

Newsletter No.9

Sept.2022

<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
Summary	3
「高速分子動画」技術解説	4
ハイライト研究紹介	9
イベント情報・領域活動	11
総括班よりお知らせ	11

領域代表より

新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウムを2022年11月21日（月）～22日（火）の日程で行います。場所は例年通り淡路夢舞台国際会議場でハイブリッド形式で行います。シンポジウムの部分は公開ですが、同時にクローズドの領域会議も併催します。詳しいプログラムはホームページを参照ください。シンポジウムでもっとも大事なイベントの一つが夜のポスターセッションです。ポスターの前で夜中まで自由にディスカッションを行う時間で、これまでも数多くの共同研究が生まれています。会場側からのドリンク提供はありませんが持ち込みは自由となっています。事情の許す方はぜひ現地参加していただき、多くの方と親交を深め、新しい研究の種を見つけて帰っていただければと思っています。

The "Molecular Movies" annual symposium will be held from Monday, November 21 to Tuesday, November 22, 2022. The symposium will be held in a hybrid format at the Awaji Yumebutai International Conference Center as in previous years. The symposium itself is open to the public, but a closed project meeting will be also held on the second day. Please refer to the website for the detailed program. One of the more important events of the symposium is the evening poster session. This is a time for free discussion in front of posters until midnight, and has resulted in numerous collaborations. Drinks are not provided by the venue, but you are free to bring your own. If your circumstances allow, we hope you will join us on-site, deepen your friendship with many people, and leave with the seeds of new researches.



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>

Twitterを2021年12月より開始。Facebookも継続中。

誰でも更新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。

【Twitter】 <https://twitter.com/MolMovies>

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

2019-2023 MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas

Non-equilibrium-state molecular movies and their applications (Molecular Movies)

Newsletter, vol 9, September 2022

From the P.I.	2
Table of contents and Summaries	3
Introductions to Molecular Movies Technologies	4

Daichi Yamada (University of Hyogo, C01 group)

In this explanatory article, we provide a "What can we know by spectroscopy?" and examples of applying spectroscopic techniques to light-induced systems are given, respectively. Spectroscopy enables chemical state analysis by analyzing in detail local areas that cannot be identified by crystal structure analysis alone. Spectroscopy is very useful when you are trying to determine the protonation state of the active center, or when you cannot identify the chemical structure based on electron density alone. We hope that this article will provide a good opportunity for learning about the use of spectroscopy and inspire further collaboration with structural and theoretical researchers.

Tetsunari Kimura (Kobe University, C01 group)

Solution mixing is one of the general techniques to trigger chemical reactions. In this topic, two methods, turbulent mixing and laminar-flow molecular diffusion, realized by micro-fluidic devices are introduced, and their combined use with micro-spectroscopy is presented for time-resolved measurements.

Research Topics **9**

Hideko Nagasawa (Gifu Pharmaceutical University, A01 group)

The Nagasawa Lab designs and synthesizes useful functional molecules to better understand biological phenomena and diseases and to create more effective therapeutics. Here I present novel caged compound and fluorescent probe that are useful tools for the study of oxidative stress.

Toshiaki Hosaka (RIKEN, A01 group)

This letter describes the protein preparation by using the *E. coli* cell-free synthesis system and the development of a system for site-specific introduction of a nonnatural amino acid, caged-Tyr (oNBtyr), into proteins. The *E. coli* cell-free synthesis system is a method for preparing proteins by adding factors necessary for synthesis to *E. coli* cell extracts. In addition, we produced an oNBtyr-containing lysozyme through a modified cell-free protein synthesis system.

Events Calendar and Announcements **11**

「高速分子動画」技術解説！

分光法の使い所と光誘起系の分光技術

山田大智（兵庫県立大学・C01 班）



はじめに

本記事では、分光法で「何がわかるのか？」についての簡単な解説と光誘起系の分光技術を活用した例をそれぞれ示しています。この解説記事が、分光法の使い所を改めて知ってもらう良い機会となり、構造・理論研究の方々とさらなる共同研究につながることを期待しています。

分光法について

分光学は、分光器・分光計などを用いて物質が吸収もしくは放出する光のスペクトルの解析を行い、そこから原子や分子のエネルギー準位、電子配置、分子の形、化学結合などの情報を得る学問分野です。分光法には、主に物質を透過したときに吸収される量（吸光度）のスペクトルを測定する吸収分光法と、物質から放出される発光（蛍光、りん光など）のスペクトルを測定する発光分光法、物質に光を入射した時に散乱される光のスペクトルを測定する散乱分光法の大きく分けて三種類が存在します。著者は、紫外可視吸収や赤外吸収などの吸収分光法を主に利用しているため、本記事では吸収分光の説明をします。

