

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：24506

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：19H05784

研究課題名（和文）時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測

研究課題名（英文）Precise microspectroscopic measurements to complement time-resolved X-ray crystallography

研究代表者

久保 稔（Kubo, Minoru）

兵庫県立大学・理学研究科・教授

研究者番号：90392878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 107,200,000円

研究成果の概要（和文）：私たちの体のなかではタンパク質が立体構造を変えながら機械のように働いている。新学術領域「高速分子動画」では、タンパク質の構造変化を動画（分子動画）として記録する最先端の研究が行われたが、われわれは顕微分光法を用いて、タンパク質の中で起こる電子や陽子の動きを解析し、それらミクロな情報を分子動画に付加することで、タンパク質がはたらく仕組みの化学的な解明を目指した。その結果、光のエネルギーを利用してイオンを通す微生物のタンパク質、DNAを修復する両生類のタンパク質、窒素循環にかかわるカビのタンパク質、オワンクラゲの発光タンパク質など、多様なタンパク質の精密な仕組みが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、構造生物学分野を化学分野と融合させるものであった。また、タンパク質がはたらく仕組みを化学的に理解することは、今後社会に役立つ人工タンパク質をデザインするイノベティブな応用研究を展開するうえで基盤を築くものであった。実際に本研究で仕組みを明らかにした光で動作するタンパク質は、光遺伝学（光で神経細胞などの活動を制御する技術）で応用されるものであり、本研究成果はその発展に不可欠な知見を与えた。

研究成果の概要（英文）：Proteins work like machines in our bodies by changing their shape. In the MEXT program for Scientific Research on Innovative Areas, "Molecular Movies," the changes in protein shape were recorded as movies using a novel X-ray technique. To complement the movie, we used microspectroscopy to analyze the movements of electrons and protons inside proteins. The results revealed how proteins function at the chemical level. The proteins studied here cover a wide range of biological functions. They include a microbial protein that uses light energy for ion transport, an amphibian protein involved in DNA repair, a fungal protein involved in the nitrogen cycle, and a jellyfish luminescent protein.

研究分野：生物物理学

キーワード：時間分解分光測定 動的構造解析 振動分光 蛍光分光 紫外可視分光

1. 研究開始当初の背景

X線自由電子レーザーを用いた時間分解結晶構造解析(分子動画法)は、機能時のタンパク質構造変化を原子分解能で可視化できる新しい手法として注目されている。しかしこの手法は微結晶化したタンパク質を扱う制約があるため、得られた分子動画をどのように解釈し、溶液相の機能研究とどう結びつけるかが常に問題となる。これは分子動画法が抱える本質的な問題であるが、われわれは分子分光学の立場からこの問題に取り組んできた。本研究を開始する以前に、われわれは微結晶に適用できる顕微タイプの時間分解紫外可視分光装置を開発し、バクテリオロドプシンを始めとする複数のタンパク質を計測した。その結果、結晶相と溶液相とでは反応速度が異なることや蓄積する中間体が異なることが明らかとなり、分子動画研究を機能研究と結びつけるためには、時間分解分光の相補的活用が必要不可欠であることが示された。

2. 研究の目的

新学術領域「高速分子動画」の計画研究である本研究では、顕微分光解析をラマン・赤外振動分光や蛍光発光分光にまで拡張し、領域研究で扱われるさまざまなタンパク質に対して、分子動画法と分子分光法の相関的・補完的な解析を推進する。結晶相と溶液相で起こるタンパク質ダイナミクスの共通点と相違点を明確化し、分子動画の適切な解釈を導くとともに、分光で得られる微視的情報(電子状態変化、プロトン移動、微細な化学結合変化など)を分子動画に付加することで、分子動画研究を化学のレベルにまで深化させる(図1)。

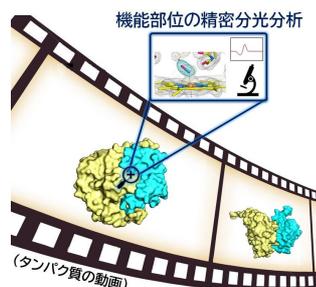


図1. 本研究のコンセプト.

3. 研究の方法

本研究では溶液測定に加えて、分子動画研究で実際に使用されるタンパク質微結晶そのものを測定できる顕微分光技術を開発し、新学術領域「高速分子動画」がターゲットとする以下のタンパク質の分光研究を実施する。

- (1) 天然に存在する光駆動型のタンパク質(微生物型ロドプシンやDNA光修復酵素)の紫外可視分光および赤外分光解析
- (2) ケージド化合物等を介して光による反応制御を試みるタンパク質(CO₂固定酵素やヘム含有酵素)の紫外可視分光およびラマン・赤外分光解析
- (3) Ca²⁺の結合により発光する化学発光タンパク質(イクオリン)の発光分光解析

