

Newsletter No.4

<抜粋版>

2019–2023 年度 文部科学省科学研究費助成事業
Non-equilibrium-state molecular movies and their applications
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

目次

領域代表より	2
公募班紹介	3
イベント情報	3
「高速分子動画」技術解説	4
ハイライト研究紹介	8
研究会報告	10
これまでの領域活動	11
総括班よりお知らせ	11

領域代表より

早いもので、新学術領域「高速分子動画」も2年目（2年度目ではない）が終わろうとしています（この文章は令和2年12月25日に書いています）。コロナ騒動でSACLAでの実験に大幅な遅れが出ているなど難しい問題に直面していますが、できることからこなしていこうと思っています。

まずは淡路島の領域会議で総括班評価者の中村先生よりいただいたコメントに対応して、計算分野の連携を深めるために、1月より月に2度を目安に計算の方と実験の方を一人ずつお呼びしてオンラインセミナーを開催することにしました。1回目は2021年1月12日（火）10:00～11:00に行い、櫻庭俊先生（量子科学技術研究開発機構）と山元 淳平先生（大阪大学）に話題を提供していただきます。計算科学の方そして計算科学に興味のある方はぜひ参加していただき、活発な議論と新しい共同研究の可能性について検討をお願いできればと考えています。

また来年は早くも中間評価の年となります。予定では6月下旬評価報告書の作成・提出締め切り、10～11月ヒアリング、12～1月評価結果の通知となっています。成果の論文文化を可能であれば6月末まで、遅くともヒアリングの時までにしていただけると大変助かります。報告書の作成に関しても各位にご協力をお願いすると思います。より一層マネジメントに励むようにしますのでよろしくお祈りします。

最後になりますが、令和3年も皆様にとって実りの多い年になりますようお祈りしています。良い年をお迎えください。



領域代表 岩田想（京都大学医学研究科）

ホームページを2019年9月より立ち上げ、事務局で更新中。記事や情報を募集中！

【 HP 】 <http://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp>

Facebookを2019年9月より開始。だれでも更新OKなので、希望者は事務局（mol_movie@mfour.med.kyoto-u.ac.jp）にご連絡ください。

【 Facebook 】 <https://www.facebook.com/MolMovies/>

公募班の紹介



島 扶美
神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科
教授
caged-GTP を用いた低分子量G蛋白質のシグナル伝達過程の時分割構造解析
A01 班

私は X 線結晶解析、NMR などの分光計測手法を駆使することにより、がん遺伝子産物 Ras の薬剤結合ポケットを独自に発見し、生化学・細胞生物学的手法を組み合わせた構造ベース創薬 (Ras 阻害剤開発) を行ってきました。Ras は多くのがんにおいて活性化されているにもかかわらず未だ有効な臨床治療薬としての Ras 阻害剤は存在しません。Ras の薬剤結合ポケットならびに隣接する酵素触媒部位の運動に係る構造情報の少なさが医薬品設計の難易度を高めている要因の一つと考えられます。

本提案研究では、Ras の基質 GTP の光制御可能なアナログ cagedGTP を利用し、cagedGTP・Ras 複合体結晶あるいは溶液を用いて、SFX 測定、SS-ROX 測定、溶液・固体 NMR 測定を協奏的に実施して分子動画を作成することにより、Ras の介するがん化シグナル伝達の時分割調節メカニズムを可視化するとともに、医薬品設計のための構造基盤情報収集を目指します。

イベント情報

2021 年 1 月 12 日 (火)	第 3 回「高速分子動画」オンラインセミナー
2021 年 1 月 26 日 (火)	第 4 回「高速分子動画」オンラインセミナー
2021 年 3 月 26 日 (金) ~29 日 (月)	日本薬学会第 141 年会・シンポジウム共催 (広島)
2021 年 6 月 4 日 (金) ~5 日 (土)	第 47 回生体分子科学討論会・共催 (姫路)
2021 年 6 月 14 日 (月) ~16 日 (水)	日本顕微鏡学会第 77 回学術講演会 (つくば)
2021 年 6 月 16 日 (水) ~18 日 (金)	第 21 回日本蛋白質科学会年会 (富山)
2021 年 5 月~6 月予定	「高速分子動画」領域会議 (横浜・Online ハイブリット開催予定)
2021 年 11 月 3 日 (水) ~5 日 (金)	第 94 回日本生化学会大会 (横浜)

計算科学の手法について：古典 MD

宮下治（理研・C01）



第2回目の解説記事として、理論計算・シミュレーションの原理について簡単な解説をまとめてみました。この解説記事が実験の方々との計算研究の可能性を共有する助けになり、さらなる共同研究につながることを期待しています。

まず、「計算」と言った時に二つの大きなカテゴリーがあると言えます。まず一つは、「実験データ解析」とも呼ぶべき計算処理です。これは、例えばリアルタイムト秒結晶構造解析(SFX)に関していうと、ヒット画像の判定や、指数付の計算です。これらの計算は「実験データ」の処理であり、後述のような「仮定」はあまり入っていません。

