

シンポジウム | 中長期テーマシンポジウム：次世代分子システム化学のフロンティア—協奏的機能発現の素過程的理解

■ 2025年3月26日(水) 13:00 ~ 15:40 ■ [G]3101(第4学舎 3号館 [1階] 3101)

## [[G]3101-1pm] 次世代分子システム化学のフロンティア—協奏的機能発現の素過程的理解

座長、シンポジウム関係者：清中 茂樹、林 重彦

分子が複雑な集合体を形成するプロセスにより新たな分子機能の発現を目指す—それが次世代分子システムであり、そのフロンティアでは、従来の分子単体での機能に特化した化学では到達できない新規機能物質の開発に対して分野横断的な新たなアプローチが展開されている。分子を組み合わせることで1 + 1以上の新たな機能を創出するためには、それらの協奏的連動が不可欠である。本シンポジウムでは、高機能性を有する協奏的新機能の生成に向けた分子機能活性化の理解と分子デザインに関して議論を行う。特に生体分子などの高度で複雑な協奏的分子機能に関して、分子機能が発現する瞬間的な時空間状態を直接観測する計測技術、それを理論的にモデリングしデザインする理論技術、そして現実に新機能を創出する実験技術を独白に有する研究者を一同に集め、最新の研究成果の講演およびパネルディスカッションを行い、次世代分子システム化学の将来展開を討論する。

13:00 ~ 13:05

開会挨拶

◆ 日本語

13:05 ~ 13:18

[[G]3101-1pm-01]

機能性タンパク質の設計に向けたタンパク質構造ライブラリーの生成

○古賀 信康<sup>1,2</sup> (1. 大阪大学、2. 自然 ExCELLS)

◆ 日本語

13:18 ~ 13:31

[[G]3101-1pm-02]

AlphaFoldと分子シミュレーションの統合によるタンパク質機能発現ダイナミクスの解明

○岡崎 圭一<sup>1</sup> (1. 分子科学研究所)

◆ 日本語

13:31 ~ 13:44

[[G]3101-1pm-03]

分子が機能する瞬間を捉える：X線自由電子レーザーによる分子動画解析

○南後 恵理子<sup>1,2</sup> (1. 東北大学 多元物質科学研究所、2. 理化学研究所 放射光科学研究センター)

◆ 日本語

13:44 ~ 13:57

[[G]3101-1pm-04]

時間分解赤外分光法による酵素反応中間体の捕捉

○久保 稔<sup>1</sup> (1. 兵庫県立大学)

◆ 日本語

13:57 ~ 14:10

[[G]3101-1pm-05]

化学修飾で探る酵素の機能創出

○小野田 晃<sup>1</sup> (1. 北海道大学)

◆ 日本語

14:10 ~ 14:23

[[G]3101-1pm-06]

タンパク質と合成低分子の協奏による蛍光センサーの開発

○寺井 琢也<sup>1</sup> (1. 東大)

---

◆ 日本語

14:23 ~ 14:36

[[G]3101-1pm-07]

細胞機能の厳密制御を目指した細胞膜受容体の機能デザイン

○清中 茂樹<sup>1,2</sup> (1. 名大・院工、2. 名大・量子イノベ研)

---

14:36 ~ 15:36

[1G\_310105-11-9add]

パネルディスカッション

---

15:36 ~ 15:40

閉会挨拶

---

## 機能性タンパク質の設計に向けたタンパク質構造ライブラリーの生成

(阪大蛋白研<sup>1</sup>, 自然 ExCELLS<sup>2</sup>) ○古賀 信康<sup>1,2</sup>

The generation of protein structure libraries toward the design of functional proteins (<sup>1</sup>ASPiRE, IPR, Osaka University, <sup>2</sup>ExCELLS, NINS) Kensuke Kiyokawa,<sup>1</sup> ○Nobuyasu Koga<sup>1</sup>

Naturally occurring protein structures exhibit remarkable complexity and diversity, serving as the foundation for their vast array of functions. We have developed principles for de novo protein design based on simple rules related to protein structures. These principles have enabled us to design a wide range of  $\alpha\beta$ -protein structures, including topologies that are not observed in nature. In this study, we focused on all- $\alpha$  proteins to unravel the structural mechanisms underlying the emergence of their complex architectures and identified the simple structural rules that govern them. By applying these rules, we successfully generated libraries of all- $\alpha$  protein structures encompassing a broad spectrum of complexity, ranging from simple to highly intricate shapes. In the presentation, in addition to these findings, we will discuss the design of oligomer structures using a de novo designed complex all- $\alpha$  protein and explore the potential for creating functional proteins by utilizing the generated libraries as scaffolds.