いずれも分子動画研究の研究対象とされており、分光との相関解析が期待されているタンパク質群である。(1)と(2)の計測手法は微結晶懸濁液に励起光を照射するポンプ-プローブ測定となるが、(3)は微結晶懸濁液とCa²⁺飽和溶液を瞬時に混合する二液混合測定となる。

4. 研究成果

本研究期間内に全ての分光手法(紫外可視分光、ラマン・赤外振動分光、蛍光発光分光)において顕微分光装置の開発を完了し、CO₂固定酵素以外の全てのタンパク質で時間分解分光解析の成果を得た。CO₂固定酵素については、当初ケージドCO₂を用いた分子動画研究が計画されていたが、ケージドCO₂の量子効率の問題から計測手法が二液混合に切り替えられた。それに呼応してわれわれはストップフローラマン分光装置を開発した。今後の計測が期待される課題である。

- (1) 天然に存在する光駆動型のタンパク質の研究

微生物型ロドプシン: 近年メタゲノム解析により、古細菌や真正細菌、真核微生物等から多くのロドプシンタンパク質が発見されている。それらは共通してレチナルの光異性化を起点に光サイクル反応を開始し、多様な機能を発現する。それらは光で機能を制御する天然のタンパク質ツールとして、分子動画研究のターゲットとされたが、われわれはそれに呼応して、微結晶の時間分解紫外可視分光測定を行なった。一例として、光駆動性の陽イオンチャネル(ChR)の測定結果を示す(図2)。この研究では、われわれは結晶相と

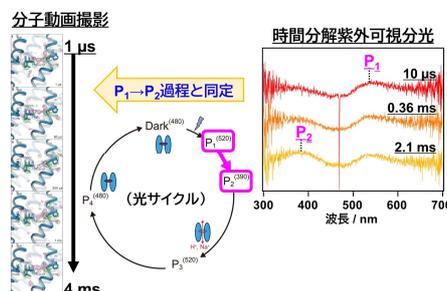


図2. ChR 微結晶の時間分解紫外可視分光測定.

溶液相での反応速度を比較解析することで分子動画に現れる中間体を同定するとともに、微結晶中でも光サイクルの進行にともなってレチナルが脱プロトン化することを示した。分子動画と分光の結果を統合することで、ChRのイオン透過の仕組みを明らかにした[1]。ChR

は光遺伝学の中心的なツールであるが、その機能改良に資する基盤情報を提供した意義がある。ChR 以外にも、Clポンプロドプシン (NM-R3) やヘリオロドプシン (HeR) について同様の測定を行ない、一部成果を報告している[2,3]。さらに HeR に関しては、分子動画研究に先立って、赤外分光測定によりレチナル光異性化後の水素結合変化を詳細に解明したほか[4]、Zn²⁺結合能を発見し、その結合サイトを同定した[5]。

DNA 光修復酵素：DNA は紫外線によって損傷するが、多くの生物は DNA 光修復酵素により、青色光のエネルギーを用いて損傷を修復できる。われわれは分子動画研究に先立って、(6-4)光産物(損傷 DNA)を修復するアフリカツメガエル由来 DNA 光修復酵素の反応を時間分解紫外分光測定によって追跡し、光修復中間体を捕捉した。さらにわれわれは、酵素反応(非光サイクル反応)を追跡可能な時間分解赤外分光装置を新規に開発し、光修復中間体の化学構造の決定に成功した。この研究を遂行した大学院生は第 47 回生体分子科学討論会において優秀ポスター賞を受賞している(2021年)。

(2) 光による反応制御を試みたタンパク質の研究

一酸化窒素還元酵素：酵素反応は、ケージド基質(光照射によって基質を放出する化合物)の光分解をトリガーに開始することが可能であろう。その計測モデルとして、ケージド NO を反応トリガーとした一酸化窒素還元酵素(NOR)の分子動画研究が計画された。NOR とは、NO を N₂O にまで還元することで窒素循環を担っている酵素である。N₂O は温暖化ならびにオゾン層破壊ガスであり、その発生源として NOR の反応の化学的理解が求められていた。われわれはカビの NOR(活性中心にヘム鉄をもつ P450nor)について顕著な成果をあげた。NO 還元反応の肝は活性窒素種の過渡的生成にあるが、われわれは微結晶試料の時間分解赤外分光測定に成功し、分子動画解析とあわせて、活性窒素種がニトロキシルラジカルアニオン(Fe³⁺-NHO^{•-})であることを証明した(図3)[3,6]。この酵素の機構は約30年間謎とされてきたが、本研究により反応機構の全容が解明された。

