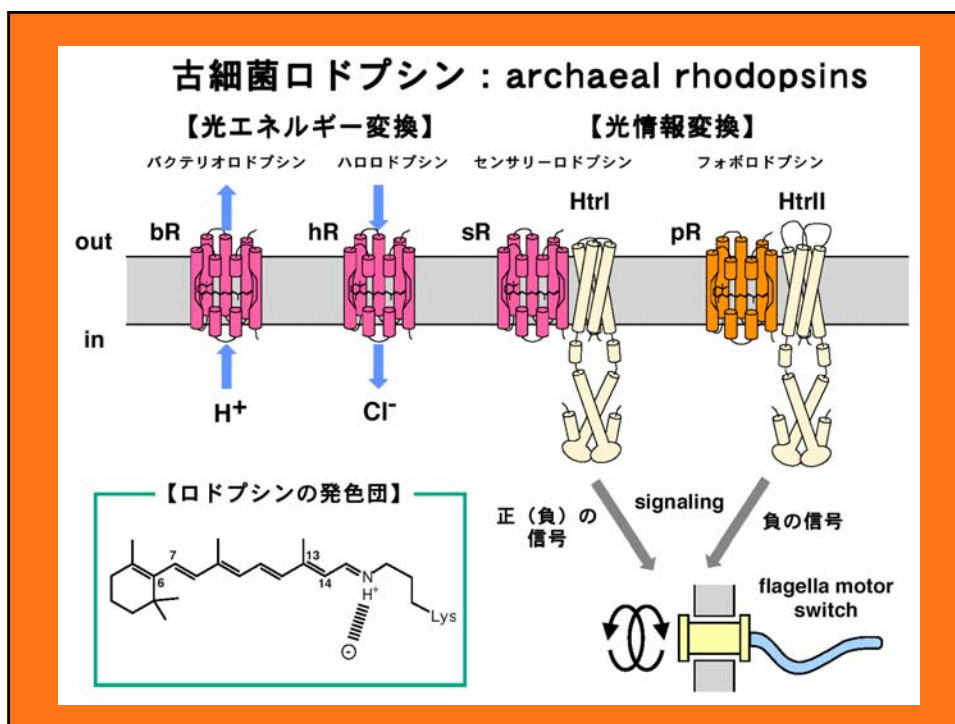
機能を光を使って解明する

☆ヒトはどうやって色を見分けているの？

☆濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？

☆傷ついたDNAをどうやって直すの？

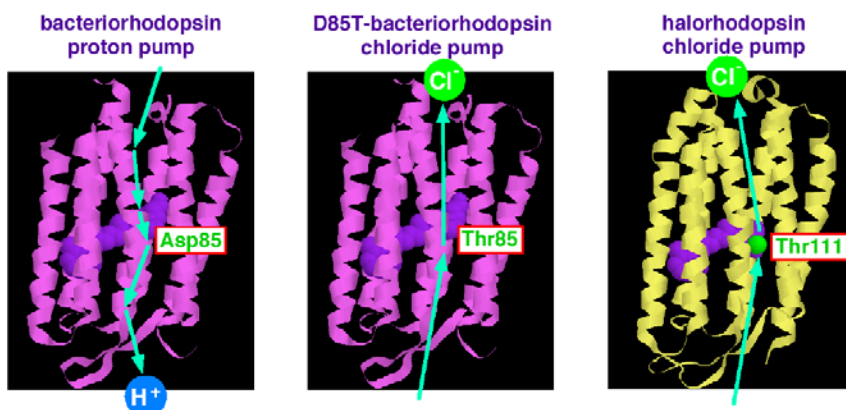




バクテリオロドプシンは1アミノ酸の置換でクロライドポンプになる

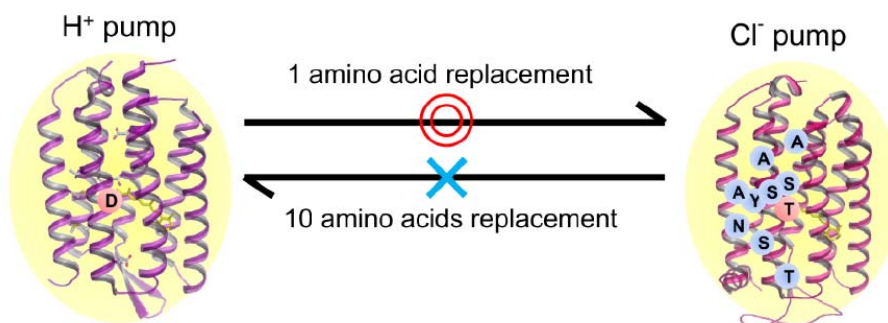
Sasaki et al. *Science* (1995).

