

## Spectroscopy

## 生体物質構造学Ⅱ

### I 金属タンパク質のラマン分光解析

#### Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

柳澤幸子・佐藤航・長尾聡・山田大智・久保稔  
Yanagisawa, S., Sato, W., Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

当講座では共同利用機器センターの振動分光装置群を維持管理するとともに、それらを用いて金属タンパク質の構造機能相関を研究している。特に可視共鳴ラマン分光法を用いて、ヘムと銅原子を含むチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性増強機構を調べている。昨年度は低酸素下で CcO の活性を増強する膜タンパク質 (Hypoxia-inducible gene domain 1; HIGD1) が CcO の H<sup>+</sup>ポンプ経路に構造変化を引き起こすことを見出した。2022年度はさらに、H/D 交換に伴うヘム側鎖ラマンバンドの変化から H<sup>+</sup>ポンプ経路上の構造変化箇所を同定した。また、リポソームを用いたアッセイ系を用いて、HIGD1 結合時の H<sup>+</sup>ポンプ活性の上昇を観測した。共同利用機器センターの振動分光装置を用いた学外共同研究を 5 報論文発表した。

### II タンパク質の SACLA 時間分解構造解析

#### Time-resolved structural analysis of proteins using SACLA

長尾聡・山田大智・久保稔  
Nagao S., Yamada, D., Yanagisawa, S., Kubo, M.

SACLA を用いた時間分解結晶構造解析は、タンパク質の動きを時間軸上で観測できる動的構造解析手法である。当講座は特にチトクロム P450 の中間体構造解析を進めてきた。2022年度は、基質の結合、ヘムの還元、O<sub>2</sub> の結合に伴う連続した構造変化を動画として捉えることで、活性部位における基質配向の制御機構を明らかにした。

### III 酵素反応の時間分解分光解析

#### Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

山田大智・柳澤幸子・久保稔  
Yamada, D., Yanagisawa, S., Kubo, M.

ケージド基質を用いた光誘起時間分解ラマン・赤外分光装置やストップフローラマン分光装置を立ち上げ、ヘムやフラビンなどの補因子を有する酵素の触媒反応機構を研究して

いる。2022年度は、Trp代謝酵素（インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ）の基質阻害機構を stopped-flow 法を用いて解析し、基質阻害サイトの熱力学的性質を明らかにした。さらに本年度は、損傷 DNA を光依存的に修復するフラビン酵素（6-4 フォトリアーゼ）の反応中間体を時間分解赤外分光測定により捕捉し、同位体解析やスペクトルシミュレーションと合わせて、反応中間体の化学構造を決定した。また、NO還元酵素の初期中間体の赤外分光解析を論文発表した。

## IV タンパク質の構造機能解析に向けた表面増強

### 赤外分光装置の開発

SEIRAS system development for *operando* analysis of protein structure and function

山田大智・久保稔  
Yamada, D., Kubo, M.

タンパク質の構造解析と機能解析を同時に行なえる表面増強赤外分光装置を開発している。この装置では、Ni-NTA を化学修飾した金表面に His タグを付加したタンパク質を固定化し、表面敏感な赤外分光測定によりタンパク質の構造と機能をオペランド計測する。2022年度は温度依存性チャンネル（TRP チャンネル）の温度変化に伴う SEIRAS スペクトルを測定した。脂質由来のバンドのスペクトル変化が観測されており、TRP に結合した脂質を含めて現在解析中である。

## V 二機能性クリプトクロムの天然変性領域の構造解析

Structural analysis of intrinsically-disordered region in bi-functional cryptochrome

