

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05780

研究課題名（和文）酵素が巧みに織りなす化学反応過程のダイナミズムの撮像

研究課題名（英文）Shooting Molecular Movies of Enzyme Reactions

研究代表者

永野 真吾（Nagano, Shingo）

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号：60286440

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 100,600,000円

研究成果の概要（和文）：酵素やタンパク質の反応過程を動画として可視化することを目標に、様々なターゲットを対象として研究を進めた。ディールスアルダー反応を行う酵素Phm7、Fsa2の立体選択的な反応機構を説明できる基質結合様式を分子シミュレーションから提案し、その正確さを生成物メチル化体結合型の結晶構造で確認した。また、イクオリンの発光を誘起するCa²⁺が結合する順序と位置を明らかにすることができた。さらに、活性型Rubiscoにリガンドが結合していない構造を決定し、これまで知られていたオープン型、クローズド型のいずれとも異なる構造であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子シミュレーションでは推定が困難なタンパク質・酵素の構造変化を実験的に捉えることは生命科学において今後ますます重要性を増す。本研究では、目標とした酵素反応の過程を可視化するには至らなかったものの、そのゴールに向けて乗り越えるべき課題、例えば試料調製やビームラインでの試料の取り扱い、時分割構造解析のデータ測定などを明らかにし、それらのいくつかについて乗り越えることができた。本研究で得られた技術と経験が今後のXFELを用いた時分割構造解析に向けた確かな礎となるであろう。

研究成果の概要（英文）：Research was conducted on various targets to visualize the reaction processes of enzymes and proteins as molecular movies. From the molecular dynamics simulations and the substrate-free crystal structures of Dieals-Alderases, Phm7 and Fsa2, we proposed a substrate binding mode that can explain the stereoselective reaction mechanism of the enzymes, and confirmed its accuracy with crystal structures of the methylated product-bound form of Fsa2. The order and position of the Ca²⁺ binding that induces the luminescence of Aequorin were also clarified. Furthermore, we determined the structure of the active and ligand-free form of Rubisco and showed that this structure is distinct from both the open and closed forms of the enzymes known so far.

研究分野：構造生物学

キーワード：高速分子動画 ディールスアルダー反応 発光タンパク質 Rubisco

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素反応の分子メカニズムを明らかにするためには、その反応が起こりつつある非平衡状態の反応場の構造を高い空間・時間分解能で解析することが必須である。本研究を開始するまでに光駆動型プロトンポンプ、バクテリオロドプシンなどについて光刺激後の機能発現に重要な核心部分の構造変化を時分割シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析 TR-SFX (Time-Resolved Serial Femtosecond X-ray crystallography) で可視化できることがすでに報告されていた。これはタンパク質の時分割構造解析の記念碑的な業績であるが、ほとんどの酵素反応は基質などのリガンドがタンパク質に結合することによって開始されるため、光をトリガーとして結晶状態の酵素による反応を同期的に開始することが困難である。

2. 研究の目的

本研究計画では、すでに結晶構造が決定されている分子内ディールスアルダー環化反応を行う酵素 Phm7 と Fsa2, タウリン水酸化酵素 TauD, 発光タンパク質イクオリン, および光合成 CO₂ 固定の鍵酵素 Rubisco を対象に、二液混合法やベルトコンベアシステムなど光トリガーに依存しない手法による TR-SFX を行い、分光学的解析や理論計算による解析を組み合わせることで化学および生物学的に重要な酵素の反応メカニズムを解明するのみならず、光作動性ではない一般的な酵素の反応が進みつつある非平衡状態の構造解析法の汎用化につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 立体選択的なディールスアルダー反応酵素 Phm7 と Fsa2

Phm7 と Fsa2 の基質非結合型の結晶構造解析を行い、その構造に基づいた分子動力学シミュレーション、基質結合部位への変異導入解析、および量子化学計算を行い、これらの酵素による立体選択的なディールスアルダー反応が行われるメカニズムの解明を進めた。また、生成物メチル化体フォマセチンとエキセチンが Phm7 と Fsa2 にそれぞれ結合した結晶構造解析を行った。新学術領域研究「高速分子動画」の計画研究清中班的永澤教授(岐阜薬科大学)らが合成した Fsa2 の基質を用いて、Phm7 と Fsa2 のディールスアルダー反応を行い、立体選択性が決定されるメカニズムについて検討を行った。さらに、一定速度で移動するテープ上に Fsa2 の微結晶懸濁液を滴下し、さらに合成基質の溶液を加えるベルトコンベアシステムを用いて XFEL による時分割構造解析を行った。

