

I ラマン分光法を用いた金属タンパク質の構造機能解析

Raman spectroscopic analysis of metalloproteins

久保 稔・柳澤幸子・山田大智・北川禎三

Kubo, M., Yanagisawa, S., Yamada, D., Kitagawa, T.

活性中心に Fe や Cu などの遷移金属を有する金属タンパク質は、アミノ酸残基が金属イオンの電子状態を精密に制御することによって機能している。当講座では、金属タンパク質の機能メカニズムを明らかにするために、金属結合部位やリガンドの構造・電子状態を、ラマン分光を用いて解析している。特にミトコンドリア呼吸系で働くチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の阻害剤や活性調節因子の作用機序をラマン分光で解析し、金属中心近傍で起こる構造変化を捉えた。また、種々の金属タンパク質のモデル錯体の活性種をラマン分光で解析した。

II 酵素反応の SACLA 時間分解構造解析

Time-resolved structural analysis of enzymatic reactions using SACLA

久保 稔・柳澤幸子・山田大智

Kubo, M., Yanagisawa, S., Yamada, D.

酵素反応の可視化は、生命科学研究における大きな夢の一つである。この実現に向けて、当講座では、X線自由電子レーザー-SACLA と、光励起により基質を放出するケージド化合物を組み合わせた時間分解 X線結晶構造解析を世界に先駆けて行なっている。チトクロム P450_{nor}、チトクロム P450、CcO 等のヘム酵素が研究対象である。特にチトクロム P450_{nor} においては、ケージド NO を利用して中間体の構造を高分解能で捉えることに成功した。チトクロム P450 や CcO においては、ケージド O₂ を利用した反応系を構築している。一方、新規ロドプシン類や光駆動型イオンポンプの研究を開始し、微結晶中の反応解析を行なった。

III 酵素反応の時間分解振動分光解析

Time-resolved vibrational analysis of enzymatic reactions

久保 稔・柳澤幸子・山田大智

Kubo, M., Yanagisawa, S., Yamada, D.

時間分解ラマン・赤外分光を用いて、(時間分解 X 線結晶構造解析の分解能では解析できない) 酵素反応中間体の電子状態や化学状態の変化を精密に解析し、酵素反応機構の物理化学的理解を目指している。チトクロム P450_{nor} を始めとした NO を還元するヘム酵素や Trp を代謝するヘム酵素が主な研究対象であり、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フローラマン分光装置を立ち上げている。ストップフローラマン分光装置が完成したところである。また、青色光を用いて損傷 DNA を修復する酵素 (6-4 フォトリアーゼ、および CraCRY) の研究を新たに開始した。両酵素の発現・精製系を構築し、6-4 フォトリアーゼにおいては、青色光 (1 光子) 吸収後の長寿命中間体を時間分解紫外吸収分光で捉えた。

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の開発に着手した。この装置では、金表面に膜タンパク質を吸着させて、表面敏感な赤外分光測定を行なう。温度依存性イオンチャネル (TRP チャネル) が研究対象である。金薄膜の調製に成功したところである。

発表論文 List of Publication

- I-1 Kokubo, Y. (愛知工業大), Wasada-Tsutsui, Y. (名古屋工業大), Yomura, S. (名古屋工業大), Yanagisawa, S., Kubo, M., Kugimiya, S. (愛知工業大), Kajita, Y. (愛知工業大), Ozawa, T. (名古屋工業大), Masuda, H. (名古屋工業大): Syntheses, characterizations, and crystal Structures of dinitrogen-divanadium complexes bearing triamidoamine ligands, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2020, 1456-1464 (2020).
- I-2 Kadoya, Y. (同志社大), Fukui, K. (同志社大), Hata, M. (同志社大), Miyano, R. (同志社大), Hitomi, Y. (同志社大), Yanagisawa, S., Kubo, M., Koder, M. (同志社大): Oxidative DNA cleavage, formation of μ -1,1-hydroperoxo species, and cytotoxicity of dicopper(II) complex supported by a p-cresol-derived amide-tether ligand, *Inorg. Chem.*, 58, 14294-14298 (2019).
- I-3 Kotani, H. (筑波大), Shimomura, H. (筑波大), Horimoto, M. (筑波大), Ishizuka, T. (筑波大), Shiota, Y. (九州大), Yoshizawa, K. (九州大), Yanagisawa, S., Kawahara-Nakagawa, Y., Kubo, M., Kojima, T. (筑波大): Fundamental electron-transfer and proton-coupled electron-transfer properties of Ru(IV)-oxo complexes, *Dalton Trans.*, 48, 13154-13161 (2019).
- I-4 Yanagisawa, S.: Visible resonance Raman study on respiratory supercomplex from bovine heart mitochondria, 7th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-7) (Ontario, Canada), May 22, 2019 (招待講演).

