

Newsletter No.12
October.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

高速分子動画の国際シンポジウム「高速分子動画；今後の展開に繋げて」が11月30日から12月1日まで淡路夢舞台国際会議場で開催されます。趣旨については以前書いていますし、詳細については高速分子動画 web ページの記事 (https://cscenter.co.jp/mol_movie_2023/) をご覧ください。感慨深いのは、これが「高速分子動画」の最後の領域会議・シンポジウムになることです。前半はコロナの影響でミーティングができないことが多かったのですが、まだまだやり足りない気がするのですが、最近の会は盛況でポスターの数、ショートトークの数も随分増えました。高速分子動画法の確立という意味では新学術は完全に役割を果たしたとは言えないとかもしれないのですが、分野間の共同研究を促進するという意味では大成功だったと思います。シンポジウム・領域会議の共同研究促進に果たした役割は小さくないと思っています。これが出る頃にはもう申し込みが終わっていると思うのですが、多くの人に参加していただけることを期待しています。淡路島（または Zoom）でお会いしましょう！

The 2nd International Symposium "Molecular Movies; to be continued" will be held at Awaji Yumebutai International Conference Center from November 30 to December 1. The purpose of this symposium was described in the previous issue of the Newsletter, and for more information, please see the article on the Molecular Movies website (https://cscenter.co.jp/mol_movie_2023/). What is deeply moving is that this will be the last general meeting and symposium of the Molecular Movies Program; I still feel that without the CoVID pandemic, we could have had more meetings. Nevertheless, our recent meetings have been very successful, and the number of posters and short talks has increased considerably. While we may not have been able to realize all that we promised in terms of establishing methods for Molecular Movies, I think we have been very successful in promoting interdisciplinary collaboration. I believe that the symposium played no small role in promoting collaborative research. By the time the Newsletter is published, conference registration will have already closed, but I hope that many people will attend. See you on Awaji Island (or on Zoom)!



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 12, October 2023

| | |
|--|----------|
| From the P.I. | 2 |
| Table of Contents and Summaries | 3 |
| Research Topics | 4 |

Robert E. Campbell (University of Tokyo, A01 group)

Fluorescent protein-based biosensors enable the visualization of dynamic changes in the concentrations of ions or metabolites in cells. Such biosensors have the potential to revolutionize whole fields of cell biology but, unfortunately, the pace of development is slowed due to a poor understanding of the mechanisms by which they function. To address this goal, we are striving to obtain insight into the detailed atomic changes that occur when a biosensor interacts with its target.

Fumi Shima (Kobe University, A01 group)

Precise perturbation analysis linked to protein activity with high structural and temporal resolution is indispensable to elucidate a variety of dynamic cellular events including signal transduction, while it is often challenging without appropriate structure analysis strategies by combination with favorable tool proteins, that enable to visualize a wide-range of time-resolved protein-catalytic reactions at atomic level. Visualization, instead, will provide attractive information that proceed our knowledge for structure-activity relationship of various proteins of our interests, and may offer a clue for development of novel protein engineering approaches, and for discovery or improvement of the agents targeting disease-associated proteins, that fulfill unmet medical needs.

Shigehiko Hayashi (Kyoto University, C01 group)

Hayashi group (Publicly Offered Group in C01) has been conducting theoretical studies on biological functions by means of molecular simulations. We have developed a hybrid method combining an ab initio quantum chemistry calculation of a functionally active site with a long-time molecular dynamics simulation of the surrounding biological molecular systems, which allows one to simulate a complex chemical reaction of the active site coupled with large conformational changes of the biological systems. We have been studying with the method a bioluminescent reaction of aequorin in collaboration with Nakatsu group in this research area and photo-activation of anion channelrhodopsin.