(2) タウリンを水酸化する 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ TauD

基質が結合した金属非結合型 TauD の微結晶に硫酸鉄(II)を添加することで、活性中心の非ヘム鉄を再構成する実験を行った。また、嫌気条件で基質および非ヘム鉄結合型 TauD の微結晶を調製し、これに酸素飽和溶液を、ベルトコンベアシステムを用いて混合することで時分割構造解析を行った。

(3) 発光タンパク質イクオリン

イクオリンはカルシウムが 3ヶ所ある EF-hand 構造に結合すると青色発光することが知られている。そこで、カルシウムをトリガーとして加えたときにどのような構造変化を起こすかを観測する。

カルシウムが結合していないイクオリンを用い、PEG を沈殿剤として用い 5-10 μm の結晶を作成した。SACLA での測定のタイミングを決定するために、この微結晶を用いた発光スペクトル測定をおこなった。ここで得られたスペクトルをもとに、SACLA での 2 液混合法による TR-SFX 法を用いて、カルシウム反応後の測定を行った。さらなる汎用化や早い反応段階を観測するためにセルロースを加えた測定法の開発を目指した。セルロースが入ったイクオリン微結晶懸濁液から微結晶を取り出し、カルシウム溶液に浸漬したのちにフリーズトラップし、SPring-8 の small-wedge 法と組み合わせる方法で測定を行った。さらには Mg²⁺ の複合体の構造解析も行った。得られた結晶構造を用いて理論計算を行い、酸化反応後のプロトン移動過程を明らかにした。

(4) 光合成 CO₂ 固定化酵素 Rubisco

Rubisco は活性中心残基 Lys201 がカルバミル化され、そこに Mg²⁺ が配位することで活性型 (ECM) となり、カルボキシラーゼ反応またはオキシゲナーゼ反応を触媒する機能を獲得する。触媒反応中の分子動画を TR-SFX で解析するには、2 液混合インジェクターを用いて ECM 型酵素の微結晶中に基質 RuBP を添加することで反応を誘起する手法が考えられる。従来、触媒部位に何も結合していない ligand free の ECM 型酵素 (ECM-LF) の結晶を得るのは困難とされてきた。本研究ではまず、イネ Rubisco を用いて結晶化条件を詳細に検討することで、RuBP の結晶中への浸透効率に優れた微結晶の調製条件をスクリーニングし

た。続いて、得られた微結晶を用いて、SACLAにてSFX計測を実施する条件を最適化してECM-LF型酵素単独での結晶構造を解析し、さらに、RuBPを添加したTR-SFXでの時分割解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 立体選択的なディールスアルダー反応酵素 Phm7 と Fsa2

分子動力学シミュレーションから Phm7 と Fsa2 の活性部位ポケット内で、それぞれの基質のコンフォメーションは互いに疑似的な鏡像の関係にあることが明らかとなり(図1)、これらの結合モデルが立体選択的なディールスアルダー反応を説明できることを示した。また、基質結合部位へ網羅的に変異を導入し酵素活性に与える影響を評価したところ、結合モデルを指示する結果が得られた。量子化学計算では結合モデルで推定された基質と Phm7 との水素結合ネットワークがディールスアルダー反応を加速していることが示された。フォマセチン結合型 Phm7 の結晶は得られなかったが、エキセチン結合型 Fsa2 の結晶構造を決定し(図2)、これが分子動力学シミュレーションで推定された基質結合様式とほぼ一致していたこと、すなわちシミュレーションで推定されたコンフォメーションで結合することで立体選択的にディールスアルダー反応がこれらの酵素によって行われていることが示された。さらに、合成基質を用いた Phm7 と Fsa2 の生成物の解析から、基質のテトラミン酸部分と酵素との水素結合、および6位のメチル基の立体配置がこれらの酵素のディールスアルダー反応の立体選択性を決定していると推定された。基質と Phm7 または Fsa2 をベルトコンベアシステムで混合してTR-SFXをおこなうことは困難であったが、光解離性保護基が結合した基質もすでに合成されているので、光をトリガーとして酵素反応を開始する方法の適用も今後期待される。