一方、計算にはいわゆる「シミュレーション」と呼ぶものがあります。これらの計算には強い仮定やデータ以外からの情報が入っています。つまり、タンパク質などの物理化学的な性質や物理現象の進み方をプログラムの中で可能な限り正確に再現することにより、分子の運動を予測することを可能にしています。ここで概念的には実験データはシミュレーションの初期構造を与えるのみであり、その後はあくまでも理論的な予測です（実際にはパラメータの選択には実験データの再現性が考慮されているのですが、それでもタンパク質によらない普遍的なパラメータとして準備されています）。

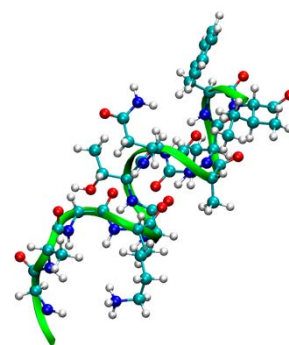
最後に、この二つの間の計算です。色々な手法がありますが、「モデリング」とここでは呼ぼうと思います。生体分子の構造や運動は複雑であり、直接見ることもできないので得られる実験データから全てを導き出すことはできません。そのため、他の情報を組み合わせることで実験データに基づく何らかのモデルを導き出すことが行われます。どのようなデータを使いどのような仮定を入れるかという組み合わせで様々なモデリングが可能になります。

このようなことをグダグダ書かせていただいたのは、計算科学的手法を活用する時には使っている手法の原理とそこに組み込まれている仮定を知っておく必要があると思うからです。そうすることで計算が力を発揮できる状況（とそうでない状況）を知ってもらえるのでは無いかと思います。今回は宮下が古典的分子力学シミュレーションとモデリングについて、庄司さんに古典/量子力学シミュレーションについて簡単な解説をお願いします。

古典的分子力学シミュレーション・MDの手法

タンパク質の運動をシミュレーションすることで何らかの情報を得ようとするとき、タンパク質の大きな運動（空間的、時間的に）については古典的分子力学シミュレーション、MD、を行うこととなります。これは量子力学的なシミュレーションはより複雑なため計算時間がかかるためです。逆に、化学反応のようなシミュレーションはMDでは解析できません。

古典MDでは、タンパク質、水などを原子を表す質点の集まりとして表します。そして、それらの質点が可能な限り物理化学的に正しく動くようにモデルとパラメーター（分子力場）を準備します。まず、原子の間の共有結合が定義さ



れ、原子の間の距離、角度、二面角に依存する原子に働く力、さらに、全ての原子の間に働く電気的な相互作用や原子間力による力が計算されます。CHARMM, AMBER, OPLSといった数十年の歴史を持ついくつかの主流のパラメーターセットがあり、力を計算する数式や、パラメータに細かい違いがあります。パラメーターは実験データや量子力学計算とできるだけ一致するように決められているのですが、現在でも改良が加えられています。また、通常パラメーターはアミノ酸や核酸残基ごとに決められており、普通のタンパク質や核酸については簡単に定義をすることができますが、特殊な残基やリガンドについては特別な準備が必要になります。

また、通常のMDでは共有結合も含めたパラメーターはシミュレーションの途中では変更しません。そのため、分子異性化などのトリガーに対するタンパク質の応答のようなシミュレーションは、途中でパラメータを変更することで行われます。速いタイムスケールの詳細な解析はQMが必要になります。

全ての原子に働く力を計算した後（周囲の水も含めて）、ニュートンの運動方程式を用いて少し後の時間に原子がどこに動くかを計算するのですが、通常数フェムト秒後の位置しか正確に計算できません。そのため興味のあるミリ秒などのシミュレーションをするためには力の計算を膨大な回数繰り返す必要が出てきます。ここが通常のMDの適応できる限度がある原因です。アルゴ

リズムの開発やGPUなどのハードウェアの発達により高速化が進み、タンパク質の大きさにもよりますが、 μ 秒は普通に、頑張ればミリ秒も可能になってきています[1]。

しかし、ミリ秒のシミュレーションを一回行うだけで全てが正しく理解できるわけでも無く、さらに遅い運動も重要なこともあります。そこで、遅い運動に関する情報を効率よく得るためのアルゴリズムや、タンパク質分子を表すモデルを粗視化する（例えばアミノ酸残基を一つの質点で表したり、水を計算に入れない）ことにより、より大きなタンパク質についてより長時間の解析をする手法が盛んに研究されています（これらについてはまた別の解説記事を企画します）。

