

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05476

研究課題名(和文)新規時間分解計測法の開発とABCトランスポーターの分子機構解析への応用

研究課題名(英文)Development of time-resolved spectroscopic systems with micro-flow devices and their application to the molecular mechanism of ABC transporters

研究代表者

木村 哲就(KIMURA, TETSUNARI)

神戸大学・理学研究科・特命講師

研究者番号：70506906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ流路加工技術と最先端のレーザー分光・検出装置を組み合わせることで、あらゆるタンパク質分子の反応を時間分解計測できる汎用性の高い計測系を構築した。加えて、X線自由電子レーザーを用いた時間分解シリアルフェムト秒X線結晶構造解析法の適用範囲の拡張をマイクロ流路技術を用いることで可能にした。これらの手法を、ATPを利用して小分子を細胞膜の一方から他方へと輸送する膜タンパク質であるABCトランスポーターの輸送・構造ダイナミクス観察に適用し、その分子機構解析に成功した。

研究成果の概要(英文)：The novel time-resolved measurement systems that are applicable to many proteins have been developed by combining micro-fluidic techniques and spectroscopic measurements. In addition, time-resolved serial-femtosecond x-ray crystallography was developed by using the micro-fluidic mixer, allowing us to monitor the conformational changes in protein during the expression of functions in real-time manner. These novel measurement systems were applied to the ABC transporter, clarifying its transport and structural dynamics.

研究分野：生物物理化学

キーワード：時間分解分光法 マイクロ流路デバイス 顕微分光 X線自由電子レーザー 赤外分光法

## 1. 研究開始当初の背景

化学反応の時間分解計測は、過渡的に存在する反応中間状態に関する分子情報を得ることができる強力な手法であり、反応機構を解明する上で重要である。特に高次の機能発現を実現する生体分子反応においては、タンパク質分子、あるいはドメインと呼ばれる分子部分が発現する固有の機能や情報が「運動」・「協奏」・「相互作用」することで、『生体分子システム』が構築されている。しかし、個々のタンパク質分子の機能についてさえも原子・アミノ酸レベルでの機構解明は達成されておらず、ましてや分子部分の運動性や化学反応の共役性といった分子システムの構築原理については未解明のままである。

また、今日まで、時間分解分光計測の多くは、レーザー分光法の確立とともに進展してきた。しかしながら、レーザー分光法は光によって誘起される反応を主な対象としており、基質の結合や溶媒環境の変化によって反応が誘起される生体分子反応への適用は限定的である。また、従来の溶液を混合する手法では時間分解能がミリ秒程度と、計測できる時間領域に限界がある。申請者は平成 25 年度より参画した現所属先(城生体金属科学研究室)において、レーザー分光法を一般のタンパク質反応へと展開するために、低収量膜タンパク質の酵素反応に適用可能な時間分解フローフラッシュ計測系の新規開発を推進している。現在、マイクロ流路フローセルに試料を導入し、試料溶液中のケージド化合物への光照射によって基質分子を溶媒へ放出し、金属酵素が触媒する化学反応が誘起される。この化学反応を数マイクロ秒の高い時間分解能で可視・赤外吸収分光計測することに成功している。その一方で、ケージド化合物の開発や合成は簡単ではなく、基質への適用範囲に限界がある上、タンパク質-タンパク質間相互作用を光照射によって引き起こすことはほぼ不可能である。したがって、時間分解計測をより広範な生体分子試料に適用するためには、基質の結合や、タンパク質間相互作用によって反応を誘起でき、高い時間分解能での計測が可能な系の構築が強く望まれる。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、基質あるいはタンパク質分子の結合によって誘起される反応を追跡可能な最先端の時間分解計測法を開発し、ATPを利用して小分子を細胞膜の一方から他方へと輸送する膜タンパク質 ABC トランスポーターにおいて起こる、

