

Newsletter No.6
September 2021

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
「高速分子動画」技術解説	3
イベント情報	6
これまでの領域活動	6
ハイライト研究紹介	7
公募研究募集情報	9
総括班よりお知らせ	10

中間報告書の作成に協力していただきどうもありがとうございました。コロナの影響で実験の進捗が遅れがちで、どうなることかと思いましたが、特に策を弄さずとも良い内容の報告書ができたと思っています。最大の成果は、多くの共同研究が領域内で生まれたことに尽きると思います。コロナがないときの新学術では、多くの班員の方は年二回の領域会議に来るだけ、という状況に陥りやすかったのです。ところが、対面開催ができないことにより、オンラインセミナー等を頻繁に開いた結果、逆に共同研究が進む結果となりました。また総括班会議も月一回ずつ開かれているので、総括班メンバーのまともにもとても良いと感じています。

9月には2度目の公募を開始して来年度より新しい班員を迎えることとなりますが、引き続き共同研究を推進してくださる方を採用していきたいと考えています（僕が決められるわけではないのですが、審査委員の方に方針についてお伝えすることができます）。また総括班評価者からの指摘があったのですが、女性の班員が少ないこともあり積極的に採用していこうと考えています。ぜひ素晴らしい候補の方をご存知でしたら、積極的にお誘いくださるようお願いいたします。高速分子動画についても、是非、“ブロックバスター”を撮りたいと思っていますし、制御可能なタンパク質、タンパク質制御可能な化合物などの成果物を創製してくれるようなメンバーを加えていきたいと考えています。

最後になりますが、高エネルギー研究機構の足立君が特別推進研究を獲得して、研究代表を辞退することになりました。これは（辞退はもちろん残念ですが）素晴らしいことで領域の面目躍如です。多くの人も後に続いてくれればよいと思っています。足立君は研究協力者として領域に残ってくれますので、是非とも多くの方が彼と協力して研究を進めて行ってくださればと思います。



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/>

「高速分子動画」技術解説！

時間分解 X 線溶液散乱法

足立 伸一（高エネルギー加速器研究機構・BO1 班）



はじめに

本新学術領域の研究テーマは「高速分子動画法によるタンパク質の非平衡状態の構造解析」ですが、本稿では、実験手法と研究対象をもう少し広く捉えてみます。「タンパク質の非平衡状態」に関連するテーマとして、生命科学に関連の深い有機分子、金属錯体などを対象とした「非平衡状態の構造解析」についても、本領域における広義の研究テーマと考えます。特に、化学や生物学における多くの反応は溶液中で起こるため、溶液中での分子構造変化には大きな興味を持たれるところです。ここでは、我々が放射光 X 線施設と X 線自由電子レーザー施設で行っている時間分解 X 線溶液散乱法の原理と方法について、ごく簡単にご紹介します。

X 線散乱の一般的な表式

まず、X 線散乱の一般的な取扱いから始めます[1,2]。いま、図 1 のように散乱体に X 線が入射する case を考えます。

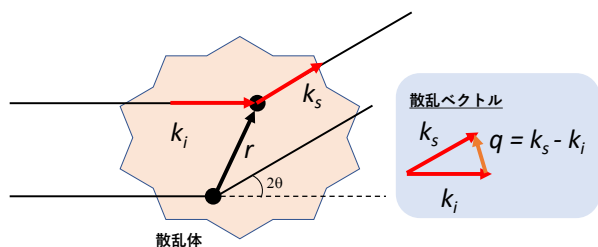


図 1 X 線散乱の模式図

入射 X 線から角度 2θ のところで観察すると、散乱体中のあらゆる場所で散乱された X 線の重ね合わせを観察することになります。 r だけ離れた 2 点を通る X 線の間には光路差があり、その位相差は $r \cdot q$ で与えられ、 q は散乱ベクトルと呼ばれる量で、入射 X 線と散乱 X 線の波数ベクトル k_i 、 k_s の差で定義されます。したがって、電子密度分布 $\rho(r)$ の試料からの散乱 X 線の振幅 $F(q)$ は、位相差を考慮に入れて各散乱波を加え合わせて、以下の式で与えられます。

$$F(q) = \int_V \rho(r) \exp(-iq \cdot r) dr \quad (1)$$

この式の意味するところは、X 線の散乱振幅 F は、電子密度分布 ρ のフーリエ変換であるということなので、あらゆる散乱ベクトルの方向について、散乱波の位相差 $r \cdot q$ が求められれば、式(1)の逆フーリエ変換によ

