

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18937

研究課題名（和文）新しい金属酵素研究へのテラヘルツ電子スピン共鳴法の応用

研究課題名（英文）Application of novel THz ESR for metalloenzymes

研究代表者

堀谷 正樹（Horitani, Masaki）

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：80532134

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：金属酵素は金属イオンの電子状態を上手く操作することで機能発現していることが知られているが、市販のESR装置では半整数スピンをもつもののみが研究対象であった。そこで、すべての金属酵素を測定対象とすべく高周波数・強磁場ESR装置の開発および金属酵素のESR信号検出に取り組んだ。これまでに開発してきた高周波数ESR装置では感度不足なため金属酵素のようなスピン濃度希薄系では信号が観測できないことが分かった。そこで従来より1,000～1,000,000倍高出力なジャイロトロン高周波数発振器を利用したESR測定に取り組み、世界で初めて金属タンパク質由来のジャイロトロンテラヘルツESR信号の観測に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高検出感度である熱検出器および高出力発振器であるジャイロトロンを利用することで、これまで不可能だと考えられていた金属タンパク質の高周波数・強磁場電子スピン共鳴（ESR）信号の観測に成功した。これにより市販の装置で信号検出できる金属タンパク質以外の試料や反応中間体も研究対象となることが明らかになった。また、ジャイロトロンを利用した最大出力テラヘルツ光を利用することで、市販の装置ではESR信号を飽和させることのできない金属タンパク質も飽和させられることが明らかになった。この現象は通常のESRより発展的な測定法である電子-核二重共鳴法（ENDOR）への応用が可能であることを示している。

研究成果の概要（英文）：The function of metalloprotein has a relationship with the electron structure of metal ion in the active site. The conventional EPR, however, can detect signals from metalloproteins with half interger spin system. Thus we have developed high frequency and high field EPR spectroscopy.

The EPR transition of metalloproteins was not observed by using reacently developed high frequency EPR spectroscopy since metalloprotein has only one metal ion in the large macromolecule. To increase the sensitivity of high frequency EPR, we have utilized gyrotpron THz osillator as a light source, which was one thousand to one million higher power.

研究分野：生物物理

キーワード：金属酵素 電子常磁性共鳴 テラヘルツ ヘムタンパク質 高周波数強磁場ESR 整数スピン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

金属タンパク質、金属酵素は、その活性中心に含む『遷移金属イオンの電子状態や配位構造を上手く変化させ、多種多様な化学反応を触媒する』重要な生体内キープレイヤーである。特に金属酵素の代表格である『ヘム酵素』は、その活性中心に鉄イオンを含む、プロトポルフィリン IX (ヘム) を有する。このヘム鉄の電子状態や配位構造の詳細な情報を解析することは、ヘム酵素の生理学的な機能を正確に理解するのに必要不可欠である。このような情報を詳細に検出できる最も適した物理化学的手法が、『電子スピン共鳴法』(Electron Spin Resonance:『ESR』) であり、これまで多くのヘム酵素の研究において『ESR』が主役を担ってきた。しかし市販 ESR 装置ではヘム鉄イオンが  $\text{Fe}^{3+}$  (スピン量子数  $S = 5/2, 1/2$ ) などの半整数スピン系を持つ時のみが測定対象となり、生理的活性を有する整数スピン系  $\text{Fe}^{2+}$  ( $S = 2$ ) や反応中間体 ( $S = 1, 2, \dots$ ) 等は、測定不可能であった。これは市販の装置では整数スピン系の ESR 遷移を観測するのに必要な周波数、磁場ともに不足しているだけである。このような背景があり、2000 年代に入り世界中で高周波数・強磁場 ESR 装置の開発が盛んとなってきた。市販の装置では空洞共振器を使用することで装置の高感度化が行われているが、高周波数 ESR で使用されるマイクロ波は波長が mm サイズ以下になるため、空洞共振器による高感度化が不可能である。そのため、高周波数・強磁場 ESR 装置による研究は磁性体などに留まっていた。

### 2. 研究の目的

金属タンパク質や金属酵素はアミノ酸から成る巨大な高分子中にひとつしか金属イオンが存在しない。またタンパク質や酵素はたくさんの水分子に囲まれており、濃度を上昇させることが困難である。このように金属タンパク質・金属酵素中の金属イオンから ESR 信号を取り出すことは困難である。高周波数・強磁場 ESR では上述のとおり、感度が低いことがネックとなり、生体分子への研究が進んでいない。そこで、本研究では金属タンパク質の ESR 信号が可能な装置開発に取り組む。

