

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

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：19H05776

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Non-equilibrium-state molecular movies and their applications

研究代表者

岩田 想（Iwata, So）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60452330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 42,800,000円

研究成果の概要（和文）：より多くの生体高分子観察に適用できる普遍的な方法として確立するためビームラインのエンジニアリング、タンパク質工学、ケミカルバイオロジーなどの技術を最大限に活用し「高速分子動画」法から制限をできるだけ取り除くことを行った。この結果、視覚ロドプシンやDNAフォトリアーゼなどの新しいタンパク質の高速分子動画を得ることに成功した。さらに実際に観察された「高速分子動画」を計算科学や分光学の手法を用いて定量的、理論的に解析し報告した。またこの結果を元にタンパク質を制御できる新規化合物などの開発を行い、その性質についての評価を行った。またこれらの成果を報告・討論するための国際シンポジウムを開催した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本領域は単にタンパク質の分子動画を撮るだけではなく、タンパク質のダイナミクスを理解し、それに基づき新しい機能性タンパク質やタンパク質の機能を制御できる化合物を創生できる可能性を示した。今後は実際に光遺伝学に使える新規機能タンパク質や光薬理学に使えるツールを開発し、それらを基礎研究や臨床研究そして実際の治療法や新規薬物の開発につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：In order to establish this method as a universal method applicable to the observation of more biological macromolecules, we have tried to remove as many limitations as possible from the “molecular movie” method by maximizing the use of beamline engineering, protein engineering, chemical biology, and other technologies. As a result, we succeeded in obtaining fast molecular movies of new proteins such as visual rhodopsin and DNA photolyase. Furthermore, we reported a quantitative and theoretical analysis of the observed molecular movies using computational and spectroscopic methods. Based on these results, we also developed new compounds that can control proteins and evaluated their properties. An international symposium was held to report and discuss these results.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学 計算科学 ケミカルバイオロジー ビームラインテクノロジー 光薬理学 光遺伝学 分光学 動的構造解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

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、光感受性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する。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す。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する。

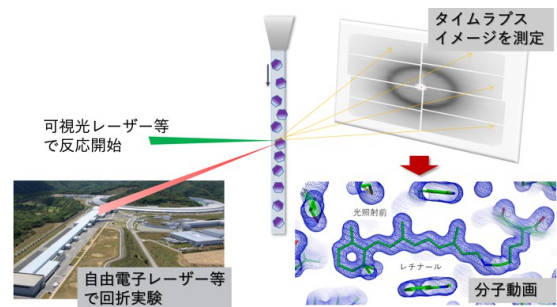


図1 高速分子動画面測定イメージ図

3. 研究の方法

高速分子動画面法では、XFEL のフェムト秒パルスを用いて、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う。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っている。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、これと分子動画面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する (図 2)。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・開発を実施する。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ている。

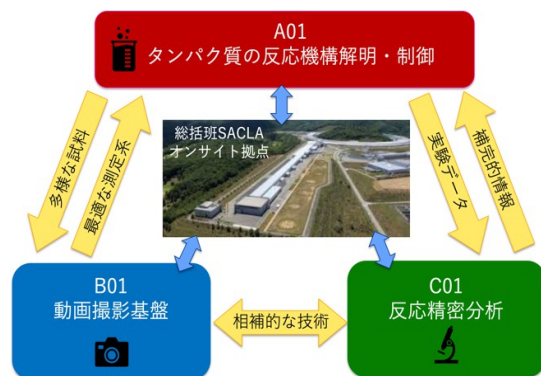


図2 研究戦略

4. 研究成果

研究項目ごとに進展状況・成果をまとめる。

研究項目 1 (A01): 高速分子動画面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
高速分子動画面の撮影に関して最も進んでいるのは草木迫らで、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明らかにし eLife (2021) に報告している (図 3)。反応開始より 1 ミリ秒後にヘリックス 3 と 7 が動くことにより、分子の内部に溶媒の侵入が可能になることが実験によって示された。志甫谷らは次の分子動画面のターゲットとなりうるシゾロドプシン (PNAS) および酵素型ロドプシン Rh⁻ PDE (Nat. commun. 2020) の静的な構造についても報告を行っており今後の研究に期待がもたれる。岩田らは 2 光子励起で光遺伝学ツール CRY2 を活性化する BFP との融合タンパク質を分子設計することに成

