

高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析  
と分子制御への応用

領域番号：8101

令和元年度～令和5年度

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

（新学術領域研究（研究領域提案型））

研究成果報告書

令和7年5月  
領域代表者 岩田 想  
京都大学大学院医学研究科・教授

## はしがき

本領域では自由電子レーザーを用いたタンパク質結晶中の構造変化を化学結合の切れるより速く (fs スケール) でかつ原子分解能(Åスケール)で記述することができる高速分子動画法を活用し、生体分子の動的機構の解明を進めた。その結果、光応答性イオンチャンネル内でのイオンの動き、光回復酵素の損傷 DNA の修復反応、銅含有アミン酸化酵素の反応過程、光合成における光化学系 II における酸素発生機構、Mn イオンに結合した CO 分子のレーザーによる解離過程など、さまざま重要な生体分子の動的過程を高速分子動画として記録することに成功した。我々はこれらの分子動画を単に定性的な記述にとどめるだけでなく、計算科学や分光学の手法と組み合わせることにより、定量的・理論的に解析することを行った。この結果に基づき新規のたんぱく質を制御する化合物を合成することにも成功している。このように構造生物学、計算科学、タンパク質工学、ケミカルバイオロジーなどを駆使することにより、各種刺激によってスイッチできるタンパク質やタンパク質を制御できる物質を開発する道を切り開いた。

## 研究組織

領域代表者	岩田 想	(京都大学・大学院医学研究科・教授)
(総括班)		
研究代表者	岩田 想	(京都大学・大学院医学研究科・教授)
研究協力者	清中 茂樹	(名古屋大学・工学研究科・教授)
研究協力者	朴 三用	(横浜市立大学・生命医科学研究科・教授)
研究協力者	永野 真吾	(鳥取大学・工学研究科・教授)
研究協力者	南後 恵理子	(東北大学・多元物質科学研究所・教授)
研究協力者	山本 雅貴	(理化学研究所・放射光科学研究センター・部門長)
研究協力者	久保 稔	(兵庫県立大学・大学院理学研究科・教授)
研究協力者	宮下 治	(理化学研究所・計算科学研究センター・上級研究員)
(A01 岩田班)		
研究代表者	岩田 想	(京都大学・大学院医学研究科・教授)
研究分担者	野村 紀通	(京都大学・医学研究科・准教授)
研究分担者	近藤 美欧	(大阪大学・工学研究科・准教授)
研究分担者	志甫谷 渉	(東京大学・理学系研究科・助教)
研究分担者	草木迫司	(2019-2022 東京大学・理学系研究科・助教)

研究分担者 山下恵太郎 (2019-2020、東京大学・理学系研究科・客員共同研究員)

(A01 清中班)

研究代表者 清中 茂樹 (名古屋大学・工学研究科・教授)

研究分担者 古田 寿昭 (東邦大学・理学部・教授)

研究分担者 永澤 秀子 (岐阜薬科大学・薬化学研究室・教授)

(A01 朴班)

研究代表者 朴 三用 (横浜市立大学・生命医科学研究科・教授)

研究分担者 梅名 泰史 (名古屋大学・シンクロトン光研究センター・准教授)

研究分担者 別所 義隆 (理研 SPring-8 センター・客員研究員)

(A01 永野班)

研究代表者 永野 真吾 (鳥取大学・工学研究科・教授)

研究分担者 中津 亨 (和歌山県立医科大学・薬学部・教授)

研究分担者 溝端 栄一 (大阪大学・工学研究科・講師)

(B01 南後班)

研究代表者 南後 恵理子 (東北大学・多元物質科学研究所・教授)

研究分担者 清水 伸隆 (高エネ機構・物質構造科学研究所・教授)

研究分担者 大和田 成起 (JASRI・XFEL 利用研究推進室・研究員)

研究分担者 宮下 治 (2019、理化学研究所・計算科学研究センター・上級研究員)

研究分担者 庄司 光男 (2019、筑波大学・計算科学研究センター・助教)

研究分担者 篠田 恵子 (2019、東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教)

(B01 山本班)

研究代表者 山本 雅貴 (理化学研究所・放射光科学研究センター・部門長)

研究分担者 熊坂 崇 (JASRI・タンパク質結晶解析推進室・室長)

(B01 足立班、2019-20 のみ。代表者が特別推進研究を獲得したため廃止)

研究代表者 足立伸一 (高エネルギー加速器研究機構・理事)

研究分担者 片山哲夫 (高輝度光科学研究センター・主幹研究員)

(C01 久保班)

研究代表者 久保 稔 (兵庫県立大学・大学院理学研究科・教授)

研究分担者 木村 哲就 (神戸大学・理学研究科・講師)

研究分担者 古谷 祐詞 (名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授)

(C01 宮下班)

研究代表者 宮下 治 (理化学研究所・計算科学研究センター・上級研究員)

研究分担者 庄司 光男 (筑波大学・計算科学研究センター・教授)

研究分担者 篠田 恵子 (統計数理研究所・ものづくりデータ科学研究センター・特任助教)

公募研究

研究代表者 松尾 和哉 (京都工芸繊維大学・分子化学系・助教)

研究代表者 松井 敏高 (東北大学・多元物質科学研究所・准教授)

研究代表者 志甫谷 渉 (東京大学・理学系研究科生物科学専攻・助教)

研究代表者 片山 耕大 (名古屋工業大学・工学(系)研究科・准教授)

研究代表者 菅 倫寛 (岡山大学・異分野基礎科学研究所・教授)

研究代表者 保坂 俊彰 (理研・生命機能科学研究センター・技師)

研究代表者 島 扶美 (神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授)

研究代表者 鈴木 明大 (北海道大学・電子科学研究所・准教授)

研究代表者 田中 伊知朗 (茨城大学・理工学研究科(工学野)・教授)

研究代表者 林 重彦 (京都大学・理学研究科・教授)

研究代表者 杉本 宏 (理研・放射光科学研究センター・専任研究員)

研究代表者 櫻庭 俊 (量研機構・量子生命科学研究所・上席研究員)

研究代表者 山元 淳平 (大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授)

研究代表者 日野 智也 (鳥取大学・工学部・准教授)

研究代表者 村川 武志 (大阪医科薬科大学・医学部・助教)

研究代表者 下村 拓史 (生理学研究所・分子細胞生理研究領域・助教)

研究代表者 當舎 武彦 (兵庫県立大学・理学研究科・教授)

研究代表者 北尾 彰朗 (東京工業大学・生命理工学院・教授)

研究代表者 水野 操 (大阪大学・理学研究科・助教)

研究代表者 Basudev Maity (東京工業大学・生命理工学院・特任助教)

研究代表者 小野 純一 (早稲田大学・理工学術院総合研究所(理工学研究所)・次席研究員)

研究代表者 福田 昌弘 (東京大学 総合文化研究科・特任助教)

研究代表者 ロバートキャンベル (東京大学・大学院理学系研究科・教授)

研究代表者 島田 敦広 (岐阜大学・応用生物科学部・准教授)

研究代表者 片山 哲郎 (徳島大学・ポスト LED フォトニクス研究所・助教)

研究代表者 光武 亜代理 (明治大学・理工学部・准教授)

研究代表者 八木 清 (理研・開拓研究本部杉田研究室・専任研究員)