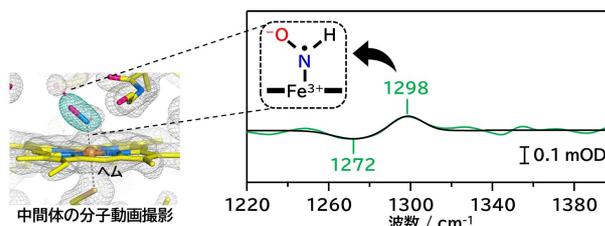


図3 .P450nor 微結晶の時間分解赤外分光測定 .¹⁴N と ¹⁵N の同位体差スペクトルによりNO伸縮振動バンドを検出。

(3) 化学発光タンパク質の研究

イクオリン：テレンセラジンという発光基質をもつイクオリンは3個のCa²⁺が結合すると青色光を発する化学発光タンパク質である。イクオリン微結晶溶液にCa²⁺飽和溶液を瞬時に混合することで発光過程のタンパク質構造変化を捉える分子動画研究が計画されたが、われわれは、微結晶溶液に対してCa²⁺飽和溶液を層流で重ね、Ca²⁺の分子拡散により発光をトリガーできるマイクロ流路デバイスを開発した。そしてイクオリンからの発光強度の時間発展を分光計測し、結晶相でも溶液相と同様に発光が誘起されることを示した[3]。さらに、発光ダイナミクスのCa²⁺濃度依存性を詳しく解析し、分光データと分子動画データを照合することで、イクオリンの発光反応スキームを明らかにした。

以上、代表的な研究成果を述べたが、KAKENに登録したようにその他多くの分光研究の成果を報告している。なお、上記の研究で使用した時間分解顕微分光装置の詳細は、邦文の総説にまとめている[3]。

< 参考文献 >

- [1] Oda K. et al. Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin. *eLife* 10, e62389 (2021).
- [2] Hosaka T. et al. Conformational alterations in unidirectional ion transport of a light-driven chloride pump revealed using X-ray free electron lasers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 119, e2117433119 (2022).
- [3] 片山哲郎, 木村哲就, 久保稔 タンパク質微結晶を測定する時間分解顕微分光技術. *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)* 75 (3), in press (2024).
- [4] Tomida S. et al. Inverse Hydrogen-Bonding Change Between the Protonated Retinal Schiff Base and Water Molecules upon Photoisomerization in Heliorhodopsin 48C12. *J. Phys. Chem. B* 125, 8331-8341 (2021).
- [5] Hashimoto M. et al. Specific Zinc Binding to Heliorhodopsin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 25, 3535-3543 (2023).
- [6] Nomura T. et al. Short-lived intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2101481118 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計34件（うち査読付論文 34件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 12件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Hashimoto, M., Miyagawa, K., Singh, M., Katayama, K., Shoji, M., Furutani, Y., Shigeta, Y., Kandori, H. | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Specific zinc binding to heliorhodopsin | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics | 6. 最初と最後の頁 3535 ~ 3543 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cp04718g | 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 Hosaka, T. et al. | 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 Proc. Natl. Acad. Sci. USA | 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 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. | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 Short-lived intermediate in N2O generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA | 6. 最初と最後の頁 e2101481118 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2101481118 | 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 Tomida, S., Kitagawa, S., Kandori, H., Furutani, Y. | 4. 巻 125 |
| 2. 論文標題 Inverse Hydrogen-Bonding Change Between the Protonated Retinal Schiff Base and Water Molecules upon Photoisomerization in Heliorhodopsin 48C12 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B | 6. 最初と最後の頁 8331-8341 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c01907 | 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 Oda, K. et al. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e62389. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62389 | 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 Kuroi Kunisato, Tsukamoto Takashi, Honda Naoya, Sudo Yuki, Furutani Yuji | 4. 巻 1864 |
| 2. 論文標題 Concerted primary proton transfer reactions in a thermophilic rhodopsin studied by time-resolved infrared spectroscopy at high temperature | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics | 6. 最初と最後の頁 148980 ~ 148980 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2023.148980 | 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39件(うち招待講演 20件/うち国際学会 13件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 梶野亜衣, 山田大智, 山元淳平, 久保稔 |
| 2. 発表標題 時間分解赤外分光法を用いた(6-4)光修復酵素の光修復中間体の追跡 |
| 3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会(優秀ポスター賞受賞) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 桑野わ子, 長尾聡, 當舎武彦, Joshua Kyle Stanfield, 笠井千枝, 有安真也, 荘司長三, 杉本宏, 久保稔 |
| 2. 発表標題 Structure of a heme-oxy intermediate of cytochrome P450BM3 catalyzing a non-natural substrate |
| 3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会(学生発表賞受賞) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 仲絢香、小堀康博、城宜嗣、杉本宏、木村哲就 |
| 2. 発表標題 二重スピンラベルESR分光法を用いたABCトランスポーターBhuUV-TのATP結合状態の解析 |
| 3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（学生口頭発表賞受賞） |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計5件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--------------------------------------|----------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 膜タンパク質の安定化のための液体組成物および方法 | 発明者 藤田恭子, 溝端栄一, 古谷祐詞 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-030067 | 出願年 2023年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 古谷 祐詞 (Furutani Yuji) (80432285) | 名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (13903) | |
| 研究分担者 | 木村 哲就 (Kimura Tetsunari) (70506906) | 神戸大学・理学研究科・准教授 (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 |
|---------|---------|