長尾聡・山田大智・久保稔  
Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

クラミドモナス由来の動物型クリプトクロム（CraCRY）は、DNA 光修復酵素／クリプトクロムスーパーファミリーに属するフラボタンパク質であるが、(i) クリプトクロムとしての概日時計制御機能に加えて、(ii) DNA 光修復酵素としての酵素機能も保持した二機能性タンパク質である。CraCRY は C 末端に約 100 残基の天然変性領域を有するが、光に依存した C 末端領域のダイナミクスが二機能性制御の鍵を握る。2022年度は、明状態（FADH<sup>-</sup>型）CraCRY の SAXS 測定に成功し、青色光吸収に伴う C 末端天然変性領域の構造変化を明らかにした。また、明状態 CraCRY の NMR 測定にも成功した。現在、暗状態（FADH<sup>•</sup>）CraCRY の調製を試みている。

## VI 協同性を有するミオグロビン人工二量体の分子設計

Molecular design of artificial myoglobin dimer as cooperative O<sub>2</sub> carrier

長尾聡・山田大智・久保稔

Nagao, S., Yamada, D., Kubo, M.

ミオグロビンは特定のループに変異を加えることで、互いの部分構造をスワップさせた二量体を形成する。本研究では変異導入を工夫することで、酸素結合に協同性をもったミオグロビン二量体を分子設計する。2022年度は、三箇所変異を加えたミオグロビン二量体を設計し、O<sub>2</sub>結合型の結晶構造解析をするとともにO<sub>2</sub>解離曲線を測定した。本変異体はO<sub>2</sub>親和性が非常に高くなっていることが判明した。現在、協同性を調べているところである。

## 発表論文 List of Publication

- I-1 Kokubo, Y. (愛知工業大学), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Masuda, H. (名古屋工業大学), Kajita, Y.\* (愛知工業大学) et al.: Syntheses, characterizations, crystal structures, and protonation reactions of dinitrogen chromium complexes supported with triamidoamine ligands, *Inorg. Chem.* 62, 5320-5333 (2023).
- I-2 Nishida, Y. (国立循環器病研究センター), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Takashima, S. (大阪大学), Shintani, Y.\* (国立循環器病研究センター) et al.: Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases, *Nat. Commun.* 13, 7591 (2022).
- I-3 Yoshida, Y. (順天堂大学), Shimizu, I.\* (順天堂大学), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Soga, T.\* (慶応大学), Minamino, T.\* (順天堂大学) et al.: Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism, *Sci. Rep.* 12, 14883 (2022).
- I-4 Nagatomo, S.\* (筑波大学), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, et al.: Heme-bound tyrosine vibrations in hemoglobin M: resonance Raman, crystallography and DFT calculation, *Biophys. J.* 121, 2767-2780 (2022).
- I-5 Gupta, R. (Ewha Womans University), Li, X.-X. (Ewha Womans University), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Sarangi, R.\* (Stanford University), Cho, K.-B.\* (Jeonbuk National University), Fukuzumi, S.\* (Ewha Womans University), Nam, W.\* (Ewha Womans University) et al.: Heme compound II models in chemoselectivity and disproportionation reactions, *Chem. Sci.* 13, 5707-5717 (2022).
- I-6 **柳澤幸子**, **松村和香**, 長尾壮将 (国立循環器病研究センター), 西田優也 (国立循環器病研究センター), 伊藤-新澤恭子, 新谷泰範 (国立循環器病研究センター), **久保稔**: チトクロム c 酸化酵素活性増強因子 Higd1a の作用機序に関する分光学的研究, 第 48 回生体分子科学討論会, 鳥取, 2022 年 7 月 1 日.
- I-7 **佐藤航**, **柳澤幸子**, 新澤-伊藤恭子, 西田優也 (国立循環器病研究センター), 長尾壮将 (国立循環器病研究センター), 新谷泰範 (国立循環器病研究センター), **久保稔**: プロテオソーム中における Higd1A によるシトクロム c 酸化酵素の活性増強機構, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 28 日.
- III-1 Takeda, H., Shimba, K., Horitani, M. (佐賀大学), Kimura, T. (神戸大学), Nomura, T., **Kubo, M.**, Shiro, Y.\*, Tosha, T.\* (理化学研究所): Trapping of a mononitrosyl nonheme intermediate of nitric oxide reductase by cryo-photolysis of caged nitric oxide, *J. Phys. Chem. B* 127, 846-854 (2023)(Selected for Cover Picture).

