

令和5年度 新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム・領域会議  
<講演要旨>

シンポジウム

生命現象の光操作技術の創出

佐藤 守俊（東京大学大学院総合文化研究科，神奈川県立産業技術総合研究所(KISTEC)）

細胞内のシグナル伝達を司る分子や遺伝子の働きを光で操作できるとしたら，どうなるだろう？  
光が得意とする高い時間・空間制御能をもってすれば，様々な生命機能や疾患を自在にコントロールできるようになるかもしれない．このような未来を実現すべく，私たちは新しい技術の開発を行っています．

**Next-generation high-performance genetically-encoded biosensors for the imaging toolbox**

**Robert E. Campbell (The University of Tokyo)**

Genetically-encoded biosensors, such as the archetypical GCaMP series of green fluorescent calcium ion biosensors, represent one of the most important classes of tools in the fluorescence imaging toolbox. Advances in this field have been a driving force behind advances in neuroscience, and cell biology in general, for the past two decades. One important direction in this field have been the ongoing expansion of the range of biosensor specificities, beyond calcium ion, in order to enable visualization of membrane potential, neurotransmitter release, and neurometabolism. A second important direction has been the ongoing expansion of the color palette of genetically encoded biosensors, particularly into the red and near-infrared region of the spectrum, to enable multicolour, multiplexed imaging applications and imaging deeper into tissue. Yet another direction has been an ever-rising bar for the expected performance of biosensors. Our lab has strived to push the frontiers in all of these directions and is continuing to work towards developing a new generation of very high-performance indicators for multi-parameter visualization of ions and metabolites. We aim to achieve this goal by exploiting structure-guided biosensor design, iterative cycles of directive evolution, and lower throughput testing of promising variants in mammalian cells. In this seminar I will present some of our most recent efforts to add new biosensors to the fluorescence imaging toolbox, with a focus on new biosensors for ions other than calcium and key neurometabolites.

## 二元機能性動物類縁型クリプトクロムの光活性化過程の動的構造解析

山元 淳平 (大阪大学大学院 基礎工学研究科)

光回復酵素・クリプトクロムスーパーファミリーは FAD を補酵素に持つフラビントタンパク質であり、高度に類似した三次元構造を持つタンパク質群である。一方、その機能は多岐に富み、光回復酵素は DNA 修復に、クリプトクロムは概日リズムの形成やシグナル伝達に関与する。クラミドモナス由来動物類縁型クリプトクロムは、この両者の機能を併せ持ち、FAD の酸化還元状態の違いを巧みに使い分けることで機能を果たすと考えられている。この酵素の二元機能性の両方に関与する光依存的な FAD 還元過程を SACLA における時分割構造解析実験で捉えたところ、光励起に伴う FAD および近傍環境での構造変化に加えて、タンパク質部分構造が単調に変化する様子が観測された。

## GPCR 高速分子動画の機能検証プラットフォーム

井上 飛鳥 (東北大学 薬学研究科)

我々は、GPCR のシグナル多様性がどのような原理で生み出され、制御されているかに興味を持ち研究を進めている。この過程で、プレートリーダーベースで高精度に測定可能な手法として、TGF $\alpha$  切断アッセイや NanoBiT シグナルセンサーを構築してきた。また、GPCR エフェクターを欠損させた HEK293 細胞ライブラリーを作製することで、シグナルクロストークを切り分けた解析が可能となった。本シンポジウムでは、これら GPCR シグナル解析手法がどのように構造研究の検証実験に活かされてきたかを概説し、高速分子動画研究への応用について議論を深めたい。

## MFS トランスポーターの高活性変異と基質排出機構

篠田 恵子 (統計数理研究所)

Major facilitator superfamily(MFS)型の多剤排出トランスポーターにおけるプロトン共役輸送機構には様々な知見があるが、基質がトランスポーターに与える影響についてその詳細はよく分かっていない。本研究では、我々の実験グループで見出された IMP 分泌型 MFS トランスポーターとその高活性変異体 (G64E) に対して分子動力学シミュレーションを用いて活性向上のメカニズムを調べた。シミュレーションから G64E では保存された "RxxQG"モチーフと E64 が相互作用することにより膜貫通ヘリックス間の相互作用が強化され、基質存在下でさらに強まり構造が変化することが示唆された。

## SACLA における動的構造解析の現状と展望

登野 健介 (高輝度光科学研究センター)