り、めでたく電子密度分布 ρ が求められることとなります。ただし、この位相差は実験的に測定することができないので、実験で失われた位相情報を何らかの方法で回復する必要があります。結晶構造解析であれば、直接法や異常散乱などを用いた位相決定法で、またコヒーレント X 線散乱実験であれば、オーバーサンプリングによる位相回復法[3]で、実験で失われた位相情報を計算で回復することにより、最終的に実空間の電子密度分布が得られることとなります。これが X 線構造解析における位相問題です。

X 線溶液散乱の場合

上記の結晶構造解析やコヒーレント X 線散乱実験であれば、位相問題を解決する術がありますが、これらはある意味特殊な case であり、試料に空間的な規則性がある（＝結晶）とか、X 線が照射される試料の全域にわたって X 線の空間干渉性が保証される（＝コヒーレント X 線）といった条件が成立しなければなりません。もし扱う試料や X 線がそのような条件を満たさなければ、位相問題を解くことは潔く諦めて、位相は失われたものとして前に進むしかありません。試料中に多数の分子がランダムに分布していて、空間的な規則性を持たないような試料の場合（溶液試料など）は、まさにそのような case になります。（コヒーレント X 線を用いた溶液散乱実験については、最後に少しコメントします。）具体的には、X 線の散乱振幅 F ではなく、 $|F|^2$ として実測される散乱強度 I を、以後の解析対象とします。散乱強度 $I(q)$ は、以下の式で与えられます。

$$\begin{aligned} I(q) &= |F(q)|^2 = F(q) \cdot F^*(q) \\ &= \iint_V \rho(r) \exp(-iq \cdot r) \rho^*(r') \exp(iq \cdot r') dr dr' \\ &= \iint_V \rho(r) \rho(r' - r) dr \exp(-iq \cdot r') dr' \\ &= \int_V g(r') \exp(-iq \cdot r') dr' \end{aligned} \quad (2)$$

ただし、 $g(r)$ は以下で定義される自己相関関数です。この式は、結晶学ではパターンソン関数と呼ばれます。

$$g(r) = \int_V \rho(r') \rho(r - r') dr'$$

(3)

式(1)とのアナロジーで、式(2)の X 線の散乱強度 I は、自己相関関数 g のフーリエ変換になります。ただし、式(1)と(2)の大きな違いは、式(1)の F が複素数であるのに対して、式(2)の I は実数なので、位相差はゼロとして、 I のフーリエ変換から自己相関関数 g を簡単に計算することができることです。 $I(q)$ もしくは $g(r)$ を元にして構造情報にアプローチするというのが、X 線溶液散乱での大まかな解析の流れになります。

時間分解 X 線溶液散乱 (測定と解析方法)

図 2 に、時間分解 X 線溶液散乱の実験セットアップの模式図を示します[4]。試料の溶液を送液ポンプで循環させ、噴出し口 (ジェットノズル) 付近で試料が安定な層流として噴出している部分を狙って、励起レーザー光と X 線パルスを入射します。試料からの X 線散乱信号を試料後方の X 線 CCD 検出器で計測し、その後の解析に使用します。ただし、時間分解 X 線溶液散乱の計測では、散乱イメージそのものではなく、レーザー励起前と励起後の 2 つのイメージの差分を測定し、その差分イメージをその後の解析に使用します。こうすることによって、光反応に関与しない溶媒からの散乱によるバックグラウンド信号を除去し、光励起によって変化した散乱信号のみを抽出します。図 2 では、レーザーパルスから時間 t 後に X 線パルスが入射した場合と、レーザーパルスの 3 ナノ秒前に X 線パルスが入射した場合 (レーザー励起前) の 2 枚の X 線散乱イメージを使って、X 線散乱イメージの差分を取る例を示しています。

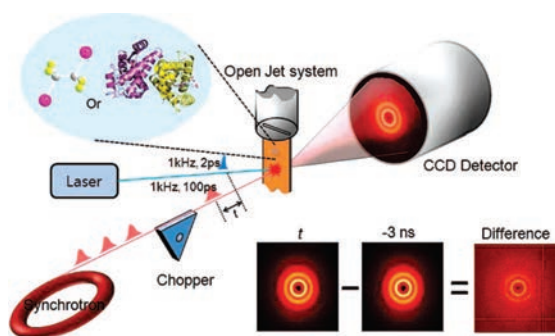


図 2 時間分解 X 線溶液散乱実験の模式図 [4]