**Keywords :** *Protein Design*

自然界のタンパク質構造は非常に多様で複雑であり、これはタンパク質が発現する多彩な機能の基盤となっている。我々は、タンパク質構造に関するシンプルな構造ルールに基づき、タンパク質をゼロから人工設計する原理を開発し、この原理を用いることで、自然界には存在しないトポロジーを含む、様々な  $\alpha\beta$  型タンパク質構造を原子レベルの精度で人工的に設計することに成功している。本研究では、特に  $\alpha$  ヘリカルタンパク質に着目し、その複雑な構造を生成するためのルールを明らかにした。さらに、これらのルールを適用することで、単純な形状から非常に複雑な形状に至るまで、多様な  $\alpha$  ヘリカルタンパク質構造のライブラリーを作成することに成功した。本発表では、これらの成果に加え、複雑な形状の  $\alpha$  ヘリカルタンパク質構造をもとにしたオリゴマー構造の設計や、生成したライブラリーを鋳型として用いた機能性タンパク質を創出の可能性について議論する。

## AlphaFold と分子シミュレーションの統合によるタンパク質機能発現ダイナミクスの解明

(分子研<sup>1)</sup>) ○岡崎 圭一<sup>1</sup>

Integration of AlphaFold and Molecular Simulation for Elucidating Conformational Dynamics of Proteins in Function (<sup>1</sup>*Institute for Molecular Science*) ○Kei-ichi Okazaki<sup>1</sup>

Proteins change their conformation when they function. To elucidate the conformational dynamics in function, we have developed and applied methods that integrate AI-based AlphaFold2 (AF2) and physicochemical-based molecular dynamics (MD) simulations. In particular, AF2, which has revolutionized the relevant field of protein science by achieving highly accurate protein structure prediction, is difficult to predict conformational changes in its normal use, but when combined with the results of MD simulations and the manipulation of sequence evolution information used in AF2, it is possible to predict conformational changes. In this talk, I will discuss a study that elucidated functional conformational changes by integrating AF2 and MD simulations, using a transporter protein as an example.

*Keywords : AlphaFold; MD simulation; Machine Learning; Transporter Protein*

タンパク質は機能する際にその構造を変化させる。この機能発現ダイナミクスを解明するために、AI ベースの AlphaFold2 (AF2) と物理化学ベースの分子動力学 (MD) シミュレーションを統合した方法の開発・応用を進めている。特に、高精度なタンパク質構造予測を達成してタンパク質科学の関連分野に革命を起こした AF2 は、通常の使い方では構造変化の予測は困難であるが、MD シミュレーションの結果や AF2 で用いられる配列進化情報の操作と組み合わせることにより、構造変化予測が可能になる。本講演では、トランスポータータンパク質を例にとって、AF2 と MD シミュレーションを統合することで機能的構造変化を解明した研究<sup>1,2)</sup>についてお話しする。

- 1) J. Ohnuki, T. Jaunet-Lahary, A. Yamashita, and K. Okazaki “Accelerated Molecular Dynamics and AlphaFold Uncover a Missing Conformational State of Transporter Protein OxIT,” *J. Phys. Chem. Lett.* 15, 725–732 (2024)
- 2) J. Ohnuki and K. Okazaki “Integration of AlphaFold with Molecular Dynamics for Efficient Conformational Sampling of Transporter Protein NarK,” *J. Phys. Chem. B*, 128, 7530-7537 (2024)

## 分子が機能する瞬間を捉える：X線自由電子レーザーによる分子動画解析

(東北大学<sup>1</sup>・理化学研究所<sup>2</sup>) ○南後 恵理子<sup>1,2</sup>

Dynamic Analysis of Reaction Mechanisms in Proteins (<sup>1</sup>*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Tohoku University*, <sup>2</sup>*RIKEN SPring-8 Center*) ○Eriko Nango<sup>1,2</sup>

We have been developing a technique for serial femtosecond crystallography (SFX), a protein structure determination method using X-ray free electron lasers (XFELs). Time-resolved experimental techniques for capturing light-induced changes in photosensitive proteins have been established and used in many user experiments by combining SFX and pump-probe methods. This technique is suitable for tracking fast reactions, such as chemical reactions that could not be followed at the atomic level because of the high temporal resolution. In addition, time-resolved experiments using a reaction trigger other than light have also been developed. Mix-and-inject SFX allows a rapid mixing with microcrystals and substrates in a microfluidic channel to capture processes of enzymatic reactions. These time-resolved experimental techniques can contribute to life science research by elucidating reactions and structural changes of proteins at atomic resolution. In this presentation, I will introduce our developments and successful results from time-resolved experiments using XFELs.

