

Newsletter No.11
May.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

5月10日～11日に横浜で開催された領域会議は、大盛況のうちに終了しました。現地参加者87名、オンライン参加者21名、合計107名が会議に参加しました。これは、領域期間の初期段階でCovid-19のパンデミックに見舞われた私たちのプログラムにおいて、過去最大の現地参加者数となりました。シンポジウムには15名、クローズドセッションには8名が登壇し、46件のポスター発表がありました。特に、2日目に行われた若手研究者のシンポジウムは新しい企画でしたが、非常にレベルの高い発表が多く、この分野の今後の発展に期待したいと思います。総括班評価者の先生方からのコメントにもあったように、このプログラムを最後にこのフォーラムを解散してしまうのはもったいないことです。何らかの形で継続していきたいと思います。本フォーラムの前身は「膜タンパク質研究会」で、年に1回、手弁当で開催していたものです。同じような形でフォーラムへの参加をご検討いただければ幸いです。最後に、開催にご尽力いただいた横浜市立大学生命医科学研究科の朴先生、水谷先生、村岡様をはじめとするみなさま、京都大学分子細胞情報学の吉田さんをはじめとするみんな、理研SPRING-8センターの樋口さんをはじめとするみんなに感謝いたします。

Our programs' symposium held on May 10-11 in Yokohama, Japan, was a great success. A total of 107 people attended the meeting, including 87 local participants and 21 online participants. This was the largest meeting ever for our program, which was hit by the Covid pandemic in the early stage of the program. There were 15 speakers in the symposium, 8 speakers in the closed sessions, and 46 poster presentations. In particular, the symposium for young researchers on the second day was a new project, but there were many very high-level presentations, and we look forward to future developments in this field. As the board members commented, it would be a shame to dissolve this forum after this program. We would like to continue it in some form. The predecessor of this forum was the "Membrane Protein Research Group", which was held once a year on a voluntary basis. We hope you will consider joining our forum in a similar format. Finally, I would like to thank Dr. Park, Dr. Mizutani, Mrs. Muraoka, and others from Yokohama City University, Mrs. Yoshida and others from Kyoto University and Mrs. Higuchi and others from Riken SPRING-8 Center for their efforts in organizing this meeting.



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 11, May 2023

From the P.I.	2
Table of contents and Summaries	3
Research Topics	4

Toru Nakatsu (Wakayama Medical University, A01 group)

Our group is focusing on the luminescence reaction process of aequorin, which is a blue-luminescent protein of jellyfish. The blue light is transferred to a fluorescent protein, GFP which emits green fluorescence in jellyfish. The luminescent substrate, coelenterazine is oxidized to peroxidized coelenterazine which is stabilized and bound in aequorin. The blue luminescence induced by aequorin is due to a conformational change caused by calcium binding. Currently, We are working to investigate its luminescent reaction by time-resolved crystallography at SACLA and SPring-8.

Takeshi Murakawa (Osaka Medical and Pharmaceutical University, A01 group)

In order for enzymes to catalyze chemical reactions effectively and specifically, it is essential to optimize the active site environment at each reaction step, thereby reducing activation energy and achieving reaction specificity. We aim to elucidate the catalytic mechanism of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* kinetically and structurally using mix-and-inject serial femtosecond X-ray crystallography at SACLA.

Ayori Mitsutake (Meiji University, C01 group)

Molecular simulation algorithms, such as generalized ensemble algorithm, relaxation mode analysis, and reference interaction site model theory have been developed or incorporated for investigating protein stability, dynamics, and functions in my group. In our research project, we have investigated the dynamics of the orexin 2 receptor, which is one of class A GPCRs using molecular simulations. In the newsletter, our results on molecular simulations of the orexin 2 receptor and its mutants were briefly described.

Events Calendar and Announcements	7
--	----------

ハイライト研究紹介

発光タンパク質の時分割 X 線結晶構造解析

中津亨 (和歌山県立医科大学・A01 班)



A01 永野班の分担者として参画させていただいております中津亨です。2021年4月に開学した和歌山県立医科大学薬学部教授として着任しました。所属している薬品物理化学研究室は建物最上階の11階にあり、目の前に和歌山城を眺めることができます。また隣には和歌山城ホール(2021年10月開館)があり、和歌山の学術文化の中心地になっていけば良いなあ、と思っています。和歌山は非常に遠いというイメージがありますが、大阪から約1時間、関西国際空港から約40分と比較的に位置し、食べ物も美味しいです。すでに研究室に来ていただいた方に伺うと、「思ったより近いですね」、とおっしゃられますので、是非お立ち寄りください。

現在研究室は准教授の入江克雅さん、助教の森口舞子さん、博士課程1年の真栄田有紀さんの4人体制です。私と森口さんは生物発光、入江さんと真栄田さんはイオンチャンネルを主な研究テーマとし、構造生物学研究を軸にして分子機構の解明をおこなっています。ようやく3年目を迎え、学生の数も300人となり大学も少しずつ活気づいてきているところです。10月になると3回生が研究室配属となるので、その日を待ち侘びています。

SACLAでの実験は、領域代表である岩田想さんが代表を務めた「創薬ターゲット蛋白質の迅速構造解析法の開発」(2012-2017年度)に参加させていただいたのがはじまりです。SACLAからのX線強度は非常に強いことから1回のX線照射で結晶が壊れてしまうほどの大きなダメージを与えます。そのため微結晶をX線照射位置に連続的に導入してデータを収集するSFX実験が開発されました。それでは、この手法で撮ったデータで新規立体構造は決定できるのか?データの精度はどの程度なのか?解析に必要なイメージデータはどの程度なのか?を明らかにしたいと考えました。そこで、Single-wavelength Anomalous Dispersion (SAD)法による構造解析を計画しました。構造解析の際によく用いられる1Å程度の高エネルギーのX線波長を使うことができたのは、その当時SACLAだけでした。そこで、SACLAの優位性をアピールすることも鑑み、ルシフェリン再生酵素の微結晶を作成し水銀によるSAD法を行いました。当初はうまく構造が決定できなかったのですが、まずはSingle Isomorphous Replacement with Anomalous Dispersion (SIRAS)法による構造決定を行いました(*Sci.Rep.* 2015)。その後、処理ソフトの改良が進み、理研播磨の山下恵太郎さん(現MRC)、東大の中根崇智さん(現阪大蛋白研)らが精力的に解析を進めてくれた

おかげで、SAD法による構造解析に成功しました(*IUCrJ.* 2017)。SACLAのBeam Time中に2人が嬉しそうに「解けましたよ」と報告しにきてくれ、喜びあったことを昨日のように思い出します。

現在は青色発光するオワンクラゲのイクオリンの発光反応過程を明らかにすべく、時分割X線結晶構造解析をSACLAやSPRING-8を用いて行なっています。この青色発光は蛍光タンパク質であるGFPに受け渡され、オワンクラゲが緑色に光る際に用いられています。発光基質であるセレンテラジンがアポ体のイクオリン中に取り込まれて酸化され、過酸化状態のセレンテラジンがタンパク質中で安定化された状態で結合している、これがイクオリンです。イクオリンは高エネルギー化合物を安定化しているという非常に稀有なタンパク質であり、カルシウムの結合により構造変化を起こして青色発光すると考えられています。GFP研究でノーベル賞を受賞された下村脩博士が2000年にイクオリンの立体構造を決定され、過酸化状態が確認されましたが、X線によるダメージを受けていました。そこで、イクオリン微結晶を作成し、SACLAにおいてSFX実験を行ったところ、非常に綺麗な過酸化状態を確認することができました(未発表)。現在、イクオリン微結晶懸濁液とカルシウム溶液を反応させた後の立体構造を、反応時間を変えながらSACLAやSPRING-8で測定し、イクオリンが発光に至る過程の時分割測定を行っています。残りの時間で少しでも反応過程を明らかにしていきたいと考えています。



和医大薬・薬品物理化学研究室のメンバー

ハイライト研究紹介

銅含有アミン酸化酵素の二液混合時分割 SFX 村川武志 (大阪医科薬科大学・A01 公募班)



A01 公募班に参画させていただいている村川武志です。本稿では、公募班として取り組んでいる、銅含有アミン酸化酵素の二液混合 SFX について紹介させていただきます。本酵素の研究は、大阪大学の谷澤克行先生（現名誉教授）により 1990 年代から始められ、現在は岡島俊英先生が中心となり行われています。私は谷澤研究室の大学院生として参加したのがきっかけで、現在までこの研究に関わっております。

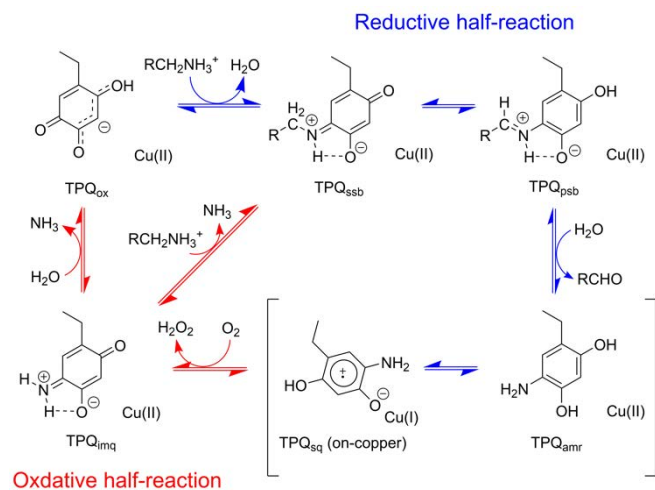


Figure 1 Presumed catalytic mechanism of copper amine oxidase.

銅含有アミン酸化酵素は生物界に広く分布し、種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒します。本酵素はホモダイマー構造をもち、各サブユニットは、補欠金属の 2 価銅イオンと補酵素トパキノン (TPQ) を含有しています。触媒過程は、TPQ の酸化還元状態により、前半の還元的半反応と、後半の酸化的半反応に分けられます (図 1)。私たちはこれまでに、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来銅含有アミン酸化酵素 (AGAO) を研究対象とし、速度論および構造学的解析から、補酵素 TPQ が、銅イオン非配位型 (off-Cu) と配位型 (on-Cu) をもち、前者で Asp298 との酸塩基反応、後者で銅イオンとの酸化還元反応を行うことを明らかにしました (図 2)。さらに B01 山本班の馬場清喜先生らが開発した HAG 法を用いて、構造変化を熱力学的に解析しました。補酵素 TPQ が大きくコンフォメーションを切り替える機構は、本酵素の重要な特徴ですが、得られた構造は変化前・後のものであり、TPQ 面のスライドや反転を伴う大きな構造変化が、なぜ周辺残基とぶつからずに進行できるのか、という大きな謎が残りました。ちょうどそのころ B01 南後班の鈴木守先生より二液混合時分割 SFX をご紹介いただき、今回の研究へと繋がりました。

本研究の準備として、私たちは B01 南後班のご協力のもと SFX 測定に向けた微結晶 (3-5 μm) の大量生産系を確立し、SACLA にて十分な回折像を得ることに成功しました。さらに、測定は嫌気下で

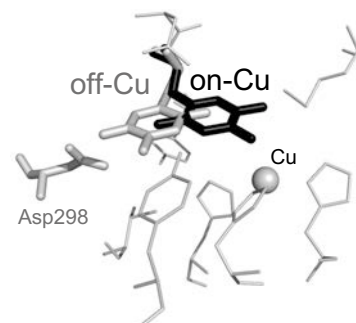


Figure 2 Conformational change of TPQ

行う必要があるのですが、嫌気下で長時間基質を加えた微結晶についても SFX 測定し、測定終了時まで試料が嫌気状態に保たれていることを確認しました。上記により、本酵素の二液混合 SFX は SACLA 実施課題として採択され、2020 年以降、測定を実施しています。

測定では、酵素微結晶液と基質液の混合から XFEL 照射までの時間 (遅延時間) を変えることにより、反応開始後、数十ミリ秒から数百ミリ秒オーダーでの構造変化を追跡しました。これまでに、遅延時間に沿ったいくつかの反応中間体の検出に成功しております。特に反応終盤の補酵素 TPQ の off-Cu から on-Cu へのコンフォメーション変化を明確にとらえることができました。

SACLA での二液混合 SFX 測定は、試料充填 (特に嫌気下で行う場合は煩雑になります)、回折測定、構造解析 (測定と並行して構造解析を行い、残りビームタイムの測定条件を検討します) など多くの人員が必要となります。このため測定は 4,5 名 x 2 交代で行われており、B01 南後班の先生方や、上述の岡島先生、鈴木先生に加え、大阪医科薬科大学の福井健二先生、大阪公立大学の宮原郁子先生、B01 南後班の榎田哲哉先生、A01 公募班の當倉武彦先生、A01 班の溝端栄一先生、さらに各先生方の研究室に所属する学生さんのご協力を頂いております。これまでの約 2 年半の二液混合 SFX 測定で、AGAO の反応過程全体についてのおおよそのランドスケープを描くことに成功しており、今後は pH や基質を変えることにより、反応の詳細を明らかにすることを目指します。得られた結果については、C01 班の庄司光男先生との計算による共同研究も実施予定です。

二液混合 SFX は今後の SFX の主流になりうる汎用性の高い技術ですが、まだ確立されたとは言い難い状況です。今後とも本領域の先生方と連携し、本技術の発展を通して本領域に貢献できればと考えております。どうぞよろしくお願いいたします。



ハイライト研究紹介 分子シミュレーションを駆使したオレキシン受容体の機能機構の解明 光武亜代理 (明治大学・C01 公募班)

2021年度からC01の公募班に加わりました。これまで分子シミュレーションのアルゴリズム開発を重点的に行ってきました。サンプリング手法である拡張アンサンブル法やトラジェクトリーからレアイベントを抜きだす動的解析手法である緩和モード解析を開発してきました。また、主に丸山博士との共同研究で溶媒の効果を見積もるRISM理論を生体高分子系に適用してきました。近年、これらの手法を駆使して、より複雑な蛋白質の安定性、ダイナミクス、機能メカニズムの解明などの応用研究を行いたいと考えています。

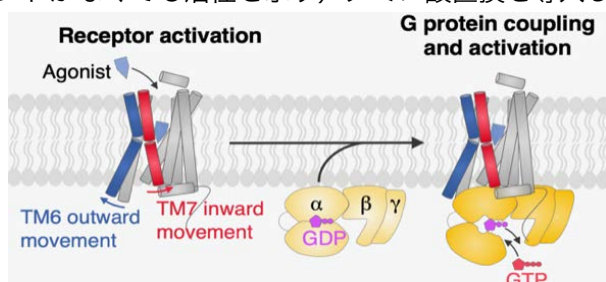
明治大学に2018年4月に准教授として赴任し、2019年から当時4年生(現在博士後期課程2年生)の横井さんが主となり膜蛋白質のGタンパク質共役受容体(以下、GPCRs)の研究を立ち上げました。図のようにGPCRsは7回膜貫通ヘリックス(TM)からなります。リガンドであるアゴニスト(作動薬)と細胞外側で結合すると、活性構造にシフトして細胞内側でGタンパク質と結合し、シグナルを伝達します。不活性構造とは細胞内側でGタンパク質が結合できない構造で、活性構造とはGタンパク質との結合過程の構造です。よって、X線結晶構造解析で、不活性構造は解かれています。活性構造は少ないです。近年、クライオ電子顕微鏡法でGタンパク質との複合体として活性構造が解かれており、急激に研究が進んでいます。岩田先生が主催する研究会で関西医科大学の寿野博士と知り合い、Class A GPCRのオレキシン2受容体の計算を開始しました。ここでは、オレキシン2受容体に関する我々の最初の研究“Yokoi, S. and Mitsutake, A., JCPB, 125, 4286(2021)”について簡単に紹介します。

不活性と活性構造の違いは、図のTM6(青)の外向き動きと、TM7(赤)の内向き動きによるものと知られています。シミュレーションの解析で、2つの状態を区別するには上記は少し曖昧で、具体的な原子間距離などの指標が提案できないか考えました。リガンドなしで不活性から活性構造への構造シフトをシミュレーションで実現しなかったため、他のGPCRで恒常活性を示す(リガンドがなくても活性を示す)アミノ酸置換を導入して

シミュレーションを実行しました。緩和モード解析を用いて解析すると、恒常活性変異体のV309^{6.40}Yにおいて、不活性から活性構造の方向にシフトする構造変化が起こっていることが分かりました。これを詳細に解析し、これまでの実験のデータベースとも照合して、Class A GPCRに関して、TM3上のx(3.46)とTM7上Y(7.53)のアミノ酸間の距離が不活性と活性構造を区別するのに良い指標であることを示唆しました。また、TM6とTM7の構造変化の際、M305^{6.36}とL367^{7.56}の側鎖の構造スイッチングが必要でした。(ただ先日、オレキシン2受容体のV309^{6.40}Yの恒常活性については良い結果が得られていないことが分かりました。原子間距離に関しては実験データのサポートがありますが、オレキシン2受容体に関するV309^{6.40}Yの恒常活性に関しては議論が必要です。)現在、アゴニスト、アンタゴニストやGタンパク質との複合体の分子シミュレーションを実行して、研究を進めています。原子レベルでダイナミクスを解析することにより、リガンドについて何か知見を得られたらと思っています。また、他のGPCRsの系に関して共同研究を始めました。

他の最近の研究としては、10残基のシニョリンの準安定構造を安定化するアミノ酸置換の提案(東京大学の竹内博士の指導のもと学生がNMRの構造決定しました)、環状ペプチドのシミュレーションなどの研究を行ないました。コロナ関係では名古屋大学の吉田博士と丸山博士との共同研究で、ACE2とRBDの結合に関して、RISM理論を用いて溶媒効果も含めた安定性の解析を進めています。並列して方法論を開発しています。緩和モード解析を開発した元同僚の高野名誉教授と高野グループで学位取得して現在産総研の唐澤博士と緩和モード解析と非弾性中性子散乱実験から得られるデータの比較に関する共同研究を行なっています。方法論の開発も、理論の開発やその検証の積み重ねが必要で時間のかかる研究ですが、唐澤博士が主として実直に進めています。他、いくつかの研究も進めています。

オレキシン2受容体の研究において、コロナの中、オンラインで寿野博士にGPCRsの基礎的な知識から教えてもらいました。実験研究者に聞かなければわからないことも多く、本新学術ではGPCRに関連した研究をしている実験の研究者が多いので色々と議論できればと思います。オレキシン2受容体の性質を理解するとともに、Class A GPCRsで共通のメカニズムについて調べられたらと思っています。どうぞよろしくをお願いします。





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月以降の領域活動

2023年5月23日(火)	第30回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー (講演者: 苮口友隆先生・慶應大, 大和田成起先生・JASRI)
2023年5月10日(水)～11日(木)	令和5年度新学術領域「高速分子動画」シンポジウム・領域会議 (横浜+zoom)
2023年4月4日(木)	第34回総括班会議(Web)
2023年3月28日(火)	第29回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー (講演者: 寺田透先生・東京大, 菅倫寛先生・岡山大)
2023年3月1日(水)	第33回総括班会議(Web)
2023年2月28日(火)	第28回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者: 丸山豊先生・統計数理研究所, 古田寿昭先生・東邦大)
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)

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
(理研横浜 交流棟, オンラインハイブリッド開催)

総括班よりお知らせ

学術調査官

- 桶葎 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