この差分イメージを動径方向に積分して一次元の散乱強度データに変換し、差分 X 線散乱強度の実測値という意味で、 $\Delta I(q, t)_{\text{exp}}$ と表します。一方で、理論計算により導出した差分 X 線散乱強度を、 $\Delta I(q, t)_{\text{theory}}$ と表記します。これらの実測値と理論値について、全ての遅延時間の散乱データに関するグローバルフィッティングを行うことにより、パラメータを最適化します。

理論値の差分 X 線散乱強度は、式(4)に示すように、溶質分子の構造変化に起因する項 (solute-only)、溶質分子と溶媒分子の相互作用部分の構造変化 (溶媒和構造の変化) に起因する項 (solute-solvent)、そして溶媒分子の構造変化 (主に温度上昇と密度変化) に起因する項 (solvent-only) の 3 つに分けて、それぞれ評価します。

$$\begin{aligned} \Delta I(q, t)_{\text{theory}} &= \Delta I(q, t)_{\text{solute-only}} + \Delta I(q, t)_{\text{solute-solvent}} \\ &\quad + \Delta I(q, t)_{\text{solvent-only}} \\ &= \left[\sum_k c_k(t) I_k(q) - I_g(q) c_g(0) \right] + \left(\frac{\partial I}{\partial T} \right)_\rho \Delta T(t) \\ &\quad + \left(\frac{\partial I}{\partial \rho} \right)_T \Delta \rho(t) \end{aligned} \quad (4)$$

ここで、添字 k は溶質分子が取り得る分子種 (反応物、中間体、生成物) を表し、 $c_k(t)$ は時間 t の関数としての各分子種の割合、 $I_k(q)$ は分子種 k に関連する溶質成分と溶媒和成分からの散乱強度、 $I_g(q)$ は反応物の散乱強度 ($g =$ 反応物) です。また、 $(\partial I(q)/\partial T)_\rho$ は密度一定の条件での温度上昇に対する溶媒の散乱強度変化、 $(\partial I(q)/\partial \rho)_T$ は温度一定の条件での密度変化に対する溶媒の散乱強度変化、 $\Delta T(t)$ および $\Delta \rho(t)$ は時間の関数としての溶媒の温度および密度変化です。この式から、 $\Delta I(q, t)_{\text{theory}}$ を計算するには、 $I_k(q)$ 、 $(\partial I(q)/\partial T)_\rho$ 、 $(\partial I(q)/\partial \rho)_T$ などの時間に依存しない成分と、 $c_k(t)$ 、 $\Delta T(t)$ 、 $\Delta \rho(t)$ などの時間に依存する成分が必要であることがわかります。これらの成分について、例えば $I_k(q)$ は、溶質分子および溶媒和領域の MD シミュレーションと量子化学計算を組み合わせることで算出します。

一方、時間に依存する項は、グローバルフィッティング解析のパラメータに依存します。例えば $c_k(t)$ は、妥当な反応経路を含む反応速度式を設定し、この反応速度式を積分することで求めます。個々の成分の計算方法の詳細についてご興味のある方は、参考文献をご覧ください[4-6]。

解析例

具体的な解析例として、ジシアノ金錯体三量体の光反応の例を紹介します[5-8]。ジシアノ金錯体 $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ は、水溶液中で aurophilic interaction と呼ばれる金原子間の弱い相互作用により、錯体濃度に依存して基底状態でオリゴマーの構造を形成します。三量体が形成する実験条件で紫外光で励起すると、電子が金-金間の結合性軌道に励起され、金原子間に強固な共有結合が生成します。従って、このジシアノ金錯体の系は、