**Keywords :** *protein dynamics; X-ray free electron laser; serial crystallography*

我々は、X線自由電子レーザー（XFEL）を用いたタンパク質構造解析手法の一つであるシリアルフェムト秒結晶構造解析の技術開発に取り組んでいる。XFELとポンププローブ法を組み合わせることにより、光励起性タンパク質が光により変化する様子を原子レベルで“動画”のように捉える時分割実験技術は既に確立され、多くのユーザー実験で利用されている。この手法はその時間分解能から、これまで原子分解能で追うことのできなかった化学反応などの早い反応の追跡に適している。また、上記の方法を更に応用し、最近では光非励起性タンパク質の動画解析も可能になってきている。その方法の一つとして、基質やリガンドのような低分子と微結晶を迅速にマイクロ流路内で混合する二液混合法があげられ、実際に酵素反応の過程を捉えることにも成功している。これらの時分割実験技術は、従来は得ることができなかったタンパク質の反応や構造変化を原子レベルで解明することにより、生命科学研究の深化に深く貢献すると期待される。本発表では、我々が取り組んできた時分割実験の技術開発とそれを用いた実際の解析例について紹介する。

## 時間分解赤外分光法による酵素反応中間体の捕捉

(兵庫県大院理<sup>1</sup>) ○久保 稔<sup>1</sup>

Capturing enzyme reaction intermediates by time-resolved IR spectroscopy (<sup>1</sup>*Graduate School of Science, University of Hyogo*) ○Minoru Kubo<sup>1</sup>

Proteins are now being designed and utilized as components of molecular systems. Understanding the fundamental processes underlying protein function requires the observation of their dynamics, and numerous techniques, primarily based on spectroscopic methods, have been developed for this purpose. Recently, time-resolved (TR) X-ray crystallography using SACLA has emerged as a powerful method for visualizing protein dynamics. This technique allows the direct observation of positional changes of individual atoms within a protein, enabling structural changes related to function to be visualized as “molecular movies.” While TR spectroscopy has long been regarded as a useful method for observing protein dynamics, the advent of “molecular movies” prompts a re-evaluation of the role of TR spectroscopy. In structural biology, we are now entering an era in which providing only kinetics is insufficient to fully appreciate the value of TR spectroscopy.

The limitations of TR X-ray crystallography are as follows: (1) Capturing the formation and breaking of chemical bonds is difficult; (2) Observing protons is challenging. (3) Distinguishing between single and double bonds, and consequently identifying molecular species, is difficult; and (4) Analyzing electronic state dynamics is impossible. Importantly, these challenges can be addressed by TR spectroscopy, highlighting the potential for complementary use of TR spectroscopy with TR X-ray crystallography. From this perspective, TR spectroscopy is likely to find more opportunities in studying enzymes and photo-responsive proteins than in research on channels and receptors.

In this presentation, I will introduce our TR-IR spectroscopic instruments<sup>1,2)</sup> and discuss two examples of vibrational spectroscopic research on enzymes. The first example involves the intermediate analysis of DNA photolyase, a flavin enzyme that repairs damaged DNA using blue light energy. The repair reaction can be initiated by photoinduced electron transfer from flavin to damaged DNA. We observed the repair reaction of the (6-4) photoproduct (a type of DNA lesion) and obtained the IR absorption spectrum of a key intermediate. By using isotopically-labelled (6-4) photoproducts and performing DFT calculations, we assigned the intermediate as an oxetane species.

The second example involves the intermediate analysis of NO reductase, a heme enzyme that catalyzes the reduction of NO to N<sub>2</sub>O in the nitrogen cycle. We used a photo-sensitive caged substrate (caged NO) to trigger the enzymatic reaction with light and measured the IR absorption spectra of the intermediates. By employing isotopically-labelled caged substrates and DFT calculations, we demonstrated that the reactive nitrogen species appearing during the reaction is a nitroxyl radical anion (Fe<sup>3+</sup>-NHO<sup>•</sup>).

