総説

REVIEW ARTICLE

光誘起赤外差分分光法による微生物型ロドプシンのイオン輸送機構の研究

古谷 祐詞

分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域 生体分子情報研究部門

(平成 27 年 8 月 26 日受理, 平成 27 年 10 月 21 日掲載決定)

The Molecular Mechanisms of Ion Transportation in Microbial Rhodopsins Studied using Light-Induced Infrared Difference Spectroscopy

Yuji Furutani

Institute for Molecular Science

(Received August 26, 2015, Accepted October 21, 2015)

要 旨

オプトジェネティクス (光遺伝学) は, チャネルロドプシンの遺伝子を神経細胞に導入することで, 光依存的に活動電位を発生させる技術をさきがけとして急速に発展してきた. チャネルロドプシンなどの微生物型ロドプシンが動作する分子機構の解明は, 遺伝子工学による機能改変の指針を与える. 本稿では, 微生物型ロドプシンの光応答機構を解明するのに有力な手法である光誘起赤外差分分光法について解説する.

キーワード: 膜タンパク質, ロドプシン, 光遺伝学, 赤外線, 分子振動

Abstract

Optogenetics has been rapidly grown up since a start of pioneering works utilizing channelrhodopsin to generate action potentials of nerve cells in light dependent manner. Elucidation of molecular mechanisms of microbial rhodopsins including channelrhodopsin gives guides for rational designs toward their functional alteration by genetic engineering. In this review article, the light-induced infrared difference spectroscopy is introduced as a powerful technique for investigation of light-responsive mechanisms of microbial rhodopsins.

Key words: membrane protein, rhodopsin, optogenetics, infrared, molecular vibration

1. 緒言

光受容タンパク質の一種である微生物型ロドプシンは, その名の通り, 主に細菌や原核生物などの微生物に存在する¹⁾. 動物の視覚ではたらく視物質ロドプシンと同様に, レチナールを発色団とし, 7本の α -ヘリックスが脂質二重層を貫通した構造であるなど類似性があるが, 進化的な起源は異なると考えられている²⁾. 一方, 視物質ロドプシンとは異なり, 微生物型ロドプシンの多

くは大腸菌で異所的に発現できるため, レーザー分光などの物理化学計測に必要な量の試料調製が比較的簡単であるなどの理由から, 分子および原子レベルでの光反応機構や機能発現機構の解析が進んでいる.

微生物型ロドプシンは発色団として all-trans 型レチナールを特定のリジン残基とのプロトン化シッフ塩基結合を介して結合している. タンパク質内部では, all-trans 型から 13-cis 型への光異性化反応が 60% 程度の高い量

子収率により、ピコ秒以下の超高速で起こる特殊な反応場が形成されている。さらに、光異性化によって誘起されるレチナル発色団の構造変化により、タンパク質内部でプロトン移動反応が生じたり、 α ヘリックスが傾くなどのタンパク質部分の構造変化が誘起され、プロトンポンプやイオンチャネル、光情報変換など様々な機能が発現する²⁻⁶⁾。

2003年頃に光開閉陽イオンチャネルとしてチャネルロドプシン^{7,8)}が報告されてからは、遺伝子操作により動物の神経細胞に微生物型ロドプシンを導入することで、動物の神経活動や行動を光で制御する光遺伝学(オプトジェネティクス)という技術に注目が集まっている^{9,10)}。他にもオプトジェネティクスで利用される光受容タンパク質として、光駆動陰イオンポンプであるハロロドプシン、光駆動プロトンポンプであるアーキロドプシンやバクテリオロドプシンがある⁹⁻¹²⁾。微生物型ロドプシンに変異を加えて、イオン選択性や電気生理応答を改変し、有用な機能変換を実現するために、微生物型ロドプシンの光反応や機能発現の分子機構解明の研究に拍車がかかっている。

本稿では、光反応によって誘起されるタンパク質の構造変化の解析に有効な光誘起赤外差分分光法によって、微生物型ロドプシンのイオン輸送機構などの分子機構がどのようにして解明されてきたのかを紹介する。