### 3. 研究の方法

以下、2 種類のアプローチから高周波数・強磁場 ESR 装置による金属タンパク質の ESR 信号観測に挑戦する。

市販の装置の高感度化は空洞共振器と磁場変調の利用により達成されている。ところが、これら 2 つを現在開発している高周波数・強磁場 ESR 装置に組み込むことは技術的に困難である。そこで、信号検出系をメンブレン検出法および熱検出法にすることで高感度化を行う。通常の高周波数マイクロ波の発振器はガンダイオード発振器による通倍波などを利用することから発振強度が  $\text{mW} \sim \mu\text{W}$  レベルとなる。ESR 測定では発振周波数による信号の飽和が起こらない限り、高強度光の方が信号強度は増大する。つまり高出力高周波数マイクロ波の利用によって高感度な測定が期待できる。そこで高出力が期待できるジャイロトロン発振器を利用し、金属タンパク質由来 ESR 信号の観測を目指す。

### 4. 研究成果

メンブレン検出および熱検出高周波数・強磁場 ESR 装置は神戸大学分子フォトサイエンス研究センター設置の分光器を利用した。まず初めにメンブレン検出法による金属タンパク質由来高周波数 ESR 信号の検出を目指した。当装置では粉末試料のみが測定対象であった。しかしタンパク質試料は大量の水を含有するため、水溶液試料の測定ができるように試料ホルダーの開発を行った。新しい試料ホルダーで  $\text{Fe}^{3+}$  ミオグロビン (Mb) についての測定を行ったが、開発した試料ホルダーでは供することのできる試料量に制限があり、信号検出に十分なスピン量を持った試料を供せないことが明らかになった。そこで試料濃度を高めることで信号検出に至らないか検証を行った。遺伝子組み換え大腸菌を利用して大量にマッコウクジラ由来 Mb を発現させ、高純度になるように精製を行った。この試料を限外濾過によって 20mM 程度の Mb になるまで濃縮を行った。ここでさらに高濃度化できるように凍結粉末状にした。この試料について ESR 測定を行った結果、信号観測はさらたが、ベースラインの再現性に問題があることが明らかになった。これはメンブレンの外部振動によるものだと考えられる。

そこで検出法を熱検出型に変更して同様の測定を行った。熱検出型では試料ホルダーが金属製であることから、上述の外部振動が避けられると予想された。そこで高濃度化・凍結粉末化した試料を銅製ステージに設置し、高周波数・強磁場 ESR 測定を行った。その結果、 $\text{Fe}^{3+}$ Mb の多周波数で強磁場 ESR 信号の検出に成功した。これは熱検出 ESR 法において世界で初めての金属タンパク質の ESR 信号の観測である。