Through these studies, this presentation will explore the role and potential of spectroscopy in understanding the elementary processes underlying protein function.

*Keywords : Infrared spectroscopy; DNA photolyase; NO reductase; Enzyme reaction intermediate*

生体高分子であるタンパク質は、分子システムの構成要素として、いまや設計・利用されるステージに入りつつある。タンパク質機能発現の素過程を理解するためには、そのダイナミクスの観測が不可欠であり、これまで分光技術を中心に多くの手法が開発されてきた。近年、その中でもタンパク質ダイナミクスを可視化する優れた手法として、SACLAを用いた時間分解 X 線結晶構造解析が登場した。この手法では、タンパク質を構成する各原子の座標変化が直接得られるため、タンパク質が機能する際の構造変化をあたかも“分子動画”として観ることができる。ダイナミクス観測の有用な手法はこれまで時間分解分光法であったが、“分子動画”を観ることができるようになったいま、時間分解分光法に求められるものは何かが問われつつある。特に構造生物学においては、単にキネティクスを与えるだけでは分光法の価値は十分に理解されない時代が到来している。

時間分解 X 線結晶構造解析の制約を整理すると、(1) 分解能に依存するが、多くの場合、化学結合の形成・開裂を捉えるのが困難、(2) プロトンの観測が困難、(3) 一重結合と二重結合の区別が困難、したがって分子種の同定が困難、(4) 電子状態ダイナミクスの解析が困難、といった点が挙げられる。これらの課題はまさに分光法が得意とする領域であり、分光法の時間分解 X 線結晶構造解析との相補的な活用が期待される。この観点からすれば、分光法の相補活用の際は、チャンネルや受容体よりも、酵素や光応答性タンパク質の研究において見出しやすいと思われる。

本講演では、演者が開発してきた時間分解赤外分光装置を紹介し<sup>1,2)</sup>、2つの酵素に関する振動分光研究を話題提供したい。1つ目の研究例は、DNA 光修復酵素の中間体解析である。この酵素は、青色光のエネルギーを利用して損傷 DNA を修復するフラビン酵素であり、修復反応はフラビンから損傷 DNA への光電子移動によって引き起こされる。われわれは、(6-4)光産物（損傷 DNA の一種）の修復反応を観測し、その過程で現れる中間体の赤外吸収スペクトルを取得した。スペクトル解析に同位体ラベルした(6-4)光産物を用い、さらに DFT 計算を併用することで、その中間体がオキセタン種であることを明らかにした。

2つ目の研究例は、一酸化窒素還元酵素の中間体解析である。この酵素は窒素循環に関与し、NO を  $\text{N}_2\text{O}$  に還元するヘム酵素である。われわれは、光感受性のケージド基質（ケージド NO）を用いて光で酵素反応をトリガーし、酵素中間体の赤外吸収スペクトルを測定した。同位体ラベルしたケージド基質を用い、DFT 計算を併用することで、反応途中に現れる活性窒素種がニトロキシラジカルアニオン ( $\text{Fe}^{3+}\text{-NHO}^{\bullet-}$ )であることを示した。

本講演ではこれらの研究例を通して、タンパク質機能発現の素過程理解における分光法の役割や可能性について議論したい。

1) Short-lived intermediate in  $\text{N}_2\text{O}$  generation by P450 NO reductase captured by time-resolved IR spectroscopy and XFEL crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, 118, e2101481118.

2) Time-resolved IR spectroscopy for monitoring protein dynamics in microcrystals. *Methods Enzymol.* **2024**, 709, 161-176.

