

I 金属タンパク質のラマン分光解析

Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・北川禎三
Kubo, M., Yanagisawa, S., Kitagawa, T.

当講座では、共鳴ラマン分光法を用いて金属タンパク質の機能メカニズムを研究している。特にミトコンドリアで好気呼吸酵素として働いているチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の機構解明に力を入れている。CcO は、ヘム Fe と Cu を含む活性中心で O₂ を H₂O にまで還元するとともに、それと共役してプロトンをポンプする膜タンパク質である。本年度は、CcO の分子表面に結合し、アロステリックに作用する小分子 (阻害剤) の作用機序を解明した。さらに、CcO の活性をアロステリックに上昇させる 2 つのタンパク質 (Higd1a, CHCHD2) の作用機序解明を進めている。また、共同利用機器センターの共同研究として実施した金属タンパク質やモデル錯体のラマン分光解析 2 件を論文発表した (*J. Am. Chem. Soc.* 及び *Angew. Chem. Int. Ed.*掲載)。

II タンパク質の SACLA 時間分解構造解析

Time-resolved structural analysis of proteins using SACLA

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・長尾 聡
Kubo, M., Yanagisawa, S., Yamada, D., Nagao S.

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原子レベルで可視化する新しい手法であり、当講座は世界に先駆けてこの手法を活用してきた。特にケージド基質を用いた計測手法を開拓し、ヘム酵素 (NO 還元酵素、チトクロム P450、CcO) に応用している。ケージド NO を用いた NO 還元酵素の中間体構造解析は構造精密化を終え、後述の時間分解分光解析とあわせて論文投稿中である。一方、チトクロム P450 と CcO の系は、引き続きケージド O₂ を用いた中間体微結晶の生成方法を検討している。その他、新規ロドプシン類の時間分解結晶構造解析を進めているが、本年度は光遺伝学ツールであるチャネルロドプシンの構造変化観測に成功し、機能メカニズムを論文にまとめた (*eLife* 掲載)。

III 酵素反応の時間分解分光解析

Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・長尾 聡

当講座では、ケージド化合物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トフローラマン分光装置を立ち上げ、さまざまな酵素の反応機構を研究している。特にヘム酵素 (Trp 代謝酵素、CcO、NO 還元酵素) とフラビン酵素 (DNA 光修復酵素) の反応解析に力を入れている。本年度はケージド NO を用いた 2 つの NO 還元酵素 (カビと緑膿菌の酵素) の反応機構研究を論文にまとめた (*PNAS* 改訂中および *Bull. Chem. Soc. Japan* 掲載)。特にカビの NO 還元酵素の研究では、微結晶試料を扱える顕微時間分解 FTIR 装置を新たに開発し、SACLA 時間分解構造解析と時間分解赤外分光をあわせて、中間体の構造および電子状態を決定した。まさに“ダイナミックピコバイオロジー”を推進した。また、DNA 光修復酵素 (6-4 フォトリアーゼ) の研究において大きな進展が見られた。鍵となる中間体を時間分解紫外吸収分光で捉えたことは前年度に報告したが、本年度は時間分解赤外分光で捉えることに成功した。今後さらなる解析を通して中間体の化学構造を解明し、反応機構の決定を目指す。

IV 膜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

Development of the SEIRAS system for functional analysis of membrane proteins

久保 稔・山田大智
Kubo, M., Yamada, D.

膜タンパク質の構造解析と機能解析を同時に行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、His タグを付加した膜タンパク質を Ni-NTA を化学修飾した金表面に固定化し、表面敏感な赤外分光測定を実現する。前年度は金薄膜の形成に成功したが、本年度は金表面への Ni-NTA の化学修飾に成功した。今後生体試料 (温度依存性 TRP チャンネル) の測定を進める。

発表論文 List of Publication

- I-1 Xue, S.-S. (Ewha Womans Univ.), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Kim, S. H. * (Ewha Womans Univ.), Fukuzumi, S. (Ewha Womans Univ.)*, Nam, W.* (Ewha Womans Univ.) et al.: Enhanced redox reactivity of a nonheme iron(V)-oxo complex binding protons, *J. Am. Chem. Soc.* 142, 15305-15319 (2020).
- I-2 Fujieda, N. (大阪府大) *, Umakoshi, K. (阪大), Ochi, Y. (大阪府大), Nishikawa, Y. (阪大), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Kurisu, G. (阪大), Itoh, S. (阪大) *: Copper-oxygen dynamics in tyrosinase mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 13385-13390 (2020).
- I-3 柳澤幸子: 第 1 編 第 2 章 第 16 節 ピコバイオロジー: 振動分光法. 膜タンパク質工学ハンドブック (津本浩平、浜窪隆雄監修), NTS, 122-129 (2020).