種々の化学反応の共役

融合集散を制御する分子間相互作用

構造変化のドメイン間の運動性

を実時間観察する。そして、多角的観察によって得られた情報を統合し、高次機能を実現する生体分子システムの設計原理の解明を目指す。

本課題で対象とする ABC (ATP-binding cassette; ATP 結合ドメインを持った) トランスポーターは ATP の結合・加水分解を利用することで、小分子の輸送を行う膜タンパク質であり、種々の化学反応の共役と、構造変化の運動によって輸送が実現される、生体分子システムの代表例である。X 線結晶構造解析から、ABC トランスポーターは小分子の輸送経路を形成する疎水的な 2 つの膜貫通ドメイン(TMD) と、ATP の結合・加水分解を行い、細胞に露出した 2 つのヌクレオチド結合ドメイン(NBD; ATP 分解ドメインとも呼ばれる) から構成されていることがわかっている。さらに、ペリプラズムタンパク質 (PP) と呼ばれる水溶性タンパク質が TMD のペリプラズム側と結合し、輸送基質を ABC トランスポーターへと運びこむと考えられている。これらの結晶構造は、細胞の外側に開いた状態と細胞質側に開いた 2 つの異なる状態をとっていることから、PP との結合および ATP の結合・加水分解反応と共役する形で、小分子の輸送が起こるだろうという仮説が提案されてきた。しかし、X 線結晶構造解析で得られる構造はスナップショットであり、『ABC トランスポート』という高次機能の発現機構を明らかにするためには、反応の時間軸に沿ったダイナミクスを直接観察することが必要であると考えられる。特に、

(i) 輸送基質の取り込み・輸送、ABC トランスポーターのコンフォメーション変化、ATP の結合・加水分解反応、PP と ABC トランスポーターの融合・集散が同期しているか？

(ii) NBD の ATP 結合/加水分解に伴う構造変化と TMD の構造変化がどのように連動しているか？

といった疑問に答えるには、それぞれのダイナミクスを直接観察し、どのタイミングで、どの分子部分で、どの化学反応が起こっているかを反応軸にそって解析する必要がある。実時間観察という観点では、NBD ドメイン単独で、ATP の結合・加水分解反応を分光学的に追跡した実験も報告されているが、他の構成反応との共役についての情報は得ることはできていない。

このような ABC トランスポーターの分子科学は生物学的見地からも重要である。ABC トランスポーターは大腸菌では全遺伝子の 5% を占める 78 個もの遺伝子としてコードされている。ヒトでも少なくとも 48 の遺伝子が見つかり、膜タンパク質の 15-30 % を占め、細胞で消費される全エネルギーの 2/3 を ABC トランスポーターが利用することもある。加えて、嚢胞繊維症といった疾病やガン細胞の化学治療薬耐性に関与する重要な分子であり、創薬などの疾病治療のためにも ABC 輸送の分子機構解析は待ち望まれている。

そこで、本研究では、代表者がこれまで培ってきたマイクロ流路加工技術を駆使した分

子拡散型マイクロ流路ミキサーを応用・改良し、かつレーザー分光法や最先端光源である X 線自由電子レーザー(XFEL)を用いることによって、新規の時間分解計測系を開発する。具体的には、可視吸収分光、蛍光寿命、赤外吸収分光、XFEL を用いたシリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析(SFX)という 4 つの時間分解計測系の開発を行う。マイクロ流路セルとレーザー分光法の 2 つの技術を併せ持つ研究者は世界的にも稀であり、膜輸送タンパク質の分子科学という独創的な研究はこれらの技術が融合することによって初めて可能になると自負している。以上のように、そこで、本申請課題では ABC トランスポーター複合体の輸送ダイナミクスを、マイクロ流路セルと組み合わせた 3 つの時間分解レーザー分光計測系と、最先端の光源である XFEL を用いた時間分解 SFX (TR-SFX) を駆使して多角的に解析し、小分子の膜輸送の分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本申請課題では以下の 2 つの命題を設定し、研究を遂行した。

- (i) 輸送基質の取り込み・輸送、ABC トランスポーターのコンフォメーション変化、ATP の結合・加水分解反応、PP と ABC トランスポーターの離合・集散が同期しているか？
- (ii) NBD の ATP 結合/加水分解に伴う構造変化と TMD の構造変化がどのように連動しているか？