アミノ酸の一致度 25 %の2つの光駆動ポンプにおいて
バクテリオロドプシンの D85 → T の置換で機能転換が実現した。
輸送機構は共通であり、活性中心がイオン選択性を決定することが示唆された。



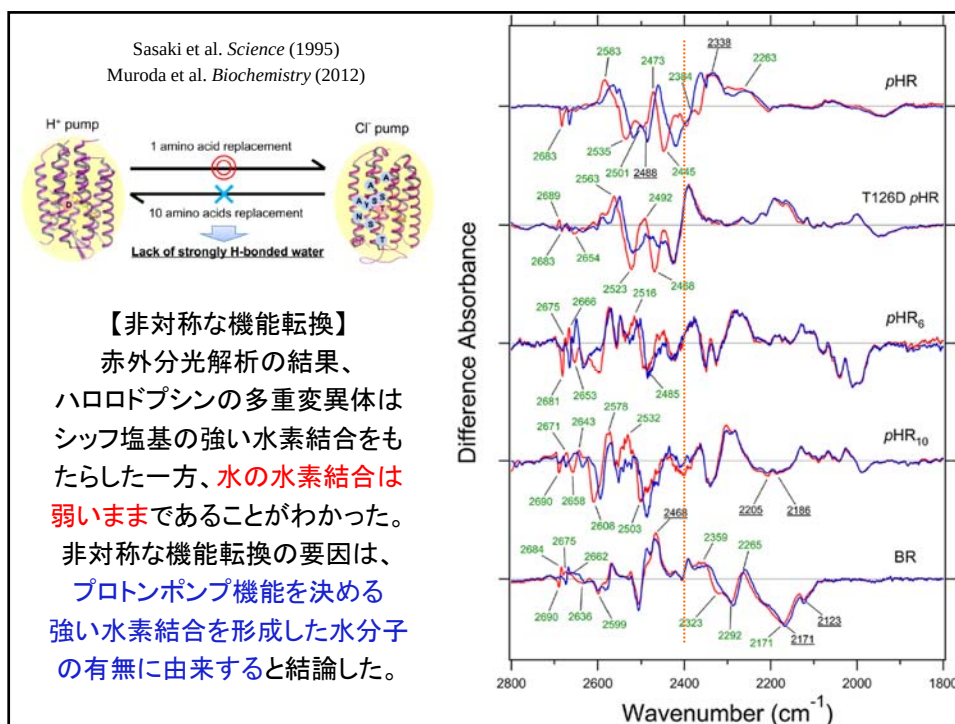
ハロロドプシンの T → D の置換では？

ハロロドプシンは10個換えてもプロトンポンプにはならない



【非対称な機能転換：20年近く未解明の謎】

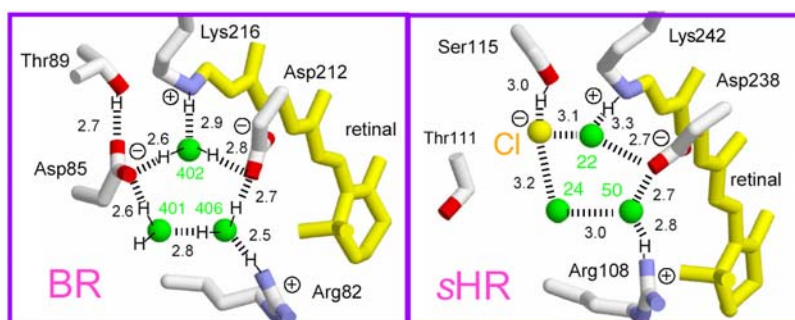
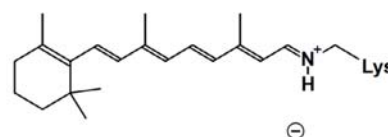
なぜプロトンポンプとクロライドポンプの
機能転換が非対称になるのか？