近年の高速分子動画法の大きな進展には、計算科学や電子顕微鏡の目覚ましい進歩とともに、レーザー分光法や X 線動的構造解析の技術開発が大きな役割を果たしてきた。SACLA においては、光学レーザーと XFEL によるポンプ・プローブ測定法が確立され、さらに二液混合法や温度ジャンプ法などへの拡張が進められている。SPring-8 でもミリ秒程度の高速測定技術の開発が進み、XFEL との相補的利用が進みつつある。世界の状況に目を向けると、メガヘルツ級の高繰返し XFEL や第 4 世代放射光源が登場し、高速分子動画法の新たな展開が始まろうとしている。本講演では、今後の分子動画法の可能性について考えるための情報として、SACLA における構造解析研究を振り返るとともに、施設の高度化も含めた展望を述べる。

## 若手シンポジウム

### タンパク質を化学の力で作る「タンパク質化学合成技術」

林 剛介 (名古屋大学 工学研究科)

本講演では、有機化学的にタンパク質を作る「タンパク質化学合成法」について、その方法論と応用研究について紹介する。タンパク質生合成系である翻訳系では、利用可能なアミノ酸が 20 種類のアミノ酸に制限されるのに対し、化学合成法では多様な非タンパク質性アミノ酸の導入が可能である。そのため、メチル化やアセチル化などの翻訳後修飾を有するタンパク質や、蛍光分子など機能性分子が導入された人工タンパク質、D 体アミノ酸が連なった鏡像異性体タンパク質など、多様なポリアミド型配列分子の合成が可能である。本発表では、我々が開発してきたタンパク質化学合成の方法論について紹介するとともに、化学合成タンパク質の応用例についても紹介する。

### 可逆的に光応答する分子ツールを用いた細胞内構造体の操作

松尾 和哉 (京都工芸繊維大学 分子化学系)

タンパク質の原子レベルにおける時分割解析を実現する高速分子動画法において、タンパク質の反応開始点を同期させるための分子技術は不可欠である。光応答性分子は、「光」という非侵襲的な外部刺激によって制御できるため、高速分子動画法を非光感受性タンパク質へと展開するための有力なツールとなりうる。これまで、アゾベンゼン誘導体の光による cis-trans 光異性化反応を利用し、酵素活性を可逆的に制御するための分子ツールを開発してきた。本発表では、細胞分裂で機能するモータータンパク質 CENP-E の光制御型阻害剤や Rho キナーゼの光制御型阻害剤を

取り上げ、細胞内構造体である染色体やアクチンファイバーを光操作した事例を紹介する。

### フェムト秒顕微過渡吸収分光法によるタンパク質微結晶の励起状態ダイナミクスの観測

片山 哲郎 (徳島大学 ポスト LED フォトニクス研究所)

近年、時間分解 X 線自由電子レーザー(XFEL)分光によりたんぱく質結晶における原子レベルでの電子密度および構造変化ダイナミクスを観測することで多くの光生命化学現象が解明されつつある。これら原子レベルの電子密度、構造変化ダイナミクスとは相補的に、過渡吸収分光(時間分解電子スペクトル計測)によりたんぱく質結晶内における色素分子の電子励起状態から進行するエネルギー移動反応、プロトン移動反応、電子移動反応、光異性化反応などの反応速度定数および反応因子を解明することは、XFEL による電子密度変化、分子間相互作用の変化の解釈および反応機構解明の観点から重要である。本発表ではフェムト秒顕微過渡吸収分光を用いて高速分子動画領域内の共同研究で観測したタンパク質結晶中の励起状態ダイナミクスの事例について議論する。

### 呼吸鎖末端酵素による水素結合ネットワークを介したプロトンポンプ機構

島田 敦広 (岐阜大学 応用生物科学部)

シトクロム酸化酵素 (CcO) は酸化的リン酸化の中樞を担う酵素であり、酸素還元反応と共役してプロトンを膜間能動輸送 (ポンプ) する。本酵素は、CuB と heme a<sub>3</sub> によって構成される酸素還元中心へ結合した酸素へ、CuA と heme a を介して 1 電子が伝達されるごとに 1 プロトンをポンプすることが分かっている。CcO 内に取り込まれたプロトンは CuA と heme a の酸化還元による構造変化と静電的反発力を利用して一方向的にポンプされると考えられているが、その反応機構はいまだ未解明である。本発表では、様々な酸化状態の CcO の高分解能構造を比較することで、CuA と heme a の酸化状態変化に駆動される構造変化とプロトン輸送機構を提案する。

