

機関番号：14301

領域設定期間：令和元年度～令和5年度

領域番号：8101

研究領域名（和文）高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用

研究領域名（英文）Non-equilibrium-state molecular movies and their applications

領域代表者

岩田 想（IWATA So）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60452330

交付決定（予定）額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,025,600,000円

## 研究の概要

生命現象を支えているタンパク質の機能やその機構を理解するためには、タンパク質の中で実際に起こっている化学反応や構造変化を追跡することが不可欠である。現在、タンパク質の動的構造を観察する方法としては構造解析的手法や分光学的手法があげられるが、構造解析的手法は平衡に達したのちの分子種の分布を観察しているだけで、構造変化の途中で一時的に生じるような非常に寿命が短くかつポピュレーションの低い分子種の観察はできない。分光学的手法はタンパク質分子の原子分解能での位置情報を与えない。これに対し、XFELを用いたポンププローブ法による分子動画撮影(図1)は、フェムト秒に達する時間分解能でタンパク質の平衡に達するまでの構造変化を原子分解能で分子動画記述できる唯一の方法である。特にこの手法はその時間分解能から、これまで原子分解能で追うことのできなかった化学反応などの早い反応の追跡に適している。

2010年から本格的に稼働が始まったXFELは、10フェムト秒以下の強力なX線パルスレーザーという既存にはなかった特性のために、従来のX線結晶解析の技術そのままでは装置・解析法ともに適用できず、現在も各国で激しい開発競争が行われるなど新興技術として脚光を浴びている。一方、タンパク質の動的構造解析もまた、タンパク質機能発現や理解を深めるために非常に関心を集めている分野である。本領域が取り組むXFELによる解析は、空間分解能及び時間分解能の点で他の手法では全く解析不可能な領域であることから、XFELによる分子動画法が汎用的な技術として確立され、多種多様なタンパク質試料で動的構造が解明されると、XFEL技術の発展並びに生命科学の飛躍的深化に繋がる。

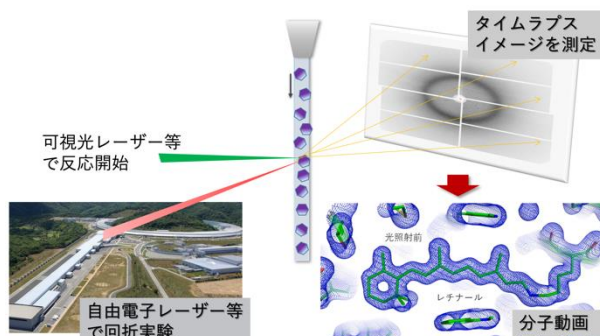


図1 高速分子動画測定イメージ図

研究分野：構造生物学、タンパク質工学、ケミカルバイオロジー、分光学、計算科学

キーワード：

**X線自由電子レーザー（XFEL）**：X線領域におけるレーザーで、超高輝度・極短パルス・高空間コヒーレンスという特徴を有し、X線回折実験では化学結合が切断されるより短い時間（10フェムト秒以下）で回折像を収集することができる。

**分子動画**：XFELを用いれば、化学変化など物質の極めて速い動きをフェムト秒台の時間分解能かつ原子分解能で、回折像をコマ撮りで撮影し、「分子動画」として映像化することができる。

### 1. 研究開始当初の背景

本領域研究が始まる前の段階では、光で反応を開始するタンパク質を標的とした分子動画法が実証されていたが、光以外をトリガーとして用いる分子動画法はほとんど確立されておらず、例えば温度やpHなどの外部刺激や、基質・リガンドの添加などによる時分割実験を可能とする装置の開発が急務であった。またタンパク質工学やケミカルエンジニアリングを用いて、光感受性

でない系を光で同期できる系に改変することにより、タンパク質の中の酵素反応の追跡や受容体タンパク質の活性化機構の研究などに、本手法の対象を大きく拡張することが可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本領域研究では、本法をタンパク質の中で起こる早い反応を追跡するスタンダードな技術として確立するために、ケミカルバイオロジーの手法を中心に用いて反応を同期させる技術を開発するとともに、反応開始のち徐々に同期が外れて複数の状態が混ざっていく問題をコンピューターシミュレーションにより解析分離し、実際のタンパク質の中で起こっている反応をより現実に即して捉えることを主眼とする。同時に、この目的を達成するための測定システムの開発を行い、光によるタンパク質のスイッチ機構の解明、ユニークな反応を触媒する酵素の反応機構など、幅広いターゲットに適用することを目指す。更に、本法によって得られた精密な構造情報を基にタンパク質分子の光制御法の確立など分子制御への応用も推進する。

