

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・北川禎三・久保稔
Yanagisawa, S., Sato, W., Nagao, S., Yamada, D., Kitagawa, T.,
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。2021年度は、チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性増強機構の解明を大きく進めた。CcO はミトコンドリア内膜の呼吸鎖末端で働く酵素であり、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、膜を介して H⁺ をポンプしている。近年、低酸素下で CcO の活性をアロステリックに増強する膜タンパク質 (Hypoxia-inducible gene domain 1; HIGD1) が同定されているが、われわれは共鳴ラマン分光法を用いて、HIGD1 が CcO の H⁺ ポンプ経路に構造変化を引き起こすことを見出した。リポソームを用いたアッセイ系を構築し、HIGD1 結合時の H⁺ ポンプ活性の上昇も捉えつつあり、さらなる機構解明を進めている。また、学外との共同研究を 8 件実施し、金属酵素モデル錯体のラマン分光解析を 2 報論文発表した (*Inorg. Chem., Chem. Eur. J.*)。

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・柳澤幸子・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り、当講座は世界に先駆けてこの手法を活用してきた。2021年度は、チトクロム P450 の O₂ 結合型中間体の構造解析を進め、ヘム Fe への O₂ 結合が基質の配向を最適化する動きを捉えることに成功した。本発見で講座配属生 (M1 桑野わ子) が第 59 回日本生物物理学会年会で学生発表賞を受賞した。その他、学外との共同研究で種々のタンパク質の時間分解結晶構造解析を進めている。2021年度は塩化物イオンポンプロドプシンと光化学系 II の動的構造解析を論文発表した (*PNAS, IUCrJ*)。

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。2021年度は、NO還元酵素（チトクロム P450_{nor}）の中間体の化学構造を顕微時間分解 FTIR で決定し、時間分解結晶構造解析の結果と併せて論文発表した（*PNAS*）。2つの先端手法を統合することで、本酵素のラジカル反応機構を解明した。また、Trp代謝酵素（インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ）の中間体を Stopped-flow ラマン分光法で解析し、基質 Trp のヘムポケットへの結合ステップを解明した。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）の研究にも大きな進展が見られた。時間分解紫外可視・赤外分光測定により、本酵素においては DNA の完全修復に光吸収が 2 回必要であることを解明した。本発見で講座配属生（M1 楞野亜衣）が第 47 回生体分子科学討論会優秀ポスター賞を受賞した。

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。前年度までに赤外分光測定で用いる Si プリズムへの金薄膜形成と Ni-NTA の化学修飾に成功している。2021年度は His タグを付加したタンパク質（フォトリアーゼ）の金表面への固定化を試みた。しかし、His タグを介さず金表面に直接吸着したタンパク質が多数見られ、タンパク質の固定化法に課題が残された。

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。2021 年度は、C 末端領域を含む全長 CraCRY の発現・精製法を確立し、まずは空気酸化した酸化状態の X 線小角散乱 (SAXS) 実験を行なった。現在、SAXS データを解析し、C 末端領域の構造状態を解析するとともに、NMR による構造解析を試みている。

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 O₂ 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。2021 年度は、三箇所変異を加えたミオグロビン二量体を調製し、CO (O₂ アナログ) 結合に対して協同性を示唆する結果を得た。今後、酸素解離曲線の測定によるヒル係数の決定、O₂ 結合時の構造変化解析へと研究を進める計画である。

発表論文 List of Publication

- I-1 Mikata, Y.* (奈良女子大), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Kodera, M. (同志社大) et al.: A synthetic model for the possible Fe^{IV}₂(μ-O)₂ core of methane monooxygenase intermediate Q derived from a structurally characterized Fe^{III}Fe^{IV}(μ-O)₂ complex, *Inorg. Chem.* 61, 786-790 (2022).
- I-2 Shinke, T. (大阪大), **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Itoh S.* (大阪大) et al.: Revisiting alkane hydroxylation with *m*-CPBA (*m*-chloroperbenzoic acid) catalyzed by nickel(II) complexes, *Chem. Eur. J.* 27, 14730-14737 (2021).
- I-3 Hagiwara, S. (筑波大), Momotake, A. (筑波大), **Ogura, T.**, **Yanagisawa, S.**, Suzuki, A. (長岡工業高専), Neya, S. (千葉大), Yamamoto, Y.* (筑波大): Effects of Heme Electronic Structure and Local Heme Environment on Catalytic Activity of a Peroxidase-Mimicking Heme-DNAzyme, *Inorg. Chem.* 60, 11206-11213 (2021).