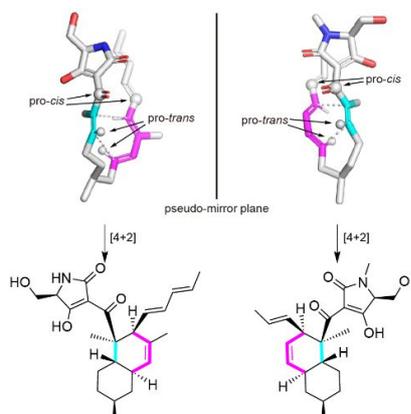


図1. 分子動力学シミュレーションから推定された基質結合様式

(2) タウリンを水酸化する 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ TauD

基質が結合した金属非結合型 TauD に硫酸鉄を添加することで、非ヘム鉄を再構成できることが確認された。また、この実験で占有率は低いものの基質結合部位に結合したアミノアセトアルデヒドが確認され、微結晶中でタウリンの水酸化反応が進行したことが確認された。この実験で、酸化活性種や水酸化反応の過程を捉えることは困難であったが、ベルトコンベアシステムを用いて嫌気条件に保った基質および非ヘム鉄結合型 TauD 微結晶試料と酸素飽和溶液を混合してTR-SFXをおこなうことは可能であると考えられた。

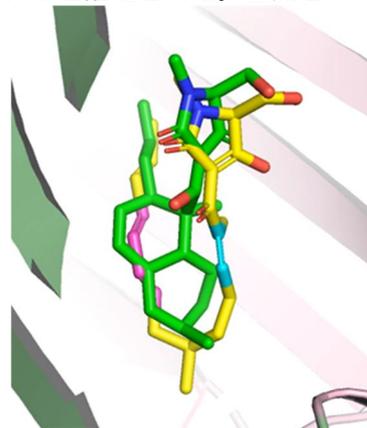


図2. エキセチン結合型 Fsa2 の結晶構造と分子動力学シミュレーションで推定された基質の結合コンフォメーションの重ね合わせ

(3) 発光タンパク質イクオリン

イクオリンは発光基質の過酸化状態がタンパク質中で安定になっている稀有なタンパク質である。この過酸化部位はX線によりダメージを受けやすく、これまでにいくつかの構造が提唱されていた。SACLAのX線は大強度であるがゆえ、タンパク質分子がX線によるダメージを受ける前に測定が終了する。すなわちX線無損傷のデータを得ることができる。そこでカルシウムによる反応を起こす前の構造をSACLAで決定した結果、過酸化状態の正確な構造を明らかにすることができた。

SACLAでの2液混合TR-SFX法により測定を行ったところ、Ca²⁺が2箇所ないしは3箇所に結合した立体構造を決定することができた。イクオリン微結晶とCa²⁺を混合後の発光スペクトルの解析から、もっとも発光強度が高かったのは1秒であった。そこで、SACLAでの測定は反応後、0.5、1.3、5秒後の測定を行ったが、それぞれに大きな違いはみられなかった。

続いて、カルシウムが1箇所に結合した状態を明らかにするため、イクオリン微結晶懸濁液にセルロースを加えることで粘性をあげ、全体の反応を遅くすることを計画した。こ

のように調製した結晶を結晶マウントループに挿入し、カルシウム溶液に浸漬した。浸漬する時間は1秒から10秒まで1秒おきに行い、液体窒素中に入れることでフリーズトラップして反応を止め、SPring-8で測定した。得られたX線回折強度データは、さまざまな状態のものがあったため、同質のデータ同士になるようにクラスタリングを行い、それぞれのデータについて構造解析を行ったところ、 Ca^{2+} が1箇所に結合した構造を得ることができた。