まず、紫外可視吸収分光法は、分子のもつ電子のエネルギー準位に相当する紫外可視光を用いる分光法です。分子の電子状態が変わると吸収する光の波長が変化する性質を利用して、色素活性中心や金属中心等の光応答部位の電子状態解析に有用です。例えば、レチナール、フラビン、ヘム鉄などの色素の場合、異性化状態、酸化還元状態、結合しているリガンドが異なる状態などをそれぞれ解析できます。一方、赤外吸収分光法は、分子振動のエネルギー準位に相当する赤外線を用いる分光法で、ラマン散乱法と同じ振動分光法の一種です。分子振動を検出することにより、タンパク質中の機能箇所（アミノ酸官能基、補酵素、リガンドや ATP などの小分子）の分子構造、電子状態、プロトン化状態などの局所構造の解析に有用です。特に、赤外分光法ではタンパク質の二次構造を反映するアミノ酸の主鎖や極性アミノ酸（グルタミン酸等）の解析が得意です[1]。例としてグルタミン酸では、プロトン化状態の違いをカルボキシル基のCO伸縮振動を観測することで判別できます（図1）。プロトン化状態、脱プロトン化状態それぞれのCOの結合長を比較すると、約 0.11 Å の違いしかありません。しかし、赤外分光で観測する振動スペクトルでは、プロトン化状態は $\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ に、脱プロトン化状態は

~ 1560 または 1400 cm^{-1} にバンドが現れるので、明確に区別することができます。

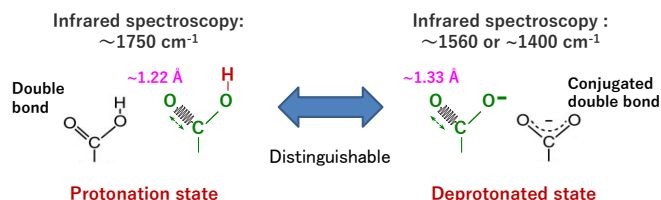


図1 グルタミン酸側鎖のCO伸縮振動の例

分光法では、結晶構造解析のように、原子の位置情報を得ることはできませんが、グルタミン酸の例のように1.5重結合と2重結合を区別できるぐらいに高分解能の構造情報を与えることができ、結晶構造解析だけでは特定できない局所を詳細に解析した化学状態解析を行うことができます（図2）。これらの情報がわかる分光法の使い所としては、例えば、活性中心のプロトン化状態を知りたい場合、または電子密度だけでは化学構造を同定できない場合など、局所の構造を詳細に解析したい場面で大いに役立ちます。また、AかBが分からない、どちらかの仮説に決着を付けたい時に分光を使うのもよい使い方だと思っています。

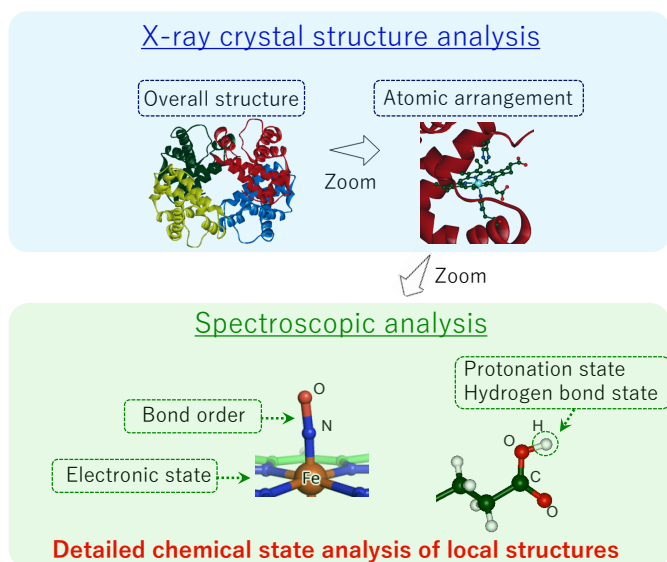


図2 分光法による局所を詳細に解析した化学状態解析

分光法を活用した例

次に、具体例として、脱窒カビ由来一酸化窒素還元酵素（以下、NO還元酵素）に分光法を用いた研究[2]について紹介します。NO還元酵素は、活性中心にヘム鉄を持

ち、NADH からの電子（ヒドリド）とプロトンを利用して二分子の NO を亜酸化窒素 (N_2O) へと還元する反応 ($2NO + NADH + H^+ \rightarrow N_2O + H_2O + NAD^+$) を触媒しています。この NO 還元反応により発生する N_2O は、温室効果作用やオゾン層破壊作用があり、環境問題に大きく関係していることから、 N_2O 発生分子メカニズムの理解が強く求められています。これまでの NO 還元酵素の研究で、高分解能の結晶構造解析、溶液試料を用いた時間分解分光計測や計算科学から、図3の反応機構が提案されています。しかし、NO 還元反応において、最も重要な状態である NO 活性型の化学構造は、明らかになっていませんでした。そこで、微結晶試料を用いた時間分解分光測定と、結晶構造解析、計算科学を組み合わせることで、NO 活性型の構造状態を明らかにする試みを行いました。