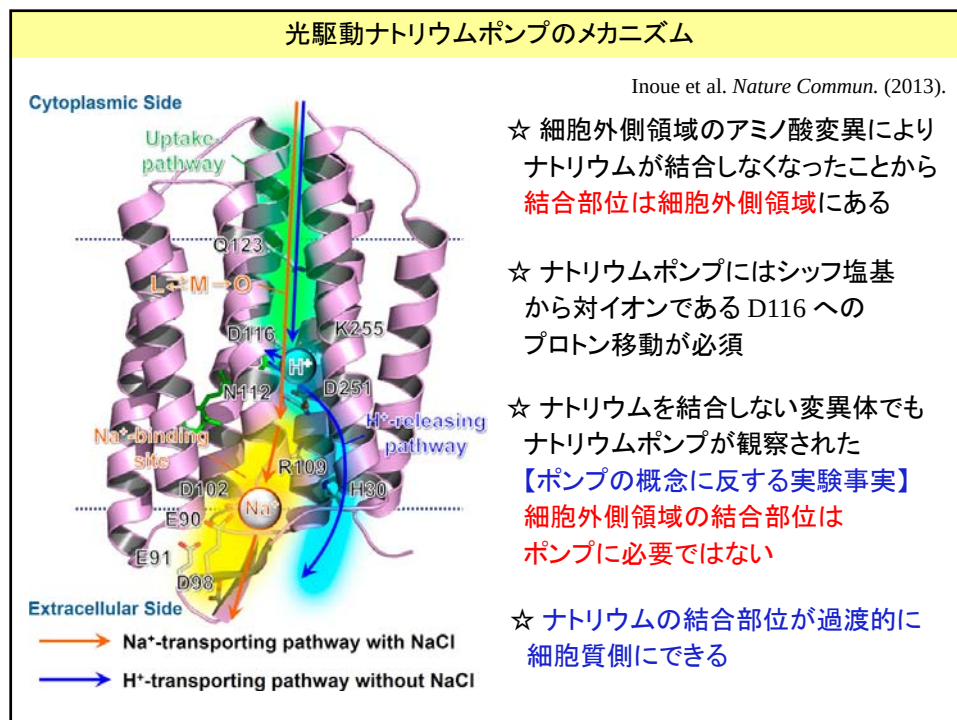
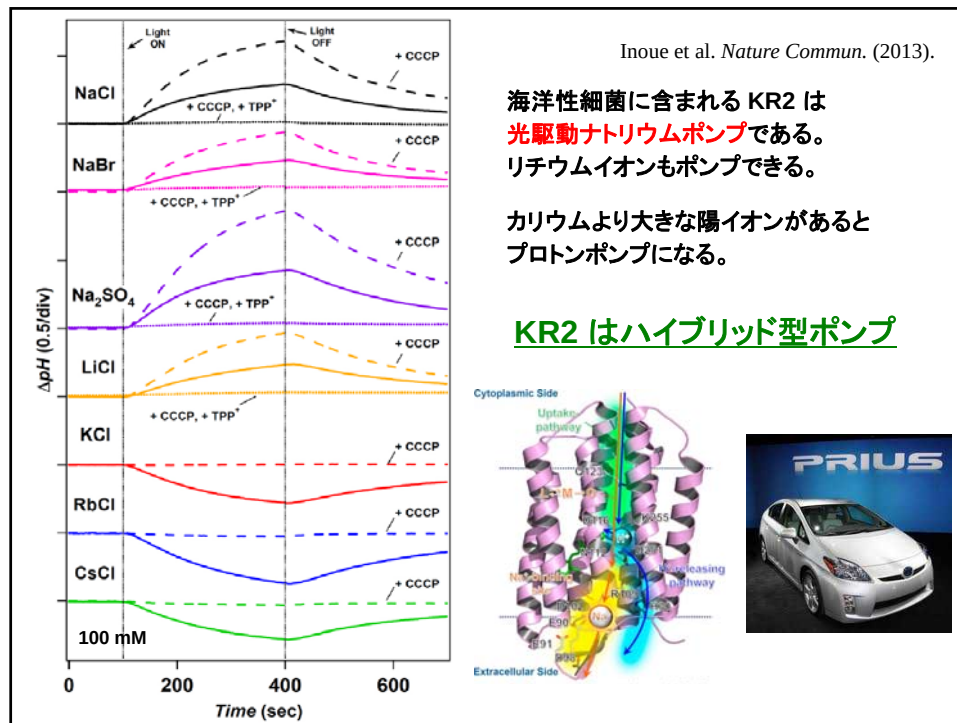