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

ハイライト研究紹介/Research Highlight

Investigating Fluorescent Protein-based Biosensors
Robert E. Campbell (Univ of Tokyo · A01 group)


Fluorescent protein (FP)-based biosensors (**Fig. 1**) have revolutionized specific fields of cell biology research, with the most notable example being neuroscience. This major impact in some, but not all, fields of cell biology research is attributable to the limited selection of high-performance biosensors that are currently available. Researchers in the area of neuroscience have benefited tremendously from the availability of the highly optimized GCaMP Ca^{2+} biosensor for imaging of neural activity in model organisms. Unfortunately, no other biosensors have been optimized to the same extent as GCaMP, and therefore the impact of fluorescent biosensors on the broad fields of cell biology has been limited. A major limitation for development of a broader range of high performance biosensors is the almost complete lack of understanding of the mechanisms by which these biosensors actually operate. For most biosensors, our depth of understanding the mechanism of the response does not go much deeper than the ‘cartoon’ schematic represented in **Fig. 1**.

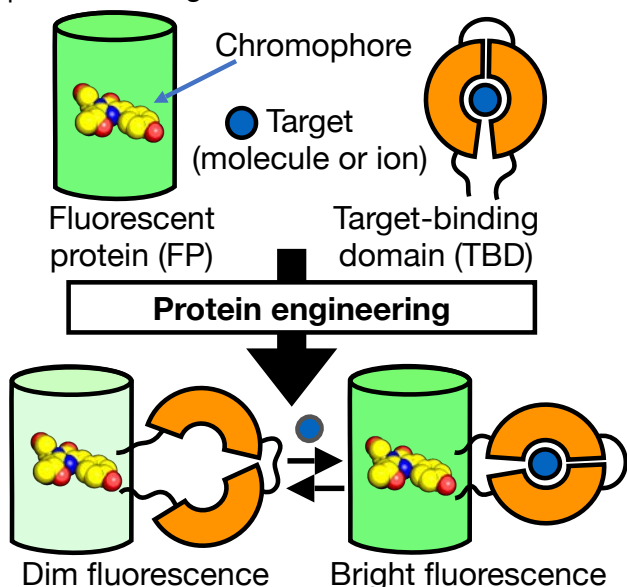


Figure 1. FP-based biosensors are engineered proteins composed of a genetic fusion of an FP and protein that binds to a molecular or ion of interest (the target).

The Biomolecular Chemistry lab at The University of Tokyo is focused on expanding the toolbox of FP-based biosensors using protein engineering and directed evolution. Our primary goal is to democratize FP-based biosensors, and create tools that have the potential to revolutionize sub-disciplines of cell biology that have not yet benefited from these types of tools. Our secondary goal has been to better understand biosensor responses

in terms of specific molecular mechanisms. In one representative example, we developed the eLACCO L-lactate biosensor with the goal of revolutionizing the study of cell metabolism and intercellular L-lactate transport (**Fig. 2**).

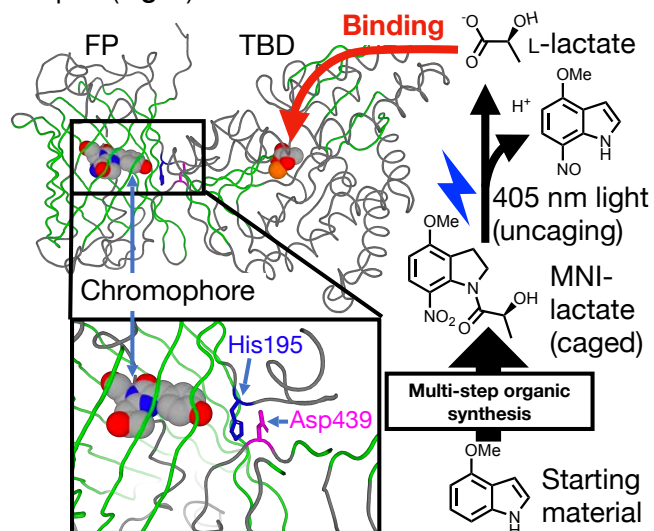


Figure 2. An example of a FP-based biosensor is eLACCO L-lactate biosensor (PDB ID 7E9Y), developed in our laboratory. With the support of the Molecular Movies grant, we developed “caged” MNI-lactate that enables the photo-induced release of L-lactate.

Based on the crystal structure of eLACCO, we proposed a mechanism in which the neutral (dim) chromophore is stabilized by interaction with Asp439 in the absence of L-lactate and, in the presence of L-lactate, the anionic (bright) chromophore is stabilized by interaction with His195. The goal of our Molecular Movies grant was to obtain an unprecedented understanding of a biosensor response mechanism by visualizing the eLACCO conformational changes that occur upon L-lactate binding.