#### (1) 新規測定装置の開発

ABC トランスポーターの構造・輸送ダイナミクスの実時間観察を可能にするために、分子拡散型マイクロ流路ミキサーによる溶液混合、あるいはケージド ATP への光照射という 2 つの手法を利用しながら、4 つの時間分解計測法を新規に開発した。

#### (2) ABC トランスポーターのダイナミクス観察

種々の ABC トランスポーターが存在する中で、ヘムを細胞内へ輸送するヘムインポーター: BhuUV を対象とする。BhuUV を選択することの最大の利点は、輸送基質であるヘム自体をプローブにでき、ABC トランスポーターの輸送ダイナミクスを実時間で初めて観測できることにある。

ミリ秒の時間分解能をもつ分子拡散型ミキサーを組み込んだ 3 種類の時間分解分光法を新規開発し、輸送基質であるヘムの受け渡し/輸送、輸送を駆動する基質 ATP の結合/加水分解、BhuUV のコンフォメーション変化、BhuT/BhuUV の離合・集散という 4 つのダイナミクスについて、それぞれが起こるタイミングと反応速度の ATP 濃度依存性を解析する。以上の結果を統合することで、ABC トランスポートを実現する素反応の共役性について詳細に検討し、BhuUV と BhuT の離合・

集散を制御する分子間相互作用についても明らかにする。

#### (2-1) ヘム輸送ダイナミクス

輸送は輸送基質である小分子の化学変化を伴わないために、どのタイミングで輸送が起こっているかを同定することは困難であった。ヘムは可視光を吸収し、結合様式によって吸収スペクトルが変化することから、プローブとして用いることが可能である。つまり、BhuT に結合している状態、BhuUV に受け渡された状態、そして溶媒に放出された状態をそれぞれ検出できると考えられる。そこで、可視吸収スペクトルの変化を追跡することによって、ヘムがどのタイミングで取り込まれ、輸送されているかを明らかで期待される。可視吸収分光計測については、研究代表者が平成 25 年度に構築したマイクロ秒の時間分解能をもつ自作の時間分解可視吸収スペクトル計測装置に対して、マルチチャンネル CCD 分光器を新規導入することで S/N を 10 倍以上高感度化し、精密計測を行う。

#### (2-2) ATP 結合/加水分解反応

ATP は赤外領域に吸収をもつことから、時間分解赤外吸収分光計測によって結合・加水分解反応を追跡できる。この計測には、所属研究室において平成 26 年度に作製した、フェムト秒赤外レーザー技術と高精度のマルチチャンネル赤外検出系を駆使した自作の分散型赤外分光装置を用いる。

#### (2-3) BhuUV のコンフォメーション変化

コンフォメーション変化の観察には蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を伴う蛍光寿命計測が有効である。蛍光エネルギー供与体(D)と受容体(A)を TMD もしくは NBD に化学修飾し、D の蛍光寿命を計測すると、フェルスターのエネルギー移動の式に基づいて、D-A 間距離が算出でき、コンフォメーション変化の時間分解解析が可能になる。蛍光寿命計測は若手研究(A)で確立した蛍光顕微鏡と時間相関単一光子計数法を組み合わせた計測系を利用する。

#### (2-4) BhuT/BhuUV の離合・集散ダイナミクス

BhuT・BhuU に D・A をそれぞれ化学修飾し、D・A の蛍光寿命を同時に計測することで BhuT と BhuUV の離合・集散がどのタイミングで起こるかを検証する。

#### (2-5) 構造変化の連動性

ヘム輸送の実現には、「ATP 結合・加水分解が NBD の構造変化を誘起し、それが TMD へと伝達し、TMD の構造変化によってヘム結合ポケットが細胞質に露出する」という仮説がたてられている。しかし、NBD および TMD の構造変化の連動性を議論するためには(2-3)の FRET 計測による距離という 2 次元情報だけでは不十分であり、アミノ酸・原子レベルの空間分解能で、3 次元構造の時間変化が必要である。それを実現できる唯一の手法は SACLA の XFEL 光源を利用した時