## 交付決定額

年度	合計	直接経費	間接経費
令和元年度	283,530,000 円	218,100,000 円	65,430,000 円
令和2年度	279,240,000 円	214,800,000 円	64,440,000 円
令和3年度	260,923,000 円	200,710,000 円	60,213,000 円
令和4年度	255,970,000 円	196,900,000 円	59,070,000 円
令和5年度	258,050,000 円	198,500,000 円	59,550,000 円
合計	1,337,713,000 円	1,029,010,000 円	308,703,000 円

## 研究発表

### 雑誌論文 (全て査読有)

#### A01 岩田班 計 101 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Chazan A, Das I, Fujiwara T, Murakoshi S, Rozenberg A, Molina-Márquez A, Sano FK, Tanaka T, Gómez-Villegas P, Larom S, Pushkarev A, Malakar P, Hasegawa M, Tsukamoto Y, Ishizuka T, Konno M, Nagata T, Mizuno Y, Katayama K, Abe-Yoshizumi R, Ruhman S, Inoue K, Kandori H, León R, \*Shihoya W, \*Yoshizawa S, \*Sheves M, \*Nureki O, \*Béjà O. “Phototrophy by antenna-containing rhodopsin pumps in aquatic environments” *Nature* 615: 535-540 (2023)
2. Kosugi K, Akatsuka C, Iwami H, Kondo M, Masaoka S. “Iron-Complex-Based Supramolecular Framework Catalyst for Visible-Light-Driven CO<sub>2</sub> Reduction” *J. Am. Chem. Soc.* 145(19): 10451-10457 (2023)
3. Asami J, Kimura KT, Fujita-Fujiharu Y, Ishida H, Zhang Z, Nomura Y, Liu K, Uemura T, Sato Y, Ono M, Yamamoto M, Noda T, Shigematsu H, Drew D, Iwata S, Shimizu T, \*Nomura N, \*Ohto U. “Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP” *Nature* 606(7916): 1021-1026 (2022)
4. Kishi KE, Kim YS, Fukuda M, Inoue M, Kusakizako T, Wang PY, Ramakrishnan C, Byrne EFX, Thadhani E, Paggi JM, Matsui TE, Yamashita K, Nagata T, Konno M, Quirin S, Lo M, Benster T, Uemura T, Liu K, Shibata M, Nomura N, Iwata S, Nureki O, Dror RO, Inoue K, \*Deisseroth K, \*Kato HE. “Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine” *Cell* 185(4): 672-689 (2022)
5. Oda K, Nomura T, Nakane T, Yamashita K, Inoue K, Ito S, Vierock J, Hirata K, Maturana AD, Katayama K, Ikuta T, Ishigami I, Izume T, Umeda R, Eguma R, Oishi S, Kasuya G, Kato T, Kusakizako T, Shihoya W, Shimada H, Takatsuji T, Takemoto M, Taniguchi R, Tomita A, Nakamura R, Fukuda M, Miyauchi H, Lee Y, Nango E, Tanaka R, Tanaka T, Sugahara M, Kimura T, Shimamura T, Fujiwara T, Yamanaka Y, Owada S, Joti Y, Tono K, Ishitani R, Hayashi S, Kandori H, Hegemann P, Iwata S, \*Kubo M, \*Nishizawa T, \*Nureki O. “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in

channelrhodopsin” *eLife* 10: e62389 (2021)

A01 清中班 計 13 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Araya T, Matsuba Y, Suzuki H, Doura T, Nuemket N, Nango E, Yamamoto M, Im D, Asada H, \*Kiyonaka S, \*Iwata S. “Crystal Structure Reveals the Binding Mode and Selectivity of a Photoswitchable Ligand for the Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 695: 149393 (2024)
2. Ojima K, Kakegawa W, Yamasaki T, Miura Y, Itoh M, Michibata Y, Kubota R, Doura T, Miura E, Nonaka H, Mizuno S, Takahashi S, Yuzaki M, \*Hamachi I, \*Kiyonaka S. “Coordination chemogenetics for activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue” *Nat. Commun.* 13(1): 3167 (2022)
3. Kawai K, \*Hirayama T, Imai H, Murakami, T, Inden M, Hozumi I, Nagasawa H. “Molecular Imaging of Labile Heme in Living Cells Using a Small Molecule Fluorescent Probe” *J. Am. Chem. Soc.* 144(9): 3793 (2022)
4. Ojima K, Shiraiwa K, Soga K, Doura T, Takato M, Komatsu K, Yuzaki M, \*Hamachi I, \*Kiyonaka S. “Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking” *Nat. Commun.* 12(1): 831 (2021)
5. Suzuki AZ, Sakano T, Sasaki H, Watahiki R, Sone M, Horikawa K, \*Furuta T. “Design and synthesis of gene-directed caged cyclic nucleotides exhibiting cell type selectivity” *Chem. Commun. in press.*

A01 朴班 計 21 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Asami J, J Park JH, Nomura Y, Kobayashi C, Mifune J, Ishimoto N, Uemura T, Liu K, Sato Y, Zhang Z, Muramatsu M, Wakita T, Drew D, Iwata S, Shimizu T, \*Watahi K, \*Park SY, \*Nomura N, \*Ohto U “Structural basis of hepatitis B virus receptor binding” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3: 447-454 (2024)
2. Ang AKR, Umena Y, Sato-Tomita A, Shibayama N, Happo N, Marumi R, Yamamoto Y, Kimura K, Kawamura N, Takano Y, Matsushita T, Sasaki YC, Shen JR, Hayashi K. “Development of serial X-ray fluorescence holography for radiation-sensitive protein crystals” *J. Synchrotron. Radiat.* 30: 368–378 (2023)
3. \*Maestre-Reyna M, Wang PH, Nango E, Hosokawa Y, Saft M, Furrer A, Yang CH, Gusti Ngurah Putu EP, Wu WJ, Emmerich HJ, Caramello N, Franz-Badur S, Yang C, Engilberge S, Wranik M, Glover HL, Weinert T, Wu HY, Lee CC, Huang WC, Huang KF, Chang YK, Liao JH, Weng JH, Gad W, Chang CW, Pang AH, Yang KC, Lin WT, Chang YC, Gashi D, Beale E, Ozerov D, Nass K, Knopp G, Johnson PJM, Cirelli C, Milne C, Bacellar C, Sugahara M, Owada S, Joti Y, Yamashita A, Tanaka R, Tanaka T, Luo F, Tono K, Zarzycka W, Müller P, Alahmad MA, Bezold F, Fuchs V, Gnau P, Kiontke S, Korf L, Reithofer V, Rosner CJ, Seiler EM, Watad M, Werel L, Spadaccini R, Yamamoto J, Iwata S, Zhong D, Standfuss J, Royant A, \*Bessho Y, \*Essen LO, \*Tsai MD. “Visualizing the DNA repair process by a photolyase at atomic resolution” *Science* 382(6674): eadd7795 (2023)
4. Park JH, Iwamoto M, Yun JH, Uchikubo-Kamo T, Son D, Jin Z, Yoshida H, Ohki M, Ishimoto N, Mizutani K, Oshima M, Muramatsu M, Wakita T, Shirouzu M, Liu K, Uemura T, Nomura N, Iwata S, Watahi K, Tame JRH, Nishizawa T, \*Lee W, \*Park SY “Structural insights into the HBV receptor and bile acid transporter NTCP” *Nature* 606(7916): 1027-1031 (2022)
5. Yun JH, Li X, Yue J, Park JH, Jin Z, Li C, Hu H, Shi Y, Pandey S, Carbajo S, Boutet S, Hunter MS, Liang M, Sierra RG, Lane TJ, Zhou L, Weierstall U, Zatsepin NA, Ohki M, Tame JRH, Park SY, Spence JCH, Zhang W, \*Schmidt M, \*Lee W, \*Liu H. “Early-stage dynamics of chloride ion-pumping rhodopsin revealed by a femtosecond X-ray laser” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 118(13): e2020486118 (2021)