## 化学修飾で探る酵素の機能創出

(北大院地球環境) ○小野田 晃

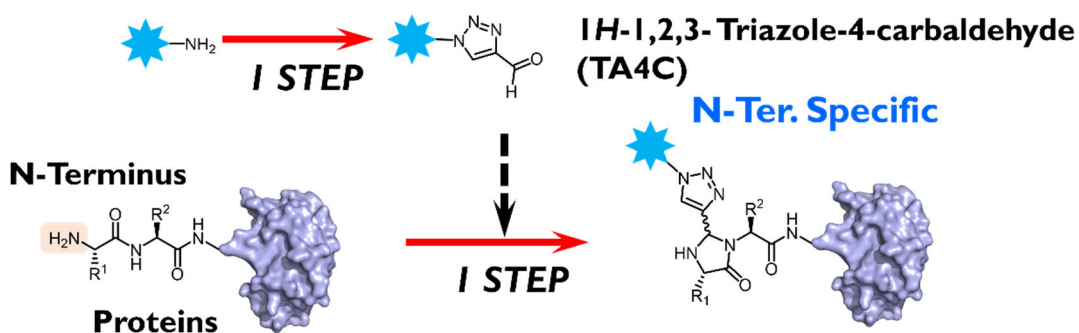
Exploring New Aspects of Enzyme Function Through Chemical Modification (*Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University*) ○Akira Onoda

Enzyme and protein functions are often investigated and regulated through site-specific chemical modifications. The N-terminus of proteins is a universal modification site, characterized by features such as minimal impact on function since it is typically not included in the folded structure. As a result, it is a versatile target for modification. We have developed a simple method for preparing N-terminal modification reagents and a technique for chemical modification of N-terminus via the formation of an imidazolidinone ring. In this presentation, we will introduce basic and applied research on enzymes and biomolecules using N-terminal modifications.

**Keywords :** Chemical Modification; N-Terminus; Proteins

酵素やタンパク質の機能制御には位置特異的化学修飾は重要なツールである。タンパク質 N 末端は普遍的な修飾点であり、機能へ影響が小さいなどの特徴があり、汎用性の高い修飾対象である。我々は、N 末端修飾試薬を簡便に調製する手法と、その試薬を用いて主鎖骨格をイミダゾリジノン環への変換により化学修飾する技術を開拓した<sup>1)</sup>。本発表では、この N 末端修飾を活用した酵素や生体分子の基礎・応用研究について紹介したい。

### Simplest & Specific Bioconjugation



1) A. Onoda, N. Inoue, E. Sumiyoshi, T. Hayashi, *ChemBioChem*, **2020**, 21, 1274.



## タンパク質と合成低分子の協奏による蛍光センサーの開発

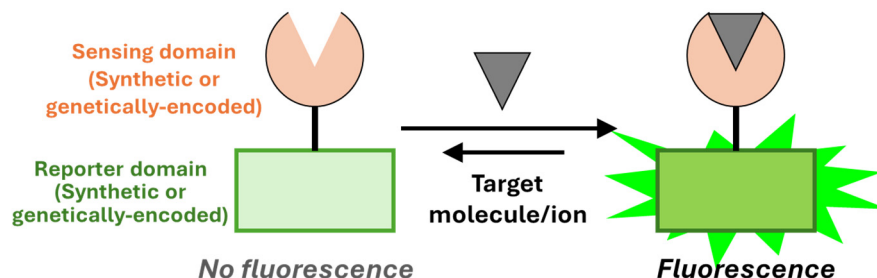
(東大院理) ○寺井 琢也

Development of fluorescent sensors using the synergy of proteins and synthetic molecules  
(<sup>1</sup>Graduate School of Science, The University of Tokyo) ○Takuya Terai

Fluorescent sensors are the functional molecules that bind to the targets of interest in living cells and then change their fluorescent properties such as intensity or color (Figure). Because they are powerful tools in biology including neuroscience, many sensors have been developed so far. Traditional sensors are either based on synthetic small molecules or fluorescent proteins, but they have their own drawbacks. Hence, we are developing hybrid chemigenetic sensors in which both small molecules and proteins are combined and work synergistically. In this talk, I will introduce the two recent studies in our group on this topic. The first one is a high-performance far-red sensor for  $K^+$ , which uses a synthetic fluorogenic dye as a reporter domain.<sup>1)</sup> The second one is a ratiometric green sensor for  $Na^+$ , which contains a synthetic chelator as a sensing domain.<sup>2)</sup> Both sensors were empirically optimized by directed evolution of the protein part. In future, we expect to take advantage of rational protein design to create such sensors de novo.