拡散に律速されることなく、紫外光をトリガーとして化学結合が生成する過程を観測することができるという興味深い実験系です。

図3(a)は、X線散乱の差分イメージを動径方向に積分して一次元の散乱強度データに変換した $\Delta I(q,t)_{\text{exp}}$ を遅延時間順に並べて表示しています。(散乱強度 I を、ここでは S と表記しています。) 遅延時間 100 ピコ秒未満のデータは X線自由電子レーザー(SACLA)で、100 ピコ秒以上のデータは放射光施設(KEK PF-AR)でそれぞれ測定したものです。200 フェムト秒から300 ナノ秒という幅広い時間範囲で差分 X線散乱強度が徐々に変化している様子が見て取れるかと思えます。図3(b)はこのデータをフーリエ変換し、実空間の動径分布関数に変換したものです。こちらも時間を追うごとに、ピークの位置と強度が変化しており、この変化は金原子間の結合距離が異なる中間体が生成・消滅していることを示しています。その時系列に沿った分子種の時間変化を解析するために、特異値分解(singular value decomposition, SVD)を用います。こちらも解析方法の詳細については述べませんので、参考文献をご参照ください[5,6]。SVD解析の結果、時間に依存する成分として各分子種の濃度の時間変化 $c_k(t)$ が(図3(c))、時間に依存しない成分として分子種 k の溶質成分の散乱強度 $I_k(q)$ がそれぞれ算出され、 $I_k(q)$

から各中間体の分子構造に対応する動径分布関数(図3(d))が求められます。このような一連の解析により、溶液中で進行する高速な光反応に伴う分子種の構造を決定することが可能となります。

最後に、コヒーレント X線を用いた溶液散乱実験について少しコメントします。X線自由電子レーザーによる X線溶液散乱実験では、空間的に干渉性のある X線を用いているので、コヒーレント長の領域内であれば、原理的にはオーバーサンプリングによる位相回復法が適用できるはずですが、ただしその適用の可否は、構造解析の対象となる分子の個数やサイズに依存します。今回ご紹介した溶液散乱実験のように、溶液中にモルオーダー (10^{23}) の分子がランダムに配向しているような実験系では、個々の分子からのコヒーレント散乱は空間的に平均化され、結果的にコヒーレント X線を用いない通常の X線溶液散乱と同じ情報しか得られないこととなります。もちろん、溶液中に存在する少数の物体に対してコヒーレント X線散乱を適用する場合には、ここで示した空間平均された溶液散乱とは異なる情報が得られます[9,10]。このような計測・解析手法を一般的な溶液化学反応の構造解析法として利用するためには、溶液中にまばらに存在する溶質分子からの微弱な散乱信号を、溶媒分子からの巨大なバックグラウンドの散乱信号から抽出する必要があるでし