間分解シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析(TR-SFX)である。ケージド ATP を含んだ BhuUV-T 複合体微結晶へ紫外光照射を行うことによって ATP を放出し、それによって誘起されるヘム輸送の時間軸に沿った結晶構造解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規測定装置の開発と応用

マクロ流路ミキサーを開発当初はフォトレジストと PDMS によって作製していたが、PDMS は赤外光および近紫外光を吸収してしまうことから応用できない分光法があることが確認された。そこで、化学エッチング処理を施したステンレス薄膜(厚さ 20-50  $\mu\text{m}$ )を 2 枚の石英窓あるいは  $\text{CaF}_2$  窓によって挟んだ新たなマイクロ流路ミキサーを作製した。

##### 時間分解紫外/可視吸収測定装置

マイクロ流路ミキサーの観察流路中を流れる 10  $\mu\text{m}$  以下のタンパク質試料流れを観察するために、カセグレン鏡を用いた顕微分光器を独自に開発した。その結果、15  $\mu\text{m}$  まで観察光を絞ることに成功し、効率的な分光測定が可能になった。また LabVIEW を用いて独自に測定用ソフトウェアを作成し、共同研究等にも適用可能なシステム開発を行った。その結果、10 秒間の積算時間で 350-700 nm の範囲の吸収スペクトル変化を 0.5 mOD 以下のノイズで測定可能にした。

##### 時間分解赤外吸収測定装置

ATP は赤外領域に吸収をもち、特に ATP に特有の  $\gamma$ -リン酸由来の 1250  $\text{cm}^{-1}$  付近の  $\text{PO}_2^-$  基の伸縮振動由来のバンドを観察することで、加水分解反応を追跡できる。この計測には、理化学研究所在籍時に作製した、フェムト秒赤外レーザー技術と高精度のマルチチャンネル赤外検出系を駆使した自作の分散型赤外分光装置を用いることで予備実験を開始した。しかし、研究遂行に伴って、より高い S/N と空間分解能での測定を実現するためには焦点サイズを 150  $\mu\text{m}$  から一桁オーダー小さくする必要性があった。そこで、SPRing-8 BL43IR の放射光赤外顕微鏡を利用し、赤外ビームを 15 x 15  $\mu\text{m}^2$  まで絞ることを

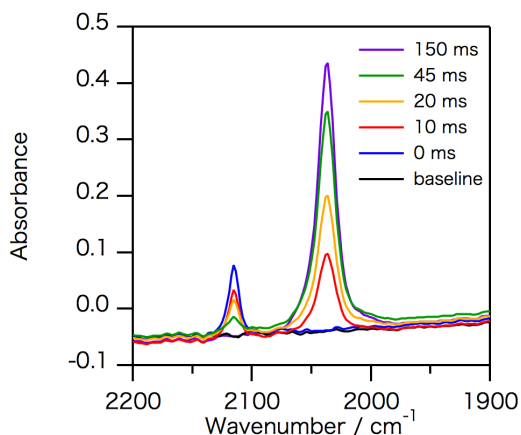


図 1. 時間分解顕微赤外分光法によるシアニ化鉄(III)の還元反応

試みた。この赤外ビームをマイクロ流路中の試料溶液流れに照射し、FT-IR 測定を行うことを可能にした。マイクロ流路での観察位置の変更や流速を制御しながら、シアニ化鉄(III)イオンのアスコルビン酸による還元反応を追跡し、装置の性能評価を行ったところ時間分解能が 10 ミリ秒と見積もることができた。

##### 時間分解蛍光寿命計測

コンフォメーション変化の観察には蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を伴う蛍光寿命計測が有効である。蛍光寿命計測系は若手研究(A)で確立したマイクロ流路ミキサーと蛍光顕微鏡の測定系に加えて、時間相関単一光子計数測定を可能にするアバランシェフォトダイオードとカウンティングボードを導入し、反応軸に沿った蛍光寿命測定が可能な計測系を異動後の神戸大学において構築した。これにより、D-A ペアを導入したタンパク質の構造変化、あるいは D および A を相互作用タンパク質にそれぞれ導入したタンパク質ペアの分子間相互作用を測定可能にした。蛍光寿命測定を行うことで、距離分布関数を計算可能であり、反応に伴ってどのような構造がどの程度蓄積するのかという情報を得ることが可能になった。

