

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・管理し、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。2024年度は、ミトコンドリア呼吸活性増強因子 CHCHD2 によるチトクロム *c* 酸化酵素 (CcO) の活性化機構を調べた。その結果、CHCHD2 は、チトクロム *c* から CcO への電子伝達過程ではなく、CcO の酸素還元反応を直接促進することが明らかになった。CHCHD2 は低酸素下で働くことから、まずは酸素結合過程が促進されているかどうかを時間分解赤外分光法により調べる計画である。さらに、別の呼吸活性増強因子 Higd1a の作用機序を、リポソームを用いたアッセイ系で明らかにした。また、2024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整備し、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。2024年度は、損傷 DNA を光依存的に修復するフラビン酵素 (6-4 フトリアーゼ) について、DNA 修復に必要な光子数が動物酵素と植物酵素で異なることを明らかにした。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も進めている。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構造解析手法であるが、微結晶化されたタンパク質を用いるという制約があり、観測された構造変化の解釈や、溶液相の機能研究との関連付けが問題となる。当講座では、微結晶を計測可能な独自の顕微時間分解分光装置を開発し、結晶相と溶液相における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。2024年度は、顕微時間分解赤外分光装置を改良した。さらに、当講座自ら SACLA を用いてヘム酵素 P450 の中間体構造解析を実施し、タンパク質構造変化とともに基質が活性中心内で回転し、反応に適した配向へと誘導・固定される様子を観測することに成功した。

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.

クラミドモナス動物型クリプトクロム (CraCRY) は、(i) 光受容体としてのクリプトクロム機能と、(ii) DNA 修復に関わるフォトリアーゼ機能を併せ持つ二機能性タンパク質である。フォトリアーゼホモロジー領域 (PHR) と天然変性領域 CTE からなり、PHR 内の FAD は①酸化型、②セミキノン型、③還元型の三状態をとる。二機能の切り替えには、FAD の状態に応じた CTE のダイナミクスが関与すると考えられる。2024 年度は、酸化型と還元型で PHR-CTE 間の相互作用が局所的に変化することを NMR で明らかにした。さらに、CTE がリン酸化されると、この変化に伴い CTE の構造 (または構造分布) に大きな変化が生じることを X 線小角散乱法で示した。現在は、その変化部位の同定を進めている。

Ⅳ 磁気受容クリプトクロムの分光学的解析

Spectroscopic analysis of magnetoreceptive cryptochrome

佐藤 航・久保 稔
Sato, W, Kubo, M.

ヨーロッパコマドリやオオカバマダラなどの渡りを行う生物は、青色光依存的に地磁気を検知しており、その初期反応にはクリプトクロムのラジカルペア仮説が提唱されている。本研究では、オオカバマダラにおける初期反応およびタンパク質構造変化を分光学的に解明することを目的としている。現在、オオカバマダラ由来クリプトクロムの試料調製法の確立に取り組んでいる。

Ⅴ 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える表面増強赤外分光装置を開発中である。この装置では、Ni-NTA 基を末端に持つ自己組織化単分子膜 (SAM) を金表面に形成し、その上に His タグ付きタンパク質を固定化する。こうして構築された金表面に対して表面増強赤外分光法を適用することで、タンパク質の構造と機能をオペランドで計測する。2024 年度は、Ni-NTA SAM の形成およびバッファ条件を最適化し、クリプトクロムが 60% 以上の配向整列で金表面に吸着する条件を見出した。

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

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、部分構造を互いに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持たせたミオグロビン二量体を分子設計する。2024 年度は、この二量体に追加の変異を導入したミオグロビンを設計し、ラマン分光法によりヘム鉄-His 周辺構造を解析した。その結果、ヘム遠位側の変異導入により、二量体間のヘム-ヘム相互作用が消失する可能性が示唆された。