Towards this goal we developed MNI-lactate (**Fig. 2**), that enables the rapid photo-induced release (uncaging) of L-lactate. We anticipate that this new reagent will prove invaluable for the acquisition of high-speed molecular movies of the eLACCO conformational change. We have also found that MNI-lactate is suitable for release of L-lactate in the presence of cultured cells, thereby providing a powerful new way to artificially perturb and investigate cellular metabolism using time-lapse microscopy. Although we have not yet succeeded in making atomic-scale molecular movies of the biosensor, it is fascinating that this project has led us to a new tool for making cell-scale molecular movies!

ハイライト研究紹介

光制御型 RAS を用いたがん化シグナル伝達機構の

原子スケールでの解明

島扶美 (神戸大学・A01 公募班)



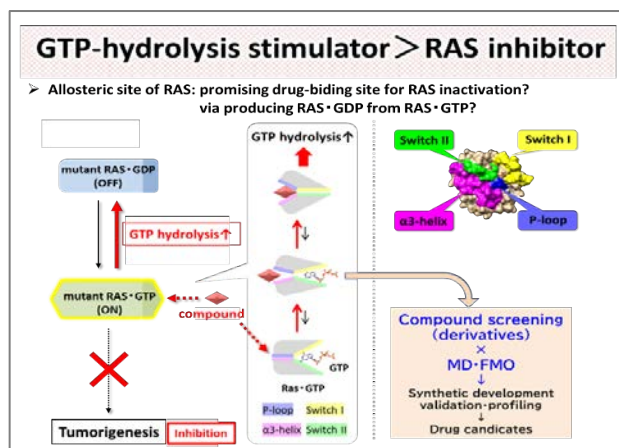
A01 公募班として参画させて頂いている島扶美です。私はもともと消化器内科医として7年間ほど臨床の現場で働いておりましたが、出身大学である神戸大学医学研究科の大学院への進学をきっかけに基礎医学研究者となり、がん遺伝子産物 RAS のシグナル伝達系の分子生物学・構造生物学の研究に携わることになりました。2016 年から現所属である神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科・先端医療学講座において、構造ベース創薬を基軸とした医薬品開発候補品の創出を目指す研究活動を行う研究室の運営をしています。

研究室では、バイオ専門の特命准教授・吉川陽子さん、構造生物学特命助教・榎野義輝さん、修士課程の学生さん、技術補佐員さんたちと非常にコンパクトな体制ではありますが、個性的な面々と日々活発な議論を交わしながら、理化学研究所（計算科学、有機合成化学）、JASRI、米国・メモリアルスローンケタリングがんセンターなど、国内外の機関との共同研究を通じて、医薬品開発とその分子設計に必須となる基盤情報収集のための RAS とそのシグナル関連分子群の原子スケールでの構造・機能解析を行っています。

酵素触媒反応全体の可視化には、反応の ON/OFF を同期できる基質あるいは基質・蛋白複合体が実験材料として必要です。また酵素触媒反応は、複数の反応ステップから構成されているので、各反応ステップすなわち種々の反応速度観測に至適な構造解析手法も必要となります。我々は、高速反応の可視化を得意とする Pump-probe time-resolved serial femtosecond crystallography (TR-SFX)、中速反応測定に適したクライオトラップ法による Serial synchrotron rotation crystallography (SS/ROX) と固体 ^{31}P -NMR、酵素触媒反応全体を各アミノ酸残基のキネティクスとして俯瞰できる溶液 NMR を組み合わせたマルチモード時分割構造解析を、RAS の酵素触媒反応の ON/OFF が光制御可能な RAS の基質である cagedGTP を付与した RAS-cagedGTP 複合体の微結晶サンプルと溶液サンプルに適応することで、2020 年度から A01 班公募班として表題プロジェクトを開始しました。SACLA での TR-SFX と SS/ROX による光制御による RAS の酵素触媒反応の可視化は、東北大学・南後恵理子先生 (B01 班) と JASRI の先生方 (河村高志先生、熊坂崇先生) との共同研究下で、2022 年度からは、ケミカルバイオロジー、光制御型基質などの分子設計・合成に精通しておられる、名古屋大学・清中茂樹先生、東邦大学・古田寿昭先生、岐阜薬科大学・永澤秀子先生か