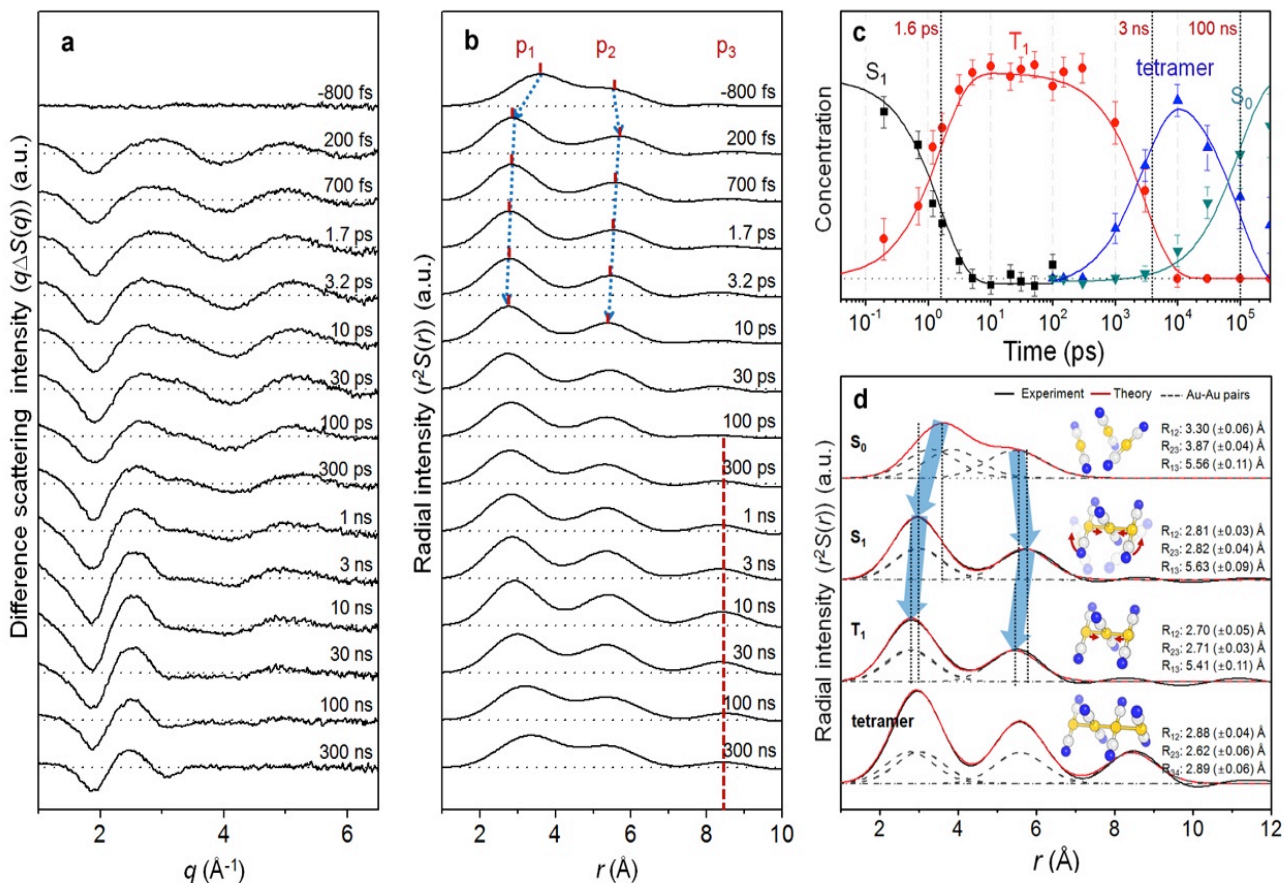


図3 時間分解 X線溶液散乱計測データの解析例 (ジシアノ金錯体三量体の光反応) [5,6]



よう。技術的には非常に困難な課題ですが、今後可能となることを期待したいと思います。

【参考文献】

1. Guinier, "X-ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals, and Amorphous Bodies", Dover Publications, New York (1994).
2. Guinier and G. Fournet, "Small Angle Scattering of X-rays", Wiley, New York (1955).
3. J. Miao *et al.*, Nature, 400, 342–344 (1999).
4. H. Ihee, Acc. Chem. Res., 42, 356–366 (2009).
5. K. H. Kim *et al.*, Nature, 518, 385–389 (2015).
6. S. Adachi and H. Ihee, "X-ray Free Electron Lasers, Applications in Materials, Chemistry and Biology", Chap.13, 264-283, Royal Society of Chemistry, UK (2017).
7. J. G. Kim *et al.*, Nature, 582, 520–524 (2020).
8. J. G. Kim *et al.*, Acc. Chem. Res., 54, 1685–1698 (2021).
9. R. Iida *et al.*, Langmuir 31, 4054-4062 (2015).
10. J. Wei *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 138, 3274-3277 (2016).

イベント情報

- | | |
|-----------------------|------------------------------------|
| 2021年9月7日(火) | 公募説明会(オンライン開催) |
| 2021年11月1日(月)～2日(火) | 「高速分子動画」領域会議(淡路・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(オンライン開催) |
| 2021年11月25日(木)～27日(土) | 第59回日本生物物理学会年会(オンライン開催) |

2021年5月以降の領域活動

- | | |
|----------------------|--|
| 2021年5月17日(月)～18日(火) | 「高速分子動画」領域会議(オンライン開催) |
| 2021年5月27日(火) | 第17回総括班会議(Web) |
| 2021年5月 | ニュースレターNo.5発行 |
| 2021年6月1日(火) | 第9回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー
(講演者: TAMA Florence 先生・名古屋大/理研, 田中 伊知朗先生・茨城大) |
| 2021年6月4日(金)～5日(土) | 第47回生体分子科学討論会・共催(オンライン) |
| 2021年6月14日(月)～16日(水) | 第77回顕微鏡学会講演会・シンポジウム共催(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・ワークショップ共催(オンライン) |
| 2021年6月22日(火) | 第10回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー
(講演者: 重田 育照先生・筑波大, 梅名 泰史先生・名古屋大) |
| 2021年7月7日(水) | 第18回総括班会議(Web) |
| 2021年7月13日(火) | 第11回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー
(講演者: 平田 邦生先生・理研, 近藤 美欧先生・大阪大) |
| 2021年8月3日(火) | 第12回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー
(講演者: 庄司 光男先生・筑波大, Maity Basudev 先生・東京工業大) |

ハイライト研究紹介 シミュレーションと実験データの融合による構造モデリング 宮下治 (理研・C01 班)