- III-2 **Kubo, M**: Time-Resolved Spectroscopy for Tracking DNA Repair by Photolyase, Molecular Movie and Beyond, Yokohama, May 13, (2022).
- III-3 **久保稔**: 酵素反応ダイナミクスの時間分解分光追跡, 第 95 回日本生化学会大会「タンパク質構造ダイナミクス研究の最近のトピックスと未来展望」, 名古屋, 2022 年 11 月 11 日 (招待講演) .
- III-4 **久保稔**: 分光学から見た光回復酵素のメカニズムと分子進化, 第 3 回構造生命科学研究会, 姫路, 2022 年 12 月 23 日.
- III-5 **楞野亜衣**, **山田大智**, 重田育照 (筑波大学), 山元淳平 (大阪大学), **久保稔**: 時間分解赤外分光法による(6-4)光修復酵素の光修復中間体の解析測定, 第 48 回生体分子科学討論会, 鳥取, 2022 年 6 月 30 日.
- III-6 **名定加峰**, **柳澤幸子**, **久保稔**: 免疫調節因子ヒト IDO における基質阻害機構の分光学的研究, 兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2022, 姫路, 2022 年 9 月 27 日.
- III-7 **前野達海**, **山田大智**, **楞野亜衣**, 山元淳平 (大阪大学), **久保稔**: クリプトクロムが触媒する DNA 光修復反応の時間分解分光解析, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 29 日.
- IV-1 **北山実咲**, **山田大智**, **久保稔**: 温度感受性チャネルの反応機構解明に向けた表面増強赤外分光装置の立ち上げ, 兵庫県立大学知の交流シンポジウム 2022, 姫路, 2022 年 9 月 27 日.
- V-1 松田颯真, 長尾聡, 山田大智, 久保稔: X 線小角散乱測定を用いたクラミドモナス由来クリプトクロムの溶液構造解析, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 29 日.
- VI-1 **長尾聡**, **丸尾知紘**, **山田将司**, **山田大智**, **久保稔**: ミオグロビンへの協同的な配位子結合性付与に向けた二量体の合理的設計, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 9 月 29 日.

## 生命科学専攻

### 博士前期課程

- 楞野亜衣 (M2): 時間分解赤外分光法を用いた DNA 光修復酵素の触媒機構の解明
- 北山実咲 (M2): 温度感受性チャネルの反応機構の解明に向けた表面増強赤外分光解析
- 桑野わ子 (M2): 非天然基質を酸化するシトクロム P450BM3 の酸素化型中間体の無損傷構造解析
- 名定加峰 (M2): インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ基質阻害の温度依存性
- 前野達海 (M2): クリプトクロムの DNA 光修復機能の分光学的解析
- 貝出裕規 (M1): 核磁気共鳴分光法を用いたクリプトクロムの C 末端変性領域の動的構造研究
- 亀井拓斗 (M1): 時間分解分光法を用いたチトクロム酸化酵素活性増強因子 CHCHD2 の作用機序解明
- 松田颯真 (M1): X 線小角散乱測定を用いたクリプトクロムの溶液構造解析の研究

## 科学研究費補助金等

- 科学研究費補助金 (令和 1~5 年度) 新学術領域「高速分子動画」 課題番号: 19H05784  
研究課題 時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測  
研究代表者 久保 稔
- 科学研究費補助金 (令和 4~6 年度) 基盤研究(B) 課題番号: 22H02588  
研究課題 二機能性タンパク質のダイナミックな構造と機能制御

- 研究代表者 久保 稔
- 3 科学研究費補助金（令和 4～6 年度） 若手研究 課題番号：22K15076
- 研究課題 呼吸活性化因子 Higd1A によるミトコンドリア呼吸鎖末端の多段階反  
応制御機構
- 研究代表者 佐藤 航