ら積極的なご指導・ご協力を頂きながら、より精密な時分割構造解析を可能にする新たな cagedGTP を使用した、SACLA と SS/ROX による光制御による RAS の酵素触媒反応の可視化を進めています。この期間の研究成果としては、①RAS が内因性の GTP 加水分解反応により自身を不活化して OFF 構造 (ON 構造 = GTP 型; OFF 構造 = GDP 型) を生成する過程では複数の conformation を経由すること、②GTP の加水分解の現場である RAS 上のヌクレオチド結合領域とは遠く離れた部分領域 (アロステリック領域) で、加水分解の初動となる構造変化が起こり、それが RAS 分子内のパスウェイを伝播するという RAS のグローバルな構造イベントの結果として RAS の構造・機能が OFF となるだろうこと、などが分かってきました (論文投稿準備中)。

RAS の結晶構造は 30 年以上前に既に決定されており、古くから抗がん剤開発有望なターゲットとして世界中の製薬企業やアカデミアで医薬品研究開発が行われてきましたが、臨床の現場で使用可能な治療薬不在の時代が長らく続きました。しかし、2021 年の RAS のアイソフォームである KRAS の少数派のがん型変異 KRASG12C・GDP 特異的な阻害剤抗がん剤 (ソトラシブ) 上市を皮切りに、2 剤が漸く臨床現場で使用されるようになっていきます。しかし、これら 2 剤についても 2021 年の段階で既に薬剤耐性の問題が既に指摘されており、RAS が関与するがん領域ではまだまだアンメット・メディカル・ニーズを満たす医薬品の分子設計の効率化が必要です。我々の基礎研究が「RAS のアロステリック阻害剤 (不活化促進剤)」という新たな視点で、次世代のがん創薬のシーズ開拓・効率化に繋がるよう、今後も精力的に研究を進め成果を発信していきます。



ハイライト研究紹介

ハイブリッド自由エネルギー最適化法によるタンパク質機能活性化の理論的解明

林 重彦 (京都大学大学院理学研究科・C01 班)



C01 公募班に参画しております林重彦です。我々の研究グループでは、分子シミュレーションを用いて生体分子機能の分子機構の解明を行っています。多くの生体分子機能は、複雑な化学反応と生体分子の構造変化が協奏して現れます。一般的に、巨大な生体分子系の分子シミュレーションには、分子のエネルギーを古典的で単純な関数で近似した分子力場 (MM) を用いた分子動力学 (MD) シミュレーションが用いられ、生体分子の構造変化が調べられます。一方、化学反応を調べるためには、分子の電子状態を陽に取り扱う量子化学的手法 (QM 法) が必要であり、巨大な生体分子系の場合には、活性部位に QM 法を用い、周辺の生体分子環境を MM 力場で表すハイブリッド法である QM/MM 法が用いられています。しかし、部分的にでも QM 法を用いているために、計算コストが非常に増大し、通常の MD シミュレーションで調べられるような生体分子の構造変化との協奏的相関を見る事が出来ません。

そこで、我々は、QM 法と MD シミュレーションの計算手続きを完全に分離した上で、生体分子の全系の自由エネルギーを変分的に最小化する手法である QM/MM RWFE-SCF 法を開発しました。この手法では、活性部位の QM 計算による最適化と生体分子環境の MD シミュレーションが繰り返し行われ (図 1)、活性部位の化学的変化と相関する生体分子の大規模な構造変化を明らか

グが必要な変異体などの高精度な解析が可能になります。

我々は、これまでに本手法を用いてレチナルタンパク質の色変異体の理論デザインや光活性化中間状態の理論予測に成功してきました (図 2)。本領域では、本手法を用いて、主に光発光タンパク質イクオリンの化学発光反応機構の解明、及びアニオンチャネルロドプシンの光活性化構造のモデリングを行っています (図 2)。前者は、領域内の中津グループ (和歌山県立医科大) の TR-SFX 実験との共同研究です。中津グループにより得られた構造情報に基づき、発光反応の活性化分子機構を明らかにすることを試みています。TR-SFX 測定と理論計算の協同により、それぞれの手法のみでは達することができない知見が得られていると考えており、非常に有意義な共同研究が進んでいます。また、後者のアニオンチャネルロドプシン研究では、恐らく世界で初めてのチャネルロドプシンのチャネル開状態の原子構造モデルが得られたと考えています。安定な開状態のモデルが得られたことにより、実際にイオンのチャネル透過の分子機構のシミュレーションに進んでおり、今後の展開が楽しみです。