2. タンパク質の構造変化解析に有効な赤外差分分光法

タンパク質が機能する過程での詳細な分子機構を語る上で重要になるのは、精密な立体構造情報と機能発現過程で形成する様々な中間状態での構造変化に関する情報である。また、それぞれの中間状態の遷移の時間に関する情報も重要である。タンパク質の精密な立体構造情報は、X線結晶構造解析、核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance, NMR)分光法、電子線構造解析などを適用することで、0.1～10 nm程度の空間分解能で得ることができる。膜タンパク質の立体構造解析は一般的に困難とされているが、上記の微生物型ロドプシンについては結晶構造が既に報告されており(Fig.1)¹³⁻¹⁸⁾、その過程で開発されたLipidic Cubic Phase法は膜タンパク質の結晶化手法として定着している¹⁹⁾。また、2012年に報告されたチャネルロドプシン1とチャネルロドプシン2のキメラタンパク質の立体構造¹³⁾は、チャネルロドプシン2のオプトジェネティクス分野での利用が進んでいることもあり、提案されたイオン透過経路やチャネル開閉の分子機構などに注目が集まった。このようにタンパク質の原子レベルでの立体構造は機能発現機構を解明するために重要な研究基盤となっている。

一方、タンパク質の機能発現に至る構造変化の情報を得るにはいくつかの工夫が必要となる。一般的に機能を発現する活性化状態や中間体は安定ではないために、それらの状態を安定化する化合物を作用させたり、変異体を作製したりする必要がある。また、光受容タンパク質においては、低温で結晶に光照射することで各種中間体を安定化する方法が適用されている^{4,6)}。最近では、パルスレーザーを用いることで、光照射後の構造変化を時分割で追跡する方法も開発されている²⁰⁾。このように様々な方法が試みられているが、タンパク質の構造変化

Fig.1 X-ray crystal structures of microbial rhodopsins.

を議論する上では、本質的には結晶中での構造変化であるということを考慮する必要がある。つまり、結晶のパッキングによって生理的な構造変化が抑制されるなどの問題があるためである²¹⁾。このため構造変化を得る手段として、その他の分光学的手法、特に光照射前後の差を取得する赤外差分分光法が古くから注目されてきた²²⁻²⁶⁾。赤外分光法では、タンパク質を構成する原子の座標情報を得ることはできないが、分子の局所的な構造情報、すなわち化学結合の情報を鋭敏に捉えることが可能である²⁷⁾。結晶構造で得られる静的な構造情報と組み合わせることで、様々な微生物型ロドプシンについて詳細な分子機構の解明がなされてきている。

赤外線的光子エネルギーは分子の振動のエネルギー準位に相当し、分子内で形成される化学結合や分子間の相互作用に関する情報を与える。タンパク質分子は20種類のアミノ酸が直鎖状にペプチド結合によって連結されたものが、特定の形に折り畳まれたものである。その主鎖にあるC=O基とN-H基は規則的な水素結合を形成することで、 α ヘリックスや β シートと呼ばれる二次構造を構築する。C=O基およびN-H基は、それぞれアミドIやアミドIIと呼ばれる特徴的なバンドを赤外吸収スペクトルに示し(Fig.2上)、特にアミドIバンドはタンパク質の二次構造の解析によく利用されている^{27,28)}。ロドプシン分子は光受容部位としてレチナル分子をシッフ塩基結合を介して結合しているが、その基本骨格はC-C単結合とC=C二重結合が交互に結合したポリエン鎖である。光異性化によってそれぞれの振動の変化が赤外差吸収スペクトルとして現れる(Fig.2下)。さらにタンパク質の側鎖に由来する赤外吸収バンド²⁹⁾は水素結合変化などタンパク質の微細な構造変化を議論するのに有用である。特にアスパラギン酸やグルタミン酸側鎖のカルボン酸(COOH基)のバンドはプロトン化状態の指標となるため、微生物型ロドプシンのプロトン移動反応の解明に重要な役割を果たしてきた^{23,24)}。また、赤外線は水に良く吸収されるため、試料に含まれる水を極力少なくして計測するなどの注意が必要となる。このように水は赤外分光計測にとって邪魔な存在になるが、タンパク質が機能する生理的な環境に近い状況で計測するには欠くべからざる存在でもある。さらに、タンパク質内部に存在する水分子のO-H基の伸縮振動から水素結合の変化を議論することが可能になる(Fig.2下)^{22,30-32)}。このことは、赤外分光法の魅力的な特徴の1つである。