計算班は宮下と筑波大学の庄司光男先生、東京大学の篠田恵子先生が分担者として参加されており、高速分子動画の実験データを活用しながら計算機シミュレーションにより分子の動的構造や反応機構の理解を進めるための研究を行っています。本稿では宮下が所属するタマ研究室（名古屋大・理研）のメンバーと行っている実験データと計算機シミュレーションを融合利用するハイブリッドモデリングアプローチの最近の研究についてご紹介させていただきます。

タンパク質などの構造を調べる実験手法には様々なものがあります。生体高分子の原子レベルでの構造情報を与える X 線結晶構造解析は欠かせない手法です。XFEL による時分割実験で運動に関する情報を得ることも可能になってきています。クライオ電子顕微鏡観測は結晶の必要がない点などからそれを補完する強みがありますが、通常得られる解像度は X 線結晶解析に比べればまだ低いです。高速分子間力顕微鏡(HS-AFM)も近年盛んに利用されている手法です。これは溶液中の生体高分子が動く様子をリアルタイムに観測できる画期的な手法ですが、その一方で、解像度が数ナノメートル程度と低いことや、探針が当たる分子の表面に関する情報しか得ることができないという点が現時点での弱みです。

このような実験手法の強みと弱みを補完し合うために、複数の実験手法を活用することが当たり前になりつつあります。しかし、個々のデータからより詳細な情報を得るためには計算機シミュレーションも組み合わせることが必要だと考え、いろいろな実験データからの構造モデリングを行う手法の開発を行っています。複雑なタンパク質の構造や運動を手動で予測することには限界があり、分子動力学シミュレーションを活用することにより、物理化学エネルギー的にも安定な構造と運動を客観的に導き出すことができます。

このようなモデリングの手法をハイブリッドモデリングと呼んで様々な実験データに応用してきました。初期に行ってきたのはクライオ電子顕微鏡の低解像度の実験データから、原子モデルを構築する手法の開発です。この手法では X 線結晶構造解析などから得られる高解像度の構造モデルから分子動力学シミュレーションを行い、クライオ電子顕微鏡で観測されている構造のモデルを導き出します(J Comp Chem 2017)。新学術領域ではこの手法を応用して XFEL による時分割 SFX のデータから構造変化のモデルを構築するための手法を開発しており、電子密度差マップを用いた分子動力学モデリングの手法を

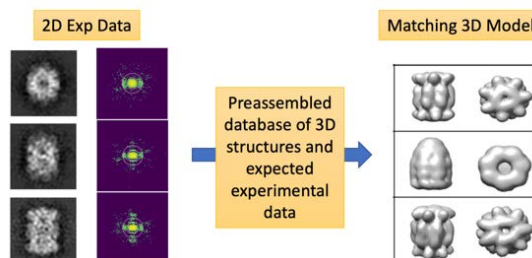
開発しています。

また、昨今取り組んできたのが HS-AFM の二次元画像データから 3 次元構造の運動を推定する手法の開発です。AFM のデータは解像度が低いため、原子レベルでの運動を記述することは精度的に難しいと考え、タンパク質のドメインの運動などの予測を第一目標として、Gaussian Mixture Model と呼ばれる粗視化モデルを用います (図)。そして、個々の楕円体をシミュレーションにより動かしながら AFM の実験画像に合う配置を探索してもっともらしい構造モデルを導き出します。これを ClpB タンパク質の構造変化のデータに応用した結果を発表した所です (Frontiers Mol Bio 2021)。この手法は他の二次元データにも応用が可能であり、XFEL の coherent diffraction imaging (CDI) のデータをターゲットとしたモデリングの手法の開発にも取り組んでいます。



他に新しく進めているアプローチが構造データベースの活用です。生体高分子の構造決定が進み大規模なデータベースが構築されています。そこで多量の実験データが必要になる複雑な 3 次元構造再構築の手順を踏むことなしに、少数の画像データから推定される立体構造をデータベースの中から探索し提案するアルゴリズムを開発しました (下図)。まだシミュレーションのデータによるアルゴリズム実証の段階ですが電子顕微鏡画像のデータや XFEL-CDI のデータから構造推定が可能なることを示しました(J Chem Info Model 2021)。

本稿では最近の結果をご紹介させていただきました。モデリングの手法の開発だけでなく実際の実験データへの応用も当然ですが行っていきたいと考えておりますので領域内の実験グループのみなさまには気軽にお声をかけていただき、いろいろな共同研究につなげていくことができるとありがたいです。



ハイライト研究紹介—SACLA での時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析から明らかになったチャンネルロドプシンの構造変化— 草木 迫 司 (東京大学・A01 班)