### 構造から見る光駆動型イオンチャネルの分子機構

福田 昌弘 (東京大学 先進科学研究機構)

自然界では多様な光感受性タンパク質が光エネルギーをイオン輸送や化学変化といった様々な仕事に変換している。光駆動型イオンチャネルであるチャネルロドプシンは光エネルギーを「イオン輸送」へと変換する分子機械であり、神経科学をはじめとした多くの分野で光遺伝学ツールとして利用されている。チャネルロドプシンをはじめとしたロドプシンタンパク質は、共通して

7本の膜貫通ヘリックスと発色団としてのレチナールを有するが、その分子機構の詳細な理解のためには原子分解能の構造情報が重要である。さらに、近年では次々に新しいチャンネルロドプシンが発見されてきており、大きく注目されている。本発表では、近年発見された新規チャンネルロドプシンのクライオ電子顕微鏡を用いた立体構造像解析の実例を示すとともに、今後の展開に関して議論する。

### ネットワーク理論に基づく酵素ホモログ配列分類法の開発と応用

中野 祥吾 (静岡県立大学 食品栄養科学部)

研究対象とする酵素・タンパク質配列を Blastp 解析すると、1000以上のホモログ配列が取得されることがあるが、この場合どの配列を研究対象に選ぶか悩むことが多い。本研究では、配列分類法「iAnglerNet」の開発を行い、この課題を解決することを目指した。iAnglerNetは3つのプロセスで分類を達成するプログラムである。まず無作為抽出した配列と鋳型配列のアラインメントを複数回(N回)行い、20種アミノ酸の出現頻度行列を出力する。次にN個の頻度行列を正順相関分析で解析し、1つの相関マップとして出力する。相関マップには鋳型配列のアミノ酸座位間における出現頻度から算出された相関係数が出力されている。最後にネットワーク理論で相関マップを解析し、中心性の高い残基をランキング化し、上位ランクの残基をモチーフとみなしたのちに分類を達成する。本発表では、iAnglerNet法のアルゴリズム詳細と高機能化酵素デザインの成功例を報告する。

### 分子動力学シミュレーションを用いた脂質フリップを誘起する膜貫通ペプチドの膜内構造解析

齋藤 大明 (北陸大学 薬学部)

富山大学の中野等の実験によると、膜貫通(TM)ペプチドと脂質膜との長さのミスマッチや、親水性アミノ酸残基の導入により脂質フリップ能が変化することが知られている。本研究では系統的にアミノ酸配列を変えたTMペプチドのモデリングやMDシミュレーションを実施し、各々の系におけるTMペプチドの膜内構造や、周辺の脂質や水分子との相互作用の詳細を明らかにする。シミュレーションの解析結果から、TMペプチドによる脂質フリップの分子機構について言及する。

## 阻害剤設計に向けた金属酵素反応の計算化学的研究

齋藤 徹 (広島市立大学 大学院情報科学研究科)

金属酵素の多様な機能は、タンパク質の立体構造と活性部位の配位構造・電子状態が協同的かつ柔軟に変化することで発現される。我々は、半経験的手法から量子/古典混合近似分子動力学 (QM/MM-MD) 法に至る様々な計算手法を用いて、金属酵素による物質変換反応の研究を行ってきた。本発表では、QM/MM-MD シミュレーションを用いた、ウレアーゼによる尿素の加水分解およびウレアーゼ阻害剤による阻害機構に関する研究について発表する。また、アルデヒドオキシダーゼによる含窒素複素環化合物の代謝部位を、半経験的手法とデータ科学を用いて簡便に予測する手法について述べる。

### 新学術領域「高速分子動画」領域会議 (Closed)

#### 光動作タンパク質の時分割構造解析と合理的改変

岩田 想 (京都大学)

#### タンパク質の非平衡状態構造解析を可能にするケミカル光制御法の開発

清中 茂樹 (名古屋大学)

#### 光感受性タンパク質の多様な光反応機構解明

朴 三用 (横浜市立大学)

#### 酵素が巧みに織りなす化学反応過程のダイナミズムの撮像

永野 真吾 (鳥取大学)

#### 時分割実験のための多様な反応誘起システムの開発

南後恵理子 (東北大学)

#### 動的構造解析に資する固定ターゲット微小結晶解析法の開発

山本 雅貴 (理化学研究所)

#### 時間分解構造解析を補完する精密顕微分光計測

久保 稔 (兵庫県立大学)

#### 分子シミュレーションによるタンパク質化学反応ダイナミクスの解明

宮下 治 (理化学研究所)