**Keywords :** *Fluorescent Sensor; Chemigenetics; Bioimaging; Directed Evolution*

細胞内の標的物質と結合して蛍光特性（強度、波長など）が変化する蛍光センサー（下図）は、神経科学をはじめとする生物学研究で重要な役割を果たしており、これまで数多くのセンサーが開発されてきた。従来のセンサーは合成低分子あるいは蛍光タンパク質のどちらかを基盤としていたが、それぞれ固有の利点と欠点があるため、我々は最近、両者が組み合わさって協奏的に機能するハイブリッド型センサー（＝化学遺伝学蛍光センサー）の開発に取り組んでいる。本講演ではその最前線、具体的には最近発表した、①合成色素をレポーター部位とする高性能深赤色  $K^+$  センサー<sup>1)</sup>、および②合成キレーターを認識部位とするレシオ変化型緑色  $Na^+$  センサー<sup>2)</sup>、について紹介する。これらのセンサーはいずれも、タンパク質の指向性進化という経験的な方法論によってその機能が最適化された。しかし近い将来は、合理的なタンパク質設計によっても高性能センサーの開発が可能になると期待される。



1) D. Cheng, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146, 35117–35128.

2) S. Takeuchi, et al., *RSC Chem. Biol.*, in press.

## 細胞機能の厳密制御を目指した細胞膜受容体の機能デザイン

(名大院工<sup>1</sup>・名大量子イノベ研<sup>2</sup>) ○清中 茂樹<sup>1,2</sup>

Design of cell surface receptors for precise control of cellular functions

(<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya University, <sup>2</sup>Research Institute for Quantum and Chemical Innovation, Nagoya University) ○Shigeki Kiyonaka<sup>1,2</sup>

"Drugs" are indispensable in our lives. Most drugs exert their effects by selectively acting on target proteins. However, like anticancer drugs, even when drugs act selectively on a target protein, they can still cause severe side effects. This is because target proteins are often expressed not only in diseased tissues but also in normal tissues and cells, leading to the inhibition of normal functions. While selectively delivering drugs to diseased tissues could potentially resolve the issue of side effects, this is generally extremely challenging.

As a "novel" approach to control biological functions by acting specifically on target tissues or cells, we focus on the chemogenetic approach. This method utilizes engineered receptor proteins that are activated by artificial ligands (designer ligands), which do not interact with endogenous proteins. With the dramatic advancements in genetic engineering techniques in recent years, it has become possible to selectively express engineered proteins in target cells or tissues in animals, including humans. By leveraging these genetic engineering technologies, we can selectively control the functions of cells expressing engineered receptors by administering designer ligands at specific times.

In our research, we consider clinically approved drugs as designer ligands and focus primarily on G protein-coupled receptors (GPCRs), which are the main target proteins of 30-40% of approved drugs. Our aim is to design and develop engineered receptors that either dramatically decrease or enhance their affinity for these approved drugs (artificial ligands) without altering the natural functions of GPCR proteins. In this presentation, we will report on our research strategy and preliminary findings.

*Keywords : receptor; GPCR; chemogenetics*

我々の生活において「薬」は不可欠な存在である。「薬」の大多数は、標的タンパク質に対して選択的に作用することでその薬効を示す。しかし、抗ガン剤のように、標的タンパク質に対して選択的に作用する「薬」においても、重い副作用を示すことがある。それは、「薬」の標的タンパク質は、病巣だけでなく正常な組織・細胞にも発現することが多く、「薬」は正常な機能も阻害してしまうことに起因する。病巣に対して選択的に「薬」を輸送することができれば副作用の問題を解決できるが、それは一般的に極めて困難である。

標的とする組織・細胞に特異的に薬を作用させて生体機能を制御する「新たな」方法として、我々はケモジェネティクス（化学遺伝学）法に着目する。この方法では、生体内のタンパク質に対しては作用しない人工リガンド（デザイナーリガンド）で活性化される人工受容体タンパク質を用いる。近年の遺伝子工学技術の劇的な進歩により、ヒトを含めた動物において、標的細胞・組織に対する選択的な人工タンパク質の

発現が可能となった。この遺伝子工学技術を使えば、デザイナーリガンドを動物に投与するタイミングで、人工受容体を発現させた細胞機能を特異的に制御できる。

我々は、臨床薬をデザイナーリガンドとみなし、承認薬の 30-40%が標的とする G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を主な標的タンパク質として選択し、GPCR のタンパク質機能を変えることなく、「承認薬 (人工リガンド)」に対する親和性を劇的に落とす、もしくは向上させた人工受容体をデザインおよび開発することを進めている。本発表では、その研究戦略および初期的な研究成果に関して報告する。