3. プロトンポンプタンパク質 - バクテリオロドプシン -

バクテリオロドプシンは高度好塩菌 *Halobacterium*

Fig.2 Absolute (upper panel) and light-induced difference (lower panel) infrared spectra of halorhodopsin.

salinarum から 1971 年に発見³³⁾された光駆動プロトンポンプタンパク質である。570 nm 付近に吸収極大波長を示し、紫色を呈している。様々な実験及び理論的な手法によって分子機構が研究されてきた。all-*trans* 型レチナールの 13-*cis* 型への光異性化反応の後、K (585 nm), L (545 nm), M (410 nm), N (560 nm), O (630 nm) 中間体を形成し、10 ミリ秒程度で元に戻る光反応サイクルの過程で 1 個のプロトンを経細胞内から細胞外へと輸送する (Fig.3)³⁾。光誘起可視・紫外差分分光法により M 中間体で短波長シフトすることが明らかにされ、レチナールシッフ塩基が脱プロトン化していることが明らかとなった。さらに光誘起赤外差分分光法により、M 中間体形成時にレチナールシッフ塩基のプロトンが Asp85 へと移動し、N 中間体形成時に Asp96 よりシッフ塩基が再びプロトン化することが示された。また、タンパク質外部へのプロトン放出の際にはタンパク質内部に存在するプロトン化水クラスターが重要な役割を果たしていることが報告された^{31,34)}。

近年のゲノム解析の進展により、海洋の微生物から様々な微生物型ロドプシンが単離された。特にプロテオロドプシンは海洋性細菌に普遍的に存在するため、生物が太陽エネルギーを獲得する手段の 1 つとして重要な役割を果たしているものと考えられた³⁵⁾。この頃から古細菌型ロドプシンではなく、微生物型ロドプシンという名称が定着するようになった。著者は、様々な微生物型ロドプシンに対する網羅的な光誘起赤外差分分光計測を行い、プロトン輸送活性を示す微生物型ロドプシンには強い水素結合を形成した水分子が存在するという相関を見いだした^{36,37)}。おそらく水分子の強い水素結合が光異性化反応で不安定化されることが、プロトン輸送を駆動する反応に必要なのではないかと考えている。

Fig.3 The photocycle of bacteriorhodopsin with close look of the X-ray crystal structure near the retinal chromophore.

4. 塩化物イオン輸送タンパク質 - ハロロドプシン -

ハロロドプシンは、塩化物イオン存在下ではバクテリオロドプシンと同様に 575 nm に吸収極大波長を示すが、プロトンではなく塩化物イオンを経細胞内に輸送するタンパク質である³⁸⁾。光照射により細胞の膜電位を下げるため、オプトジェネティクスでは神経細胞の脱分極を抑制するツールとして利用されている³⁹⁾。プロトン化シッフ塩基の対イオンとして、Asp のカルボキシレート基 (COO⁻ 基) の代わりに Thr 残基があり、その近傍に塩化物イオンが結合している。バクテリオロドプシンではシッフ塩基のプロトン受容部位となる Asp85 を、ハロロドプシンで保存されている Thr 残基に置換するだけで、プロトンポンプから塩化物イオンポンプへの機能変換が達成された⁴⁰⁾。

塩化物イオンは赤外吸収を示さない単原子イオンであるため、赤外分光法で輸送過程での位置の変化を議論することは難しい。つまり、プロトン (水素イオン) の場合は、カルボン酸や水分子と容易に化学結合を生じるため、赤外吸収スペクトルの変化として観測することができるが、塩化物イオンは、その負電荷により形成される電場によるタンパク質構造への影響から間接的にその位置を推測せざるを得ない。塩化物イオンと同様に輸送される臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硝酸イオンなどとの比較解析によって、イオンと相互作用する水分子やアミノ酸残基を判別するといった工夫も行われる⁴¹⁾。