A01 岩田班の分担者として、山下恵太郎博士（現所属：英国 MRC 研究所）に代わり、2020 年 6 月より本新学術領域に参加しています。

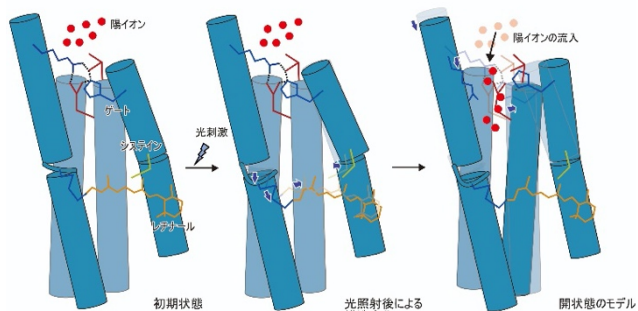
私が所属する濡木研究室では、タンパク質による物質の認識・刺激の受容とそれに伴う構造変化という生命現象の素過程を原子分解能で明らかにすることを目的として、立体構造解析をベースに、機能解析や計算機シミュレーションを組み合わせた研究を進めています。主な研究対象は膜タンパク質（チャンネル・ポンプ・トランスポーター・受容体）と非翻訳 RNA 関連タンパク質で、研究メンバー一人ひとりが 1 つ以上の研究テーマに取り組んでいます。構造決定の手法としては X 線結晶構造解析や XFEL を用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析（SFX 解析）に加えて、最近ではクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を用いることも多くなってきています。今回は今年 3 月に出版した SACLA でのチャンネルロドプシン（ChR）の時分割 SFX 解析（TR-SFX）についてご紹介いたします（Oda *et al.*, *eLife*, 2021, <https://doi.org/10.7554/eLife.62389>; プレスリリース：<https://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2021/7284/>）。

光遺伝学のツールとして広く用いられている ChR は、光を受容すると発色団であるレチナールが異性化し、様々な中間体を経てイオンを透過します。SPring-8 の BL32XU ビームラインのマイクロビームを用いた X 線結晶構造解析によって、濡木研が世界に先駆けて明らかにした ChR の結晶構造は、イオン透過経路が閉じた状態でした（Kato *et al.*, *Nature*, 2012）。ChR がどのような構造変化により開状態へと遷移するのか解明することが次の課題となったちょうどその頃に SACLA が立ち上がり、小田和正博士（今年 3 月に博士課程修了）と西澤知宏博士（現横浜市立大学教授）を中心に、ChR の TR-SFX プロジェクトは始まりました。SFX 実験では、数 μm の微結晶を連続的に流して回折像を収集することから大量の試料を必要とし、また結晶試料を吐出するノズルの径に合わせて、それまでの X 線結晶構造解析で得ら

れていた結晶よりも更に小さなサイズの結晶が高密度で得られる新たな結晶化条件を検討する必要がありました。さらに、測定は数時間おきに人の手で試料交換が必要であり、かつ 36 時間程ノンストップで行うというものでした。このように、ChR の昆虫細胞での大量発現・大量精製・結晶化条件の検討・測定に向けた大量の結晶化・回折測定といった実験の各過程で多くの人手が必要になり、濡木研のメンバーが多数参加する一大プロジェクトとなりました。余談ですが、結晶試料を安定した一定の流速で流すために、測定直前には結晶試料にキュービック相の脂質とパラフィンを混ぜる工夫があったのですが、この作業は暗室で行う必要があったために参加した多くの人の心に深く刻まれる経験となりました。

励起光と同期させた XFEL による TR-SFX 解析から、ChR が光によって開状態に遷移する構造変化の一端が明らかになりました。光が照射した ChR の内部では、異性化したレチナールにねじれるような動きが生じ、これによって膜貫通ヘリックス（TM）のうち、レチナール近傍のシステイン残基を有する TM3 が外側へと押し出されるような動きと、レチナールが結合した TM7 の構造変化が起こることが分かりました（図）。今回明らかになった ChR の構造変化は、光照射後 1 μs から 4 ms にかけての 5 つのタイムポイントを捉えたもので、イオンの流入が始まる前の状態ですが、この構造変化が波及して TM3 と TM7 の残基の相互作用で形成されるゲートが開くことでイオン流入を引き起こされると考えられました。本研究は、濡木研のメンバーをはじめ、本新学術領域の方々や国内外の研究グループを含めて、多くの人の力を結集してまとめることができました。ここに感謝いたします。