ナトリウムのポンプは？ これまでによくあった質疑応答

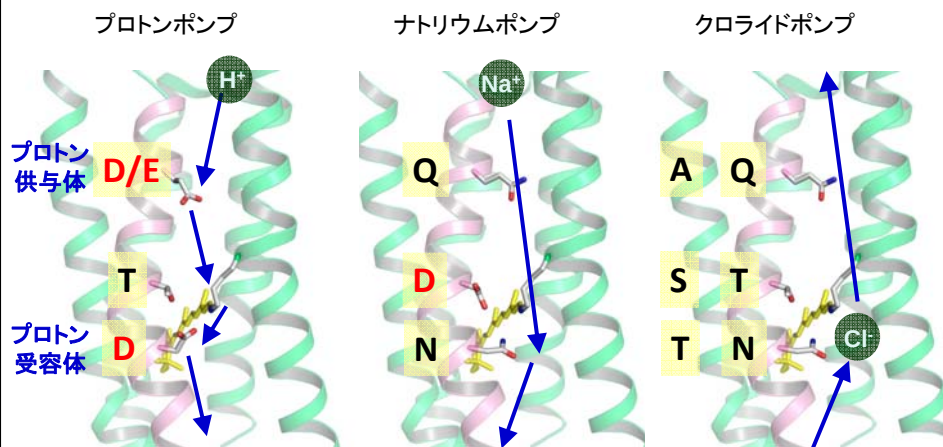
高校生 「光でナトリウムをポンプするロドプシンはないのですか？」

神取 「たいへんよい質問ですが、光スイッチとしてはたらくレチナールシッフ塩基はプロトン化しているので陽イオンなんですよ。だからプロトン自身や陰イオンの結合と輸送はできても、**ナトリウムポンプは有り得ないですね。**」





なぜナトリウムポンプが発見できたのか？ ロドプシンの機能を決める部位



プロトンポンプに必須の2つのカルボン酸(プロトン供与体と受容体)が
中性化される一方、その間にアスパラギン酸が導入された興味深い配列
ただしナトリウムポンプとは予想できず...

ナトリウム
ポンプの反応
サイクルモデル

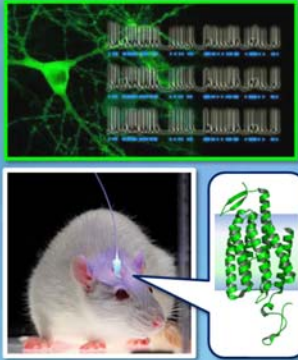
NaR

未 発 表 モ デ ル

生物は光をどのように利用しているか？

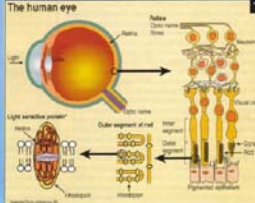
神取研究室

光はいのちの源
Light is mother of life



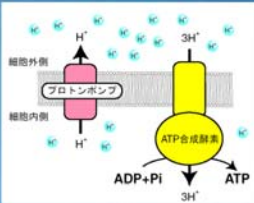
最先端バイオ
テクノロジー

光は生物の中で**情報**や**エネルギー**になる。
ロドプシンは光を捉える膜タンパク質



高等動物のロドプシン
視覚のセンサー

→ 医療



微生物のロドプシン
イオンポンプ

→ エネルギー

生命現象の不思議を光を使って解明する

- ☆ヒトはどうやって色を見分けているの？
- ☆濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？
- ☆傷ついたDNAをどうやって直すの？

脳機能解明のための新技術: オプトジェネティクス(光遺伝学)
光観察から光操作へ

Fiberoptic Control of Locomotion in ChR2 Mouse

イオン輸送性ロドプシンは必須のツール

Deisseroth Lab
(Stanford Univ.)