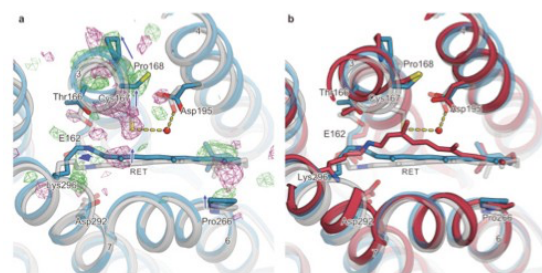


図3. チャンネルロドプシンの光照射による構造変化 (a. 灰色→水色)。QM/MM シミュレーションの結果 (b. 赤色) ともタンパク質部分の構造はよく一致する。

岩田らは 2 光子励起で光遺伝学ツール CRY2 を活性化する BFP との融合タンパク質を分子設計することに成

功しており、今後の動画撮影に興味を持たれる(Nature Meth. 2019)。

ミリ秒の時間制御を可能にする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た(Nat. Commun. 2021)。永野らは立体選択性が異なる 2 種類の DAase ではそれらの酵素の MD シミュレーションから、それぞれの酵素に基質が疑似的な鏡像異性のコンフォメーションで結合することで立体選択的な環化付加反応を行っていることを示している(Angew. Chem. Int. Ed. 2021)

研究項目 2 (B01) : 高速分子動画撮影法の基盤構築

南後らは基質と結晶を急速に混合する二液混合法の開発では、実際に酵素微結晶を用いて実験を行い、活性部位に基質、イオン、補酵素が結合している様子を時間に応じて追跡していくことに成功した。足立らは銅(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 Comm. 2019)。ジシアノ 金(I)錯体(Au(CN)⁻)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)。

研究項目 3 (C01) : 高速分子動画に資する反応精密分析

久保らは温室効果・オゾン層破壊の原因である N₂O の生物的発生機構を解明した(PNAS 2021)。具体的には、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。地球環境における N₂O 排出量を抑制する上で重要な分子基盤を提供すると考えられる。

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。バクテリオ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。

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)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 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 and *Shirouzu M.	4. 巻 119
2. 論文標題 Conformational alterations in unidirectional ion transport of a light-driven chloride pump revealed using X-ray free electron lasers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2117433119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2117433119	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 Pan Dongqing, Oyama Ryo, Sato Tomomi, Nakane Takanori, Mizunuma Ryo, Matsuoka Keita, Joti Yasumasa, Tono Kensuke, Nango Eriko, Iwata So, Nakatsu Toru, Kato Hiroaki	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 該当する
1. 著者名 Bath P, Banacore A, Borjesson P, Iwata S, *Branden G and *Neutze R. et al.	4. 巻 78
2. 論文標題 Lipidic cubic phase serial femtosecond crystallography structure of a photosynthetic reaction centre	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 698 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798322004144	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 該当する
1. 著者名 Gruhl T, Weinert T, Rodrigues M, Iwata S, Neutze R, Standfuss J, *Schertler G and *PanneelsV. et al.	4. 巻 615
2. 論文標題 Ultrafast structural changes direct the first molecular events of vision	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 939 ~ 944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-05863-6	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 該当する

1. 著者名 Maeda Shintaro, Shiimura Yuki, Asada Hidetsugu, Hirata Kunio, Luo Fangjia, Nango Eriko, Tanaka Nobuo, Toyomoto Masayasu, Inoue Asuka, Aoki Junken, Iwata So, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Endogenous agonist-bound S1PR3 structure reveals determinants of G protein subtype bias	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf5325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abf5325	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 Im D, Inoue A, Fujiwara T, Nakane T, Yamanaka Y, Uemura T, Mori C, Shiimura Y, Kimura KT, Asada H, Nomura N, Tanaka T, Yamashita A, Nango E, Tono K, Kadji FMN, Aoki J, *Iwata S and *Shimamura T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 6442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20221-0	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 Toyomoto M, Inoue A, Iida K, Denawa M, Kii I, Ngako Kadji FM, Kishi T, Im D, Shimamura T, Onogi H, Yoshida S, Iwata S, Aoki J, Hosoya T and *Hagiwara M.	4. 巻 28
2. 論文標題 S1PR3-G 12-biased agonist ALESIA targets cancer metabolism and promotes glucose starvation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chem Biol.	6. 最初と最後の頁 1132-1144.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.01.004.	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩田想
2. 発表標題 高速分子動画：これまでの成果と今後の展開
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田想
2. 発表標題 高速分子動画法とその分子制御への応用, Making Molecular Movies
3. 学会等名 第77回顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩田想
2. 発表標題 高速分子動画による構造ダイナミクス研究
3. 学会等名 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田想
2. 発表標題 抗体フラグメントを用いたGPCRの構造解析と創薬への応用
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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2件

国際研究集会 "Molecular Movies" International Symposium 2022	開催年 2022年～2022年
国際研究集会 "The Molecular Movies and beyond"	開催年 2023年～2023年

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