ジャイロトロン発振器を用いた金属タンパク質の ESR 測定はこれまでに行われていない。そ

ここで、福井大学遠赤外領域研究開発センターで開発されているジャイロトロン発振器を利用して、金属タンパク質の高周波数・強磁場 ESR 信号の観測を行った。一般的に  $\text{Fe}^{3+}\text{Mb}$  の ESR 信号は高強度マイクロ波でも信号の飽和は観測されないと知られている。そこで高感度測定のため、最大出力でジャイロトロンより 154 GHz を発振し、 $\text{Fe}^{3+}\text{Mb}$  の ESR 測定を行った。その結果、予想に反して信号が観測されなかった。そのため、発振強度を 125 mW まで下げて測定を行ったところ、強い ESR 信号が観測されることが明らかになった。これは世界初の金属タンパク質のジャイロトロン ESR 信号の観測である。また今回の研究により高出力ジャイロトロンを利用することで、 $\text{Fe}^{3+}\text{Mb}$  の ESR 信号を飽和させられることが明らかになった。ESR 信号を飽和させることができると、他の電子-核二重共鳴法などの先端的測定に利用できる。今後は先端的測定法への開発も視野に入れた分光器の開発も行う。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Horitani Masaki, Yamada Risa, Taroura Kanami, Maeda Akari, Anai Toyoaki, Watanabe Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of Genes Responsible for the Synthesis of Glycitein Isoflavones in Soybean Seeds	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 156 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants13020156	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 Kobayashi Kazuo, Ito Yuko Tsutsui, Kasu Yuri, Horitani Masaki, Kozawa Takahiro	4. 巻 238
2. 論文標題 Intramolecular electron transfer from bipterin to FeII-O2 complex in nitric oxide synthases occurs at very different rates between bacterial and mammalian enzymes: Direct observation of a catalytically active intermediate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 112035 ~ 112035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2022.112035	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 Takeda Hanae, Shimba Kanji, Horitani Masaki, Kimura Tetsunari, Nomura Takashi, Kubo Minoru, Shiro Yoshitsugu, Toshi Takehiko	4. 巻 127
2. 論文標題 Trapping of a Mononitrosyl Nonheme Intermediate of Nitric Oxide Reductase by Cryo-Photolysis of Caged Nitric Oxide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 846 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c05852	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 Ishizaka Masato, Chen Minghao, Narai Shun, Tanaka Yoshikazu, Ose Toyoyuki, Horitani Masaki, Yao Min	4. 巻 24
2. 論文標題 Quick and Spontaneous Transformation between [3Fe-4S] and [4Fe-4S] Iron-Sulfur Clusters in the tRNA-Thiolation Enzyme TtuA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 833 ~ 833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010833	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 Yamashita Tatsuya, Matsuda Hiroki, Koizumi Kyohei, Thirumalaisamy Logu, Kim Myeongok, Negishi Lumi, Kurumizaka Hitoshi, Tominaga Yoriko, Takagi Yoshihiro, Takai Ken, Okumura Taiga, Katayama Hidekazu, Horitani Masaki, Ahsan Nazmul, Okada Yoshitaka, Nagata Koji, Suzuki Yohey, Suzuki Michio	4. 巻 -
2. 論文標題 Heme protein identified from scaly-foot gastropod can synthesize pyrite (FeS <sub>2</sub> ) nanoparticles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2023.03.005	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 Nagasawa Tomotaka, Horitani Masaki, Kawaguchi Shin ichi, Higashiyama Shigeki, Hama Yoichiro, Mitsutake Susumu	4. 巻 11
2. 論文標題 The molecular mechanism of phytosphingosine binding to FFAR4/GPR120 differs from that of other fatty acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 3081 ~ 3089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13301	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 Ishida Konan, Tsukamoto Yuya, Horitani Masaki, Ogawa Tomohisa, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 85
2. 論文標題 Biochemical properties of CumA multicopper oxidase from plant pathogen, Pseudomonas syringae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1995 ~ 2002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab123	査読の有無 無
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25件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 黒岩 もね, 垣内 亮, 平山 祐, 堀谷 正樹
2. 発表標題 ヘム駆動型フェロミクスプローブの反応機構解明
3. 学会等名 第62回電子スピンスイェンス学会年会 (SEST2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嘉数 百合, 堀谷 正樹
2. 発表標題 急速凍結-電子常磁性共鳴 (EPR) 法を用いた金属酵素活性中心における構造変化の温度依存性
3. 学会等名 第62回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masaki Horitani
2. 発表標題 The combination of EPR spectroscopy and X-ray crystallography revealed that the active site rearrangement of the di-metal center by substrate binding is temperature dependent
3. 学会等名 2023 International Joint Meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics (2023 ICCP450/JSSX) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀谷 正樹