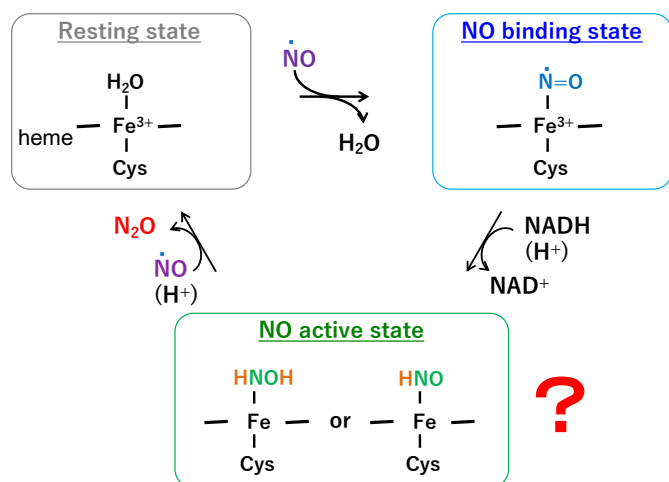


図3 NO還元酵素の反応サイクル

実験結果の説明の前に、酵素である NO 還元酵素の微結晶試料を時間分解分光に適用するための測定方法の開発について紹介します。まず、微結晶試料に適用させるために、装置の顕微化を行いました。具体的には、光学系に顕微鏡で使用する対物鏡を導入し、目的の位置の微結晶試料に集光した検出光を当てることで、微結晶試料の測定を可能にしています。次に、酵素試料への適応のために、顕微分光セルを作製しました(図4)。バクテリオロドプシンのような光サイクル反応を示すタンパク質の場合、繰り返し同一試料を使用できるので測定時に試料交換の必要はありません。一方、酵素は基質(今回の場合、NOとNADH)を消費するため、一回一回の測定で試料交換が必要となります。そこで、ウェルごとに区切りを作り、ウェルを順次移動し測定できる顕微分光セルを確立しました。これにより、酵素反応で基質(NOやNADH)を消費してしまうNO還元酵素でも、試料交換を行いながら測定が可能になりました。顕微分光セルは、 $\phi 500 \mu m$ の穴が開いた厚み $30 \mu m$ (紫外

可視分光用) または $40 \mu m$ (赤外分光用) のスペーサーに、微結晶試料を導入し、 CaF_2 の窓板で挟み込むことで調製しています(溶液試料にも適応可能)。スペーサーの厚みの違いは、それぞれの測定領域の吸収帯の量から光路長を調節するために行っており、試料条件ごとに最適化することができます。この顕微分光セルを紫外可視光の顕微分光装置または赤外顕微分光装置(図4)にセットすることで、紫外可視分光測定または赤外分光測定を行います。

続いて、光誘起による時間分解分光測定方法について紹介します。試料に対し励起光であるパルスレーザー光を照射し、一定の遅延時間の後に検出光(紫外可視光または赤外光)を照射します。ここで得られた明状態のスペクトルと励起光を照射していない暗状態のスペクトルとの差を計算した差スペクトルを取得します。この差は、光反応によって誘起された構造変化を示しており、分光研究ではわずかな変化を精度良く捉えるために、構造変化を差スペクトルで表します。差スペクトルを取得する遅延時間を任意に変え、順次測定することで時間分解測定を行います。顕微分光装置の場合、励起光を試料に当てるために、対物鏡にプリズムを貼り付け、励起光を導入する工夫をしています(図4)。また、時間分解分光測定を行う上で、どのように反応開始を制御するのかという点も重要なポイントです。光応答性のタンパク質であれば、対応する吸収波長の励起光を当てることで、反応開始を制御できますが、光応答性の無いタンパク質の場合は工夫が必要です。NO還元酵素の場合、caged-NOという紫外線(308 nm)に反応して、 μ 秒程度で2当量のNOを放出する(量子効率1.4)優れたケージド化合物[3]を用いていることで、反応開始の制御を行いました。

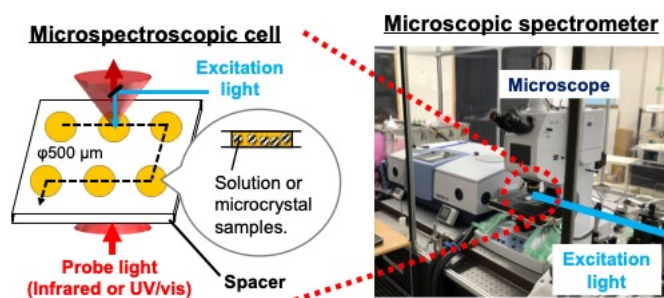


図4 顕微分光セルの概要と赤外顕微分光装置

次に、実験結果の説明に入ります。まず微結晶の NO 還元酵素の時間分解紫外可視分光測定を行い、微結晶中でも酵素反応系が働くのか確認しました。その結果、NO 結合型 ($Fe^{3+}-NO$) と NO 活性型 ($Fe-NHO$ or $Fe-NHOH$) を経由して酵素反応が進行することを確認しました。また、NO 活性型の形成の時定数は 0.8 秒で、