時間分解シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析法( TR-SFX )の構築と相補的な微結晶試料に対する時間分解可視吸収測定装置の応用

光照射によって微結晶中のタンパク質反応を開始させるための光学系を構築し、SACLA の DAPHINES への導入・最適化を行った。Nd:YAG ( Continuum ) あるいはダイオード励起一体型高エネルギー波長可変 OPO ( EKSPLA ) を二方向から  $\phi 50$ -150  $\mu\text{m}$  の試料ストリームに対して照射する。励起レーザーは試料ストリームに対して  $\phi 180$ -200  $\mu\text{m}$  のトップハット型のパワープロファイルをとっており、微結晶試料を励起するに十分なエネルギー密度を持つことを確認した。

以上の光励起 TR-SFX を用いて、バクテリオロドプシン、光化学系 II、シトクロム *c* オキシダーゼの光反応に伴う構造変化を追跡することに成功した。

一方、光励起系を自作の可視吸収測定装置に組み込み、微結晶中のタンパク質の光反応を追跡することを可能にした。これは上記の微結晶に対する TR-SFX と相補的な手法であり、タンパク質の機能に関する反応を時間分解解析し、TR-SFX で測定できる構造変化がどのような機能と相関があるのかを明らかにする上で非常に重要な役割を果たすものである。励起光は TR-SFX 用と同様の  $\phi 150$   $\mu\text{m}$ 、測定用プローブ光を放物面ミラーによって色収差なく  $\phi 100$   $\mu\text{m}$  に集光することで、10~20  $\mu\text{m}$  のバクテリオロドプシン微結晶の光反応サイクルに対して時間分解測定を行った。それによって、TR-SFX において測定した各反応遅延時間にどの中間体が蓄積し



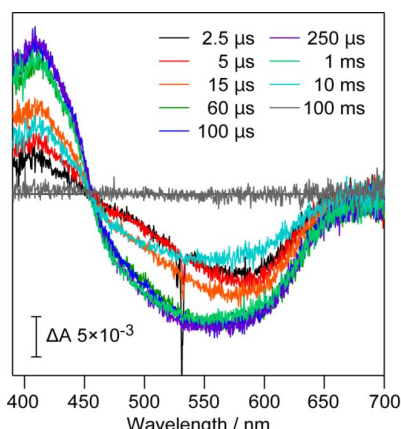


図 2. バクテリオロドプシンの微結晶試料の時間分解可視吸収測定結果。

ているのかを明らかにすることができた。

## (2) 新規時間分解測定系の ABC トランスポーターへの応用

種々の ABC トランスポーターが存在する中で、ヘムを細胞内へ輸送するヘムインポーター: BhuUV を対象とする。BhuUV を選択することの最大の利点は、輸送基質であるヘム自体をプローブにでき、ABC トランスポーターの輸送ダイナミクスを実時間で観測できると期待された。

### 時間分解可視吸収測定

ヘムを BhuT に結合させた水溶液とトランスポーター-BhuUV を混合したところ、BhuUV にヘムが移動しているスペクトルが観察された。その混合溶液に ATP を加え、輸送反応を誘起したところスペクトル変化が観察され、ヘムの輸送が確認された。その後のスペクトル変化を追跡したところ時定数 30 min の速度で BhuUV-T 複合体が最終的に形成することが明らかとなった。

### 時間分解 FTIR 吸収測定

上記と同様のマルチターンオーバー条件下での反応をマイクロ流路フローセルを用いて FTIR 観察したところ、同じ字定数で ATP 加水分解反応が進行していることが明らかとなった。これは加水分解活性測定から求められた回転数によって説明することができ、分光学的にも ATP 加水分解反応が観察できることが明らかとなった。