発表論文 List of Publication

- I-1 **Yanagisawa, S.***, **Kamei, T.**, Shimada, A (岐阜大) ., Grossman, L. I. (Wayne State University School of Medicine) , **Kubo, M.*** et al.: Resonance Raman spectral analysis of the heme site structure of cytochrome *c* oxidase with its positive regulator CHCHD2, *J. Inorg. Biochem.* 260, 112673 (2024).
- I-2 Ueda, K.(奈良女大), **Sato, W.**, **Yanagisawa, S.**, **Kubo, M.**, Hada, M.(都立大), Fujii, H.* (奈良女大) : Resonance Raman study of oxoiron(IV) porphyrin π -cation radical complex: Porphyrin ligand effect on $\nu(\text{Fe}=\text{O})$ frequency, *J. Inorg. Biochem.* 255, 112544 (2024).
- I-3 **Yanagisawa, S.**: Resonance Raman study of cytochrome *c* oxidase with a positive regulator, MNRR1, 13th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Niagara Falls (USA), 2024 年 6 月 25 日. (招待講演)
- I-4 **佐藤航**, **柳澤幸子**, 新澤-伊藤恭子 (兵県大), 西田優也 (国循), 長尾壮将 (国循), 新谷泰範 (国循), **久保稔**: 分光学的に明らかにされた Higd1A によるシトクロム *c* 酸化酵素のプロトン輸送一電子移動共役効率の制御機構, 第 24 回蛋白質科学会年会, 札幌, 2024 年 6 月 13 日.
- II-1 **Nagao, S.**, **Kuwano, W.**, Tosha, T. (理研), Ariyasu, S. (名大), Yamamoto, M. (理研), Shoji, O. (名大), Sugimoto, H. (理研) *, **Kubo, M.*** et al. : XFEL

- crystallography reveals catalytic cycle dynamics during non-native substrate oxidation by cytochrome P450BM3, *Commun. Chem.* 8, 63 (2025).
- II-2 Sato, W., Yamada, D., Kubo, M.*: Chapter 6. Time-resolved IR spectroscopy for monitoring protein dynamics in microcrystals, *Methods Enzymol.* 709: Time-Resolved Methods in Structural Biology (Editors: Moody, P. & Kwon, H.), Elsevier, 161-176 (2024).
- II-3 Orville, A. M. (DiamondLight Source) , Nango, E. (東北大) *, Iwata, S. (京大) , Mous, S. (SLAC National Accelerator Laboratory) , Standfuss, J. (Paul Scherrer Institute) , Nogly, P. (Paul Scherrer Institute) , Suga, M. (岡山大) , Shen, J.-R. (岡山大) , Kubo, M.: Chapter 15. Time-resolved studies of protein structural dynamics, *Ultrafast Electronic and Structural Dynamics* (Editor: Ueda, K.), Springer Nature Singapore, 439-476 (2024).
- II-4 片山哲郎 (徳島大) , 木村哲就 (神戸大) , 久保稔*: 第 III 章第 6 節 タンパク質微結晶を測定する時間分解顕微分光技術, 生体の科学 特集「高速分子動画: 動的構造からタンパク質分子制御へ」, 医学書院 75, 225-230 (2024).
- II-5 Kubo, M.: Tracking Light-Driven DNA Repair by Time-Resolved Spectroscopy, The 5th UOH-FZU-OMU Joint International Symposium on Photocatalysis, Photofunctional Materials, Photon-Science, Nano-Science & Technology, 姫路, 2024 年 11 月 27 日. (招待講演)
- II-6 久保稔: 時間分解赤外分光法による酵素反応中間体の捕捉, 日本化学会第 105 春季年会 次世代分子システム化学のフロンティア—協奏的機能発現の素過程的理解, 吹田, 2025 年 3 月 26 日. (招待講演)
- II-7 松田七海、前野達海、山田大智、山元淳平 (阪大) 、柳澤幸子、久保稔: DNA 光修復の光子数依存性に関する分光学的研究, 量子生命科学会第 6 回大会, 東京, 2024 年 5 月 30 日. (Best Poster Presentation Award)
- III-1 Sato, W., Kaide, Y., Inui, S., Nagao, S., Kawagoe, S. (徳島大) , Yanagisawa, S., Saio, T. (徳島大) , Kubo, M.: Light-dependent dynamics of intrinsically disordered region of bifunctional cryptochrome, The 5th UOH-FZU-OMU Joint International Symposium on Photocatalysis, Photofunctional Materials, Photon-Science, Nano-Science & Technology, 姫路, 2024 年 11 月 27 日. (招待講演)

生命科学専攻

博士前期課程

- 乾 翔太(M2): X 線小角散乱法及び円二色性分光法を用いた二機能性クリプトクロムの溶液構造解析
- 小川大輔(M1): クリプトクロム磁気受容メカニズムの解明に向けた表面増強赤外分光装置の確立
- 佐藤優樹(M1): 赤外分光法による CraCRY の機能発現メカニズムの解明
- 松田七海(M1): DNA 光修復の光子数依存性に関する分光学的研究

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（令和 6～10 年度） 学術変革領域(A)「蛋白質新機能生成」 課題番号：
24H02263
研究課題 改変タンパク質が生成する新機能の時分割分光計測
研究代表者 久保 稔
- 2 科学研究費補助金（令和 6～8 年度） 基盤研究(C) 課題番号：24K08604
研究課題 ミトコンドリア呼吸鎖活性増強タンパク質の作用機序解明を目指した
分光解析
研究代表者 柳澤幸子
- 3 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
- 4 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