ハロロドプシンは、光反応サイクル中に K (570 nm), L₁ (520 nm), L₂ (520 nm), N (520 nm), O (600 nm) 中間体を形成することが明らかにされているが、その構造変化に関する情報は限られている。低温下での光誘起赤外差分分光法の実験結果から、K, L₁ 中間体において水分子の水素結合変化や移動が生じ、塩化物イオン周辺の環境が非極性に変化することで、その後に形成される中間体で塩化物イオンの輸送が行われるのではないかと推測された⁴¹⁾。

最近、著者らはハロロドプシンに対してレーザー閃光励起の時間分解赤外分光法を適用し、水分子の O-H 伸

縮振動の変化を解析し、水素結合を形成していない O-H 基をもつ水分子の状態が N, O 中間体の形成に伴って大きく変化することを明らかにした (Fig.4)⁴²⁾. 塩化物イオンは N → O 中間体の遷移の際にタンパク質外に放出され、O 中間体からハロロドプシンへと元に戻る際に内部に取り込まれるとされている. 著者らの研究から、塩化物イオンの動きに連動するようにタンパク質内部の水分子の水素結合構造もダイナミックに変化していることが明らかになった (Fig.4). 将来的には、水の O-H 伸縮振動のより幅広い振動数領域での計測を実現し、塩化物イオンと直接、相互作用する水分子の O-H 基や Thr 側鎖の O-H 基の振動変化を捉えることができれば、より詳細な塩化物イオン輸送の分子機構が明らかにされるものと思われる.

Fig.4 The schematic view of water dynamics revealed by time-resolved FTIR spectroscopy on *pharaonis* halorhodopsin (pHR). Close look of the X-ray crystal structure near the retinal chromophore (center).

5. 光開閉陽イオンチャネル - チャネルロドプシン -

チャネルロドプシンは緑藻のクラミドモナスの眼点から見つかった光受容タンパク質であり、陽イオン選択性や光応答電流特性の異なるチャネルロドプシン 1 とチャネルロドプシン 2 の 2 種類が存在する (Fig.5)^{7,8)}. ほ乳細胞等での電気生理応答が強いため、チャネルロドプシン 2 がオプトジェネティクスのツールとして、最初に利用され、その後も遺伝子改変などにより、よく開発されている. チャネルロドプシン 2 は all-trans 型レチナールを結合して、約 470 nm に吸収極大を示すため、青色光によって活性化される. その光反応は基本的にはバクテリオロドプシンやハロロドプシンと似た、サイクル反応を示すが、中間体への光照射によって副次的な光反応産物が生じることも知られている. 光反応中間体として、P₁ (500 nm), P₂ (390 nm), P₃ (520 nm), P₄ (480 nm) と呼ばれる中間体が存在する^{43,44)}. これらの中で、電気生理実験での光応答電流が観測される時間領域から、P₂ および P₃ 中間体が陽イオンを透過する活性化状態と考えられている⁴⁵⁾. P₄ 中間体は、時定数が約 20 秒程度と長寿命であるが、電気生理実験の結果から、陽イオンを透過

Fig.5 (a) Schematic illustrations of chimeras of channelrhodopsins with their photocurrents. (b) Light-induced difference spectra in the C=O stretching region of carboxylic acid side chains. (c) X-ray crystal structure of ChR5/2.

しない脱感作状態と考えられている. P₂ 中間体は吸収極大波長が 390 nm にあることから、レチナールのシッフ塩基は脱プロトン化していると判断できる. また、P₃ 中間体で 520 nm の可視領域に吸収を示すことから、再びシッフ塩基はプロトン化していると判断できる. しかしながら、レチナールの紫外・可視吸収スペクトルの変化からはタンパク質の構造変化の詳細について議論することは困難である.