A01 永野班 計 16 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Pan D, Oyama R, Sato T, Nakane T, Mizunuma R, Matsuoka K, Joti Y, Tono K, Nango E, Iwata S, Nakatsu T, \*Kato H. “Crystal structure of CmABCB1 multi-drug exporter in lipidic mesophase revealed by LCP-SFX” *IUCrJ* 9(1): 134-145 (2022)
2. Nagata R, Suemune H, Kobayashi M, Shinada T, Shin-ya K, Nishiyama M, Hino T, Sato Y, \*Kuzuyama T, \*Nagano S. “Structural Basis for the Prenylation Reaction of Carbazole-Containing Natural Products Catalyzed by Squalene Synthase-Like Enzymes” *Angew. Chem. Int. Ed.* 61(20): e202117430 (2022)
3. \*Fukuda W, Osaki M, Yasuda Y, Hidese R, Higuchi T, Umezawa N, Fujiwara S, \*Mizohata E. “Substrate Specificity of an Aminopropyltransferase and the Biosynthesis Pathway of Polyamines in the Hyperthermophilic Crenarchaeon *Pyrobaculum calidifontis*” *Catalysts*. 12(5):567 (2022)
4. Fujiyama K, Kato N, Re S, Kinugasa K, Watanabe K, Takita R, Nogawa T, Hino T, Osada H, Sugita Y, Takahashi S, Nagano S. “Molecular basis for two stereoselective Diels-Alderses that produce decalin skeletons.” *Angew. Chem. Int. Ed.* (First Published: 13 June 2021)
5. Hidese R, Toyoda M, Yoshino KI, Fukuda W, Wihardja GA, Kimura S, Fujita J, Niitsu M, Oshima T, Imanaka T, \*Mizohata E, \*Fujiwara S. “The C-terminal flexible region of branched-chain polyamine synthase facilitates substrate specificity and catalysis” *FEBS J.* 286(19):3926 (2019)

B01 南後班 計 75 件 (以下 6 件を抜粋)

1. Wolff AM, \*Nango E, Young ID, Brewster AS, Kubo M, Nomura T, Sugahara M, Owada S, Barad BA, Ito K, Bhowmick A, Carbajo S, Hino T, Holton JM, Im D, O’Riordan LJ, Tanaka T, Tanaka R, Sierra RG, Yumoto F, Tono K, Iwata S, Sauter NK, Fraser JS, \*Thompson MC. “Mapping protein dynamics at high spatial resolution with temperature-jump X-ray crystallography” *Nat. Chem.* 15: 1549-1558 (2023)
2. Gruhl T, Weinert T, Rodrigues MJ, Milne CJ, Ortolani G, Nass K, Nango E, Sen S, Johnson PJM, Cirelli C, Furrer A, Mous S, Skopintsev P, James D, Dworkowski F, Bâth P, Kekilli D, Ozerov D, Tanaka R, Glover H, Bacellar C, Brünle S, Casadei CM, Diethelm AD, Gashi D, Gotthard G, Guixà-González R, Joti Y, Kabanova V, Knopp G, Lesca E, Ma P, Martiel I, Mühle J, Owada S, Pamula F, Sarabi D, Tejero O, Tsai CJ, Varma N, Wach A, Boutet S, Tono K, Nogly P, Deupi X, Iwata S, Neutze R, Standfuss J, \*Schertler G, \*Panneels V. “Ultrafast structural changes direct the first molecular events of vision” *Nature* 615: 939-944 (2023)
3. Fadini A, Hutchison CDM, Morozov D, Chang J, Maghlaoui K, Perrett S, Luo F, Kho JCX, Romei MG, Morgan RML, Orr CM, Cordon-Preciado V, Fujiwara T, Nuemket N, Tosha T, Tanaka R, Owada S, Tono K., Iwata S, Boxer SG, Groenhof G, \*Nango E, van \*Thor JJ. “Serial Femtosecond Crystallography Reveals that Photoactivation in a Fluorescent Protein Proceeds via the Hula Twist Mechanism” *J. Am. Chem. Soc.* 145: 15796-15808 (2023)
4. Hosaka T, Nomura T, Kubo M, Nakane T, Fangjia L, Sekine SI, Ito T, Murayama K, Ihara K, Ehara H, Kashiwagi K, Katsura K, Akasaka R, Hisano T, Tanaka T, Tanaka R, Arima T, Yamashita A, Sugahara M, Naitow H, Matsuura Y, Yoshizawa S, Tono K, Owada S, Nureki O, Kimura-Someya T, Iwata S, \*Nango E, \*Shirouzu M. “Conformational alterations in unidirectional ion transport of a light-driven chloride pump revealed using X-ray free electron lasers” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119(9): e2117433119 (2022)
5. Oda K, Nomura T, Nakane T, Yamashita K, Inoue K, Ito S, Vierock J, Hirata K, Maturana AD, Katayama K, Ikuta T, Ishigami I, Izume T, Umeda R, Eguma R, Oishi S, Kasuya G, Kato T, Kusakizako T, Shihoya W, Shimada H, Takatsuji T, Takemoto M, Taniguchi R, Tomita A, Nakamura R, Fukuda M, Miyauchi

H, Lee Y, Nango E, Tanaka R, Tanaka T, Sugahara M, Kimura T, Shimamura T, Fujiwara T, Yamanaka Y, Owada S, Joti Y, Tono K, Ishitani R, Hayashi S, Kandori H, Hegemann P, Iwata S, \*Kubo M, \*Nishizawa T, \*Nureki O. “Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin” *eLife* 10: e62389 (2021)

6. Shimazu Y, \*Tono K, Tanaka T, Yamanaka Y, Nakane T, Mori C, Terakado-Kimura K, Fujiwara T, Sugahara M, Tanaka R, Doak RB, Shimamura T, Iwata S, \*Nango E, Yabashi M. “High-viscosity sample-injection device for serial femtosecond crystallography at atmospheric pressure” *J. Appl. Crystallogr.* 52: 1280-1288 (2019)

**B01 足立班 計 24 件 (以下 2 件を抜粋)**

1. Kim JG, Nozawa S, Kim H, Choi EH, Sato T, Kim TW, Kim KH, Ki H, Kim J, Choi M, Lee Y, Heo J, Oang KY, Ichiyangi K, Fukaya R, Lee JH, Park J, Eom I, Chun SH, Kim S, Kim M, Katayama T, Togashi T, Owada S, Yabashi M, Lee SJ, Lee S, Ahn CW, Ahn DS, Moon J, Choi S, Kim J, Joo T, Kim J, \*Adachi S, Ihee H. “Mapping the emergence of molecular vibrations mediating bond formation” *Nature* 582: 520 (2020)
2. \*Katayama T, Northey T, Gawelda W, Milne C J, Vankó G, Lima F A, Bohinc R, Németh Z, Nozawa S, Sato T, Khakhulin D, Szlachetko J, Togashi T, Owada S, Adachi S, Bressler C, Yabashi M, and \*Penfold TJ. “Tracking multiple components of a nuclear wavepacket in photoexcited Cu(I)-phenanthroline complex using ultrafast X-ray spectroscopy” *Nature Comm.* 10: 3606 (2019)

**B01 山本班 計 26 件 (以下 5 件を抜粋)**

1. \*Bokhove M, Kawamura T, Okumura H, Goto S, Kawano Y, Werner S, Jarczowski F, Klimyuk V, Saito A, \*Kumasaka T. “The structure of the rat vitamin B<sub>12</sub> transporter TC and its complex with glutathionylcobalamin” *J. Biol. Chem.* 300(5): 107289 (2024)
2. Asami J, Kimura K T, Fujita-Fujiharu Y, Ishida H, Zhang Z, Nomura Y, Liu K, Uemura T, Sato Y, Ono M, Yamamoto M, Noda T, Shigematsu H, Drew D, Iwata S, Shimizu T, \*Nomura N, \*Ohto U. “Structure of the bile acid transporter and HBV receptor NTCP” *Nature* 606(7916): 1021 (2022)
3. Kwon H, Basran J, Pathak C, Hussain M, Freeman S L, Fielding A J, Bailey A J, Stefanou N, Sparkes H A, Tosha T, Yamashita K, Hirata K, Murakami H, Ueno G, Ago H, Tono K, Yamamoto M, Sawai H, Shiro Y, Sugimoto H, \*Raven E L, \*Moody PCE. “XFEL Crystal Structures of Peroxidase Compound II” *Angew. Chem. Int. Ed.* 60(26): 14578 (2021)
4. Nomura T, Kimura T, Kanematsu Y, Yamada D, Yamashita K, Hirata K, Ueno G, Murakami H, Hisano T, Yamagiwa R, Takeda H, Gopalasingam C, Kousaka R, Yanagisawa S, Shoji O, Kumasaka T, Yamamoto M, Takano Y, Sugimoto H, Tosha T, Kubo M, \*Shiro Y. “Short-lived intermediate in N(2)O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118(21): e2101481118 (2021)
5. Baba S, Shimada A, Mizuno N, Baba J, Ago H, Yamamoto M, \*Kumasaka T. “A temperature-controlled cold-gas humidifier and its application to protein crystals with the humid-air and glue-coating method” *J. Appl. Crystallogr.* 52(Pt.4): 699 (2019)

**C01 久保班 計 27 件 (以下 5 件を抜粋)**

1. Li H, Nakajima Y, Nango E, Owada S, Yamada D, Hashimoto K, Luo F, Tanaka R, Akita F, Kato K, Kang J, Saitoh Y, Kishi S, Yu H, Matsubara N, Fujii H, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Kimura T, Thao TN, Yonekura S, Yu L, Tosha T, Tono K, Joti Y, Hatsui T, Yabashi M, Kubo M, Iwata S, Isobe S, Yamaguchi I K, \*Suga M, \*Shen JR. “Oxygen-evolving photosystem II structures during S1-S2-S3 transitions” *Nature* 626(7999): 670 (2024)

2. Wolff AM, \*Nango E, Young ID, Brewster AS, Kubo M, Nomura T, Sugahara M, Owada S, Barad BA, Ito K, Bhowmick A, Carbajo S, Hino T, Holton JM, Im D, O'Riordan LJ, Tanaka T, Tanaka R, Sierra RG, Yumoto F, Tono K, Iwata S, Sauter NK, Fraser JS, \*Thompson MC. "Mapping protein dynamics at high spatial resolution with temperature-jump X-ray crystallography" *Nat. Chem.* 15: 1549-1558 (2023)
3. Ochiai S, Ichikawa Y, Tomida S, \*Furutani Y. "Covalent Bond between Lys-255 Residue and the Main Chain is Responsible for Stable Retinal Chromophore Binding and Sodium-Pumping Activity of Krokobacter Rhodopsin 2" *Biochemistry* 62(12): 1849-1857 (2023)
4. Nomura T, Kimura T, Kanematsu Y, Yamada D, Yamashita K, Hirata K, Ueno G, Murakami H, Hisano T, Yamagiwa R, Takeda H, Gopalasingam C, Kousaka R, Yanagisawa S, Shoji O, Kumasaka T, Yamamoto M, Takano Y, Sugimoto H, \*Tosha T, \*Kubo M, \*Shiro Y. "Short-lived intermediate in N<sub>2</sub>O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118(21): e2101481118 (2021)
5. Oda K, Nomura T, Nakane T, Yamashita K, Inoue K, Ito S, Vierock J, Hirata K, Maturana AD, Katayama K, Ikuta T, Ishigami I, Izume T, Umeda R, Eguma R, Oishi S, Kasuya G, Kato T, Kusakizako T, Shihoya W, Shimada H, Takatsuji T, Takemoto M, Taniguchi R, Tomita A, Nakamura R, Fukuda M, Miyauchi H, Lee Y, Nango E, Tanaka R, Tanaka T, Sugahara M, Kimura T, Shimamura T, Fujiwara T, Yamanaka Y, Owada S, Joti Y, Tono K, Ishitani R, Hayashi S, Kandori H, Hegemann P, Iwata S, \*Kubo M, \*Nishizawa T, \*Nureki O. "Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin" *eLife* 10: e62389 (2021)

#### C01 宮下班 計 33 件 (以下 5 件を抜粋)

1. Zhao W, \*Miyashita O, Nakano M, \*Tama F. "Structure determination using high-order spatial correlations in single-particle X-ray scattering." *IUCrJ* 11: 92-108 (2024)
2. \*Miyashita O, \*Tama F. "Advancing cryo-electron microscopy data analysis through accelerated simulation-based flexible fitting approaches." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 82: 102653 (2023)
3. Shinoda K, \*Yokojima S, Fukaminato T, Nakamura S. "Determining Factor of the Quantum Yield of the Cyclization Reaction via Triplet States for Dye-Attached Diarylethene" *J. Phys. Chem. A* 11: 5895 (2021)
4. Tiwari SP, \*Tama F, \*Miyashita O. "Protocol for Retrieving Three-Dimensional Biological Shapes for a Few XFEL Single-Particle Diffraction Patterns." *J. Chem. Inf. Model.* 61: 4108-4119 (2021)
5. \*Mishima K, \*Shoji M, Umena Y, Boero M, Shigeta Y. "Role of the Propionic Acid Side-Chain of C-Phycocyanin Chromophores in the Excited States for the Photosynthesis Process" *Bull. Chem. Soc. Japan* 93(12): 1509-1519 (2020)

#### A01 公募班 計 88 件 (以下 2 件を抜粋)

1. \*Maestre-Reyna M, Wang P.-H, Nango E, Hosokawa Y, Saft M, Furrer A, Yang C.-H, Gusti Ngurah Putu EP, Wu W.-J, Emmerich H.-J, Caramello N, Franz-Badur S, Yang C, Engilberge S, Wranik M, Glover HL, Weinert T, Wu H.-Y, Lee C.-C, Huang W.-C, Huang K.-F, Chang Y.-K, Liao J.-H, Weng J.-H, Gad W, Chang C.-W, Pang AH, Yang K.-C, Lin W.-T, Chang Y.-C, Gashi D, Beale E, Ozerov D, Nass K, Knopp G, Johnson PJM, Cirelli C, Milne C, Bacellar C, Sugahara M, Owada S, Joti Y, Yamashita A, Tanaka R, Tanaka T, Luo F, Tono K, Zarzycka W, Müller P, Alahmad MA, Bezold F, Fuchs V, Gnau P, Kiontke S, Korf L, Reithofer V, Rosner CJ, Seiler EM, Watad M, Werel L, Spadaccini R, Yamamoto J, Iwata S, Zhong D, Standfuss J, Royant A, \*Bessho Y, \*Essen L.-O, \*Tsai M.-D. "Visualizing the DNA repair process by a photolyase at atomic resolution" *Science* 382: 6674 (2023)

- Li H, Nakajima Y, Nango E, Owada S, Yamada D, Hashimoto K, Fangjia L, Tanaka R, Akita F, Kato K, Kang J, Saitoh Y, Kishi S, Yu H, Matsubara N, Fujii H, Sugahara M, Suzuki M, Masuda T, Kimura T, Thao TN, Yonekura S, Yu LJ, Toshi T, Tono K, Joti Y, Hatsui T, Yabashi M, Kubo M, Iwata S, Isobe H, Yamaguchi K, \*Suga M and \*Shen JR. “Oxygen-evolving photosystem II structures during S<sub>1</sub>-S<sub>2</sub>-S<sub>3</sub> transitions” *Nature*, 626, 670-677 (2024).

#### B01 公募班 計 7 件 (以下 1 件を抜粋)

- B. Maity, M. Shoji, F. Luo, T. Nakane, S. Abe, S. Owada, J. Kang, K. Tono, R. Tanaka, T. T. Pham, M. Kojima, Y. Hishikawa, J. Tanaka, J. Tian, H. Noya, Y. Nakasuji, A. Asanuma, X. Yao, S. Iwata, Y. Shigeta, E. Nango, T. Ueno. “Real-time observation of a metal complex-driven reaction intermediate using a porous protein crystal and serial femtosecond crystallography.” *Nat. Commun. in press* (2024)

#### C01 公募班 計 60 件 (以下 2 件を抜粋)

- Nakai H, Takemura T, Ono J, Nishimura Y, “Quantum-Mechanical Molecular Dynamics Simulations on Secondary Proton Transfer in Bacteriorhodopsin Using Realistic Models”, *The Journal of Physical Chemistry B*, 125,10947~10963(2021)
- Otaki H, Ishiuchi S, Fujii M, Sugita Y, \*Yagi K, “Similarity scores of vibrational spectra reveal the atomistic structure of pentapeptides in multiple basins” *Phys. Chem. Chem. Phys.* 26:9906 (2024)

#### 学会発表

計画研究班：354 件(招待講演、一般口頭講演、ポスター発表)

公募班：211 件(招待講演、一般口頭講演、ポスター発表)

以下に 36 件を抜粋

##### 1. Nobutaka Shimizu

Structural state estimation of biological macromolecules in solution using BioSAXS

蛋白研セミナー：Frontier of Dynamic Structural Biology, (2022, 10)

##### 2. Nobutaka Shimizu, Keiko Yatabe, Masatsuyo Takahashi, Yasuko Nagatani

Photon Factory の BioSAXS 測定解析システムの現状

第 36 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, (2023, 1)

##### 3. Nobutaka Shimizu, Kento Yonezawa, Yasuko Nagatani, Keiko Yatabe, Masatsuyo Takahashi

BioSAXS measurement and analysis system at the Photon Factory

Asia Oceania International Conference on Synchrotron Radiation Instruments 2022, (2022, 11)

##### 4. Nobutaka Shimizu, Hideki Takagi, Yasuko Nagatani, Takeharu Mori, Keiko Yatabe, Masatsuyo Takahashi, Noriyuki Igarashi

Upgrade of BioSAXS measurement system at the Photon Factory

第 60 回日本生物物理学会年会, (2022, 9)

##### 5. チャンフズイ, 畑 宏明, 中矢 光, 北尾彰朗

Benchmarking the free energy calculation of PaCS-MD/MSM

第 21 回日本蛋白質科学会年会, (2021, 6)

##### 6. 平悠太, Duy Tran, 北尾彰朗

DNA binding mechanisms of the p53 C-terminal domain elucidated by MD simulation

- 第 58 回日本生物物理学会年会, ( 2020 , 9 )
7. Sobeh Mohamed Marzouk、北尾彰朗  
Investigating the dissociation process of DBD-p53/DNA complex by PaCS-MD and MSM 第 58 回日本生物物理学会年会, ( 2020 , 9 )
8. 宮澤佳希、Phuoc Duy Tran、竹村和浩、北尾彰朗  
PaCS-MD/MSM を用いたタンパク質複合体の速度定数評価(Kinetic rate evaluation for protein complexes by PaCS-MD/MSM)  
第 58 回日本生物物理学会年会, ( 2020 , 9 )
9. 竹村和浩、北尾彰朗  
Unguided Binding MD of Protein-Protein Complexes by PPI-ColDock  
第 58 回日本生物物理学会年会, ( 2020 , 9 )
10. 宮澤佳希、Duy Phuoc Tran、竹村和浩、北尾彰朗  
Protein-protein complex dissociation simulated by Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics  
第 20 回日本蛋白質科学会年会, ( 2020 , 7 )
11. Tran P. Duy、Akio Kitao  
Simulating the association/dissociation process of flexible protein complexes  
第 20 回日本蛋白質科学会年会, ( 2020 , 7 )
12. 竹村和浩、北尾彰朗  
Unguided Binding MD of Protein-Protein Complexes by PPI-ColDock  
第 20 回日本蛋白質科学会年会, ( 2020 , 7 )
13. Wijaya Tegar Nurwahyu、北尾彰朗  
Dynamics of Close-Open State of *Candida antarctica* Lipase B Obtained by Parallel Cascade Molecular Dynamics Simulation and The Markov State Model  
第 10 回日本生物物理学会関東支部会, ( 2021 , 3 )
14. 溝端栄一  
銅含有亜硝酸還元酵素の動的結晶構造解析  
第 93 回 日本生化学会大会, ( 2020 , 9 )
15. Eiichi Mizohata  
Damage-free protein observation and structure determination using X-ray free electron laser  
Pacifichem2020, ( 2021 , 12 )
16. Kento Yonezawa, Masatuyo Takahashi, Keishi Oyama, Keiko Yatabe, Yasuko Nagatani, Nobutaka Shimizu  
Development of software for automatic processing of matrix data measured with SEC-SAXS/UV-Vis. spectroscopy  
第 59 回日本生物物理学会年会, ( 2021 , 11 )
17. N. Shimizu, H. Takagi, Y. Nagatani, K. Yonezawa, T. Mori, K. Yatabe, M. Takahashi, K. Oyama, N. Igarashi  
Small-angle X-ray scattering beamlines at the photon factory  
IUCr 2021 - XXV General Assembly and Congress of the International Union of Crystallography, ( 2021 , 8 )
18. 清水伸隆、高木秀彰、永谷康子、米澤健人、大田浩正、森丈晴、谷田部景子、高橋