モデリングの手法

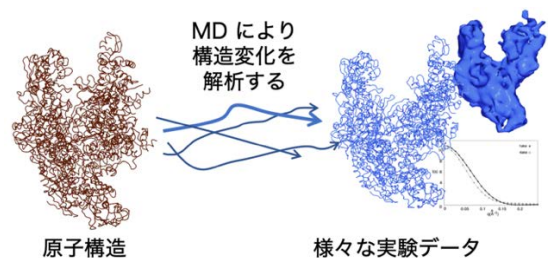
タンパク質の構造や運動に関する情報を得ることが構造生物学の重要な目的の一つですが、分子動画をビデオのように実験で撮ることは現状では無理です。そのため、実験データを元に何らかの他の情報を活用することでモデルを作ることが、機能の議論に必要なになります。これはごく一般的なことで、X線結晶解析の例で言うと、タンパク質の3次元構造を作る計算もこれになります。X線の回折像が構造モデルを作るための「データ」ですが、X線の回折像だけではタンパク質の中の原子の位置を全て特定するには情報が足りないため、タンパク質やアミノ酸残基の原子の種類や共有結合の組み合わせといった「仮定・他の情報」がモデリングの際に使われています。そう言った情報をもとに十分タンパク質らしい構造を持ち、しかも回折データにあう構造をモンテカルロ法などを用いて探索することで構造精密化が行われます。（ちなみに、イメージングというデータのみから構造情報を出しているというニュアンスで使う人が多いようです）

ここでは、実験データをMDと融合させることによりタンパク質の構造や運動に関する情報を得るためのモデリングアプローチについて説明します。最も簡単な例の一つは、構造の異なる結晶構造が複数ある時に、その間をつなぐ構造変化のシミュレーションです。これはMDで使うエネルギー関数に、知られている構造の間を行き来するようなバイアスの力を加えることで（ある意味、無理矢理）構造を変化させながら、その間の運動を推定するという手法です。本当はMDをただ走らせるだけで構造変化が観測できればそれでいいのですが、大きなシステムでは難しい（シミュレーションに何か足りないところがありできない可能性もあります）のでこのようなアプローチがよく使われます。ここで、バイアスをかける方法としても、タンパク質の全体構造を変化させるだけでなく、特定のドメインだけを動かすことや、

特定の残基やリガンドを動かすことも可能なので工夫次第で色々な仮想実験ができます。当然、どの程度のバイアスをかけるかや使う結晶構造に強く影響された結果が出るので注意が必要です。

ここで、すでに確立されているともいえるMDをモデリングに利用することには様々な利点があります。MDによって得られるタンパク質の運動は運動方程式に基づく実際に起こりうる運動です。そのため、MDによってモデリングを行うと実際に起こりうる運動に関する情報も得ることができます。逆に、モンテカルロ法などによる構造精密化のアルゴリズムよりも構造のサンプリングの効率は下がります。逆に、大きな構造変化などは通常の構造精密化のアルゴリズムでは出てきません。また、MD用に開発されてきたパラメータセットは一般的な構造精密化で使われているパラメータよりも洗練されており、精密化をよりよくできるようです。

これをさらに拡張し、様々な実験データをシミュレーションと組み合わせることも可能になります（ハイブリッドモデリングと呼んでいます）[2]。例えば、X線結晶解析の高解像度情報に基づくシミュレーションをクライオ電子顕微鏡から得られた低解像度のマップや、SAXSのデータ、最近ではAFMの画像データと組み合わせることにより構造変化のモデルを構築することが行われています。これらの実験では結晶構造解析よりは構造中間体などの観測がしやすいため、うまく組み合わせることにより、中間体の構造モデルを作ることによって機能発現のメカニズムの理解に役立ちます。また、XFELに関しても単粒子散乱からの回折パターンを使った構造予測が理論的には可能であることを示しています。



本新学術領域において開発・応用が進められているXFEL 時分割結晶構造解析は分子の動きを3次元動画として捉えることを可能にする画期的手法であり、MDと組み合わせることによりタンパク質の反応と運動に関する多くの情報が得られるはずで、その一方、実験のデザインやデータの解析などまだまだ高度化を進める余地がありそうです。様々な共同研究を通して理論解析と実験技術開発の両方のいろいろな面でMDが力を発揮するはずだと考えています。

1. Hollingsworth, S. A. & Dror, R. O. Neuron 99, 1129-1143 (2018).
2. Srivastava, A., Tiwari, S. P., Miyashita, O. & Tama, F. J Mol Biol 432, 2846-2860 (2020).