形成した NO 活性型は 60 秒経っても安定に存在することがわかりました。さらに、重要な点として、溶液試料では、NO 活性型形成の時定数は 1 ミリ秒で、同じ caged-NO を用いた光誘起の系でも、溶液と微結晶試料では反応速度が大きく異なることがわかりました。このような例は、他のタンパク質でも見られており[4,5]、構造ダイナミクス研究において、実際に結晶中で起こる反応を分光でモニターし、機能研究と結びつけながら進めることが極めて重要だということを示す結果だと思えます。

時間分解紫外可視分光測定の結果を受けて、結晶構造解析の実験では、光照射後 5 秒における NO 活性型をクライオトラップにより調製し、その試料を固定ターゲット SFX 手法も用いて回折像を得ました(図5)。既に得られている NO 結合型の結晶構造[6]と比較すると、タンパク質部分に構造上の違いは見られませんでした。Fe-N-O における角度や結合長に違いが見られたことから、NO 活性型の観測に成功したと考えられます。続いて、得られた NO 活性型の構造を鋳型に、ヘム鉄と配位するシステイン及びニトロキシル基質を QM 領域として、QM/MM 計算を行いました。ただ、この時点では、NO 活性型の化学種を同定するところまでは至りませんでした。

そこで、局所構造の解析を可能にするために、微結晶試料を用いた時間分解赤外分光測定を行いました。測定は、NO 活性型が形成されている時間領域の光照射後 1 秒~60 秒間の平均のスペクトルから、NO 活性型における NO 伸縮振動の同位体効果のみを抽出した差スペクトルを得ました(図5)。この差スペクトルから、NO 活性型の NO 伸縮振動は 1298 cm^{-1} に現れることがわかりました。この結果を含めて、QM/MM 計算の計算値を見ると、NO 伸縮振動の実験値を良く再現する状態は、 $\text{Fe}^{3+}\text{-NHO}^-$ であることがわかり、NO 活性型の化学構造は $\text{Fe}^{3+}\text{-NHO}^-$ だと結論付けました(図5)。

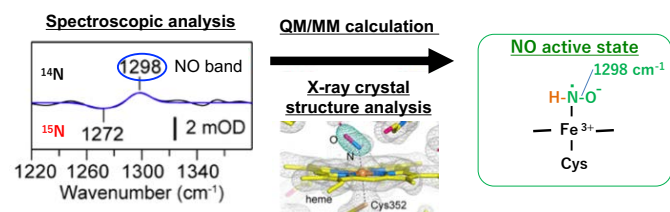


図5 NO 活性型の化学構造状態の同定

以上をまとめると本研究[2]において、分光は次のような役割を果たせたと考えています。

1. 微結晶中の反応速度と溶液中の反応速度の違いを評価し、結晶構造解析で観測すべき時間領域を決定した。

2. 実際に結晶中でも NO 活性型が形成することを紫外可視吸収変化から解明し、機能研究と結びつけた。
3. 赤外分光解析から微結晶中の NO 活性型の分子振動を同定し、結晶構造解析と計算科学の結果と合わせて、NO 活性型の化学構造を決定した。

この研究例[2]は、構造に基づいた計算データを分光データと付きあわせることで、高い信頼性の理論研究が可能になることを示しています。また、分光研究としても、構造・理論研究の方々との連携には大きな意義があり、スペクトルに含まれる豊富な化学情報を最大限に引き出すことを可能にしています。今後も分光法をうまく使える問題にアプローチすることで、実験と理論の相互作用をさらに促進できると考えています。

[参考文献]

1. Barth, A. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1767, 1073-1101.
2. Nomura, T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2021**, 118, e2101481118.
3. Namiki, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 3840-3841.
4. Nango, E. et al., *Science*, **2016**, 354, 1552-1557.
5. Oda, K. et al., *eLife*, **2021**, 10, e62389.
6. Tosha, T. et al., *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 1585.

「高速分子動画」技術解説！

溶液混合系の分光技術

木村哲就（神戸大学・C01）



溶液混合系は化学反応を開始させる際に汎用的な手法です。例えば、溶液Aとしてタンパク質を含む溶液を、溶液Bにはそのタンパク質と反応する基質を含む溶液を準備し、二液を任意の比率で混合すると酵素反応や基質結合に伴う構造変化を観察することができます。しかし、溶液と溶液を効率よく混ぜて、反応を開始し、「時間分解測定を行う」というのは意外に難しいものです。今回はマイクロ流路デバイスを用いて、これらをどのように実現しているか、解説させていただきます。

1. 溶液混合系の歴史

溶液混合を行い、反応の時間発展を追跡する装置として代表的な装置にストップ・フロー法というものがあります。これは溶液を充填したシリンジに対して、急激にモーターを動かす、あるいは急激に圧力をかけることで溶液を吐出させ、ミキサー部分で2~4液を混合し、その直後（ミリ秒以内）にストップバルブを閉じて混合溶液を観測セル内に留め、そこで時間変化を測定する方法です。1951年に発表されたのですが、現在では1~5ミリ秒以内に溶液混合が完結することから、数ミリ秒以降の時間分解測定を行う際にはファーストチョイスになるような手法として市販されています。