10年で脳の全容解明を...オバマ政権が取り組み

【ボストン(米マサチューセッツ州)＝中島達雄】米紙ニューヨーク・タイムズは18日、オバマ政権が**人間の脳機能の全容解明を目指し、今後10年かけて政府と民間による新たな共同研究に取り組む**ことを計画中だと報じた。

脳神経ごとの役割を解明し、「**脳の活動地図**」を作るというプロジェクトで、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因究明、うつ病など精神疾患の治療法の開発、人工知能(AI)の発展につながることが期待されるという。人間の全遺伝情報(ヒトゲノム)解読プロジェクトに次ぐ、大規模研究になるとみられる。

オバマ米大統領は12日の一般教書演説で、**ヒトゲノム研究の経済効果について、「1ドルごとの投資に140ドルのリターンがあった」と紹介**。その上で「現在は脳活動地図の作成が重要。1960年代の宇宙開発競争に匹敵する、高度な研究開発のために投資すべきだ」と訴えていた。

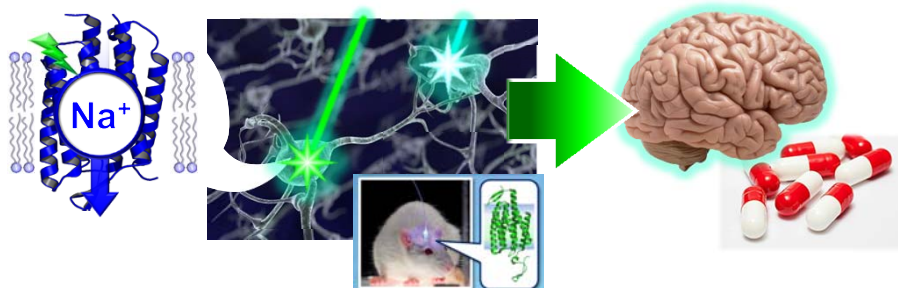
(記事提供:読売新聞、平成25年2月)

新規に開発するロドプシンが脳機能を解明

オプトジェネティクスに不可欠なツールの開発

精神・神経疾患のメカニズム解明

イオン濃度の制御による「うつ病などの新規治療」に貢献



光を使って脳・神経の機構を解明

新規治療に貢献

さらに予想もしなかった発展性の期待

◎ ◎ ◎ ◎ ×

Cl⁻ H⁺ Li⁺ Na⁺ K⁺

我々が発見したナトリウムイオンポンプは、リチウムイオンもポンプできるが、カリウムより大きなイオンはポンプできない。遺伝子工学技術を使って、より大きなセシウムイオンを運ぶことができれば、膜反転の技術は確立しているので...

Na⁺ Na⁺ 分子デザイン

機能転換 + 膜反転制御

ナトリウムポンプ (神取研で発見)

逆向きのセシウムポンプ

福島原発

水中に投入

137Cs⁺ 30年, 90Sr²⁺ 29年 半減期

光照射で水中からセシウム137を回収

生物は光をどのように利用しているか？

神取研究室

光はいのちの源
Light is mother of life

最先端バイオテクノロジー

まとめ

光は生物の中で情報やエネルギーになる。
光を捉える膜タンパク質

The human eye

ATP合成酵素

ADP+Pi → ATP

計算科学への期待

理論と実験との連携の重要性

最先端バイオテクノロジー

医療

エネルギー

★ヒトはどうやって色を見分けているの？

★濃度勾配に逆らってどうやって分子を運ぶの？

★傷ついたDNAをどうやって直すの？

謝 辞

霊長類色覚視物質の赤外分光解析

片山耕大、野中祐貴(名工大)
古谷祐詞(分子研)
今井啓雄、筒井 圭(京大霊長研)
和田昭盛、沖津貴志(神戸薬大)

バクテリオロドプシンの高速AFM

安藤敏夫、内橋貴之、柴田幹大、山下隼人(金沢大)

プロトンポンプとクロライドポンプの機能転換

室田浩助、柴田幹大、中島啓介(名工大)
出村 誠(北大)、前田章夫、佐々木 純、千 永信(京大)
R. Needleman (Wayne State Univ., USA)
L. S. Brown, J. K. Lanyi (UC Irvine, USA)

光駆動ナトリウムポンプ

井上圭一、吉住 玲、加藤善隆、伊藤洋康、大野 光(名工大)
木暮一啓、吉澤 晋(東大)