計算科学の手法について：QM/MM

庄司光男（筑波大・C01）



量子古典混合計算 (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM)) 法は分子量の大きな系、例えば生体分子系、有機分子、錯体分子および半導体表面の電子状態計算に適しており、注目するサイトにおける反応性や物性を精度よく評価することができる。QM/MM法の歴史は1976年のA. WarshelとM. Levittによる研究に始まっており[1]、導入当時からQM/MM法の重要な概念、方法が多く導入されている。1990年代にはM. Karplusらによって様々な生体分子系に適用がなされ、大きく発展がなされた。2013年にはノーベル化学賞がQM/MM法を生み出した3氏、A. Warshel, M. Levitt, M. Karplusに与えられた。受賞理由は多階層連結計算法の開発である。このようにQM/MM法は生体分子に対する有用な計算手法として広く認知され、普及している。ちなみにM. Karplusは1977年にタンパク質(ウシ膵臓トリプシンと阻害剤)の古典分子動力学計算(MD)を初めて実施しており[2]、生体分子に対するMD計算においてもパイオニアである。彼らのグループはMDパッケージCHARMMの開発元になっている。

QM/MM法では、化学反応を起こす空間領域は量子力学法(QM)で取り扱い、その他の領域はMM(古典的)で記述する。それにより、計算量を抑えつつ、系全体を取り扱いながら、化学反応を記述することが出来る(図1[3])。QM/MM計算では、量子力学に基づく(QM)計算に最も時間がかかるため、まずQM計算について解説させていただく。

QM計算では、電子の量子状態を解くことで、精密な分子構造、複雑な電子状態(電荷、スピン)、励起状態、及び化学反応に伴う結合生成乖離を記述する。分子系の電子状態計算に用いられてきた量子化学(QC)計算手法ではガウス型関数を用いて電子軌道(波動関数)を展開する。よってQC計算では基底関数の数 N が増えるに従って計算量が増加する。良く用いられるハイブリッド密度関数法(B3LYP法など)では N の2乗~3乗で計算時間が増加する。市販の計算機(ワークステーション等)で手軽に扱えるサイズは、約1000基底=100原子程度であるが、スパコンなど並列計算機が利用できる場合には、フラグメント分子軌道法(FMO)などを用いるなどで、取り扱い原子数に、ほぼ上限が無くなる。QM計算では相互作用解析などのエネルギー評価だけでなく、構造最適化計算により、局所的な安定構造を探索することができる。QM計算で用いる計算手法は研究対象毎に

適切に選択する必要がある。選択肢としては、半経験的分子軌道(AM1, PM3,...)、密度汎関数強拘束(DFTB)、Hartree-Fock(HF)、post-HF(MP2, CCSD)、密度関数法(DFT)などが挙げられる。QM領域を時間発展させる場合には、QM領域に半経験的分子軌道法やDFTB法を用いる。半経験的分子軌道法とは分子積分計算を行わないで、経験的パラメータを用いることで計算を大幅に高速化する方法である。一方で、非経験的計算手法(第一原理計算手法)をQM領域に適用する場合は、通常、QM領域とMM領域を分けて、別々に自由エネルギーを算出する。MM領域からの自由エネルギー寄与を計算する際には、QM領域の原子は固定しておく。それにより、QM/MM計算ではナノ秒領域程度までの現象をカバーできるようになっている。

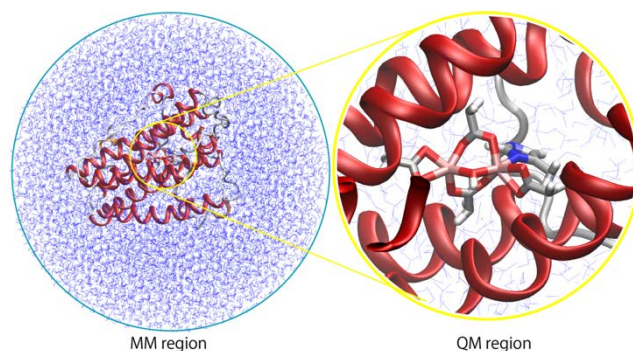


図1. QM/MM全系とQM領域拡大図。最近報告したTrypanosome Alternative OxidaseでのQM/MM計算例([3])。

古典力学に基づく計算では原子間に働く相互作用を分子力場(MM)で記述する。MM計算はQM計算に比較して軽いので、古典力学に従って構成原子を時間発展させること(分子動力学計算(MD)計算)が可能である。数十万原子以上で構成される生体分子において、MD法による取り扱いは非常に成功を納めて来ており、多くの重要な現象(構造安定性、基質結合、動的挙動)を明らかにすることが出来る。MM法に対してはAMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS-AA力場が用いられる。

QM/MM法に対する、その他の注意点としては、QM領域の選択と、QMとMM領域の境界領域の取り扱い方法が挙げられる[4]。QM領域は計算結果が変わらなくなるまで十分広い領域を取る必要がある。境界領域におけるQM系の共有結合切断方法としては、リンク原

子法や境界原子法、局在化軌道法の選択がある。リンク原子を用いる場合は、リンク原子を適用しても問題ない箇所（通常、C—C 単結合）で切断するのが無難である。切断方法も適用する系毎にテストおよび調整する必要がある。QM と MM の相互作用についても様々な取り扱いレベルがあるが、2つに大きく分けると、QM 領域に MM の静電相互作用を考慮しない取り扱い(mechanical embedding (ME) scheme)と静電相互作用を考慮させる取り扱い(electronic embedding (EE) scheme)に分けられる。静電相互作用を考慮する場合でも、MM 電荷は正確に求めている訳ではないし、MM 力場の電荷は実際の電荷分布を反映しているわけではないので、厳密に評価することは出来ないのではあるが、経験的に EE scheme でリーズナブルに計算されることが分かっている。