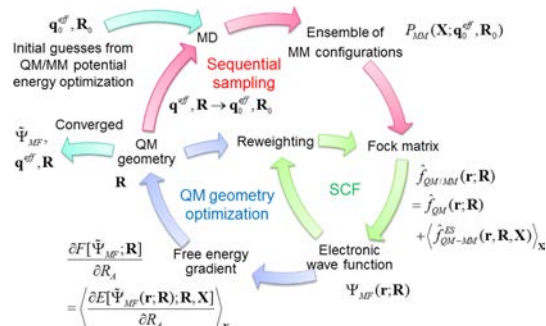


図 1 QM/MM RWFE-SCF 法の計算スキーム

にすることが出来ます。この手法により、正確な MM 力場の構築が難しい複雑な活性部位を含む機能性タンパク質分子や、長時間 MD シミュレーションによるモデリン

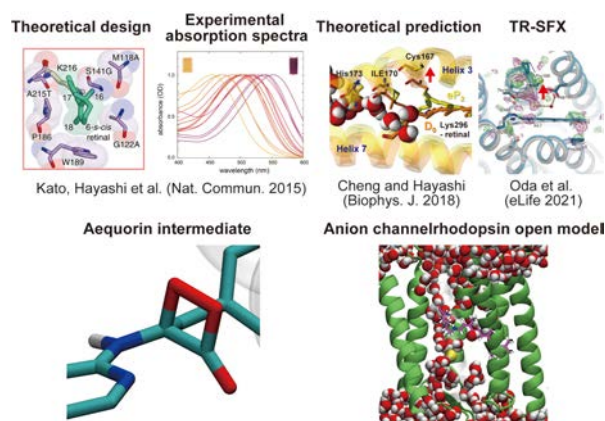


図 2 QM/MM RWFE-SCF 法によるタンパク質機能の理論的解析とデザイン。(左上) レチナルタンパク質の色変異体の理論的デザイン。100 nm の吸収波長シフトを達成。(右上) カチオンチャネルロドプシンの光活性化状態構造の理論予測。TR-SFX 測定構造の予測に成功。(左下) イクオリンの化学発光反応活性中間状態の自由エネルギー最適化分子構造。(右下) アニオンチャネルロドプシンの開構造理論モデル。

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10月4日(水) 第4回若手オンラインセミナー(講演者:松岡 佑真 先生・名古屋大, 長谷川 颯人 先生・鳥取大)

2023年5月以降の領域活動

- 2023年9月19日(火) 第33回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:李 秀栄 先生・医薬基盤・健康・栄養研, Maity Basudev 先生・東工大)
- 2023年9月19日(火) 第37回総括班会議(Web)
- 2023年8月23日(水) 第3回若手オンラインセミナー(講演者:杉浦 雅大 先生・名工大, Tran Phuoc Duy 先生・東工大)
- 2023年8月1日(火) 第32回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:奥村 久士 先生・自然科学研究機構, 梅名 泰史 先生・名古屋大)
- 2023年7月18日(火) 第36回総括班会議(Web)
- 2023年7月12日(水) 第2回若手オンラインセミナー(講演者:八木 清 先生・理研, 石本 直偉士 先生・横浜市立大)
- 2023年6月20日(火) 第31回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:鷹野 優 先生・広島市立大, 水野 操 先生・京都大)
- 2023年6月7日(水) 第1回若手オンラインセミナー(講演者:片山 耕大 先生・名古屋工業大, 志甫谷 渉 先生・東京大)
- 2023年6月6日(火) 第35回総括班会議(Web)
- 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:荳口 友隆 先生・慶應大, 大和田 成起 先生・JASRI)

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/>

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 |