以上の結果、EF-handに結合するカルシウムの順序が初めて明らかとなった。最初にEF-hand IIIに Ca^{2+} が結合し、Glu128が Ca^{2+} の方向へ構造変化した。その後、EF-hand IVに2番目の Ca^{2+} が結合し、その際の構造変化に伴いCys152がセレンテラジンペルオキシドに近づくように構造変化を起こした。さらにMet165, Phe113, His169の構造変化も観測された。最後に、 Ca^{2+} がEF-hand Iに結合し発光反応が生じると考えられた。

イクオリンは Ca^{2+} で発光するものの、 Mg^{2+} では発光しないことが知られている。そこで、 Mg^{2+} 複合体の解析を行った。その結果、 Mg^{2+} はEF-hand IIIとIに結合していた。EF-hand IIIに結合した Ca^{2+} は7配位で直接Glu128と結合していたものの、 Mg^{2+} ではGlu128が水を介して6配位での結合であった。すなわち、 Mg^{2+} では構造変化を起こすことができず、 Ca^{2+} は7配位を取れる性質を活かすことで、Glu128が Ca^{2+} に直接結合しようとする構造変化が誘引されることが明らかとなった。この構造変化によりヘリックスF-G間の水素結合が切断されることで、EF-hand IVが構造変化できるようになり、 Ca^{2+} が結合することで、その後の構造変化が誘引されると考えられた。

今回の研究で得ることができた構造は Ca^{2+} を加えているものの、すべて発光反応が進行する前の構造であり、非常に多くの段階を経て、発光に至ることがわかった。これはより不安定である過酸化状態を安定に止めるために、容易には反応しないようにするためのイクオリンの戦略であると考えられた。

SACLAで得られた立体構造は発光直前と考えられたため、その後の酸化反応の理論計算を行い、電子移動の機構を推定した。同様の理論計算を反応前の構造で行ったところ酸化反応を進めることができるような計算結果は得られなかった。すなわち、これまでの静的な構造解析では得ることができなかった構造を用いることで、さらなる詳細な反応機構を明らかにするための手法を得ることができたものと考えられる。

イクオリンと同様に発光基質としてセレンテラジンを用いながらも、立体構造が異なる発光酵素は少なくとも3種類知られており、いずれも同様の機構であると考えられている。この機構の解明は、未だ明らかになっていない非常に発光効率が良い(発光量子収率が高い)生物発光機構を考える上で基礎的なデータになると予想される。

(4) 光合成 CO_2 固定化酵素 Rubisco

イネ Rubisco の ECM-LF 型酵素の結晶化条件をスクリーニングした結果、マイクロシーディング法を組み合わせたバッチ法にて、微結晶を得ることに成功した。沈殿剤としては PEG 4,000 を用い、酵素反応の至適 pH 8.0 のバッファーで得られたこの微結晶は、RuBP の結晶中への浸透効率に優れた薄い平板状の形状であり、触媒反応の追跡を行うに適したものであった(図3)。微結晶状態での反応速度を分光的に測定したところ、溶液状態と比較して10~100分の1程度の速度であることが確認された。

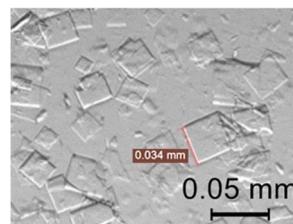


図3. イネ Rubisco の ECM-LF 型の微結晶

得られた微結晶を用いて、SACLAにてSFX実験を行い、ECM-LF型の結晶構造を初めて決定することに成功した。

以前に報告されてきた Rubisco の結晶構造は、種々の ligand との複合体状態で決定されてきており、ligand の種類によって、触媒部位の Loop6 が開いた構造(open)や閉じた構造(close)が報告されていた。驚いたことに、今回の ECM-LF 型構造は、従来の open または close 構造とは全く異なる構造状態を取っていることが明らかとなった。SFXでの Rubisco の解析事例は今回が初めてであったことによるアーティファクトの可能性を排除するため、種々の ligand との複合体構造を SFX で解析したところ、従来の X 線解析手法で報告された open または close 構造と同様であり、ECM-LF 型構造の新奇性が確かめられた(図4)。