- II-1 Wolff, A. M. (UCSF), Kubo, M., Nomura, T., Fraser, J. S. (UCSF), Thompson, M. C. (UCSF) et al.: Comparing serial X-ray crystallography and microcrystal electron diffraction (MicroED) as methods for routine structure determination from small macromolecular crystals, *IUCrJ*, 7, 306-323 (2020).
- II-2 Suga, M. (岡山大), Akita, F. (岡山大), Yamashita, K. (理研), Nakajima, Y. (岡山大), Ueno, G. (理研), Li, H., Yamane, T. (岡山大), Hirata, K. (理研), Umena, Y. (岡山大), Yonekura, S. (岡山大), Yu, L.-J. (岡山大), Murakami, H. (JASRI), Nomura, T., Kimura, T. (神戸大), Kubo, M., Baba, S. (JASRI), Kumasaka, T. (JASRI), Tono, K. (理研), Yabashi, M. (理研), Isobe, H. (岡山大), Yamaguchi, K. (大阪大), Yamamoto, M. (理研), Ago, H. (理研), Shen, J.-R. (岡山大): An oxyl/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an X-ray free electron laser, *Science*, 366, 334-338 (2019).
- II-3 Nango, E.* (京都大), Kubo, M.*, Tono, K. (理研), Iwata, S. (京都大): Pump-probe time-resolved serial femtosecond crystallography at SACLA: Current status and data collection strategies, *Appl. Sci.*, 9, 5505 (2019).
- II-4 當舎武彦 (理研), 久保稔: SACLA を利用した酵素反応の可視化、*生物物理*, 59, 205-207 (2019).
- II-5 久保稔: SACLA を用いたタンパク質の動的構造生物学、光・量子デバイス研究会“医療・バイオ応用を目指したナノ構造・ナノ界面”(姫路)、2020年1月8日(招待講演)。
- II-6 久保稔: XFEL 結晶構造解析と振動分光法を用いたタンパク質の動的精密構造解析、鳥取大学 GSC セミナー (鳥取)、2019年9月27日(招待講演)。
- II-7 久保稔: XFEL と赤外レーザーを用いた酵素反応中間体の時間分解計測。第13回バイオ関連化学シンポジウム“フォーカスドセッション:先端分光分析・計算科学を活用したバイオ関連化学最前線”(仙台)、2019年9月5日(招待講演)。
- II-8 高坂瞭汰、山本直輝、當舎武彦 (理研)、有安真也 (名古屋大)、荘司長三 (名古屋大)、久保 稔: Caged-O₂ を用いた P450BM3 酸素化型中間体の調製法の検討、CREST「革新的触媒」2019年度全体チーム会議(博多)、2019年10月12日(ポスター)。
- III-1 Kubo, M.: Time-resolved spectroscopic analysis of the enzymatic reaction dynamics of NO reductase, 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (Nara, Japan), June 5, 2019 (招待講演)。
- III-2 Kubo, M.: Catalytic reaction dynamics of NO reductase probed by flow-flash vibrational spectroscopy, 7th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-7) (Ontario, Canada), May 23, 2019 (招待講演)。
- III-3 久保稔: Catalytic reaction dynamics of NO reductase probed by time-resolved spectroscopies、第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 シンポジウム“最先端の実験科学と計算科学が明らかにする膜タンパク質の精緻な反応機構”(神戸)、2019年6月26日(招待講演)。
- III-4 久保稔: タンパク質の動的構造と機能、第46回生体分子科学討論会(筑波)、2019年6月22日(招待講演)。
- III-5 Yanagisawa, S., Kayama, K., Hara, M., Sugimoto, H. (理研), Shiro, Y., Ogura, T.: UV Resonance Raman Characterization of a Substrate Bound to Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, *Biophys. J.*, 117, 706-716 (2019).
- III-6 Yamada, D., Nomura, T., Nakajima, Y., Kubo, M.: Time-resolved spectroscopic study on photoreaction of (6-4) photolyase, The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Miyazaki, Japan) Sep 24, 2019.
- III-7 山田大智: 分光法による光受容タンパク質の分子メカニズム研究、第35回XFEL構造生物ミーティング(SACLA)、2019年7月24日(招待講演)。
- III-8 Yamada, D., Nomura, T., Nakajima, Y., Kubo, M.: 光受容タンパク質における時間分解分光解析、令和元年度 新学術領域研究「高速分子動画」キックオフミーティング・膜タンパク質研究会(淡路)、2019年10月7日。

III-9 山田大智：分光法による DNA 光修復酵素の分子メカニズム研究、兵庫県立大学城研究
室セミナー（研究Ⅱ期棟）、2019年10月21日（招待講演）。

大学院生命理学研究科

博士前期課程

魚崎凌生：ストップフローラマン分光法によるインドールアミン 2,3 ジオキシゲ
ナーゼの反応機構の解明

高坂瞭汰：ケージド酸素を用いたチトクロム *c* 酸化酵素の時分割結晶構造解析

科学研究費補助金等

- 1 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
- 2 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
- 3 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
- 4 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 莊司長三（名古屋大学）
研究分担者 久保 稔
- 5 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 CREST「構造生命」研究領域（令和 1 年
度：5 年プロジェクトの最後の 1 年間に参加）
研究課題 新たなる臓器保護剤の開発に向けた ATP 産生制御の構造生命科学
研究代表者 高島成二（大阪大学）
研究分担者 久保 稔
- 6 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
- 7 科学研究費補助金（平成 29～令和 1 年度）若手研究(B) 課題番号：17K15103
研究課題 データベース及び実験的手法を用いた光回復酵素/クリプトクロムフ
ァミリーの機能解析
研究代表者 山田大智

- 8 科学研究費補助金（平成 29～令和 1 年度）基盤研究(C) 課題番号: 17K05606
研究課題 ヘモグロビン共同性発現へのタンパク質の大振幅ゆらぎと低波数振動の寄与の実験的検証
研究代表者 長友重紀（筑波大学）
研究分担者 北川禎三
- 9 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団 教育研究助成（令和 1 年度）
研究課題 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
研究代表者 山田大智
- 10 兵庫県立大学 令和元年度特別研究助成金（若手研究者の研究支援）（令和 1 年度）
研究課題 表面増強赤外分光法を用いた不安定な蛋白質への構造変化解析
研究代表者 山田大智