- II-1 Oda, K. (東大), Nomura, T., Nakane, T. (東大), Yamashita, K. (東大), **Kubo, M.***, Nishizawa, T. (東大)*, Nureki, O. (東大)* et al.: Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin, *eLife* 10, e62389 (2021).
- II-2 久保稔: SACLA 時分割結晶構造解析による動的構造生物学研究～酵素反応の可視化に向けた分子動画～, *放射光* 33, 266-270 (2020).
- II-3 溝端栄一, 久保稔: 第1編 第1章 X線自由電子レーザーによる膜タンパク質の構造解析, 膜タンパク質工学ハンドブック (津本浩平、浜窪隆雄監修), NTS, 11-15 (2020).
- III-1 Takeda, H., Kimura, T. (神戸大), Nomura, T., Horitani, M. (佐賀大), Yokota, A., Matsubayashi, A., Ishii, S., Shiro, Y., **Kubo, M.***, Toshi, T.*: Timing of NO binding and protonation in the catalytic reaction of bacterial nitric oxide reductase as established by time-resolved spectroscopy, *Bull. Chem. Soc. Japan* 93, 825-833 (2020) (Selected paper).
- III-2 Yamada, D.: The molecular mechanism of photoreceptor proteins by infrared spectroscopy, The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (online) Sep 17, 2020.
- III-3 山田大智: 時分割紫外可視分光法を用いた(6-4)光回復酵素の反応機構解明、兵庫県立大学 知の交流シンポジウム 2020 (ウェブ開催)、2020年10月~12月.
- III-4 山田大智、柳澤幸子、久保稔: 顕微分光装置開発の現状と今後、令和二年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム (淡路)、2020年10月19日.

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 河村味奈: Stopped-flow ラマン・吸収同時測定によるインドールアミン 2,3 ジオキシングナーゼの反応機構の解明
- 松村和香: チトクロム *c* 酸化酵素と活性増強因子 Higd1a のラマン相互作用解析

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 1~3 年度) 基盤研究(B) 課題番号: 19H03171
研究課題 新規時間分解計測手法を用いた呼吸系エネルギー変換機構の解明
研究代表者 久保 稔
- 理化学研究所 Pioneering Project (平成 28~令和 2 年度)
研究課題 Dynamic Structural Biology by Integrating Physics, Chemistry, and Computational Science
研究代表者 杉田有治 (理化学研究所)
研究分担者 久保 稔
- 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 CREST「革新的触媒」研究領域 (令和 1~2 年度: 5 年プロジェクトの最後の 2 年間に参加)
研究課題 生体触媒の誤作動状態を利用するメタンの直接的メタノール変換
研究代表者 荘司長三 (名古屋大学)

- 研究分担者 久保 稔
- 5 科学研究費補助金（令和 1～3 年度） 基盤研究(C) 課題番号: 19K05698
研究課題 ストップフロー共鳴ラマン分光法によるヘム含有 2 原子酸素添加
酵素の反応機構研究
研究代表者 柳澤幸子
- 6 兵庫県立大学 令和 2 年度特別研究助成金（若手研究者支援）（令和 2 年度）
研究課題 時間分解分光計測を用いた(6-4)光修復酵素の DNA 修復機構の解明
研究代表者 山田大智
- 7 科学研究費補助金（令和 1～3 年度） 国際共同研究強化(A) 課題番号: 18KK0397
研究課題 固体高分解能 NMR を用いた不完全な配列を有するナノ構造体の構造
解析
研究代表者 長尾 聡
- 8 科学研究費補助金（令和 1～3 年度） 基盤研究(C) 課題番号: 19K05695
研究課題 ドメインスワッピングの熱力学的制御による選択的かつ安定なタンパ
ク質分子複合体構築
研究代表者 長尾 聡