2012 年にチャネルロドプシン 1 と 2 のキメラタンパク質の結晶構造¹³⁾ が報告される前に光誘起赤外分光法をチャネルロドプシン 2 に適用した研究がいくつか報告された^{43,46,47)}. まず、レチナールの光異性化に伴うタンパク質の大きな構造変化や Glu90 の水素結合環境の変化などが報告された⁴³⁾. さらに、Glu90 は P₃ 中間体で脱プロトン化して光開閉ゲートとしてはたらくという報告⁴⁶⁾ と、P₃ では脱プロトン化せずに、P₄ 中間体で脱プロトン化して脱感作にはたらくという報告⁴⁵⁾ があり、Glu90 のチャネルロドプシン 2 における役割について議論が分かれた. 著者らのグループではチャネルロドプシンのキメラタンパク質に対する定常的な光誘起赤外分光法とレーザー閃光励起による時間分解赤外分光法を適用した研究を行った⁴⁸⁾. その結果、キメラタンパク質では、Glu90 に対応する Glu129 の脱プロトン化のシグナル (1718 cm⁻¹ のバンド) が、チャネルロドプシン 1 の部分が大きいほど小さくなることを見いだした (Fig.5)⁴⁸⁾. また、共同研究者の電気生理実験によれば、チャネルロドプシン 1 の部分が大きいキメラタンパク質では脱感作状態がより小さくなることが報告されていた. これらのことから、少なくともキメラタンパク質では、Glu129 (チャネルロドプシン 2 での Glu90) の脱プロトン化の抑制が脱感作状態の抑制に重要な役割を果たしているのでは

ないかと推察された⁴⁸⁾。

これらの研究の他にも、光誘起赤外分光法を利用して、チャンネルロドプシンのキメラタンパク質内部での水分子を含めた水素結合構造の解析⁴⁹⁾がなされたり、レーザー閃光励起の時間分解赤外分光法により、レチナルのプロトン化シッフ塩基から Asp253 (キメラタンパク質の Asp292, バクテリオロドプシンの Asp212 に相当) へのプロトン移動という予想外の結果が報告⁴⁵⁾されたりした。これらの結果は、X線結晶構造解析からは推測しがたい構造情報や構造変化の情報を与えたものであり、微生物型ロドプシンの機能の違いを反映しているものと考えられる。

6. 結論

微生物型ロドプシンの医学研究における利用は、オプトジェネティクスの発展により、脳・神経科学のみならず様々な生理現象への応用へと展開されている。光開閉イオンチャンネル、光駆動イオンポンプ、光センサーと多様な機能を、7回膜貫通型ヘリックス構造とレチナル分子の光異性化で実現しており、機能の違いは微細な構造の差異によって生み出されていると考えられる。タンパク質の内部に存在する水分子も水素結合ネットワークやプロトン移動に関与することで、機能の違いに貢献しているのかもしれない。レーザー閃光励起の時間分解赤外分光法などの光誘起赤外差分分光法では、これらの微細な構造変化を明らかにすることができるため、X線結晶構造解析などの構造生物学的手法では得られない情報を与えるものである。