### 時間分解蛍光寿命計測

**D-A** 蛍光ラベルを BhuUV に導入するために野生型の 7 つのシステイン残基をセリン残基に変異させた。その後、チャンネルの開閉をモニタするためにシステイン残基を新たに導入した。しかし、BhuUV は同一二量体であり、D および A ラベルをヘテロに導入することはできなかった。そこで、スピンラベル ESR によって距離変化を測定することに方針を転換し、ラベル化試料の作製を行った。BhuT と BhuUV の相互作用についても蛍光ラベル修飾を行なったが、ヘムの吸収が大きく、相互作用反応の追跡が困難であった。

TR-SFX 測定を目指した微結晶試料作製

TR-SFX 測定を行うためには 10-20  $\mu\text{m}$  程度の大きさを持ち、十分な回折を得ることのできる質の良い微結晶試料を作製する必要がある。そこで、BhuUV の結晶化条件の最適化を行なった。2000 種類の結晶化条件を検討し、100  $\mu\text{m}$  サイズの結晶で、3.2  $\text{\AA}$  分解能を実現する結晶化条件を見出した。この条件をさらに最適化し、微結晶化が可能になると考えられる。なお、結晶化条件の最適化に伴って、ヌクレオチド結合型を結晶構造解析することを試みたが、加水分解生成物である ADP あるいは ATP 結合がたを模倣 AMP-PNP はヌクレオチド結合サイトと結合することはなく、ATP ヘソキングしたところ、回折が消失した。したがって、ATP により反応が駆動されることが確認できたことから、やはり SACLA を用いた TR-SFX が最適の測定法であることが明らかとなった。

また、ケージド化合物を利用した TR-SFX 測定の可能性を探るために、caged-NO を用いて、NO 還元反応を触媒する一酸化窒素還元酵素の TR-SFX を行い、NO 結合型の中間体の捕捉に成功した。続いて、caged-ATP の光励起による ATP 放出反応を追跡したが、現在利用可能なレーザーのエネルギーでは放出量が不十分であること、そして ATP の光解離による放出が数 10 ms の時間を要することから新たな手法開発が必要とされた。そこで、微結晶を含む溶液試料に対して、マイクロ流路を用いて分子拡散により ATP を結合させる新たな溶液混合装置の開発を行った。その性能評価実験として、イソクエン酸脱水素酵素のイソクエン酸から脱炭酸を行う反応系の TR-SFX を行うことに成功した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 9 件)

Takehiko TOSHA<sup>†</sup>, Takashi NOMURA<sup>†</sup>, Takuma NISHIDA<sup>†</sup>, Naoya SAEKI, Kouta OKUBAYASHI, Raika YAMAGIWA, Michihiro SUGAHARA, Takanori NAKANE, Keitaro YAMASHITA, Kunio HIRATA, Go UENO, Tetsunari KIMURA, (他 20 名), Hiroshi SUGIMOTO<sup>\*</sup>, Yoshitsugu SHIRO<sup>\*</sup>, Minoru KUBO<sup>\*</sup> (<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.) “Capturing an Initial Intermediate during the P450<sub>nor</sub> Enzymatic Reaction using Time-Resolved XFEL Crystallography and Caged-Substrate”, (2017), *Nat. Commun.*, **8**, 1585. [doi: 10.1038/s41467-017-01702-1.] (査読有)  
Minoru KUBO, Eriko NANGO, Kensuke TONO, Tetsunari KIMURA, (他 19 名) “Nanosecond pump-probe device for time-resolved serial femtosecond crystallography developed at SACLA.”, (2017), *J Synchrotron Radiat.*, **24**, 1086-1091. [doi: 10.1107/S160057751701030X.] (査読

有)

Atsuhiko SHIMADA<sup>†</sup>, Minoru KUBO<sup>†</sup>, Seiki BABA<sup>†</sup>, Keitaro YAMASHITA, Kunito HIRATA, Go UENO, Takashi NOMURA, Tetsunari KIMURA, (他 18 名), Hideo AGO\*, Shinya YOSHIKAWA\*, Tomitake TSUKIHARA\* (<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.) “A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from Cytochrome *c* Oxidase”, (2017), *Science Adv.*, **3**, e1603042 [DOI: 10.1126/sciadv.1603042] (査読有)