## 3. 研究の方法

高速分子動画法では、XFEL のフェムト秒パルスをストックのように用い、フェムト秒から秒に至る幅広い時間分解能での動的構造解析を行う。XFEL を用いた研究分野は新しく、物理系・工学系・化学系・生物系などの幅広い分野が協力して研究を行っている。本領域は、多種多様な生体高分子中で起こる反応・構造変化の解明を軸（研究項目 1, A01）とし、これと分子動画法の基盤構築グループ（研究項目 2, B01）と、計算科学、物理化学から成る反応精密分析グループ（研究項目 3, C01）が技術開発・解析を協調して行うことにより研究を展開する（図 2）。研究項目 1 においては特に生物学的、化学的に興味深いシステムの研究者と協力し、幅広い生命現象の分子レベルでの理解を目指す。様々なシステムに対応するために、広い分野から新しい技術の導入・開発を実施する。また計算科学を活用することにより実験だけでは理解するのが難しい現象を理論的・定量的に解釈し、その成果を用いて新たなタンパク質分子や化合物を創生することを目指している。



図2 研究戦略

## 4. 研究の進展状況及び成果

研究項目ごとに進展状況・成果をまとめる。

### 研究項目 1 (A01)：高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明及び分子制御法の開発

高速分子動画の撮影に関して最も進んでいるのは草木迫らで、チャンネルロドプシンの閉状態から開状態への遷移に伴う構造変化を明らかにし *eLife*(2021) に報告している（図 3）。反応開始より 1 ミリ秒後にヘリックス 3 と 7 が動くことにより、分子の内部に溶媒の侵入が可能になることが実験によって示された。志甫谷らは次の分子動画のターゲットとなりうるシゾロドプシン (PNAS) および酵素型ロドプシン Rh-PDE (*Nat. commun.* 2020) の静的な構造についても報告を行っており今後の研究に期待がもたれる。岩田らは 2 光子励起で光遺伝学ツール CRY2 を活性化する BFP との融合タンパク質を分子設計することに成功しており、今後の動画撮影に興味を持たれる (*Nature Meth.* 2019)。

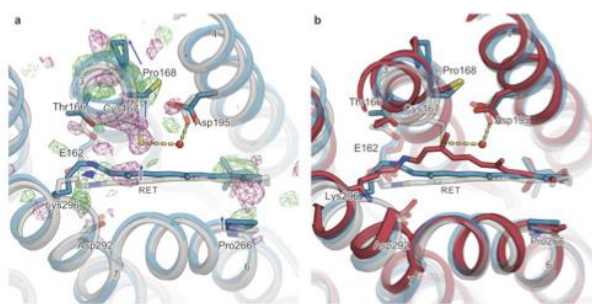


図 3. チャンネルロドプシンの光照射による構造変化 (a. 灰色→水色)。QM/MM シミュレーションの結果 (b. 赤色) ともタンパク質部分の構造はよく一致する。

ミリ秒の時間制御を可能にするケージド化合物に関して、古田らは、光特性を失うことなく新たな機能を付与できる化合物の開発に成功した。中でも、酵素によって光反応性のスイッチングができるケージド化合物を開発して、環状ヌクレオチド類の精緻な機能制御を達成した (*Chem Commun.* 2021)。マイクロ秒の時間制御を実現するために、清中らは、ケージド化合物のリガンド結合部位近傍への標識を実現する新たなタンパク質ラベル化法を開発した (*Nat. Commun.* 2021)。

永野らは立体選択性が異なる 2 種類の DAase ではそれらの酵素の MD シミュレーションから、それぞれの酵素に基質が疑似的な鏡像異性のコンフォメーションで結合することで立体選択的な環化付加反応を行っていることを示している (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2021)。

## 研究項目 2 (B01) : 高速分子動画撮影法の基盤構築

南後らは基質と結晶を急速に混合する二液混合法の開発では、実際に酵素微結晶を用いて実験を行い、活性部位に基質、イオン、補酵素が結合している様子を時間に応じて追跡していくことに成功した。