このようなストップ・フロー法の開発以前はコンティニューアス・フロー（連続フロー）法といって、シリンジをモータードライブによって押し出し、ミキサーで混合した点を反応時間ゼロとして、そこから観測点までの溶液体積を流速で割ったものが反応時間に対応する、という方法が取られていました。ただ、時間分解計測のためには溶液を流し続けなければならない、測定する反応時間を変えるたびに観測点を変えることから、試料の消費があまりに大きいために適用例が限定されていました。このような経緯もあって、一度反応させてしまえば観測セルでの時間発展を追跡できるストップ・フロー法が開発されるに至ったのです。

2. 乱流型マイクロ流路ミキサーの開発

以上のように、ストップ・フロー法は試料消費を抑えながら、ミリ秒の時間分解能で測定ができる非常に優れた手法ですが、弱点もあります。まず、混合に要する1~5ミリ秒は装置不感時間として、それより速い時間領域で起こる化学反応は追跡できないことがあります。もう一点は急激な圧力変化を利用して溶液を加速して混

合するので、タンパク質によってはこの圧によって失活あるいは凝集してしまうケースがあります。

そこで、一般的に分光測定に用いられる石英ガラスやステンレススパーサーに対して、マイクロメートルオーダーの加工が可能になった事によって、1990年前後から、連続フロー法が見直されるようになりました。流路径を100 μm 程度まで細くし、そこを流れる溶液の流速をm/sのオーダーまで上げて、2液を衝突させることで乱流を引き起こすことができるようになります。具体的には、乱流は、以下の式(1)で表されるレイノルズ数 Re が2300を超える流れ、として定義されます。

$$Re = \frac{\sigma v d}{\rho} \quad (1)$$

ここで、 σ は流体の密度、 v は流速、 d は管の直径、 ρ は粘性係数を示します。マイクロ流路を利用すると、 d は小さくなるのですが、 v を十分大きくすることによって、 $Re > 2300$ を達成することになります。 v が大きくなるということは試料消費が大きくなってしまいますが、流路自体が細いので現実的な測定は可能になります。とはいえ、満足いく反応時間点をタンパク質試料で測定しようとする、100mg以上の試料消費は覚悟しなければならないので、適用できる試料は限定されるのですが。

このようなマイクロ流路ミキサーの開発によって、混合にかかる装置不感時間が100 μs 以下まで短縮され、ストップ・フロー法では困難なサブミリ秒領域という反応の初期段階の観察が可能になりました。これらの手法は主にタンパク質のフォールディング反応や酵素反応における、未知の中間体の同定に活用されました。

3. 層流型マイクロ流路ミキサーの利用

一方で、UV光によって効率的に硬化する樹脂（PDMS等）が開発され、マイクロメートルのフォトレジスト加工が可能になったことによって、より高度で複雑なマイクロ流路加工が可能になりました。それによって、2000年頃には層流型ミキサーが成形され、応用されるようになりました。これは、溶液を物理的に混合するのではなく、溶液と溶液が層を形成できる程度の非常に低い流速で溶液を流し、その界面を通じて小分子が拡散する性質を利用して反応を引き起こす方法です。

現在、SLACやSACLAでも実装されている二液混合系はこの方法に基づいてデザインされています。

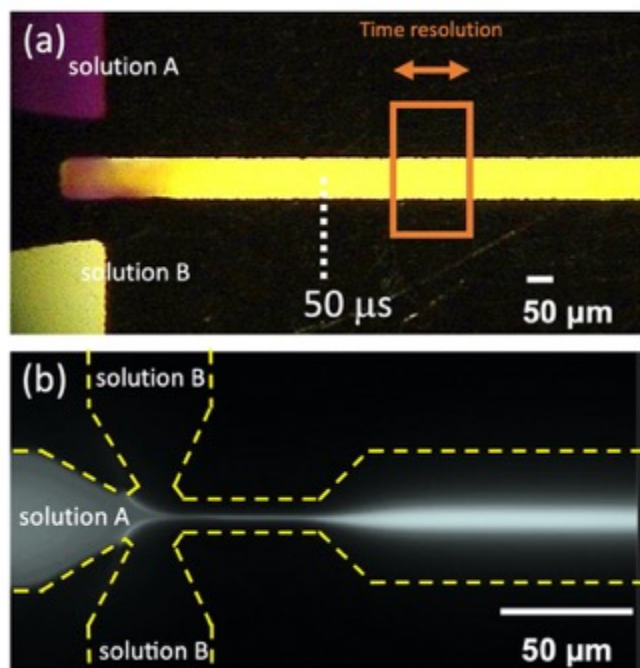


Fig.1 Microfluidic mixers for (a) turbulent mixing and (b) laminar-flow mixing. Time-resolution of the measurement is determined by the size of the focused light (orange box) and the total-flow rate in the observation channel. These images were taken with the coloring reaction by pH-jump for (a) and with the increase in fluorescence intensity of Ca^{2+} sensitive dye for (b).