2. 発表標題 ESRで何が見える? ~立体構造解析への羨望とその先へ~
3. 学会等名 第35回生物無機化学夏季セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀谷 正樹, 嘉数 百合, 杉本 宏
2. 発表標題 酵素は熱安定性を下げずに低温適応できるか? ~X線結晶構造解析・EPR法で観る南極産好冷細菌由来金属酵素~
3. 学会等名 極限環境生物学会第24回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀谷 正樹
2. 発表標題 高速混合凍結-EPR法で観る金属酵素活性中心構造変化と酵素活性の相関～低温適応複核Mn <sup>2+</sup> 酵素～
3. 学会等名 第26回ESRフォーラム研究会2023京都（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嘉数 百合, 坂本 貴太郎, 杉本 宏, 堀谷 正樹
2. 発表標題 X線・電子常磁性共鳴法で観る複核Mn中心金属酵素の構造柔軟性と活性相関
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嘉数 百合, 堀谷 正樹
2. 発表標題 電子スピン共鳴法で”観る”金属酵素活性部位の温度による微細構造変化
3. 学会等名 第25回ESRフォーラム研究会（2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢埜 紅音, 浅香 里緒, 渡邊 啓一, 堀谷 正樹
2. 発表標題 スピンラベル-ESR法を利用した酵素の構造柔軟性の実測
3. 学会等名 第25回ESRフォーラム研究会（2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀谷 正樹
2. 発表標題 南極海由来金属酵素の酵素反応・低温適応機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 和輝, 奥村 英夫、馬場 清喜、杉本 宏, 堀谷 正樹
2. 発表標題 先端X線回折法によるグルコキナーゼの動的構造-機能相関の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻 さやか, 大貝 茂希、福田 雅一、屋 宏典、杉本 宏, 堀谷 正樹
2. 発表標題 反応中間体捕捉から解き明かすミモシン合成酵素の2機能性獲得機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度西日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Horitani
2. 発表標題 EPR Spectroscopy Reveals Active Site Rearrangements of Di-Mn Center in Inorganic Pyrophosphatase
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Masaki Horitani
2. 発表標題 EPR Spectroscopy Reveals the Differences of Active Site Structure for Di-Mn Enzymes from Mesophilic and Psychophilic Bacteria
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akane Yato, Rio Asaka, Hiroshi Sugimoto, Keiichi Watanabe, Masaki Horitani
2. 発表標題 X-ray Crystallography and Spin-Labeling ESR Reveal Cold Adaptation and High Thermal Stability Mechanism of Cold-Adapted Glucokinase
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Horitani
2. 発表標題 EPR Spectroscopy and X-ray Crystallography Revealed Rearrangements of Di-Mn Active Site by Substrate Binding in Inorganic Pyrophosphatase
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢埜紅音、浅香里緒、渡邊啓一、堀谷正樹
2. 発表標題 スピンラベル-ESR法を利用した酵素の構造柔軟性の実測
3. 学会等名 第61回電子スピサイエンス学会年会 (SEST2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀優菜、堀谷正樹
2. 発表標題 ヘムトランスポーターの輸送機構解明へ向けた新たな反応中間体捕捉法の開発
3. 学会等名 第61回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嘉数百合、堀谷正樹
2. 発表標題 急速凍結-電子常磁性共鳴 (EPR) 法を用いた金属酵素活性中心における構造変化の温度依存性
3. 学会等名 第61回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒岩もね、垣内亮、平山祐、堀谷正樹
2. 発表標題 ヘム駆動型フェロミクスプローブの反応機構解明
3. 学会等名 第61回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akane Yato, Rio Asaka, Hiroshi Sugimoto, Keiichi Watanabe, Masaki Horitani
2. 発表標題 X-ray Crystallography and Site-Directed Spin-Labeling ESR Reveal Cold Adaptation and High Thermal Stability Mechanisms of Cold-Adapted Glucokinase
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Horitani, Yuri Kasu, Hiroshi Sugimoto, Keiichi Watanabe
2. 発表標題 Analysis on Cold Adaptation Mechanism of Metalloenzyme by X-ray Crystallography and EPR Spectroscopy Combined with Rapid Freeze-Quench
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀谷 正樹, 杉本 宏, 渡邊 啓一
2. 発表標題 急速凍結EPR法およびX線結晶構造解析法による好冷細菌由来無機ピロフォスファターゼの低温適応機構の解明
3. 学会等名 第47回生体分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 貫太郎, 杉本 宏, 渡邊 啓一, 堀谷 正樹
2. 発表標題 X線結晶構造解析法による低温適応無機ピロフォスファターゼの触媒活性機構の解明
3. 学会等名 第47回生体分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢埜 紅音, 浅香 里緒, 杉本 宏, 渡邊 啓一, 堀谷 正樹
2. 発表標題 動的・静的構造解析による南極産好冷細菌由来グルコキナーゼの低温適応・高熱安定性機構の解明
3. 学会等名 第47回生体分子討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀谷 正樹、堀 洋	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス 監修：城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学、第5章 測定解析技術・第3節 "磁気共鳴EPRでヘムタンパク質の何をみるか？ 活性中心の電子状態とマイクロ分子環境	

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐賀大学農学部生命機能科学科分子生命科学分野堀谷研究室 <a href="http://horitani.ag.saga-u.ac.jp/horitani/lab/index.html">http://horitani.ag.saga-u.ac.jp/horitani/lab/index.html</a> 佐賀大学農学部生命機能科学科分子生命科学分野堀谷研究室 <a href="http://horitani.ag.saga-u.ac.jp/horitani/lab/index.html">http://horitani.ag.saga-u.ac.jp/horitani/lab/index.html</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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	大久保 晋  (Okubo Susumu)  (80283901)	神戸大学・分子フォトサイエンス研究センター・准教授    (14501)	
研究分担者	原 茂生  (Hara Shigeo)  (60520012)	神戸大学・研究基盤センター・特命技術員    (14501)	

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
---------	---------