近年、X 線自由電子レーザー(XFEL)を用いた結晶構造解析法の進展により、酵素タンパク質の構造変化、特に反応サイクルの初期過程を直接観測することが可能になっている。これまで、酵素反応の反応機構は分光法や理論解析によって部分的にしか捉えることが出来なかったが、シリアルフェムト秒結晶構造解析(SFX)により、詳細な3次元構造情報が得られることにより、正確な反応機構を解き明かすことが可能になりつつある。

我々はこれまで、QM/MM 法や QM 法を用いて、X 線構造を頼りに、光反応や化学反応を検討し、その構造変化の予測と反応機構について理論的検討を行って来た(図2)。例えば、光捕集タンパク質であるC-フィコシアニンについては、A01 班の梅名泰史先生との共同研究により、光励起後の初期構造変化について理論研究を進めてきている[5]。銅含有アミン酸化酵素については、A01 公募班の村川武史先生との共同研究により、高分解能構造解析結果について理論的検証を行い、反応に重要なプロトンの状態や構造揺らぎについて、議論を深めてきている[6]。理論研究では水素や電子の違い1つだけでも明確に区別でき、その意味について議論することが可能となっている。サルコシンオキシダーゼについては水素引き抜き反応の反応機構を解明してきたが[7]、A01 班の永野慎吾先生と共同研究を進めている2-オキソグルタル酸依存性ジオキゲナーゼ(2OGD)の反応機構と多くの共通点を持っていることが分かっている。

新学術領域高速分子動画における共同研究では、様々な理論開発(プログラム、アルゴリズム、理論的検証)が必要となっている。よって、理論解析手法も大きな発展がなされると期待される。

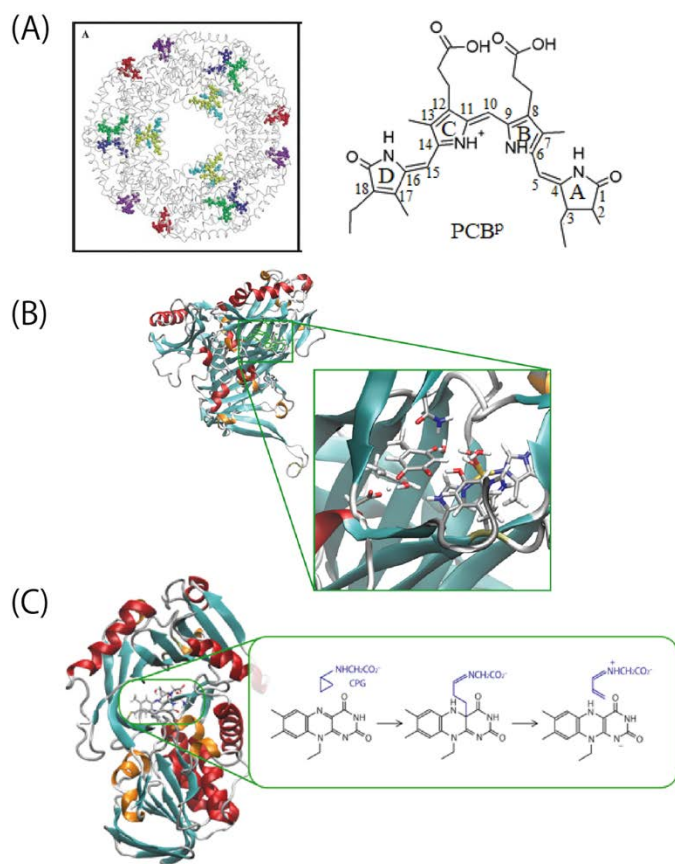


図 2. 新学術領域「高速分子動画」で理論研究を進めている QM および QM/MM 研究例の紹介。(A)光合成の光捕集を担う C-フィコシアニンにおける光吸収特性[5]、(B)銅含有アミン酸化酵素のプロトン化状態と構造変化解析[6]、(C)サルコシンオキシダーゼの反応機構解析[7]。

参考文献

1. A. Warshel, et al., *J. Mol. Bio.*, **103**, 227(1976).
2. J.A. Mccammon, et al., *Nature*, **267**, 585 (1977).
3. S. Yamasaki, et al., *BBA bio*, 2020.
4. H.M. Senn, et al., *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 1198 (2009).
5. K. Mishima, et al., *BCSJ*, **93**, 1509 (2020).
6. M. Shoji, et al., *RSC Adv.*, **10**, 38631 (2020).
7. M. Shoji, et al., *PCCP*, **22**, 16552 (2020).
8. Y. Abe, et al., *PCCP*, **19**, 9811(2017).