- 正剛、西條慎也、鈴木文俊、羽方望、五十嵐教之  
Photon Factory の小角散乱ビームラインの現状  
第 34 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, ( 2021 , 1 )
19. Kento Yonezawa, Ayako Furukawa, Naruhiko Adachi, Toshiya Senda, Nobutaka Shimizu, Yoshifumi Nishimura  
Recent hybrid methods approach utilizing Biological Small Angle X-ray Scattering at the Photon Factory  
第 58 回日本生物物理学会年会, ( 2020 , 9 )
20. Nobutaka Shimizu, Kento Yonezawa, Masatsuyo Takahashi, Keiko Yatabe, Yasuko Nagatani  
Current Status of BioSAXS at the Photon Factory  
第 58 回日本生物物理学会年会, ( 2020 , 9 )
21. K. Yonezawa, M. Takahashi, K. Yatabe, Y. Nagatani, Y. Hayashi, S. Amano, H. Kamikubo, N. Shimizu  
Recent Progress Of BioSAXS Equipment For Complex Molecular Systems At The Photon Factory  
第 20 回日本タンパク質科学学会年会, ( 2020 , 7 )
22. 清水伸隆  
SEC-SAXS による分子間相互作用測定解析システム  
第 33 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, ( 2020 , 1 )
23. 米澤健人、林有吾、吉田桂人、天野真治、岡部龍二、清水伸隆、上久保裕生  
連続滴定 X 線溶液散乱測定を利用した分子複合系における多成分平衡状態の解析  
第 33 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, ( 2020 , 1 )
24. Shimizu, Nobutaka; Yonezawa, Kento; Takahashi, Masatuyo; Yatabe, Keiko, Nagatani, Yasuko  
BioSAXS experiment at the Photon Factory  
International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, ( 2019 , 10 )
25. Nobutaka Shimizu, Kento Yonezawa, Masatsuyo Takahashi, Keiko Yatabe, Yasuko Nagatani  
Progress of Biological Small-Angle X-ray Scattering at the Photon Factory  
日本生物物理学会, ( 2019 , 9 )
26. 久保稔  
XFEL 結晶構造解析と振動分光法を用いたタンパク質の動的精密構造解析  
鳥取大学 GSC セミナー, ( 2019 , 9 )
27. 末宗周憲、日野智也、永野真吾  
アナモックス菌のラダラン脂質生合成の全容解明に向けた研究  
第 3 回生合成リデザイン若手シンポジウム, ( 2019 , 8 )
28. 上垣哲心、末宗周憲、日野智也、永野真吾  
ラダラン脂質生合成アシル ACP 中間体の探索に向けた抗 ACP 抗体の作製  
第 92 回日本生化学会大会, ( 2019 , 9 )
29. 安田早希、藤山敬介、日野智也、水谷正治、永野真吾  
トマチン 16 位水酸化酵素の X 線結晶構造解析  
令和元年度結晶学会, ( 2019 , 11 )

30. 藤山 敬介, 畑田 珠希, 日野 智也, 水谷 正治, 永野 真吾  
結晶構造に基づいた CYP90B1 によるステロール C-22 位水酸化の立体選択性の改変  
植物化学調節学会第 54 回大会, (2019, 11)
31. 清中 茂樹  
New chemogenetic approaches for artificially controlling neurotransmitter receptor  
function in neuronal system  
10th RSC-CSJ joint symposium -Chemistry for complex biological systems-, (2019, 9)
32. 清中 茂樹  
グルタミン酸受容体の精密動態を明らかにするためのケミカルラベル化法  
第 92 回日本生化学会大会, (2019, 9)
33. 清中 茂樹  
神経伝達物質受容体機能を解き明かすためのケミカルバイオロジー新技術  
第 72 回日本薬理学会西南部会 (次世代薬理学セミナー), (2019, 11)
34. 清中 茂樹  
Coordination chemogenetics, a new technique for allosteric regulation of membrane  
receptors  
The 50th NIPS International Symposium “MIRACLES” in Cardiovascular Physiology,  
(2019, 12)
35. 溝端栄一  
X 線自由電子レーザーを応用したタンパク質の動的結晶構造解析  
日本プロテオーム学会 2019 年大会 第 70 回日本電気泳動学会総会, (2019, 7)
36. Osamu Miyashita  
Hybrid Approach for Structural Biology: Simulation and Experimental Data  
CBI Society Meeting, (2019, 10)

## 書籍

合計 21 件 (計画班及び公募班) 以下 12 件を抜粋

1. 生体の科学 特集「高速分子動画：動的構造からタンパク質分子制御へ」, 金原一  
郎記念医学医療振興財団 (2024). [A01 岩田班、清中班、B01 南後班、山本班、  
C01 久保班、宮下班他]
2. Nomura N, Nomura Y, Sato Y and \*Iwata S. “The Intervening Removable Affinity Tag  
(iRAT) System for the Production of Recombinant Antibody Fragments” *Methods Mol  
Biol.* 2247; 77-103(2021) “Multiprotein Complexes”, Humana Press. [A01 岩田班]
3. Tsukamoto, H. and Furutani, Y. “Optogenetic Modulation of Ion Channels by  
Photoreceptive Proteins” *Optogenetics. Advances in Experimental Medicine and Biology*,  
Springer Nature, Vol. 1293, 73-88(2021). [C01 久保班]
4. 山下恵太郎, 溝端栄一. X 線結晶解析による新規構造の解明. 膜タンパク質工学ハン  
ドブック (津本浩平 監修, エヌ・ティー・エス) (2020), p.27-33 [A01 永野班]
5. 溝端栄一, 久保稔 第 1 編 第 1 章 “X 線自由電子レーザーによる膜タンパク質の構  
造解析” 膜タンパク質工学ハンドブック, エヌ・ティー・エス 11-15 (2020). [A01  
永野班, C01 久保班]
6. 庄司光男, フリーソフトで始める分子モデリング, Amazon Kindle direct publishing  
(電子書籍), ASIN: B087Q6PCDB, (2020) [C01 宮下班]

7. 福本恵紀、野澤俊介、足立伸一著、編集、「X線分光-放射光の基礎から時間分解計測まで-」(化学の要点シリーズ)日本化学会、共立出版(2019) [B01 足立班]
8. 竹中章郎、熊坂崇、近藤次郎、角南智子、茶竹俊行、森下えら、“生体高分子結晶のX線構造解析: 一実践手法と基礎理論一”, 丸善出版, 2022年 [B01 山本班]
9. 久保稔, 山田大智 第1章 第6節 ラマン分光法の構造生物学的利用. タンパク質の構造解析手法と *In silico* スクリーニングの応用事例, 技術情報協会, 51-61 (2023). [C01 久保班]
10. 久保稔 第1編 第5章 第2節 反応ダイナミクスの時間分解測定. ヘムタンパク質の科学 (城宜嗣、青野重利、齋藤正男監修), エヌ・ティー・エス, 193-201 (2022). [C01 久保班]
11. 當舎武彦, 木村哲就 第1編 第5章 第5節 反応速度論. ヘムタンパク質の科学 (城宜嗣、青野重利、齋藤正男監修), エヌ・ティー・エス, 219-225 (2022). [C01 久保班]
12. Raymond G. Sierra, Uwe Weierstall, Dominik Oberthuer, 4 Michihiro Sugahara, Eriko Nango, So Iwata, Alke Meents (分担執筆) 『X-ray Free Electron Lasers-A Revolution in Structural Biology』 SPringer (2019) [B01 南後班]