足立らは銅(I)フェナントロリン錯体の実験系では、銅錯体の光励起後の構造変化と分子振動の計測を試み、Cu-K 吸収端での X 線吸収分光スペクトルの解析から、光励起直後の電子移動 (MLCT) に伴う錯体構造のヤーン・テラー歪みと分子振動を明らかにした (*Nature Comm.* 2019)。ジシアノ金(I)錯体 ( $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ ) を試料として、液相光化学反応の超高速初期過程の直接観測を試みたところ、時間分解 X 線溶液散乱データにより、レーザー励起直後から 1 ピコ秒の間に X 線散乱強度が時間的に振動する成分が観測され、励起分子が励起ポテンシャル曲面上で振動して Au-Au 間の共有結合が形成する過程を捉えることに成功した (*Nature* 2020)。

## 研究項目 3 (C01) : 高速分子動画に資する反応精密分析

久保らは温室効果・オゾン層破壊の原因である  $\text{N}_2\text{O}$  の生物的発生源機構を解明した (*PNAS* 2021)。具体的には、時分割顕微赤外分光装置を開発し、分子動画で観測されたカビ由来 NO 還元酵素中間体の化学構造および電子状態 (ラジカル性) を解明した。地球環境における  $\text{N}_2\text{O}$  排出量を抑制する上で重要な分子基盤を提供すると考えられる。

宮下らは、TR-SFX 実験データから得られる時間発展前後の電子密度の差を反映する差フリーエマップをもとに、MD シミュレーションを用いることで反応後の構造モデルを構築する手法を開発した。バクテリオロドプシンの実験データについても実証研究を行い、これまで手作業で作られた構造モデルと同等な構造を自動的に導き出すことができることを示した。

小野らは、南後らによるバクテリオロドプシンの光反応サイクル L 状態スナップショット構造で観測された内部水分子に着目し大規模量子 MD 計算を実行し、水が近傍残基へとリレー形式でプロトンを受け渡した後、生じた水酸化イオン中間体がシッフベースからプロトンを受け取る 1 段階目のプロトン移動の機構を明らかにした (*J. Phys. Chem. B* 2020)。

## 5. 今後の研究計画

研究領域の今後の方針としては、(1) 分子動画撮影の推進 (2) 研究連携の推進 (3) デザインしたタンパク質や化合物などの成果物の創出、の 3 点に力を入れたい。新たな公募に関してもこの 3 点に重点をおいて行いたいと考えている。公募の方針としては、出口に向かって成果を創出できる班員を加えて行きたい。分子動画撮影に関しては二液混合や温度ジャンプなどを活用したプロジェクトを加えていきたい。また、新規機能タンパク質やタンパク質の機能を制御する化合物の創生や評価を行えるような班員を加えていきたいと考えている。構造生物学、ケミカルバイオロジー、計算科学、分光学などの各要素を融合していくために力となってくれる分野の次世代になう若い研究者を中心に採用していきたいと考えている。

## 6. 主な発表論文等 (受賞等を含む)

1. Oda K, *et al.*, "Time-resolved serial femtosecond crystallography reveals early structural changes in channelrhodopsin" *elife* 10: e62389 (2021)
2. Ikuta T, *et al.*, "Structural insights into the mechanism of rhodopsin phosphodiesterase." *Nat. Commun.* 11(1):5605 (2020).
3. Kinjo T, *et al.*, "FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics." *Nat. Methods* 16: 1029-1036(2019)
4. Suzuki AZ, *et al.*, "Design and synthesis of gene-directed caged cyclic nucleotides exhibiting cell type selectivity" *Chm. Commun.* in press. (2021)
5. Ojima K, *et al.*, "Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking." *Nat. Commun.* 12: 831 (2021)
6. Fujiyama K, *et al.*, "Molecular basis for two stereoselective Diels-Alderases that produce decalin skeletons." *Angew. Chem. Int. Ed.* (First Published: 13 June 2021)
7. T. Katayama, *et al.*, "Tracking multiple components of a nuclear wavepacket in photexcited Cu(I)-phenanthroline complex using ultrafast X-ray spectroscopy" *Nature Comm.* 10,3606 (2019)
8. J. G. Kim, *et al.*, "Mapping the emergence of molecular vibrations mediating bond formation." *Nature* 582,520 (2020)
9. Nomura T, *et al.*, "Short-lived intermediate in  $\text{N}_2\text{O}$  generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography." *PNAS. USA* 118(21): e2101481118(2021).
10. J. Ono, *et al.*, "Hydroxide Ion Carrier for Proton Pumps in Bacteriorhodopsin: Primary Proton Transfer." *J. Phys. Chem. B* 124(39): 8524-8539 (2020)

## 7. ホームページ等

ホームページ : <http://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp>

メールアドレス : [s.iwata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp](mailto:s.iwata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp)