

Newsletter No.10  
Jan.2023

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
ハイライト研究紹介	4
イベント情報・領域活動	7
総括班よりお知らせ	8

## 領域代表より

あけましておめでとうございます。プロジェクトもあと1年ちょっととなりましたが、今年は国際シンポジウムも開催いたしますし、ゴールにむけて成果をまとめていく年にしたいと思っています。多くの方も参加されたと思いますが、2022年11月21-22日に淡路夢舞台国際会議場にてシンポジウムと領域会議を開催しました。今年度も新型コロナウイルス COVID-19 対策として、会場とオンラインのハイブリッドで開催しました。非常に盛会で現地参加76名、オンライン参加38名、総計114名に参加いただきました。現地参加の学生さんが多かったことがとても印象に残っています。その影響か、これまでで最多の48件のポスター参加があり、若手研究者も交えて活発な意見交換・交流が行われました。シンポジウムは、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より計10名に講演いただきました。プロジェクトも後半に入り、今回庄司先生にお話しいただいたような、高速分子動画実験と計算科学を組み合わせた成果が上がってきており、このまま最後までこのようなケースを増やしていきたいと思っています。今年もどうぞよろしく願いいたします。

Happy New Year! We will be holding an international symposium this year, and I would like to make this a year of summarizing our achievements toward our goal. As many of you may have attended, we held a symposium and a regional meeting at the Awaji Yumebutai International Conference Center on November 21-22, 2022. This year, as a countermeasure against the novel coronavirus COVID-19, we held the symposium as a hybrid of on-site and online presentations. The symposium was a great success. We had 76 on-site and 38 online participants, for a total of 114 participants. I was very impressed by the large number of students who participated on-site. Perhaps due to this, 48 posters were submitted, the largest number to date, and there was a lively exchange of ideas and opinions among the young researchers. The symposium was attended by 10 speakers from the fields of computational science, chemical biology, spectroscopy, and structural biology. As we enter the second half of our project, we are starting to see results from the combination of molecular movie experiments and computational sciences, such as the one presented by Dr. Shoji this time. I am very much looking forward to the further development of the project.



領域代表 岩田想 (京都大学医学研究科)  
PI So Iwata (Kyoto University)



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

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

*Newsletter, vol 10, January 2023*

<b>From the P.I.</b>	<b>2</b>
<b>Table of contents and Summaries</b>	<b>3</b>
<b>Research Topics</b>	<b>4</b>

[Junpei Yamamoto \(Osaka University, A01 group\)](#)

Our group is interested in mechanisms how DNA repair enzymes recognize DNA lesions and restore intact nucleobases. In this highlight article, I introduce our work on a DNA repair enzyme, photolyase, responsible for light-dependent repair of UV-induced DNA damage. This enzyme is a member of photolyase/cryptochrome superfamily flavoproteins involved in light-dependent DNA repair and signal transduction, and we are tackling with their photoreactions investigated by using time-resolved serial femtosecond crystallography at SACLA and SwissFEL.

[Tetsuro Katayama \(Tokushima University, C01 group\)](#)

Transient absorption microscopy, which is a spatio-temporally resolved measurement, is one of the most important techniques for measuring photophysical and photochemical processes in mesoscopic areas. Here we briefly describe the technique of femtosecond transient absorption spectroscopy under a microscope.

[Michihiro Suga \(Okayama University, A01 group\)](#)

This article outlines the research background and interests of Prof. Suga at Okayama University, who is a member of PI screened from public calls. He also comments on extrapolated electron density maps, which have been shown to be useful in performing a time-resolved serial femtosecond crystallography.

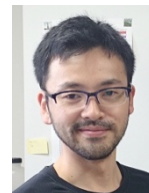
<b>Events Calendar and Announcements</b>	<b>7</b>
--	----------



## ハイライト研究紹介

### 光回復酵素・クリプトクロムの光応答反応解析

#### 山元淳平 (大阪大学・A01 公募班)



A01 公募班に参画させていただいています山元淳平です。私は DNA 断片であるオリゴヌクレオチドの化学合成を背景にもち、なかでも化学構造が変化した損傷 DNA の合成とそれを修復する酵素の反応機構解析を中心に研究を行ってきました。本稿では、現在 XFEL による時分割構造解析に取り組んでいる光回復酵素・クリプトクロム研究について紹介させていただきます。

光回復酵素はフラビンアデニンジヌクレオチド FAD を補酵素に持つフラビントタンパク質であり、太陽光の中でも高エネルギー成分である紫外線によって形成されるチミン二量体を、より低エネルギー成分の青色光を用いて元の塩基構造へと戻す DNA 修復酵素です。その反応の本質は二電子還元型 FADH<sup>-</sup> の光励起に伴う電子移動反応であり、損傷 DNA への電子移動により共有結合の組み替わりが誘起されることで、正常な DNA 構造へと戻すことができます。紫外線損傷 DNA の中でも変異原性の高い(6-4)光産物の修復は(6-4)光回復酵素が担っているのですが、その修復反応機構はかねてより研究がなされてきた CPD 光回復酵素とは異なることが考えられてきました。私は2013年に(6-4)光回復酵素による DNA 修復は2度の電子移動を必要とする逐次的2光子反応であることを報告しましたが(図1右、*Angew. Chem. Int. Ed.* 2013)、1光子目の反応で生じる中間体の化学構造については依然として明らかになっておらず、直接的な証拠を得るために奔走していました。

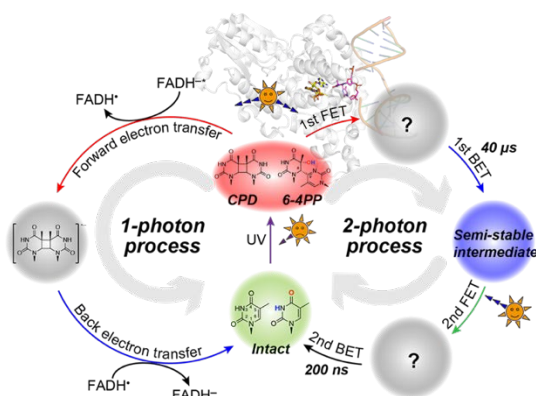


図1. 光回復酵素による DNA 修復

そのような状況の中、2016年にドイツ・フィリップ大マールブルグの Lars-Oliver Essen 教授、台湾・中央研究院(当時)の別所義隆客座教授と Manuel Maestre-Reyna 博士から、XFEL を用いた光回復酵素の時分割シリアルフェムト秒 X 線構造解析に関する共同研究についてお声かけいただきました。論文上ではそのような測定ができるのは知っていましたが、その研究手法に私自身

が関与できる可能性を考えておらず、前述の DNA 修復中間体を直接捉えられる有力な手段であることにその時になってようやく認識することができました。

2017B 期より採択された SACLA 別所課題に毎回参加させて頂く機会を得、まずは光回復酵素が保有する FAD を光によって還元する光活性化過程に関する TR-SFX 測定を行ったところ、FAD アニオンラジカルの生成に伴って、近傍に存在するアルギニン側鎖が FAD に近づくことで電荷を中和してアニオンラジカル状態を安定化している様子を捉えることに成功しました (*Nat. Chem.* 2022)。また、異なる酸化還元状態の FAD を有する光回復酵素の常温無損傷構造解析を行い、各々の酸化還元状態に特徴的な FAD イソアロキサジン環構造を初めて明らかにしました。

光回復酵素は TR-SFX 測定のよい対象となることを示すことができたので、DNA との間で起こる修復反応を捉えることが次のステップとなりますが、(6-4)光産物修復の TR-SFX による中間体構造解析を行うためには、適切な遅延時間を決定する必要があります。そこで、DNA 修復反応にて過渡的に形成される FADH<sup>\*</sup> の寿命を分光学的に決定したところ、一光子目の反応では 40 μs の寿命であったのに対して、二光子目の反応では 200 ns であることがわかりました (*ACS Catal.* 2022)。これらは溶液中での測定結果なので、結晶中での条件とは異なりますが、おおよそのタイムスケールとしては同程度であることが期待できます。

現在は、光回復酵素による DNA 修復反応を捉えるために酵素-DNA 共結晶の作成およびそれを用いた TR-SFX 測定に取り組んでいます(図2)。2021年度からの JST 創発プロジェクトでは、光回復酵素以外の DNA 修復酵素の反応過程を捉えることも目指しています。本領域の皆様のお力添えを頂いておりますので、領域の皆様の刺激になるように今後も取り組んで参りたいと思います。



図2. 2022年 SACLA ビームタイム後のグループ写真

## ハイライト研究紹介

### フェムト秒顕微過渡吸収分光法

#### 片山哲郎 (徳島大学・C01 公募班)



公募班として加わりました徳島大学の片山哲郎と申します。フェムト秒時間領域での顕微鏡下で行う顕微過渡吸収分光計測について、簡単にご紹介させていただきます。物質科学の分光研究には、電子スピン共鳴、核磁気共鳴、赤外吸収やラマン、また発光、紫外可視吸収などの多くの分光手法が用いられていますが、これらの分光法の多くは、時間分解計測においても広く利用されています。特に、過渡吸収分光と呼ばれる時間分解電子スペクトルの測定法は、(1) 電子励起状態、基底状態、イオンラジカル、ラジカルなどの多くの化学種を検出できること、(2) 参照化学種のスペクトルを用いた中間体の同定が比較的容易であること、(3) 分子吸光係数が既知の場合には反応生成量や反応量子収率などの定量的な知見が得られること、(4) 電子遷移の周波数から決定される時間分解能は一般的にはフェムト秒程度であるので原理的に高い時間分解能を得られること、などの利点を有していることから、化学反応ダイナミクスの研究においては中心的な手法として広く用いられてきました。

Fig.1 に装置のブロックダイアグラムを示しています。光源には再生増幅されたフェムト秒チタンサファイアレーザー (Solstice, Spectra Physics, 3.5 W, 795 nm) を用い、基本波をビームスプリッターで分け、片方は光学遅延台を通して光パラメトリック増幅器 (TOPAS, Light Conversion) に通して波長変換し、近赤外光 (シグナル光、1300 nm) を観測光として用いています。この 1300 nm のシグナル光は回転セル中の  $\text{CaF}_2$  板に集光しスーパーコンティニューム光を発生させ、対物レンズが紫外域と近赤外を吸収するので、通常の計測では 400-800 nm の波長域を計測しています。反射対物レ

ンズを用いると原理的には 330-1100 nm 程度までのスペクトル計測が可能です。励起光は第二高調波または自作非同軸パラメトリック発振器を用いて 400-750 nm の波長域で変換できるようにしています。空間分解能は 1  $\mu\text{m}$  程度で、時間分解能は試料の光損傷が小さい系ならば反射対物レンズを用いて 20 fs 程度まで向上させることができます。(現状では 1  $\mu\text{m}$  に集光すると試料の光損傷が生じてしまうため 100 fs 程度の時間分解能計測を行っています。) 2022 年の 12 月にダイナミックレンジの高く、縦チャンネル数を比較的少なくしても再生増幅レーザー程度の周波数で計測できる s-CMOS カメラを導入しましたので、今後は光損傷を抑えて高時間分解能での顕微過渡吸収計測結果を領域会議でもお見せできると思います。

現在、領域の中では梅名先生、溝端先生らとフィコシアニンたんぱく質結晶系、GFP 系 (rs-Gamillus) たんぱく質結晶の励起状態ダイナミクスを計測し、XFEL 実験においてそれぞれの過渡状態検出に適した遅延時間を決定するなど XFEL 計測に相補的な観点から研究を遂行しています。領域の中で短い時間領域の電子状態変化を捉えていき、XFEL 計測の足掛かりとなる基礎データをご提供して、領域に貢献していく所存ですので、どうぞ気軽にお声かけください。

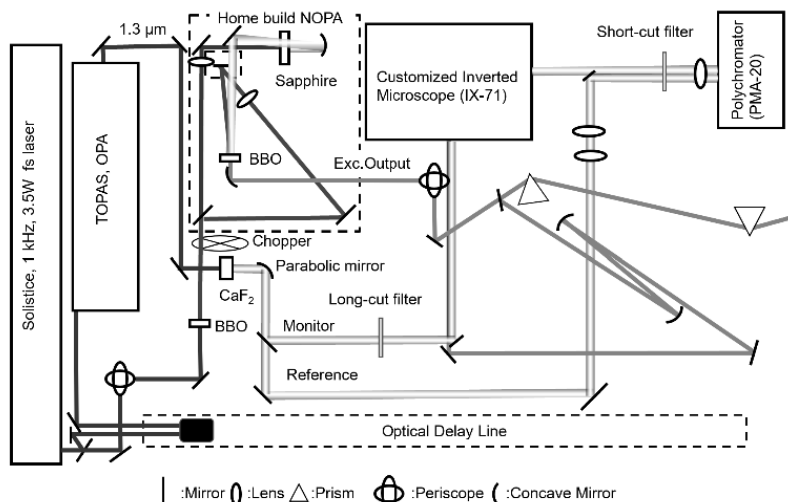


Fig.1 Block diagram of femtosecond transient absorption microscopy set-up



## ハイライト研究紹介

### 菅構造生命科学研究室

#### 菅 倫寛 (岡山大学異分野基礎研・A01 公募班)



公募A01班の菅 倫寛です。私は大阪大学の月原富武先生のご指導の下で学位をとり、学位取得後は結晶学を主軸とした構造生物学的な研究を展開してきました。もともと岡山市の出身なのですが、縁があって2012年より岡山大学の沈建仁先生の所でお世話になり、はや10年になります。2022年の4月からは独立して研究室を主宰しています。菅研究室では、これまでに進めてきたX線自由電子レーザーを駆使した光感受性光合成タンパク質の構造と機能のダイナミクスに関する研究を継続しつつ、クライオ電子顕微鏡やX線結晶構造解析によって輸送体やチャネルなどのタンパク質の構造と機能を明らかにする研究を展開しております。本稿では総括班の岩田先生、山本先生、南後先生、久保先生らと共同で行った光感受性光合成タンパク質の研究に関する最近の進展について紹介させていただきます。

酸素発生型の光合成では水分子を電子供与源として、光のエネルギーを利用してプロトンの濃度勾配と還元力が形成され、それぞれATP合成と二酸化炭素の固定に用いられます。光化学系IIは光の励起エネルギーを利用して水分子を電子とプロトンと酸素分子に分解する水分解反応を触媒します ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ + \text{O}_2$ )。この反応機構は光駆動の5段階の酸化状態を経て進行し、 $\text{S}_i$  ( $i = 0 \sim 4$ ) 状態サイクルと呼ばれます。暗黒条件下では $\text{S}_1$ 状態が安定に存在し、光を照射した回数によってS状態が遷移するので光化学系IIはX線自由電子レーザーによる解析向きのサンプルと言えます。私たちはSACLAを用いて $\text{S}_1$ 状態の放射線損傷のない構造を解析することに成功しました (*Nature* 2015)。さらに、励起レーザーを当てた後にそのまま、あるいは急速に凍結後にX線自由電子レーザーを照射して解析することで $\text{S}_2$ および $\text{S}_3$ 状態の構造解析を室温 (*Nature* 2017, *IUCrJ* 2021) あるいは凍結条件下 (*Science* 2019) を行ってきました。