ハイライト研究紹介-神経伝達物質受容体のケミカルバイオロジー

清中茂樹 (名大院工・A01 班)



清中班 (ケミカルバイオロジー班) は、タンパク質構造変化の高速分子動画撮像を実現するためのケミカルバイオロジー手法の開発を進めております。本班は、名古屋大学の清中 (私) が代表を務め、岐阜薬科大学の永澤先生、東邦大学の古田先生が分担者として加わっております。永澤先生は受容体の機能制御を専門とし、古田先生はケージド化合物をご専門とされています。分担者の先生においては、研究紹介いただく機会が別途あるかと思しますので、本稿では、私の研究室で現在進めているタンパク質化学ラベルおよびタンパク質機能制御に関する研究をご紹介します。

タンパク質の化学ラベルに関してですが、私の京都大学 浜地研究室在籍時より進めている研究です。これまでに、記憶・学習に重要な神経伝達物質受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) のラベル化・可視化に成功しました (Nat. Chem. Biol. 2016, Nat. Commun. 2017)。このラベル化では、タンパク質に対する反応の選択性を出すために小分子ラベル化剤の反応性を落とす必要があり、結果としてラベル化に 2-4 時間を必要としました。しかし、そのラベル化中にもラベル化された受容体の動態は変化するために、精密な動態解析方法としては問題点を抱えていました。また、AMPA 受容体は頻度高くリサイクリングされることが知られていたため、受容体のエンドサイトーシスを防ぐために、17°C という非生理的な温度 (低温条件下) でラベル化を行う必要がありました。そのような問題点を克服するために、ごく最近、近年ケミカルバイオロジーの分野で進歩が著しい bioorthogonal chemistry と上記のタンパク質ラベルを組み合わせることを考案しました。具体的には、受容体の化学ラベル (1 ステップ目) は生理的な温度条件下で行い、その際には、有用な生体直交反応基として知られる TCO 基を化学修飾します。次の段階 (2 ステップ目) で、TCO と非常に選択的かつ

迅速に反応するテトラジン修飾プローブと反応させます。この 2 ステップラベル化では、1 段階目のタンパク質ラベル化では内在化しても問題とならず、2 段階目の蛍光プローブの標識 (IEDDA 反応) は迅速 (2-3 分) に行えます。実際にこの方法を用いることで、AMPA 受容体の神経細胞内における細胞内動態を精密に解析することに成功しました (Nat. Commun. in press)。この迅速ケミカルラベルは、任意のタイミングでタンパク質の構造変化を惹起する方法としても応用できるので、高速分子動画手法に適用できると考えております。

受容体の化学ラベルの研究と並行して、受容体の機能を人為的に制御する研究も展開しております。私たちは、タンパク質の活性化時に起こる構造変化に着目して、その構造変化を小分子化合物で人為的に制御するという研究手法を考案しました (Nat. Chem. 2016)。それに加えて、化学的なアプローチと遺伝子工学的なアプローチを組み合わせ化学遺伝学的手法により、リガンドの認識能を人為的に制御する研究も展開しております。これらの手法は、小分子に光制御能を付与することで、従来光で制御できなかったタンパク質に対する光制御を可能にすると期待されます。

私は、2019 年 3 月に名古屋大学でラボを構えました。時が経つのは早いもので、もうすぐ 2 年を迎えます。本新学術領域研究も含めて、学際領域の研究は、密な共同研究が重要であると考えています。現在はコロナ禍であるため、対面で綿密に打ち合わせしながらの共同研究が難しい状況ではあります。一方で、オンラインミーティングの機会が増え、移動の時間を必要とせずにディスカッションできるようにもなりました。計画班、公募班を問わず、是非とも気軽に共同研究のご連絡を頂ければと思います。

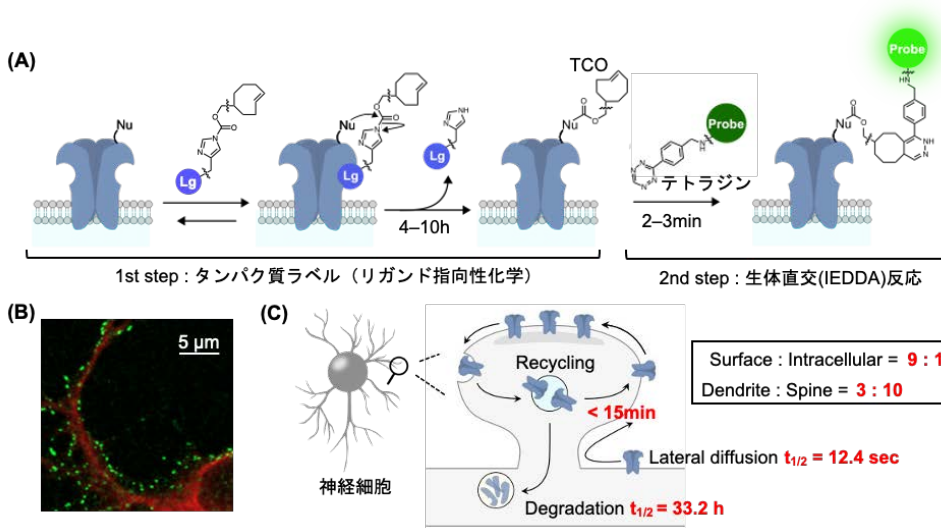


図. 受容体精密動態解析のための AMPA 受容体ラベル化法 (A) 受容体のラベル化スキーム (B) 海馬培養神経細胞におけるラベル化 AMPA 受容体の共焦点顕微鏡観察結果。緑色がラベル化蛍光、赤色は樹状突起を示す。(C) 本ラベル方法を用いて明らかにした AMPA 受容体の動態変化。赤字が私たちの研究で明らかにした数値。