ミキサーで行われるのは、変化を観察したい分子（高速分子動画の場合はタンパク質微結晶）を含んだ溶液(A)に対して、基質小分子を含む溶液 (B)を十分速い流速で流し、溶液(A)の流れ（ストリーム）を「理想的には」 $10\ \mu\text{m}$ 以下まで絞ることです。多くの小分子の拡散係数 D は $\sim 10^{-5}\ \text{m}^2/\text{s} = \sim 10^4\ \mu\text{m}^2/\text{ms}$ ですので、2液が接触し始めてからサブミリ秒以内には基質小分子が層(A)へと十分拡散していくことになります。この自由拡散によって基質分子がタンパク質へと結合し、反応が開始されるようになります。

このような層流型分子拡散ミキサーの利点は、流速が遅くても反応が引き起こせることにあり、試料への擾動が小さく、タンパク質微結晶のような物理的にも壊れやすい試料でも安定して測定できることが挙げられます。

4. 溶液混合系における分光測定的时间分解能

溶液混合を用いた時間分解計測系において、時間分解能を決定する要因は2つ挙げられます。1つ目は装置不感時間であり、溶液の混合あるいは分子拡散に要する時間になります。これらは流速を高めることで短縮でき、 $\sim 10\ \mu\text{s}$ まで短くできることが報告されています。

2つ目は観測点における時間幅です。この時間幅は連続フロー混合系に特異的なもので、流速と観測に利用する光のスポットサイズに依存します。流速が遅い条件、あるいは光のサイズが大きいと時間分解能は下がってしまいます。流速は測定したい反応時間を変更する際に変わることが好ましいのですが、光のサイズは測定に十分な光量がある限りはできるだけ小さいことが好ましくなります。そこで、顕微分光測定系を導入することで測定点のスポットサイズを小さくすることで、できるだけ時間幅が小さな測定を行い、高い時間分解能を実現するようにします。

XFEL の場合はビーム系が数 μm と非常に小さいことから、測定したい反応時間点は流速のみで決定することが可能です。

連続フロー法を基盤技術として開発された乱流型ミキサーも層流型ミキサーも溶液を流し続けなければならない、試料消費の点ではデメリットも大きいですが、顕微イメージング分光と組み合わせることができれば一度に連続的な測定が可能になり、時間分解計測の適用範囲を広げられると期待しております。

5. 反応時間の決定

ここまで、ミキサーの概略について述べてきました。これらのミキサーを最終的に測定装置へと組み込み時間分解測定を行うのですが、最後に注意しなければならないのはいかにして反応時間を決定するか、という点です。ミキサーの加工精度や光のスポットサイズなど、様々な要因で計算値とは異なるケースがほとんどです。正確な反応時間を決定するためには反応定数が既知の一次（もしくは擬一次）の化学反応を用いて実際に実験を行う必要があります。蛍光の場合は NATA と呼ばれるトリプトファンの *N*-ブロモスクシイミドによる消光反応を、紫外・可視吸収あるいは赤外分光測定では Fe^{3+} のアスコルビン酸による還元反応が用いられることがよくあります。いずれにせよ、正確な反応時間を実際の化学反応で決定することは自作の装置を使う限りは必須の条件検討だと考えられます。

6. まとめ

溶液混合によって反応を誘起する測定系はレーザー励起系に比べると、時間分解能の点では劣ります。その一方で、試料と基質が十分量確保できるのであれば、基質との結合によって反応が誘起される反応系を持つどのような試料にも適用できる汎用性を持っています。それぞれの試料に最適な測定系を選択していただき、構造解析と分光解析両面からの共同研究がより発展することを期待しております。

ハイライト研究紹介

創薬を志向したケミカルバイオロジー研究 永澤秀子 (岐阜薬科大学・A01 班)

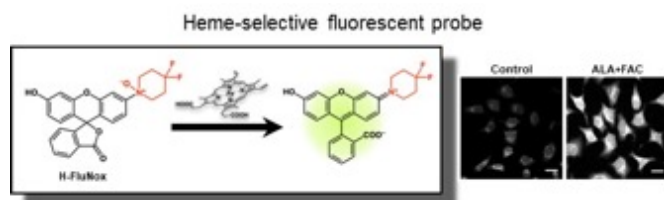


私は A01 清中班の分担者として、分子プローブの設計と合成を担当しております。私の研究室では、生命現象の解明や制御に資する機能性分子の開発と病態解析や制御のための分子の創製、すなわち創薬を志向したケミカルバイオロジー研究に取り組んでいます。研究の基盤となっているのは有機合成の力で、いわゆるドラッグライクな平面的な構造の化合物だけでなく、天然物のような複雑な骨格の化合物の合成にも取り組んでいます。今回、永野班で精製された Diels Alder 反応酵素の基質合成を博士課程の狩谷が担当し、最近完成にこぎつけました。今後、その基質をいかにケージド化して反応開始を光制御できるようにするかが勝負です。