利益相反の開示

開示すべき利益相反なし。

参考文献

- 1) J.L. Spudich, O.A. Sineshchekov, E.G. Govorunova: Mechanism divergence in microbial rhodopsins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837: 546-552, 2014.
- 2) O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown, H. Kandori: Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem. Rev.*, 114: 126-163, 2014.
- 3) J.K. Lanyi: Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757: 1012-1018, 2006.
- 4) J.K. Lanyi: X-ray diffraction of bacteriorhodopsin photocycle intermediates. *Mol. Membr. Biol.*, 21: 143-150, 2004.
- 5) J.P. Klare, V.I. Gordeliy, J. Labahn, G. Buldt, H.J. Steinhoff, M. Engelhard: The archaeal sensory rhodopsin II/transducer complex: a model for transmembrane signal transfer. *FEBS Lett.*, 564: 219-224, 2004.
- 6) E. Pebay-Peyroula, R. Neutze, E.M. Landau: Lipidic cubic phase crystallization of bacteriorhodopsin and cryotrapping of intermediates: towards resolving a revolving photocycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1460: 119-132, 2000.
- 7) G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg: Channelrhodopsin -2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13940-13945, 2003.
- 8) G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A.M. Musti, E. Bamberg, P. Hegemann: Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296: 2395-2398, 2002.
- 9) K. Deisseroth: Optogenetics. *Nat. Methods*, 8: 26-29, 2011.
- 10) E.S. Boyden: A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light. *F1000 Biol. Rep.*, 3: 11, 2011.
- 11) L. Fenno, O. Yizhar, K. Deisseroth: The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.*, 34: 389-412, 2011.
- 12) J.G. Bernstein, E.S. Boyden: Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends Cogn. Sci.*, 15: 592-600, 2011.
- 13) H.E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A.D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, O. Nureki: Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482: 369-374, 2012.
- 14) T. Kouyama, S. Kanada, Y. Takeguchi, A. Narusawa, M. Murakami, K. Ihara: Crystal structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *J. Mol. Biol.*, 396: 564-579, 2010.
- 15) N. Enami, K. Yoshimura, M. Murakami, H. Okumura, K. Ihara, T. Kouyama: Crystal structures of archaerhodopsin-1 and -2: Common structural motif in archaeal light-driven proton pumps. *J. Mol. Biol.*, 358: 675-685, 2006.
- 16) M. Kolbe, H. Besir, L.O. Essen, D. Oesterhelt: Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science*, 288: 1390-1396, 2000.
- 17) H. Luecke, B. Schobert, H.T. Richter, J.P. Cartailler, J.K. Lanyi: Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 291: 899-911, 1999.
- 18) R. Henderson: The structure of bacteriorhodopsin and its relevance to other membrane proteins. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 33: 3-15, 1979.
- 19) G. Rummel, A. Hardmeyer, C. Widmer, M.L. Chiu, P. Nollert, K.P. Locher, I.I. Pedruzzi, E.M. Landau, J.P. Rosenbusch: Lipidic Cubic Phases: New matrices for the three-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.*, 121: 82-91, 1998.
- 20) F. Schotte, H.S. Cho, V.R. Kaila, H. Kamikubo, N. Dashdorj, E.R. Henry, T.J. Graber, R. Henning, M. Wulff, G. Hummer, M. Kataoka, P.A. Anfinrud: Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 19256-19261, 2012.
- 21) R. Efremov, V.I. Gordeliy, J. Heberle, G. Buldt: Time-resolved microspectroscopy on a single crystal of bacteriorhodopsin reveals lattice-induced differences in the photocycle kinetics. *Biophys. J.*, 91: 1441-1451, 2006.
- 22) H. Kandori: Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1460: 177-191, 2000.
- 23) J. Heberle: Proton transfer reactions across bacteriorhodopsin and along the membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1458: 135-147, 2000.