次に、2液混合インジェクターを用いて TR-SFX 測定を行なった。ECM-LF 型酵素の微結晶に基質 RuBP を添加した後、種々の遅れ時間(Δt)にて XFEL を照射して回折データを取得した。その結果、 Δt が 450, 300, 160 ms では回折像が消失し、これは触媒反応と共役した大規模な分子構造変化が結晶パッキングを崩壊させたことによると考えられた。一方、 Δt を 90 ms で測定したところ、構造解析可能な反射が得られた(図5)。今後、90 ms より小さい Δt の範囲で TR-SFX 実験を行い、触媒部位に RuBP が結合した初発の構造変化を分子動画として可視化することを目指す。

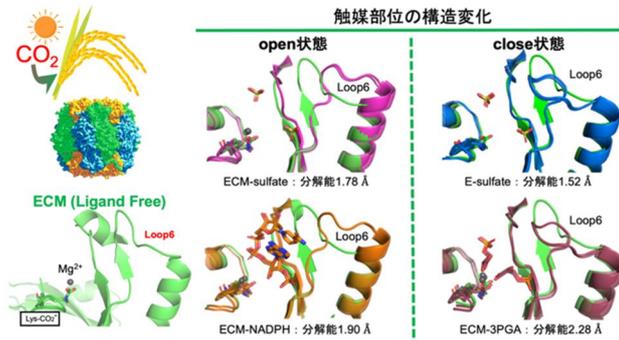


図4. イネ Rubisco の ECM-LF 型の結晶構造およびリガンド結合型構造との比較

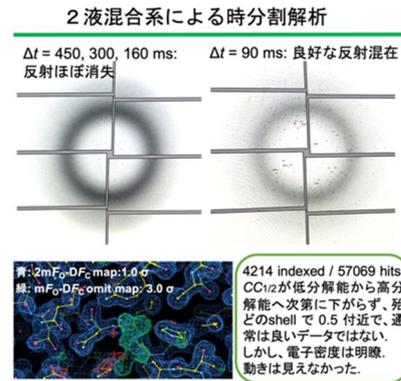


図5. イネ Rubisco の TR-SFX

(5) まとめ

新学術領域研究「高速分子動画」の酵素班として、光トリガーに依存しない酵素反応の TR-SFX を目指して研究を進めてきた。二液混合法と比べて酵素微結晶試料の消費速度を大幅に抑えることができるベルトコンベアシステムが本研究開始後に SACLA で利用可能となり、TauD の TR-SFX 実験を行うことができた。また、発光タンパク質イクオリンについて、SPring-8 での詳細な予備実験に基づいて SACAL での TR-SFX を二液混合法によって行うことができた。しかし、これらの反応過程を動画観察するには、試料に関する課題などがなお多く残っている。本研究では 3 名の研究者、および高速分子動画の領域内での分光学的解析や理論計算を専門とする多くの研究者が密接に連携して研究を進めてきた。これらのネットワークは本領域の存在によって構築された酵素反応の TR-SFX 研究推進の重要な基盤である。これらを今後も活かしながら、酵素反応の高速分子動画撮影の汎用化を目指して研究を継続していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shinya Hanashima, Takanori Nakane, Eiichi Mizohata*	4. 巻 11(11)
2. 論文標題 Heavy Atom Detergent/Lipid Combined X-ray Crystallography for Elucidating the Structure-Function Relationships of Membrane Proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes (Basel)	6. 最初と最後の頁 823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11110823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Keisuke Fujiyama, Naoki Kato*, Suyong Re, Kiyomi Kinugasa, Kohei Watanabe, Ryo Takita, Toshihiko Nogawa, Tomoya Hino, Hiroyuki Osada, Yuji Sugita, Shunji Takahashi*, Shingo Nagano*	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular basis for two stereoselective Diels-Alderases that produce decalin skeletons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 22401-22410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202106186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hironori Suemune, Doukan Nishimura, Kenjiro Mizutani, Yusuke Sato, Tomoya Hino, Hiroshi Takagi, Yumi Shiozaki-Sato, Shunji Takahashi*, Shingo Nagano*	4. 巻 593
2. 論文標題 Crystal structures of a 6-dimethylallyltryptophan synthase, lptA: Insights into substrate tolerance and enhancement of prenyltransferase activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 144-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaki Okamoto, Kazuya Yamanaka, Yoshimitsu Hamano, Shingo Nagano, TomoyaHino*	4. 巻 596
2. 論文標題 Crystal structure of the adenylation domain from an -poly-l-lysine synthetase provides molecular mechanism for substrate specificity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 43-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Kodan, Ryota Futamata, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda	4. 巻 595
2. 論文標題 ABCB1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett	6. 最初と最後の頁 707 - 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keita Matsuoka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato	4. 巻 30
2. 論文標題 The crystal structure of the CmABCB1 G132V mutant, which favors the outward facing state, reveals the mechanism of the pivotal joint between TM1 and TM3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1064_1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dongqing Pan, Ryo Oyama, Tomomi Sato, Takanori Nakane, Ryo Mizunuma, Keita Matsuoka, Yasumasa Joti, Kensuke Tono, Eriko Nango, So Iwata, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato	4. 巻 9