生体内の反応や不安定活性種の見える化は、複雑な生命現象や病態を解明する上で有用な技術になっています。私たちは、光化学で病態を検出・制御する機能性分子の開発を行っています。中でも様々な分子に光解除性保護基を導入して活性や構造変化をコントロールできる“フットスイッチ”は、本領域研究の鍵となる基盤技術になっています。近年では光薬理学としてフットスイッチで薬物の活性を制御するプロドラッグの開発も注目されています。

当研究室の辻は、細胞内の局所で光によって酸化ストレスを惹起できないかと考え、まず、*tert-butyl hydroperoxide* (TBHP)に光解除性保護基を導入した AcBhcTBHP を合成し、これが光照射により細胞内で TBHP を放出することを確認しました。次いで、ミトコンドリア標的のタグを導入した MitoTBHP を合成し、細胞に処理し光照射したところ、ミトコンドリア膜電位の脱分極を認めたことから、ミトコンドリア近傍で過酸化物を放出しているものと予想されました。この時、AcBhcTBHP では、脱分極が起こらなかったことから、MitoTBHP が、酸化ストレスを時空間的に制御できるケージド化合物として働くことが示唆されました。

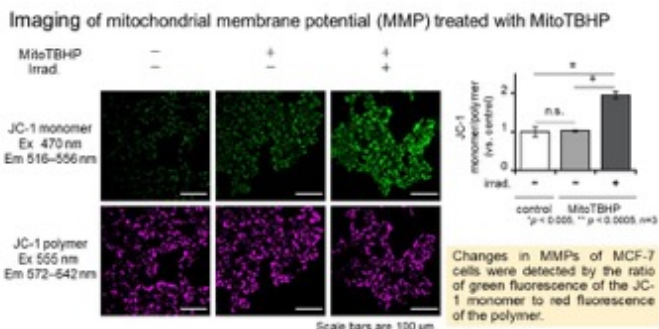
一方、平山は、細胞内でヒドロキシラジカルの生成を触媒して酸化ストレスをもたらす自由鉄 (Fe^{2+}) のセンサー分子 RhoNox-1 を開発しました(*Chem. Sci.* 2013)。RhoNox-1 は、生きた細胞で自由鉄を検出できる、世界初の OFF-ON 型鉄蛍光プローブです。また、最近、プロオキシダントとして細胞にダメージを与える遊離のヘムを特異的に検出できる蛍光プローブの開発にも成功しました(*J. Am. Chem. Soc.*, 2022)。これらの蛍光プローブはがんや神経変性疾患などの病態解明や酸化ストレス研究の基盤技術として注目されています。



現在狩谷は、クラス A GPCR の PAR1 の化学標識プローブの開発とフットスイッチの導入にも取り組んでいます。今後とも、未知なる生命現象を解き明かすためのユニークで有用な機能性分子の創製に挑戦していきたいと思います。



永澤研究室のメンバー





ハイライト研究紹介

大腸菌無細胞合成系による非天然 caged アミノ酸導入系の開発について 保坂俊彰 (理研・A01 公募班)

公募班の一員として、タンパク質の時分割構造解析を目指した研究を行っている理研の保坂俊彰です。本稿では、サンプル調製に使っている大腸菌無細胞合成系（セルフリー）と、非天然アミノ酸を部位特異的に導入する系の開発について、ご紹介させていただきます。

タンパク質の無細胞合成系とは、目的タンパク質の遺伝子を、細胞抽出液（当ラボでは大腸菌）と合成に必要な様々な因子（20種アミノ酸・ヌクレオチド・ATP・クレアチンキナーゼを使った ATP 再生系・tRNA・T7RNA ポリメラーゼ・buffer 等）を混合して、転写/翻訳を経て目的タンパク質の合成を行うものです。目的タンパク質が膜タンパク質なら界面活性剤/脂質を加え、抗体分子の様な分泌タンパク質なら酸化状態にして合成反応を行うなど、細かな修正が可能な系となっています。

すべての目的タンパク質を調製できるわけではないですが、細胞系のタンパク質調製と比較すると、試薬調製から合成終了まで6時間程度で終わるため、省力・短時間で実験ができるため予定を立てやすいこと、プラスミドではなく PCR 断片でも合成可能であり多種のタンパク質調製を並行化して行いやすいことから、目的タンパク質の様々な deletion mutant の合成チェックを気軽に行えることなどが利点として挙げられます。また、スケールアップも容易であり、筆者が行ったクロライドポンプロドプシンの時分割実験に用いた試料調製も、本法を用いて行いました（約 100 mg の試料を合成から精製まで3日以内でできる）（*PNAS*, 2022, 119, e2117433119）。