## 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

### 特許出願

1. 特願 2021-088794 (出願日: 2021年5月26日) 岩田 想、非変性チャンネルロドプシン検出キット
2. 特願 2021-028956 (出願日: 2021年5月25日) 清中茂樹、堂浦智裕、長谷川寛太、柏俊太郎、変異型 G タンパク質共役型受容体、出願人: 名古屋大学、[A01 清中班]
3. 特願 2019-192046 (2019年10月21日) 福本恵紀、足立伸一、時間分解光電子顕微鏡装置、正孔空間分布検出法、正孔寿命推定方法及び正孔移動度演算方法」、[B01 足立班]

その他 4 件

## 研究成果

### 1. 研究開始当初の背景

本領域研究が始まる前の段階では、光で反応を開始するタンパク質を標的とした分子動画法が実証されていたが、光以外をトリガーとして用いる分子動画法はほとんど確立されておらず、例えば温度や pH などの外部刺激や、基質・リガンドの添加などによる時分割実験を可能とする装置の開発が急務であった。またタンパク質工学やケミカルエンジニアリングを用いて、光感受でない系を光で同期できる系に改変することにより、タンパク質の中の酵素反応の追跡や受容体タンパク質の活性化機構の研究などに、本手法の対象を大きく拡張することが可能になると考えられる。

### 2. 研究の目的

本領域研究では、本法をタンパク質の中で起こる早い反応を追跡するスタンダードな技術として確立するために、ケミカルバイオロジーの手法を中心に用いて反応を同期させる技術を開発するとともに、反応開始のち徐々に同期が外れて複数の状態が混ざっていく問題をコンピューターシミュレーションにより解析分離し、実際のタンパク質の中で起こっている反応をより現実に即して捉えることを主眼とした。同時に、この目的を達成するための測定システムの開発を行い、光によるタンパク質のスイッチ機構の解明、ユニークな反応を触媒する酵素の反応機構など、幅広いターゲットに適用することを目指した。更に、本法によって得られた精密な構造情報を基にタンパク質分子の光制御法の確立など分子制御への応用も推進した。

### 3. 研究の方法

高速分子動画法では、XFEL のフェムト秒パルスをストロボのように用い、フェムト秒から秒に至る幅広い時間分解能での動的構造解析を行った。XFEL を用いた研究分野は新しく、物理系・工学系・化学系・生物系などの幅広い分野が協力して研究を行なった。本領域は、多種多様な生体高分子中で起こる反応・構造変化の解明を軸（研究項目 1, A01）とし、これと分子動画法の基盤構築グループ（研究項目 2, B01）と、計算科学、物理化学から成る反応精密分析グループ（研究項目 3, C01）が技術開発・解析を協調して行うことにより研究を展開した。研究項目 1 においては特に生物学的、化学的に興味深いシステムの

研究者と協力し、幅広い生命現象の分子レベルでの理解を目指す。様々なシステムに対応するために、広い分野から新しい技術の導入・開発を実施した。また計算科学を活用することにより実験だけでは理解するのが難しい現象を理論的・定量的に解釈し、その成果を用いて新たなタンパク質分子や化合物を創生することを目指した。

### 4. 研究の成果

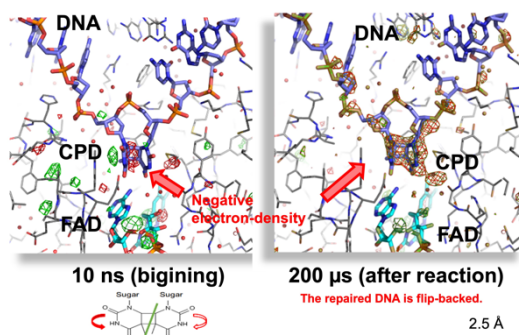
#### 研究項目 1 (A01)：高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発

高速分子動画の撮影に関しては非常に多くの成果が出ているが、主要なものだけを簡単にまとめる。

##### (1) 研究計画班の成果

光応答性イオンチャネルの高速分子動画の撮影に関して草木迫らはチャンネルロドプシンの閉状態から開状態への遷移に伴う構造変化を可視化することに成功している。(eLife 2021)。

また別所らは大阪大学の山元らおよび東北大学の南後らと協力して光回復酵素の損傷 DNA の修復反応を原子レベルで解明した (Science 2023, 右図)。他機関が主体となって行ったものに計画班が協力した成果として、インペリアルカレッジの van Thor 教授に東北大学の南後らが協力し光スイッチ型蛍光タンパク質 (rsEGFP2) の蛍光のオンオフの切り替えを観察することに成功した例がある。発色団の分子構造がねじれながら変化すること (Hula Twist 機構) を見出した (JACS 2023)。また SwissFEL との共同研究で南後らが、光受容体であり GPCR であるロドプシンの光活



性化の初期過程を解明することに成功している (Nature 2023, 右図上)。

ケミカルバイオロジーの分野においては、ミリ秒の時間制御を行うケージド化合物に関して、古田らは、光特性を失うことなく新たな機能を付与できる化合物の開発に成功した。中でも、酵素によって光反応性のスイッチングができるケージド化合物を開発して、環状ヌクレオチド類の精緻な機能制御を達成した (Chem. Commun. 2021)。マイクロ秒の時間制御を実現するために、清中らは、ケージド化合物のリガンド結合部位近傍への標識を実現する新たなタンパク質ラベル化法を開発し、(Chem. Commun. 2022)。本手法では、迅速かつ選択性の高いクリック化学を使うが、それに適用可能なケージド化合物の開発を進めており、マイクロ秒光制御法へとつなげた。

新規デザイン化合物がタンパク質内でどのように働いているかを調べる実験も行われた。清中班と岩田班の共同研究により、アデノシン A2A 受容体と新しくデザインされた光作動性リガンドの複合体の結晶構造が解析された (BBRC 2024)。今後この結晶を用いて上記のロドプシン同様の実験を計画している。

## (2) 公募班の成果

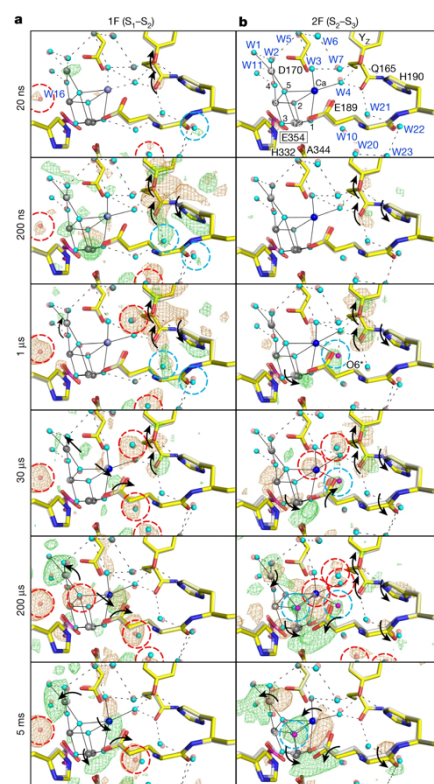
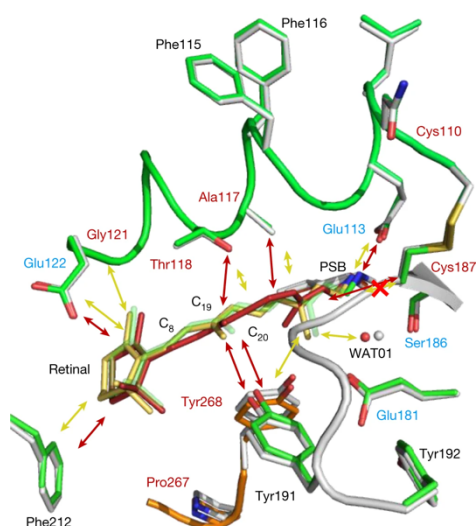
公募班は目覚ましい成果を挙げており、プロジェクトの公募・選考が良好に行われたことを示している。

