

Spectroscopy

生体物質構造学Ⅱ

I 金属タンパク質の振動分光解析

Vibrational spectroscopy of metalloproteins

柳澤幸子・佐藤航・久保稔

Yanagisawa, S., Sato, W., 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、チトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性増強機構を調べている。2023 年度は低酸素下で CcO の活性を増強するタンパク質 (CHCHD2) を集中的に研究し、活性増強時に引き起こされる CcO の構造変化箇所を同定した。また 2023 年度も引き続き、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実施した。

II タンパク質ダイナミクスの時間分解分光解析

Time-resolved spectroscopy of enzymatic reactions

柳澤幸子・佐藤航・久保稔

Yanagisawa, S., Sato, W., Kubo, M.

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、ヘムやフラビンといった補因子を有する酵素の反応機構を研究している。2023 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) について、DNA の修復に必要な光子数が生物種によって異なることを明らかにした。現在、分子進化との関連を詳細に調べている。

一方で、SACLA 時間分解結晶構造解析 (分子動画法) を補完する時間分解分光研究を行っている。分子動画法はタンパク質の動きを時間軸上で観測できる新しい構造解析手法である。しかしこの手法は微結晶化したタンパク質を扱う制約上、観測された構造変化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。当講座は微結晶を計測できる独自の顕微時間分解分光装置を開発し、結晶相と溶液相のタンパク質ダイナミクスを比較・評価することで、分子動画データの適切な解釈を導いてきた。2023 年度も引き続き、分子動画を補完する顕微分光研究を実施した。

Ⅲ 二機能性クリプトクロム天然変性領域の構造解析

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

佐藤航・柳澤幸子・長尾聡・久保稔
Sato, W, Yanagisawa, S., Nagao, S., Kubo, M.

クラミドモナス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) 光受容体としてはたらくクリプトクロム機能に加えて、(ii) DNA 光修復酵素としての酵素機能も保持している。CraCRY は C 末端に 99 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っているに違いない。2023 年度は、明状態 (FADH⁻型) CraCRY のメチル側鎖の NMR 測定に成功し、C 末端天然変性領域の構造分布や運動性の一端を明らかにした。暗状態 (FADH[•]) CraCRY については、引き続き試料調製条件を検討中である。

Ⅳ タンパク質のオペランド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

佐藤航・久保稔
Sato, W., 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。2023 年度はクリプトクロムの計測に適した金表面の作製条件を検討した。

Ⅴ 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

佐藤航・長尾聡・久保稔
Sato, W., Nagao, S., 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付与したミオグロビン二量体を分子設計する。2023年度は、ヘム遠位側に変異を加えたミオグロビン二量体を設計した。現在、その変異体のヘム周辺構造やリガンド結合特性を調べている。

発表論文 List of Publication

- I-1 **Sachiko Yanagisawa**: Application of resonance Raman spectroscopy to study an allosteric regulator of cytochrome *c* oxidase, 8th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-8), Parry Sound (Canada), 2023年5月26日。(招待講演)
- I-2 **亀井拓斗, 柳澤幸子**, 島田敦広(岐阜大), Stephanie Gladysck(ウェイン州立大学), Siddhesh Aras(ウェイン州立大学), Maik Huettemann(ウェイン州立大学), Lawrence Glossman(ウェイン州立大学), **久保稔**: Visible resonance Raman study to elucidate the action mechanism of CHCHD2 for activating cytochrome oxidase, 第61回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2023年11月16日。
- I-3 **佐藤航, 柳澤幸子**, 新澤-伊藤恭子(兵県大), 西田優也(国循セ), 長尾壮将(国循セ), 新谷泰範(国循セ), **久保稔**: シトクロム *c*酸化酵素のプロトンポンプ活性評価を通じた Higd1A の機能的意義の解明, 第49回生体分子科学討論会, 豊中, 2023年6月2日。
- I-4 **久保稔, 山田大智**: ラマン分光法の構造生物学的利用, *タンパク質の構造解析手法と In silico スクリーニングの応用事例(第1章 第6節)* (技術情報協会), 51-61 (2023).
- II-1 Li, H. (岡山大), **Yamada, D., Kubo, M.**, Suga, M.* (岡山大), Shen, J.-R.* (岡山大) et al.: Oxygen-evolving photosystem II structures during S₁-S₂-S₃ transitions, *Nature* 626, 670-677 (2024).
- II-2 Wolff, A. M. (カリフォルニア・マーセッド大), Nango, E.* (東北大), **Kubo, M., Nomura, T.**, Thompson, M. C.* (カリフォルニア・マーセッド大) et al.: Mapping protein dynamics at high spatial resolution with temperature-jump X-ray crystallography, *Nature Chem.* 15, 1549-1558 (2023).
- II-3 Ariyasu, S. (名大), **Kubo, M.**, Shoji, O.* (名大) et al.: Catalytic oxidation of methane by wild-type cytochrome P450BM3 with chemically evolved decoy molecules, *ACS Catal.* 13, 8613-8623 (2023).
- II-4 **Minoru Kubo**: Time resolved spectroscopy for monitoring the protein dynamics in microcrystals, UK-Japan meeting on dynamic and time-resolved crystallography 2023, Leicester (UK), 2023年9月14日。(招待講演)
- II-5 **Minoru Kubo**: Time-resolved IR characterization of the key intermediate in N₂O generation by P450 NO reductase, 8th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CANBIC-8), Parry Sound (Canada), 2023年5月26日。(招待講演)
- II-6 **久保稔**: 分光学から見た DNA 光修復のメカニズム, 第35回高速分子動画オンラインセミナー, オンライン, 2023年12月12日。(招待講演)
- II-7 **久保稔**: 光による DNA 修復のメカニズムと分子進化, 第1回 ATI コンファレンス バイオ単分子研究会, 北杜, 2023年11月13日。(招待講演)
- II-8 **久保稔**: 時間分解振動分光による酵素中間体の化学構造解析, 蛋白研セミナー“タンパク質のダイナミクスと機能”, 吹田, 2023年10月2日。(招待講演)
- II-9 **山田大智, 撈野亜衣, 前野達海**, 重田育照(筑波大), 山元淳平(阪大), **久保稔**: 損傷 DNA の光修復に関する分光学的研究, 第49回生体分子科学討論会, 豊中, 2023年6月1日。
- III-1 **貝出裕規, 長尾聡, 佐藤航, 久保稔**: NMR analysis of dynamics of the C terminal extension in bi-functional cryptochrome, 第61回日本生物物理学会年会, 名古屋, 2023年11月15日。

III-2 乾翔太, 松田颯真, 長尾聡, 柳澤幸子, 久保稔: X線小角散乱を用いた明状態二機能性クリプトクロムの溶液構造解析, 第49回生体分子科学討論会, 豊中, 2023年6月1日.

生命科学専攻

博士前期課程

亀井拓斗(M2): 共鳴ラマン分光法を用いたチトクロム *c* 酸化酵素活性増強因子 CHCHD2 の作用機序解明

貝出裕規(M2): NMR を用いた二機能性クリプトクロム C 末端変性領域の構造ダイナミクスの解明

松田颯真(M2): 二機能性クリプトクロムの暗状態構造解析に向けた調製方法の確立

乾翔太(M1): X線小角散乱測定による二機能性クリプトクロムの溶液構造解析

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