2. 論文標題 Crystal structure of CmABCB1 multi-drug exporter in lipidic mesophase revealed by LCP-SFX	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 134-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252521011611	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Fujiyama, Naoki Kato, Suyong Re, Kiyomi Kinugasa, Kohei Watanabe, Ryo Takita, Toshihiko Nogawa, Tomoya Hino, Hiroyuki Osada, Yuji Sugita, Shunji Takahashi, Shingo Nagano	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular basis for two stereoselective Diels-Alderases that produce decalin skeletons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 22401-22410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.02.01.429105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Kodan, Ryota Futamata, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato, Kazumitsu Ueda	4. 巻 595
2. 論文標題 ABC1/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett	6. 最初と最後の頁 707 - 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keita Matsuoka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato	4. 巻 30
2. 論文標題 The crystal structure of the CmABC1 G132V mutant, which favors the outward facing state, reveals the mechanism of the pivotal joint between TM1 and TM3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1064 - 1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計48件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 清田雄大、熊野翔太、溝端栄一
2. 発表標題 CO2固定酵素RuBisCOの分子動画撮影条件の検討
3. 学会等名 令和三年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eiichi Mizohata
2. 発表標題 Damage-free protein observation and structure determination using X-ray free electron laser
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○永野真吾
2. 発表標題 立体選択的なDiels-Alder反応によりデカリン骨格を構築する酵素の分子機構
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○末宗周憲, 永田 隆平, 小林 正弥, 品田 哲郎, 西山 真, 葛山 智久, 佐藤裕介, 日野 智也, 永野 真吾
2. 発表標題 スクアレン合成酵素に類似した放線菌由来新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造と反応機構
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○宮崎麻紗美, 藤山敬介, 佐藤祐介, 日野智也, 水谷正治, 秋山遼太, 加藤純平, 重田育照, 庄司光男, 永野真吾
2. 発表標題 ジャガイモやトマトに含まれる有毒なスピロソランを 代謝変換する16位水酸化酵素と20位脱水素酵素の反応メカニズム
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○末宗周憲, 永田 隆平, 小林 正弥, 品田 哲郎, 西山 真, 葛山 智久, 佐藤裕介, 日野 智也, 永野 真吾
2. 発表標題 スクアレン合成酵素に類似した放線菌由来新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造と反応機構
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○宮崎麻紗美, 藤山敬介, 佐藤祐介, 日野智也, 水谷正治, 秋山遼太, 加藤純平, 重田育照, 庄司光男, 永野真吾,
2. 発表標題 トマチンを代謝する2種類の酸化酵素の結晶構造が示す意外な分子メカニズム
3. 学会等名 令和3年(2021年)度 日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○三坂圭生, 宮崎麻紗美, 日野智也, 佐藤裕介, 永野真吾
2. 発表標題 タウリン水酸化酵素の時分割シリアルフェムト秒X線結晶構造解析に向けた微結晶化と構造解析
3. 学会等名 令和3年(2021年)度 日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○Shingo Nagano
2. 発表標題 Two tales of Diels-Alderases: How decalin skeletons are stereo-selectively constructed
3. 学会等名 RIKEN CSRS Seminar (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○永野真吾
2. 発表標題 立体選択性が異なるディールスアルダー反応をおこなう 酵素Phm7とFsa2の分子機構
3. 学会等名 第54回酸化反応討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○永野真吾