保坂らはクロライドポンプロドプシンのアニオンが輸送される際のコンフォメーション変化を可視化することに成功した (PNAS 2022)。村川らは南後班と共同で反応の開始を光励起によらない二液混合システムを用いて時分割構造解析を行い、銅含有アミン酸化酵素の反応サイクルの一部を動画観察し、活性部位の構造変化などを明らかにした (Acta Cryst. D 2022)。またプロジェクト終了間際に、菅らによって光合成の光化学系 II の S1-S2-S3 のトランジションにおける、Mn クラスターおよび水分子の構造変化が示された (Nature 2024, 右図下)。非常に複雑な光化学系 II による酸素発生機構のメカニズム解明に向けて大きなブレークスルーであると言える。

## 研究項目 2 (B01)：高速分子動画撮影法の基盤構築

### (1) 研究計画班の成果

足立班は本プロジェクトのファウンディングメンバーであるが、目覚ましい成果をあげ特別推進研究を獲得したため、中間評価前に離脱した。銅(I)フェナントロリン錯体の実験系では、銅錯体の光励起後の構造変化と分子振動の計測を試み、Cu-K 吸収端での X 線吸収分光スペクトルの解析から、光励起直後の電子移動 (MLCT) に伴う錯体構造のヤーン・テラー歪みと分子振動を明らかにした (Nature Commun. 2019)。ジシアノ金(I)錯体 ( $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ ) を試料として、液相光化学反応の超高速初期過程の直接



観測を試みたところ、時間分解 X 線溶液散乱データにより、レーザー励起直後から 1 ピコ秒の間に X 線散乱強度が時間的に振動する成分が観測され、励起分子が励起ポテンシャル曲面上で振動して Au-Au 間の共有結合が形成する過程を捉えることに成功した (Nature 2020)。

南後班は高速分子動画法のための各種反応同期方法を開発している。最もよく使われているのは光励起法と二液混合法でこれらが上記の高速分子動画実験のために用いられている (J. Appl. Crystallogr. 2019 など)。サンプルの導入法は旧来のインジェクターによる方法だけでなくベルトコンベアをもちいたシステムも開発している。IR レーザー照射による温度ジャンプにより反応を開始する方法の研究も行った (Nat. Chem 2023)。図 8 は IR レーザー照射で温度の上昇させた時のタンパクの動きを実際に観察したものである。温度が非常に早く下がってしまうという問題がみつきり現在それに対する対策を検討中である。

## (2) 公募班の成果

研究項目 2 は大規模施設依存の研究項目なので公募班員は少ない。その中で Maity らのグループはリゾチームに導入したマンガンに結合した一酸化炭素がレーザーの照射によって外れていく過程を明確に示した (Nat. commun. in press)。

### 研究項目 3 (C01)：高速分子動画に資する反応精密分析

#### (1) 研究計画班の成果

計算科学の分野では実験科学との共同研究により、大きな成果をあげた。庄司らは領域内共同研究を強力にすすめ、梅名らとフィコシアニン (BCSJ 2023)、村川らと銅含有アミン酸化酵素 (ACS catalysis 2023)、片山・神取らとヘリオロドプシン、Maity らとリゾチーム中のマンガン錯体 (Nature commun. in press) についての共同研究を行った。篠田らは本研究領域で多く研究対象とされる膜タンパク質の脂質の力場の最適化を行った。宮下らは、TR-SFX 実験データから得られる時間発展前後の電子密度の差を反映する差フーリエマップをもとに、MD シミュレーションを用いることで反応後の構造モデルを構築する手法を開発した。ロドプシンの実験データについても実証研究を行い、これまで手作業で作られた構造モデルと同等な構造を自動的に導き出すことができることを示した。

分光は上記の光感受性タンパク質のモニターのために広く使われた。光遺伝学ツール・チャンネルロドプシンの光誘起チャンネル開口メカニズムの解明 (eLife 2021) において久保班は、時分割顕微紫外可視吸収分光により結晶相の反応過程を解析し、分子動画で観測されたチャンネルロドプシンの時々刻々の構造変化がどの中間体遷移に相当するかを帰属した。保坂らとのクロライドポンプロドプシン (PNAS 2022)、志甫谷らとのヘリオロドプシン、山元、重田らとの DNA フォトリアーゼの研究においても同様の役割を果たした。木村は中津らとのイクオリンの研究において時分割蛍光分光を用い、古谷らはロドプシン類の研究において、分光学的手法を用い志甫谷や庄司らと連携した。

温室効果・オゾン層破壊の原因である  $N_2O$  の生物学的発生機構の解析 (PNAS 2021) のために、久保班は時分割顕微赤外分光装置を開発し、分子動画で観測されたカビ由来 NO 還元酵素中間体の化学構造および電子状態 (ラジカル性) を解明した。この研究は地球環境における  $N_2O$  排出量を抑制する上で重要な分子基盤を提供した。時分割顕微紫外可視吸収分光装置にマイクロ流路デバイスを組み込み、新開発の極微量フロー測定を用いて、緑膿菌由来 NO 還元酵素の反応速度論解析を行い、三段階からなる酵素反応ステップの詳細を明らかにした。また青色光を使って DNA を修復する DNA フォトリアーゼの反応中間体を時分割赤外分光で捕捉して反応の鍵となる中間体を初めて分光学的に観測し、その化学構造を提案した。

#### (2) 公募班の成果

計算科学においては計画班を補完する各種の計算手法を有するグループが参加した。小野らは、南後らによるバクテリオロドプシンの光反応サイクル L 状態スナップショット構造で観測された内部水分子に着目し大規模量子 MD 計算を実行し、水が近傍残基へとリレー形式でプロトン

を受け渡した後、生じた水酸化物イオン中間体がシッフベースからプロトンを受け取る 1 段階目のプロトン移動の機構を明らかにした (J. Phys. Chem. B 2020)。また同様の手法を他のタンパク質にも適用している (Chem. Phys. Lett. 2022)。このほかにも、八木班は QM/MM の手法や非断熱 MD の手法を、林班は中津班と共同でイクオリンの MD を中心とした解析を、北尾班は清中班と共同で mGlu1 のエネルギーランドスケープ解析によるアロステリック制御メカニズムの解明を、光武班はオレキシン受容体の大規模構造変化の研究を行った。分光においても計画班を補完する形で公募班が新しい技術を持ち寄った。片山班は超高速時分割分光を用い梅名班と共にフィコシアニンの励起エネルギー移動の研究を行った。