このセルフリー系で非天然アミノ酸を導入するには、以下の物質を追加導入します。① 目的となる非天然アミノ酸、② 終始コドンである UAG（アンバー）を認識できるように改変してある tRNA、③ ①の非天然アミノ酸を認識し、②の tRNA に受け渡すことができるアミノアシル tRNA 合成酵素の3つを導入しています。さらに、mRNA の終始コドン UAG を認識する終結因子 RF1 を欠損した大腸菌から得られた大腸菌抽出液を、通常の大腸菌抽出液の代わりに使います。この非天然アミノ酸を認識するアミノアシル tRNA 合成酵素と tRNA は *Methanocaldococcus jannaschii* 由来のものを用い、大腸菌がもつ他の 20 種類のアミノ酸を認識するものとは競合しません（直交性）。これにより、非天然アミノ酸を導入したい部位をアンバーコドンに置換しておけば、ほぼ 100% の割合で非天然アミノ酸を導入したタンパク質を合成することができます (Fig. 1)。

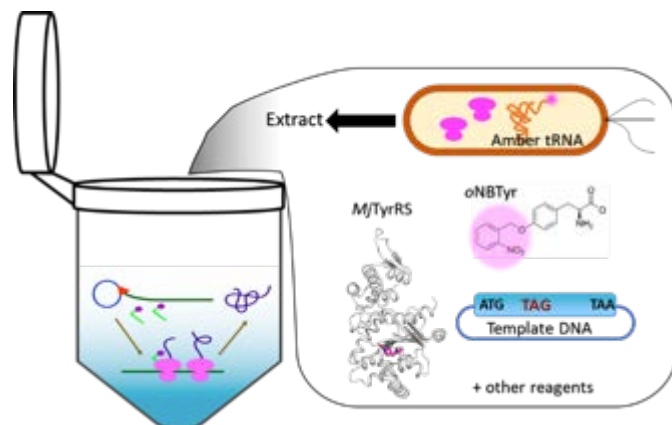


Fig. 1 *E. coli* Cell-Free Synthesis System with Nonnatural amino acids

高速分子動画の公募班に採択されて以降、私たちはこのセルフリー系に caged 基としてニトロベンジル基を Tyr に付加した O-(2-nitrobenzyl)-L-tyrosine (oNBTyr) をタンパク質に導入する手法の開発を行ってきました。その結果、oNBTyr とそれを認識するアミノアシル tRNA 合成酵素との共結晶から構造解析に成功し、oNBTyr を認識する機構について明らかとすることができました。また、セルフリー系を用いて、この oNBTyr を lysozyme に導入することができ、光反応により caged 基が外れることを、結晶構造解析により明らかとすることができました (*Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10399)。

本系は大腸菌抽出液を用いるので、大腸菌でも oNBTyr を導入するタンパク質調製は可能です。それにも関わらず、非天然アミノ酸導入にセルフリー系を用いる利点は、培養系に比べてタンパク質合成時の液量が少ない（少なくとも 1/10 量）点にあります。液量が少なければ、合成時に添加する高価な非天然アミノ酸の量を減らすことができます。また、小型インキュベーターを使って合成するため、oNBTyr のような暗での調製が必要なものでも容易に対応できる点が挙げられます。

本稿では oNBTyr を大腸菌無細胞合成系により導入する系について、ご紹介させていただきました。現在は、これを用いて別の酵素に導入した応用研究や、他の光反応性の非天然アミノ酸を導入する系の開発にも取り組んでおります。この研究を使ってみたいとお考えの領域内の実験グループのみならず、いろいろなお声をおかけいただき、いろいろな共同研究につなげていきたいと思っております。



イベント情報

2022年9月28日(水)～30日(金)	第60回日本生物物理学会・シンポジウム共催(函館アリーナ・函館市民会館)
2022年11月9日(水)～11日(金)	第95回日本生化学会大会・シンポジウム共催(名古屋国際会場)
2022年11月21日(月)～22日(火)	令和4年度「高速分子動画」シンポジウム(淡路夢舞台国際会議場, オンラインハイブリッド開催)
2022年11月28日(月)～12月3日(土)	10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference(神戸国際会議場)

2022年5月以降の領域活動

2022年9月5日(月)	第29回総括班会議(Web)
2022年8月9日(火)	第23回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者: 林重彦先生・京都大, Robert E. CAMPBELL先生・東京大)
2022年7月28日(木)	第28回総括班会議(Web)
2022年7月5日(火)	第22回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者: 光武亜代理先生・明治大学, 島田敦広先生・岐阜大)
2022年6月30日(木)～7月1日(金)	第48回生体分子科学討論会・共催(とりぎん文化会館)
2022年6月8日(水)	第27回総括班会議(Web)
2022年6月7日(火)～9日(木)	第22回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ共催(つくば国際会議場)
2022年6月3日(金)	第21回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者: 片山哲郎先生・徳島大, 篠田恵子先生・東京大)

総括班よりお知らせ

学術調査官

- 桶葭 興資
北陸先端科学技術大学院大学・准教授(2022.8.～)
- 有森 貴夫
大阪大学蛋白質研究所・准教授(2022.8.～)

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/twitter 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