現在はコロナ下で、私自身はまだ直接お会いできていない方も多いのですが、本新学術領域の皆さまと今後連携しながら、多彩なアプローチで生命現象を動的に原子分解能レベルで理解していけたらと思います。



図：観測された ChR の構造変化と、開状態への遷移モデル



濡木研究室のメンバー

公募研究募集 Call for “Publicly Offered Research” proposals

公募説明会を2021年9月7日に行います。募集の概要は下記に記載、その他の情報は

<https://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp/recruit/> をご覧ください。

研究概要

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

本領域では、X線自由電子レーザー (XFEL) を用いて、タンパク質の中で起こる非常に早い化学反応などを他の手法では全く考えられない時間分解能と空間分解能を併せ持った分子動画として観察する手法の開発を推進する。本法を多種多様なタンパク質に適用できる汎用的技術として確立するために、有機化学、計算科学、生物物理学などの分野と融合して開発を進め、光によるタンパク質のスイッチ機構や各種受容体の情報伝達機構、酵素が触媒する反応機構などの解明を目指す。また、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展開する。

本公募では、高速分子動画法の基盤技術（量子ビーム科学・ケミカルバイオロジー・蛋白質工学など）を推進する研究者、高速分子動画法と相補的な分野（生物物理学・分析化学・物理化学など）による融合研究を推進する研究者の参画を希望する。高速分子動画法は当初、光で反応開始できるタンパク質を中心に研究が行われてきたが、現在では二液混合や温度ジャンプなどにより反応開始ができるようになった。このような新しい同期法を使った分子動画撮影の提案を歓迎する。また実験的手法では観測困難な課題解決のために計算科学分野からの応募も期待している。

高速分子動画により詳細な解明が期待される生体試料や金属触媒など低分子化合物を有する研究者の参画も期待する（生化学、分子生物学、構造生物学、合成化学などの分野）。XFELを利用した研究は、物理系、化学系、生物系の分野による非常に新しい学際的研究であり、日進月歩の測定技術である。現時点で研究対象に適用可能であるかどうかに関わらず、様々な分野からの応募を望む。更に、イメージングや光遺伝学、光薬理学で期待される分子ツールを開発するなどの分子制御法への応用やその実用化に対する提案も期待する。

Research Topics

Non-equilibrium-state molecular movies and their applications

In order to understand the functions of biological macromolecules essential for life, it is most effective to capture their chemical reactions and structural changes in real time. X-ray free electron laser (XFEL) is a unique tool to observe these reactions and changes with outstanding time and spatial resolutions. Promote and develop this method as a versatile technology applicable to a wide range of biological macromolecules, we will integrate a various methodologies including organic chemistry, computational science and biophysics to understand basic questions such as switching and signaling mechanisms of proteins and reaction mechanisms of enzymes. Based on these results, we will also develop controlling methods of biological macromolecules using light and other stimulations.

In this call for “Publicly Offered Research” proposals, we encourage applications from researchers who will develop the molecular movie methods using quantum beam science, chemical biology, protein engineering and other technics as well as from those in the complementary fields including biophysics, analytical chemistry and physical chemistry. In addition to optical laser, temperature jump and rapid mixing methods are now available to initiate reactions/conformational changes in the crystals. We would invite the applications which use these new synchronization methods to make molecular movies. We also welcome computational scientists who will overcome the limitations of experimental methods.

We also expect the applications from those who study molecular mechanisms of biological materials or small molecules like catalysts in the fields including biochemistry, molecular biology, structural biology and synthetic chemistry. The free electron laser science is new and a multi-disciplinary science including physics, chemistry and biology and is advancing rapidly. We welcome the proposals about the future applications of the molecular movie method including researches of new optogenetical or optopharmacological tools and these applications.

研究項目 Research Group	応募上限額 Upper Limit of Annual Budget	採択目安件数 Number of research projects scheduled to be selected
A01 高速分子動画によるタンパク質の反応機構解明・制御 A01 Structural biology and chemical biology	500 万円/5 million yen 300 万円/ 5 million yen	7 件 7 件
B01 高速分子動画撮影法の基盤構築 B01 Molecular movie platform design		
C01 高速分子動画に資する反応精密分析 C01 Computational chemistry and spectroscopy		



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
- ・ 鈴木 大介
信州大学・学術研究院繊維学系・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	SPring-8・KEK 併設企画、学会での展示企画