Michihiro SUGA, (他 13 名), Tetsunari KIMURA, (他 22 名), Jian-ren SHEN\*, “Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL”, (2017), *Nature*, **543**, 131-135. [DOI:10.1038/nature21400] (査読有)

Eriko NANGO, Antoine ROYANT, Minoru KUBO, Takanori NAKANE, Cecilia WICKSTRAND, Tetsunari KIMURA, (他 37 名), Richard NEUTZE\*, So IWATA\*, “A three-dimensional movie of structural changes in bacteriorhodopsin”, (2016), *Science*, **354**, 1552-1557 [DOI: 10.1126/science.aah3497] (国際共著)(査読有)

Przemyslaw NOGLY, Valerie PANNEELS, Garrett NELSON, Cornelius GATI, Tetsunari KIMURA, (他 39 名), “Lipidic cubic phase injector is a viable crystal delivery system for time-resolved serial crystallography”, (2016), *Nat. Commun.* **7**, 12314 (Jun 22, 2016 accepted) [DOI: 10.1038/ncomms12314] (国際共著)(査読有)

Miyuki SAKAGUCHI<sup>#</sup>, Tetsunari KIMURA<sup>#</sup>, Takuma NISHIDA, Takehiko TOSHA, Yoshihiro YAMAGUCHI, Sachiko YANAGISAWA, Go UENO, Hironori MURAKAMI, Hideo AGO, Masaki YAMAMOTO, Takashi OGURA, Yoshitsugu SHIRO, Minoru KUBO\*, “A nearly on-axis spectroscopic system for simultaneously measuring UV-visible absorption and X-ray diffraction in the SPring-8 structural genomics beamline”, (2016), *J. Synch. Rad.*, **23**, 334-338 (<sup>#</sup>equally contributed). [doi: 10.1107/S1600577515018275] (査読有)

[学会発表](計 23 件)

1. 木村哲就「新規時間分解分光法の開発と膜タンパク質ダイナミクスへの応用」, 神戸大学先端融合科学セミナー, 神戸市, 2016年4月27日(国内・招待講演)
2. 木村哲就 “Intermediate structures of the active site in membrane proteins revealed by time-resolved spectroscopy with micro-channel devices.”, 日本生物物理学

会第 53 回年会, つくば市, 2016 年 11 月 25-27 日(国内・招待講演)

3. 木村哲就「反応のダイナミクス —今、そこで何が起きているのか?—」KRP アイデアシェアリングコミュニティ(KRP-ISC) Session1, 京都市, 2017 年 1 月 19 日(国内・招待講演)
4. 木村哲就「生体分子システムの分子機構解析に資する時間分解測定法の開発」, 第 3 回 K-CONNEX 研究会, 神戸市, 2017 年 3 月 3 日(国内・招待講演)
5. 木村哲就「時間分解分光法による ABC トランスポーターの輸送と ATP 加水分解過程の直接観察」, 日本生物物理学会第 54 回年会, 熊本市, 2017 年 9 月 19-21 日(国内・招待講演)
6. 木村哲就「新規リアルタイム観察装置の開発によるタンパク質の分子機構解明への挑戦」, 第 6 回 K-CONNEX 研究会, 神戸市, 2018 年 3 月 9 日(国内・招待講演)

[図書](計 0 件)

[その他]

報道関連: 雑誌論文 に関連

[http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016\\_12\\_26\\_01.html](http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_12_26_01.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 哲就 (KIMURA, Tetsunari)

神戸大学・大学院理学研究科・特命講師

研究者番号: 7 0 5 0 6 9 0 6

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

鐺木 基成 (TSUBAKI, Motonari)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 0 0 1 4 5 0 4 6

杉本 宏 (SUGIMOTO, Hiroshi)

理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員

研究者番号: 9 0 3 4 4 0 4 3

城 宜嗣 (SHIRO, Yoshitsugu)

兵庫県立大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 7 0 1 8 3 0 5 1

### (4) 研究協力者

林 沙英 (HAYASHI, Sae), 大西 萌 (ONISHI, Kizashi), 下中 美怜 (SHIMONAKA, Misato)

藤井 宏一 (FUJII, Koichi), 武田 英恵 (TAKEDA, Hanae)