ハイライト研究紹介ー分光で立ち回るラボを目指して 久保 稔 (兵庫県立大学・C01 班)



我々C01 班は、名工大の古谷先生、神戸大の木村先生が分担者、名工大の神取先生、阪大の水野先生、理研の河野先生が協力者、私が代表者として分光研究を進めています。通称、分光班です。

兵庫県立大の久保研は2018年にスタートしたまだ新しい研究室です。ストップフローラマン装置や顕微時間分解分光装置(UV-vis, IR)を開発し、それらをタンパク質のダイナミクス研究に応用しています。装置の顕微化は、分光法自体を発展させるものではありませんが、小ボリュームでの溶液フロー測定や微結晶の測定に有効であり、測定試料の多様化やX線構造解析との連携もたらしてくれています。

久保研の研究対象は、一口に言えばヘムやフラビンなどの補因子を有するタンパク質です。私自身はミトコンドリア呼吸鎖のチトクロム c 酸化酵素をかれこれ12年研究しています。また、ここ数年は(ポスドク時代から縁のある)公募班の當舎先生と一緒に、嫌気呼吸酵素(ヘムを3つ有する膜内在性のNO還元酵素)を研究しています。最近、時間分解 UV-vis の反応速度論データを第一報としてまとめた所です。

また公募班の山元先生とクリプトクロムの研究を新しく始めました(ちなみに山元先生はポスドク時代のラボの後輩で、やはりご縁が動いたものです)。クリプトクロムの中でも、私はクラミドモナス由来の動物型クリプトクロム(CraCRY)に興味を持っています。CraCRYはちょっと変わったタンパク質で、二つの機能を持っています。一つは概日時計や生殖サイクルの遺伝子発現を制御する光センサーとしての機能です。もう一つは、太陽紫外線によって損傷したDNAの光修復機能です。CraCRYは、DNAフォトリアーゼとクリプトクロムが共通祖先から分子進化・機能分化していく中で、両方の機能を獲得した産物と言えます。この“バイファンクショナル”なタンパク質のダイナミクス、知りたいと思いませんか？

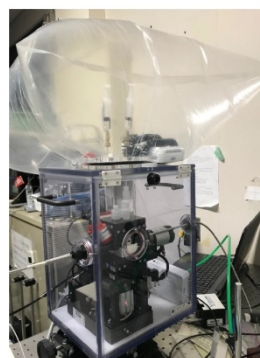
さて、好きに書いてよいとのことですので、ここからは少し分光について書きたいと思います。私が専門にし

ている振動分光学は、日本では1930年代から発展し、今では「分子科学」という主に物理化学の集まりの中で大きな位置を占めています。私は、岡崎の分子科学研究所(分子研)で振動分光学を叩き込まれました。その後2012年にさきがけ「構造生命」に時間分解振動分光(と時間分解XFEL構造解析との相関解析)をすることで採択してもらったのですが、このことが研究人生において一つの転機であったと思っています(岩田先生とはそこで初めてお会いしました)。さきがけの採択時、研究総括の若槻壮市先生から次のように言われたことを思い出します。「久保さん、これからは構造生物学に打って出てきて下さい！」勿論、若手の私にとって大変気合いの入るお言葉だったのですが、少し経ってから自問自答が始まりました。。。「あれ？これまでも分光を使って構造生物学をやってきたつもりなんだけどもなあ？」こうも思いました。「個々のタンパク質の研究では構造と分光は活発に共同研究しているけれど、構造生物学と分子科学は若干“隣の畑”のような感覚はないだろうか？」当時そのように思って活動学会を変えてしまった私ですが、このたび「高速分子動画」という構造生物ど真ん中の領域に分光班を入れていただけて大変感謝しています。

分子研時代のボスの北川禎三先生は「分光はシャープに使いなさい」とよく言っておられました。また理研の田原太平先生はSACLAにいらした時に「分光は、AかBか分からない、どちらかの仮説に決着を付けたい時に使うのがよい使い方だね」と言っておられました。同感で心に残っています。X線結晶解析やクライオ電顕といった構造解析ツールは、どんな試料に対しても「構造」という明確なデータを与えてくれます。でも分光は違います。ただスペクトルを測っても、そこに明確な意義を見出せなければ、それはただの一次元のトレースでしかありません。という訳で、皆さまと連携する中で、分光をうまく使える(分光の妙が感じられる?)問題にアプローチできたら嬉しい限りです。どうぞ宜しくお願いいたします。