これらの構造解析でしばしば問題になるのは各S状態の遷移に伴う構造変化が小さく、異なるS状態が混在してしまうことです。このようなケースでは、extrapolated mapを参考に構造モデリングを行うのが有効のようです。Extrapolated mapはポンプ状態とポンプされていない状態が混在する時に、ポンプ状態とポンプされていない状態の差に対して、ポンプ状態の占める割合 $f$ の逆数を乗じて得られる外挿の電子密度です (Genick, *Acta Cryst D* 2007)。このとき、 $f$ を過少に見

積もると誤差の伝播が大きくなり、過度に外挿された電子密度図になってしまうため注意が必要です。しかし、適切な $f$ の値は外挿電子密度図を基に構築したモデルから残差電子密度を確認することで比較的容易に決まります。この有用性については国際シンポジウム The molecular movies and beyond にて報告させて頂いた通りです。

公募研究では酸素発生しないタイプの光合成を行う、光合成細菌の反応中心のSFXに取り組んでおります。私たちは反応中心LH1-RCのX線構造解析に成功していますが (*Nature* 2018)、まだ試料調製に苦勞して時間分割SFXには進めていません。LH1-RCの光励起後の構造解析には上述の手法が役に立つと思われます。計画班、公募班の先生方と連携して、何とか最終年度には形にしたいと思っています。よろしくお願いたします。



岡山大 菅研究室のメンバー

## イベント情報

- 2023年11月30日(木)～12月1日(金) 「高速分子動画」国際シンポジウム2023 (淡路夢舞台国際会議場, オンラインハイブリッド開催予定)
- 2023年1月31日(火) 第27回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー  
(講演者: 原田 隆平 先生・筑波大, 島 扶美 先生・神戸大)
- 2023年1月19日(木) 第32回総括班会議 (Web)

## 2022年9月以降の領域活動

- 2022年12月13日(火) 第26回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー  
(講演者: 石北 央 先生・東京大, 日野 智也 先生・鳥取大)
- 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21日(月) 第31回総括班会議 (淡路夢舞台国際会議場)
- 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10月26日(水) 第30回総括班会議 (Web)
- 2022年10月25日(火) 第25回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー  
(講演者: 古賀 信康 先生・分子研, 鈴木 明大 先生・北海道大)
- 2022年10月17日(月)～18日(火) 蛋白研セミナー: Frontier of Dynamic Structural Biology  
(構造生物学と計算科学の融合による動的構造生物学の新しい展開)・協賛 (蛋白研+Online)
- 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9月13日(火) 第24回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー  
(講演者: 篠田 渉 先生・岡山大学)

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!

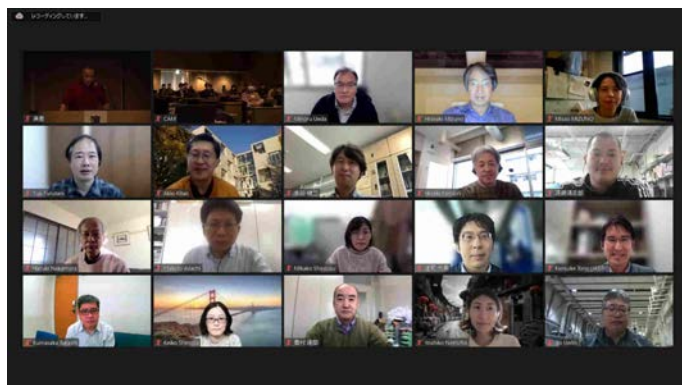
【HP】 <http://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp>

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/>



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)

開催報告はこちら

[https://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/12/R4\\_開催報告（写真有）.pdf](https://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp/wp-content/uploads/2022/12/R4_開催報告（写真有）.pdf)

## 総括班よりお知らせ

### 学術調査官

- 桶蔭 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