2. 発表標題 立体選択性が異なる 2 種類の Diels - Alder 反応酵素がデカリン骨格を構築する分子メカニズム
3. 学会等名 令和三年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム・領域会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○永野真吾
2. 発表標題 天然物生合成酵素の構造生物学
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○永野真吾
2. 発表標題 植物ステロイド化合物の生合成と代謝の構造生物学
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）[S06] 薬用植物化学研究の新展開（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 X線自由電子レーザー施設 SACLA で何ができるか？
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船橋 俊也、南後 恵理子、岩田 想、加藤 博章、中津 亨
2. 発表標題 カルシウム結合型発光タンパク質イクオリンには過酸化状態が存在する
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井 隼一、陳 月、中津 亨、加藤 博章、潘 東青
2. 発表標題 Candida albicansの多剤排出型ABCトランスポーターCdr1pの精製と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水沼 諒、小田島 圭、三和 空知、潘 東青、瀧川 紘、中津 亨、高須 清誠、加藤 博章
2. 発表標題 多剤排出トランスポーターCmABC1と基質アナログの結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 ABCトランスポーターの開閉機構
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 カルシウム結合による発光タンパク質イクオリンの初期構造変化
3. 学会等名 令和3年度高速分子動画シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 はじめに:生体分子の高速分子動画撮影
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 SACLAにおけるタンパク質X線結晶構造解析の現状
3. 学会等名 第49回構造活性相関シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 Protein X-ray crystallography at Japanese X-ray free electron laser facility, SACLA
3. 学会等名 Japan-Korea Dynamic Mechanism of Proteins Online International Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○宮崎麻紗美、藤山敬介、日野智也、水谷正治、永野真吾
2. 発表標題 野生種トマトにおけるトマチン代謝の初発反応を触媒する2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの精製と結晶化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎麻紗美、藤山敬介、日野智也、水谷正治、秋山遼太、加藤純平、永野真吾
2. 発表標題 トマチン16位水酸化酵素と20位脱水素酵素のX線結晶構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会 令和2年(2020年)度年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中津 亨
2. 発表標題 X線自由電子レーザー施設 SACLA で何ができるか？
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船橋 俊也、南後 恵理子、岩田 想、加藤 博章、中津 亨
2. 発表標題 カルシウム結合型発光タンパク質イクオリンには過酸化状態が存在する
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井 隼一、陳 月、中津 亨、加藤 博章、潘 東青
2. 発表標題 Candida albicansの多剤排出型ABCトランスポーターCdr1pの精製と機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水沼 諒、小田島 圭、三和 空知、潘 東青、瀧川 紘、中津 亨、高須 清誠、加藤 博章
2. 発表標題 多剤排出トランスポーターCmABC1と基質アナログの結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝端栄一
2. 発表標題 銅含有亜硝酸還元酵素の動的結晶構造解析
3. 学会等名 第93会日本生化学会大会, 「高速分子動画」共催シンポジウム, タンパク質の高速分子動画撮影の汎用化に向けて
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清田雄大、熊野翔太、溝端栄一
2. 発表標題 CO2固定酵素RuBisCOの分子動画撮影に向けた結晶調製
3. 学会等名 令和二年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Fujiyama, Tomoya Hino, Hyoung Jae Lee, Masaharu Mizutani, Shingo Nagano
2. 発表標題 Crystal structures of CYP90B1, a key enzyme in brassinosteroid biosynthesis
3. 学会等名 23rd International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美馬正弥、末宗周憲、日野智也、高井研、永野真吾
2. 発表標題 ラダラン脂質の梯子状疎水基を構築すると推定されているラジカルSAM酵素の補因子の再構成
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上垣哲心、末宗周憲、日野智也、永野真吾
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野真吾
2. 発表標題 酵素反応の高速分子動画撮影へのチャレンジ
3. 学会等名 令和元年度新学術領域研究「高速分子動画」キックオフミーティング・膜タンパク質研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤山 敬介, 加藤直樹, 日野智也, 高橋俊二, 永野真吾
2. 発表標題 分子内ディールスアルダー反応を触媒する酵素Phm7の結晶構造