- I-4 Nagatomo, S.* (筑波大), **Kitagawa, T.***, Nagai, M. (法政大) : Roles of Fe-Histidine bonds in stability of hemoglobin: Recognition of protein flexibility by Q Sepharose, *Biophys. J.* 120, 2734-2745 (2021).
- I-5 **Matsumura, W.**, **Yanagisawa, S.**, Shinzawa-Itoh, K. (兵県大), Nishida, Y. (国循), Nagao, T. (国循), Shintani, Y. (国循), **Kubo, M.** : Spectroscopic study on the action mechanism of Higd1a for activating cytochrome *c* oxidase, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- II-1 Hosaka, T. (理研), **Nomura, T.**, **Kubo, M.**, Nango, E.* (東北大), Shirouzu, M.* (理研) 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).
- II-2 Li, H. (兵県大), Nakajima, Y. (岡山大), **Nomura, T.**, **Kubo, M.**, Iwata, S. (京都大), Shen, J.-R.* (岡山大), Suga, M.* (岡山大) et al.: Capturing structural changes of the S1 to S2 transition of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography, *IUCrJ* 8, 431-443 (2021).
- II-3 **久保稔** : SACLA により明らかにされるタンパク質の動的構造と機能、第 39 回 ST クラブ (姫路)、2021 年 7 月 26 日 (Invited) .
- II-4 **Kuwano, W.**, **Nagao, S.**, Tosha, T. (理研), Stanfield, J. K. (名古屋大), Kasai, C. (名古屋大), Ariyasu, S. (名古屋大), Shoji, O. (名古屋大), Sugimoto, H. (理研), **Kubo, M.** : Structure of a heme-oxy intermediate of cytochrome P450BM3 catalyzing a non-natural substrate, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日 (学生発表賞) .
- III-1 **Nomura, T.**, **Yamada, D.**, Tosha, T.* (理研), **Kubo, M.***, Shiro, Y.* (兵県大) 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).
- III-2 **山田大智** : 時間分解顕微分光法による構造ダイナミクス研究、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 (online)、2022 年 1 月 8 日 (招待講演) .
- III-3 **Kubo, M.** : Time-resolved infrared and XFEL analyses of P450nor reaction intermediates using caged-substrate, Pacificchem2021 (Online) Dec 20, 2021 (Invited) .
- III-4 **Kubo, M.** : Combining time-resolved XFEL crystallography with IR spectroscopy for capturing P450nor reaction intermediates, Pacificchem2021 (Online) Dec 17, 2021 (Invited) .
- III-5 **Yanagisawa, S.** : Ultraviolet resonance Raman characterization of a substrate bound to human indoleamine 2,3-dioxygenase 1, Pacificchem2021 (Online) Dec 21, 2021 (Invited) .
- III-6 **Kawamura, M.**, **Nasada, K.**, **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.** : Investigation of reaction intermediates of indoleamine 2,3-dioxygenase by using a stopped-flow Raman/absorption spectrometer, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- III-7 **Kadono, A.**, **Yamada, D.**, Yamamoto, J. (大阪大), **Kubo, M.** : Time-resolved IR spectroscopic detection of a photorepair intermediate in (6-4) photolyase, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- III-8 **Maeno, T.**, **Yamada, D.**, Yamamoto, J. (大阪大), **Kubo, M.** : Microflow-flash Time-resolved UV-vis spectroscopic analysis of DNA photorepair reaction catalyzed by cryptochrome CraCRY, 第 59 回日本生物物理学会年会 (online)、2021 年 11 月 26 日.
- III-9 **山田大智**、**楞野亜衣**、**久保稔** : 顕微分光装置開発の現状と DNA 光修復酵素の時分割分光解析、令和三年度 新学術領域研究「高速分子動画」 シンポジウム (淡路)、2021 年 11 月 1 日.

- III-10 山田大智、楞野亜衣、山元淳平（大阪大）、久保稔：時間分解分光法を用いた(6-4)光回復酵素の逐次的 2 光子反応モデルの検証、第 15 回分子科学討論会（online）、2021 年 9 月 20 日。
- III-11 河村味奈、柳澤幸子、久保稔：Stopped-flow ラマン・吸収同時測定装置の開発とそれを用いた IDO 酵素反応追跡の試み、第 47 回生体分子科学討論会(ポスター、online)、2021 年 6 月 4 日。
- III-12 楞野亜衣、山田大智、山元淳平（大阪大）、久保稔：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、第 47 回生体分子科学討論会（ポスター、online）、2021 年 6 月 4 日（優秀ポスター賞）。

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 河村味奈（M2）：Stopped-flow 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中間体の解析
- 松村和香（M2）：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
- 楞野亜衣（M1）：時間分解赤外分光法を用いた DNA 光修復酵素の触媒機構解析
- 北山実咲（M1）：膜タンパク質オペランド解析に向けた表面増強赤外分光装置の開発
- 桑野わ子（M1）：SACLA を用いたチトクロム P450 酸素化型中間体の無損傷構造解析
- 名定加峰（M1）：Stopped-flow 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基質阻害機構の解析
- 前野達海（M1）：クリプトクロムの DNA 光修復機能の分光学的解析

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 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
- 4 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
- 5 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
- 6 公益財団法人木下記念事業団 木下基礎科学研究基金助成（令和 3 年度）

- 研究課題 表面増強赤外分光法を用いた温度感受性チャネルの反応機構解明
研究代表者 山田大智
- 7 兵庫県立大学 令和3年度特別研究助成金（若手研究者支援）
研究課題 アロステリック調節因子によるチトクロム酸化酵素活性化の作用機序
をダイナミックピコバイオロジーに基づいて理解する
研究代表者 柳澤幸子
- 8 兵庫県立大学 令和3年度女性研究者研究活動助成金
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