

# 令和6年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：新領域開拓研究 研究期間：令和5年10月～令和8年9月（予定）

研究課題名：マルチスケール時間分解X線結晶構造解析による酵素学2.0の開拓

ラボ長

所属：大学院基礎工学研究科物質創成専攻機能物質化学領域

職位 准教授 氏名：山元 淳平

研究成果：

(概要)

本年度は共同研究者である Maestre-Reyna 博士、Royant 博士、八木博士らとともに、さまざまな時間領域におけるタンパク質もしくは酵素-DNA 複合体の時分割 X 線結晶構造解析ならびそれを補完する計算科学的研究を行った。フェムト秒～秒に至る広範な時間領域において起こる生体分子内もしくは生体分子間で起こる反応に伴う構造変化について知見を得た。

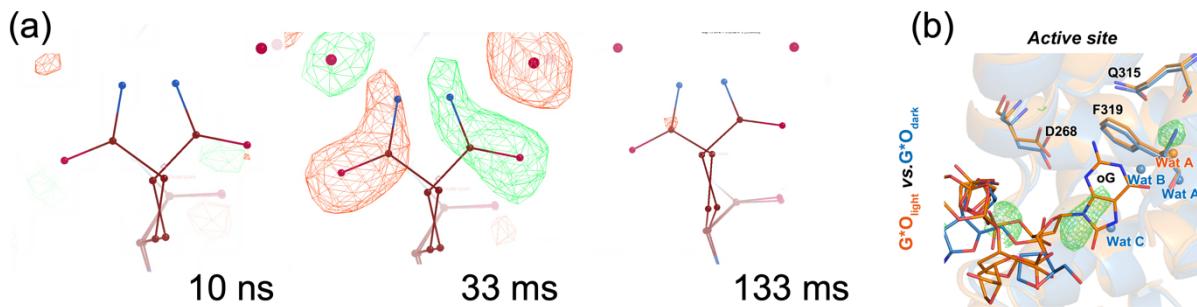
(本文)

本年は、さまざまな時間領域における時間分解 X 線結晶構造解析およびそれを補完する計算科学的研究を進めた。まず、非常に早い時間領域（フェムト秒～ピコ秒）における酵素反応の観測に向け、共同研究者・八木博士と議論を重ねた。その結果、山元の所属研究室出身で令和6年度現在、共同研究者の Maestre-Reyna 博士の研究室にて博士研究員をしている細川雄平博士を次年度以降に八木博士のもとで受け入れ、計算科学的研究を進める方針を決定した。なお、細川博士は令和7年度の JSPS 学振 PD に採択されている。

ナノ秒～ミリ秒の反応を追跡するため、SACLA 一般課題 2024A8028（2024 年 6 月 12～17 日）および 2024B8007（2025 年 2 月 14～16 日）（実験責任者：山元淳平）にて光回復酵素と呼ばれる青色光受容タンパク質の光応答反応を時分割シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析（TR-SFX）測定によって追跡した。その結果、光捕集アンテナ分子を有する光回復酵素における光応答反応について、ナノ秒からミリ秒におけるタンパク質構造変化を追跡することに成功した（図 a）。次年度中の論文投稿を目指す旨、Maestre-Reyna 博士と同意した。なお、光捕集アンテナ分子を持たない同酵素における光応答反応を TR-SFX 測定にて追跡した結果については、Science Advances 誌に責任著者の一人として論文を投稿し、現在査読審査後の改訂中である（論文 2）。

マイクロ秒～秒の反応を追跡するため、ESRF 課題 MX2664（2024 年 7 月 24～27 日、実験責任者・Manuel Maestre-Reyna）に参加し、共同研究者の Royant 博士が運用するビームラインにて、光回復酵素-DNA 複合体結晶を用いた時分割シリアルオシレーション X 線結晶構造解析（TR-SOX）を行った。しかし、回折が得られず、結晶化の条件を再度検討する必要があることがわかった。

光に応答しない酵素反応の追跡に向け、昨年度に得られたヒト由来 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼとケージ修飾 DNA (G\*O) の複合体結晶構造を精査したところ、光照射数秒後に DNA が酵素活性部位に取り込まれる様子を可視化することに成功した（図 b）。本成果は Maestre-Reyna 博士とともに責任著者として IUCrJ 誌に論文を投稿し、現在改訂版の査読審査中である（論文 3）。



図：(a)光回復酵素のTR-SFX測定結果、(b)  $G^*O$  の光照射に伴う構造変化

#### 研究経費（R6年度）の内訳：

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	728, 244 円	610, 683 円	0 円	261, 073 円	1, 600, 000 円

#### 共同研究者等：

##### (1)共同研究者（氏名・所属）

Manuel Maestre-Reyna · 台湾大学

八木清 · 筑波大学

Antoine Royant · ESRF

##### (2)研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

Hsuan-Yu Shih · 台湾大学 · M1

弓田桃子 · 大阪大学大学院基礎工学研究科 · M1

#### 発表論文等（令和7年3月31日現在）：

〔雑誌論文〕 1. Ban Y, Ando, Y, Terai Y, Matsumura R, Nakane K, Iwai S, Sato S, Yamamoto J.\* Profiling of i-motif-binding proteins reveals functional roles of nucleolin in regulation of high-order DNA structures. *Nucleic Acids Res.* 52, 13530-13543 (2024)

2. Maestre-Reyna M\*, (36名省略), Royant A, Tsai MD\*, Yamamoto J\*, Essen LO\*. Capturing structural intermediates in an animal-like cryptochromes photoreceptor by time-resolved crystallography. *Under revision.*

3. Imura T, Hosokawa Y, Yang KC, Ban Y, Shih HY, Yamamoto J\*, Maestre-Reyna M\*. Revisiting the co-crystal structure of a DNA glycosylase with photocaged substrate; a suitable time-resolved crystallography target? *Under revision.*

〔著書〕 なし

〔学会発表〕 Junpei Yamamoto, Enhanced light-driven DNA repair by a photolyase bearing an artificial light-harvesting chromophore, The 18th International Congress on Photobiology, August 26, 2024, Perth, Australia (招待講演)

〔その他〕 なし

外部資金獲得状況・申請状況：JST創発・フェーズ2中

参考となるHP等：<https://researchmap.jp/yamamotojunpei>