- 24) K. Gerwert: Molecular reaction mechanisms of proteins monitored by time-resolved FTIR-spectroscopy. *Biol. Chem.*, 380: 931-935, 1999.
- 25) F. Siebert: Infrared spectroscopy applied to biochemical and biological problems. *Methods. Enzymol.*, 246: 501-526, 1995.
- 26) K.J. Rothschild: FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24: 147-167, 1992.
- 27) A. Barth, C. Zscherp: What vibrations tell us about proteins. *Quart. Rev. Biophys.*, 35: 369-430, 2002.
- 28) A. Barth: Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767: 1073-1101, 2007.
- 29) A. Barth: The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 74: 141-173, 2000.
- 30) Y. Furutani, H. Kandori: Hydrogen-bonding changes of internal water molecules upon the actions of microbial rhodopsins studied by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837: 598-605, 2014.
- 31) F. Garczarek, K. Gerwert: Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy. *Nature*, 439: 109-112, 2006.
- 32) Y. Furutani, M. Shibata, H. Kandori: Strongly hydrogen-bonded water molecules in the Schiff base region of rhodopsins. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4: 661-666, 2005.
- 33) D. Oesterhelt, W. Stoekenius: Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.*, 233: 149-152, 1971.
- 34) V.A. Lorenz-Fonfria, Y. Furutani, H. Kandori: Active internal waters in the bacteriorhodopsin photocycle. A comparative study of the L and M intermediates at room and cryogenic temperatures by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 47: 4071-4081, 2008.
- 35) O. Beja, E.N. Spudich, J.L. Spudich, M. Leclerc, E.F. DeLong: Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 411: 786-789, 2001.
- 36) Y. Furutani, M. Shibata, H. Kandori: Strongly hydrogen-bonded water molecules in the Schiff base region of rhodopsins. *Photochem Photobiol Sci*, 4: 661-666, 2005.
- 37) Y. Furutani, H. Kandori: Internal water molecules of archaeal rhodopsins (Review). *Molecular membrane biology*, 19: 257-265, 2002.
- 38) G. Varo: Analogies between halorhodopsin and bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1460: 220-229, 2000.
- 39) F. Zhang, L.P. Wang, M. Brauner, J.F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P.G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth: Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446: 633-639, 2007.
- 40) J. Sasaki, L.S. Brown, Y.S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman, J.K. Lanyi: Conversion of bacteriorhodopsin into a chloride ion pump. *Science*, 269: 73-75, 1995.
- 41) M. Shibata, N. Muneda, T. Sasaki, K. Shimono, N. Kamo, M. Demura, H. Kandori: Hydrogen-bonding alterations of the protonated Schiff base and water molecule in the chloride pump of *Natronobacterium pharaonis*. *Biochemistry*, 44: 12279-12286, 2005.
- 42) 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: 2964-2969, 2012.
- 43) E. Ritter, K. Stehfest, A. Berndt, P. Hegemann, F.J. Bartl: Monitoring light-induced structural changes of Channelrhodopsin-2 by UV-visible and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 283: 35033-35041, 2008.
- 44) C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, E. Bamberg: Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *J. Mol. Biol.*, 375: 686-694, 2008.
- 45) V.A. Lorenz-Fonfria, T. Resler, N. Krause, M. Nack, M. Gossing, G. Fischer von Mollard, C. Bamann, E. Bamberg, R. Schlesinger, J. Heberle: Transient protonation changes in channelrhodopsin-2 and their relevance to channel gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: E1273-1281, 2013.
- 46) K. Eisenhauer, J. Kuhne, E. Ritter, A. Berndt, S. Wolf, E. Freier, F. Bartl, P. Hegemann, K. Gerwert: In channelrhodopsin -2 Glu-90 is crucial for ion selectivity and is deprotonated during the photocycle. *J. Biol. Chem.*, 287: 6904-6911, 2012.
- 47) I. Radu, C. Bamann, M. Nack, G. Nagel, E. Bamberg, J. Heberle: Conformational changes of channelrhodopsin-2. *J. Am. Chem. Soc.*, 131: 7313-7319, 2009.
- 48) A. Inaguma, H. Tsukamoto, H.E. Kato, T. Kimura, T. Ishizuka, S. Oishi, H. Yawo, O. Nureki, 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.
- 49) S. Ito, H.E. Kato, R. Taniguchi, T. Iwata, O. Nureki, H. Kandori: Water-containing hydrogen-bonding network in the active center of channelrhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 136: 3475-3482, 2014.

著者紹介

古谷 祐詞 (Yuji Furutani)

学歴：1999年3月 京都大学理学部卒業。
2001年3月 京都大学大学院理学研究科
生物科学専攻博士前期課程修了。2004
年3月同博士後期課程修了(博士(理学))。
職歴：2003年4月 日本学術振興会 特別
研究員(DC)。2004年4月 同特別研究員

(PD)。2006年4月 名古屋工業大学大学院工学研究科 助
手(2007年4月より助教)。2009年3月 自然科学研究機構
分子科学研究所 准教授。2009年4月 総合研究大学院大
学 准教授(兼務)。2011年10月～2015年3月 科学技術振
興機構 さきがけ研究員「光エネルギーと物質変換」領域(兼
務)。専門分野：光生物, 生物物理, 赤外分光法。所属学会：
日本生物物理学会, 分子科学会, 日本分光学会, 光化学
協会, 日本蛋白質科学会, 日本化学会, 日本物理学会。役職：
日本生物物理学会理事(2015年～2016年)。日本分光学会
中部支部幹事(2012年～)。受賞歴：2012年度分子科学研
究奨励森野基金, 第6回(2013年度)分子科学会奨励賞。