3. 学会等名 令和元年度新学術領域研究「高速分子動画」キックオフミーティング・膜タンパク質研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田早希, 藤山 敬介, 日野智也, 水谷正治, 永野真吾
2. 発表標題 トマチン16位水酸化酵素のX線結晶構造解析
3. 学会等名 令和元年度結晶学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤山 敬介, 畑田 珠希, 日野 智也, 水谷 正治, 永野 真吾
2. 発表標題 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
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤山 敬介, 高見祐貴, 日野 智也, 大西利幸, 轟泰司, 水谷 正治, 永野 真吾
2. 発表標題 高活性型ブラシノステロイドを生産するCYP85A3の構造決定に向けた大量発現及び精製
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美馬正弥、末宗周憲、日野智也、永野真吾
2. 発表標題 ラダラン脂質合成の推定鍵酵素コパラミン依存性ラジカルSAM酵素のホ口型発現系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水沼 諒、井上 善貴、松岡 敬太、潘 東青、中津 亨、加藤 博章
2. 発表標題 好熱性P糖タンパク質CmABCB1における膜貫通第4ヘリックス（TM4）の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧川紘、三和空知、山岡庸介、山口知宏、中津亨、加藤博章、高須清誠
2. 発表標題 P糖タンパク質CmABCB1の輸送基質としてのローダミン誘導体の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Takikawa, Sorachi Miwa, Rina Takeuchi, Yousuke Yamaoka, Tomohiro Yamaguchi, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato and Kiyosei Takasu
2. 発表標題 Synthesis and structure_ATPase activity relationship of rhodamine derivatives against Pglycoprotein CmABCB1
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keita Matsuoka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato
2. 発表標題 Mechanism of coupling between extracellular gate opening and ATP hydrolysis in P-glycoprotein, CmABCB1.
3. 学会等名 Seoul-Kyoto-Osaka_Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences_for Young_Scientists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡敬太, 小段篤史, 山口知宏, 中津亨, 木村泰久, 植田和光, 加藤博章
2. 発表標題 多剤排出ABCトランスポーターによる基質排出機構の解明
3. 学会等名 医薬系研究交流サロン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝端栄一
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝端栄一
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを利用したタンパク質の動的構造解析
3. 学会等名 文部科学省学術調査官特別会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 溝端栄一
2. 発表標題 Rubiscoの分子動画撮影に向けた戦略
3. 学会等名 第1回 高速分子動画のための光化学制御研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清田雄大、溝端栄一
2. 発表標題 CO2固定酵素Rubiscoの分子動画撮影に向けた研究
3. 学会等名 令和元年度新学術領域研究「高速分子動画」キックオフミーティング・膜タンパク質研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 溝端栄一、久保稔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 5
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック 『構造・解析 X線自由電子レーザーによる膜タンパク質の構造解析』	

1. 著者名 山下恵太郎、溝端栄一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 7
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック 『X線結晶解析による新規構造の解明』	

〔産業財産権〕

〔その他〕

天然物が持つ鏡像異性な環状骨格を作り分ける 2つの酵素の反応機構を解明
<https://www.tottori-u.ac.jp/item/18745.htm>
 天然物が持つ鏡像異性な環状骨格を作り分ける2つの酵素の反応機構を解明（プレスリリース）
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2021/210819_2/
 ディールス・アルダー反応を触媒する酵素の合理的デザインに向けて
<https://www.setsunan.ac.jp/files/no2111.pdf>
 天然物が持つ鏡像異性な環状骨格を作り分ける2つの酵素の反応機構を解明
<https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20210819-01.html>
 天然物が持つ鏡像異性な環状骨格を作り分ける2つの酵素の反応機構を解明（プレスリリース）
http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2021/210819_2/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中津 亨 (Nakatsu Toru) (50293949)	和歌山県立医科大学・薬学部・教授 (24701)	
研究分担者	溝端 栄一 (Mizohata Eiichi) (90571183)	大阪大学・大学院工学研究科・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関