久保研究室
兵庫県立大学 播磨理学キャンパスにて



ストップフローラマン試料部



ラピッドスキャン顕微FTIR

研究会報告

第一回 Serial crystallography 技術開発研究会

2020年9月29日10時-12時に、オンラインで講演を行った。

1. 南後恵理子 (東北大)

「SACLAにおける時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析」

2. 長谷川和也 (JASRI)

「SPRING-8を用いた固定ターゲットシリアル法による回折データ測定」

1では、SFXの実験基礎からSACLAによる最新の時分割手法、特に、サンプルの作成、測定の進め方などを詳しく紹介した。2ではSPRING-8を活用したSFXの手法として、微結晶ループに結晶を複数マウントし、極低温もしくは室温で測定を行う手法(SS-ROXもしくはHAG-SS-ROX)の紹介を行った。講演終了後に実際に実験を行うための注意点と測定手法に関する個別の質疑応答を行った。今回、36名の参加者であった。また、後日視聴希望も複数寄せられたため、録画し公開した。

令和二年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム

開催日：2020年10月19日-20日

会場：淡路夢舞台国際会議場+Online

2020年10月19-20日に淡路夢舞台国際会議場でシンポジウムを開催しました。新型コロナウイルスCOVID-19対策として、初めて会場とオンラインのハイブリッド開催となりました。計算科学、ケミカルバイオロジー、分光学、構造生物学等の分野から現地57名、オンライン55名(2日目は現地参加53名、オンライン参加45名)の方にご参加いただきました。シンポジウムは、オンライン発表に加えオンライン参加者からも積極的な質問が多く充実した内容となりました。ポスターセッションは会場参加者のみ・距離を保った状態での実施となりましたが、終始活発な議論が行われ、コロナ禍における貴重な対面での議論の場となりました。

プログラム

シンポジウム①

- ・チャンネルロドプシンの光活性化機構 (Online)
- 濡木 理 東京大
- ・フェムト秒 X 線溶液散乱から見た分子振動と化学結合の形成
- 足立 伸一 KEK 物構研

シンポジウム②

- ・TRPチャンネルの熱刺激応答機構を解明したい
- 日野 智也 鳥取大
- ・時間分解共鳴ラマン分光法で観るイオンポンプロドプシンの高速ダイナミクス (Online)
- 水野 操 大阪大
- ・室温での結晶回折実験～開発と利用 (Online)
- 熊坂 崇 高輝度光科学研究センター

シンポジウム③

- ・高感度動的結晶構造解析のための超低バックグラウンド試料セル
- 鈴木 明大 北海道大
- ・QM/MMで見えてきた酵素反応の特徴
- 庄司 光男 筑波大

新学術領域「高速分子動画」領域会議(Closed)

- ・高速分子動画測定のための技術開発
- 南後 恵理子 東北大
- ・細胞膜受容体の高速分子動画に向けたケミカルバイオロジー的アプローチ
- 清中 茂樹 名古屋大



2020年9月以降の領域活動

2020年12月4日(金)	第43回日本分子生物学会年会・ワークショップ共催（オンライン）
2020年12月3日(木)	第12回総括班会議（Web）
2020年10月19日(月)～20日(火)	令和二年度「高速分子動画」シンポジウム（淡路夢舞台国際会議場, オンライン同時開催）
2020年10月19日(月)	第11回総括班会議（淡路夢舞台国際会議場）
2020年9月29日(火)	第一回 Serial crystallography 技術開発研究会（講演者：南後 恵理子先生・東北大, 長谷川 和也先生・JASRI）
2020年9月16日(水)	第58回日本生物物理学会年会・シンポジウム共催（オンライン）
2020年9月14日(月)	第93回日本生化学会大会・シンポジウム共催（オンライン）

総括班よりお知らせ

学術調査官

- 田中 良和
東北大学・大学院生命科学研究科・教授（2020年8月1日付）
- 東 雅大
京都大学・大学院工学研究科・准教授

総括班評価者

- 上田 実 東北大学大学院生命科学研究科・教授
- 中川 敦史 大阪大学蛋白質研究所・教授
- 中村 春木 大阪大学蛋白質研究所・名誉教授
- 松田 道行 京都大学大学院医学研究科・教授

総括班の役割分担

	担当者	項目
班長	岩田	研究全体方針、企画調整、共同研究調整
庶務・会計	岩田/南後	会議開催、書類とりまとめ、会計
広報	岩田/宮下	HP作成、ニュースレター企画、facebook 企画
ワークショップ	清中/永野	ワークショップ企画、学会共催企画（国内）
渉外	久保/朴	海外派遣企画、海外招聘企画、国際会議企画（国外）
アウトリーチ	山本/足立	SPring-8・KEK 併設企画、学会での展示企画