

I ミトコンドリア呼吸系膜タンパク質の化学構造の振動分光学的研究

Vibrational Spectroscopic Study on Mitochondrial Respiratory Protein Complexes

小倉尚志・山口 悟・中島 聡・久保 稔・柳澤幸子
Ogura, T., Yamaguchi, S., Nakashima, S., Kubo, M., Yanagisawa, S.

ミトコンドリア呼吸系膜タンパク質複合体の詳細構造を、主としてラマン分光法および赤外分光法により分解能 1 pm 以上の精度で決定し、それを基に反応機構を解明する。チトクロム *c* 酸化酵素、複合体 I、 F_1F_0 -ATP 合成酵素などに加え、金属タンパク質のモデルとしての金属錯体が研究対象である。

II 超高精度赤外分光光度計の開発と酵素タンパク質の反応機構解明への応用

Development of Ultra-sensitive Infrared Spectrophotometer based on Femtosecond Light Source and Its Application to Enzyme Reactions

小倉尚志・山口 悟・中島 聡・久保 稔
Ogura, T., Yamaguchi, S., Nakashima, S., Kubo, M.

タンパク質の機能発現のしくみを明らかにするためには、活性中心に存在するアミノ酸残基の反応性を明らかにし、その役割を解明する必要がある。この目的のためには、赤外分光法が有効である。しかし、赤外領域では溶媒である水の吸収が極めて大きいため赤外分光法の酵素タンパク質への応用は限られてきた。本研究課題では、フェムト秒レーザーを光源とする、あらゆるタンパク質水溶液に適用可能な超高精度赤外分光光度計を開発し、酵素反応におけるアミノ酸残基の役割を明らかにして反応機構を解明する。特に膜貫通型膜タンパク質によるイオン輸送のメカニズムの解明を目指す。

III 酸素添加酵素の反応機構の解明

Resonance Raman Elucidation of Reaction Mechanism of Dioxygenases

小倉尚志・柳澤幸子

Ogura, T., Yanagisawa, S.

インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼは、ヒトのトリプトファン異化経路の最初に位置し、トリプトファンに分子状酸素由来の 2 個の酸素原子を添加して N-フォルミルキヌレニンを生成する反応を触媒する。反応機構を解明するために必要な反応中間体の捕捉と構造決定を目指す。

IV 固体 NMR 分光法を用いた生体膜表面における細胞生理機能の 制御機構の解析

Solid State NMR Study on the Structural Basis of the Cellular Functions Localized at the
Membrane Surface

辻 暁

Tuzi, S.

細胞の生理的機能は、刺激に応じた細胞内のシグナル伝達により制御されている。このようなシグナル伝達経路の中継、シグナルの変換、生理的機能との結合等は、多くの場合、細胞膜や細胞内小器官の脂質膜表面で行われている。グアニンヌクレオチド交換因子等の、細胞表面でシグナル伝達機構に関与する蛋白質を対象に、蛋白質中の脂質膜結合ドメインの脂質膜表面での構造と動きを固体 NMR 分光法を用いて明らかにし、生体膜上での生理的機能制御の基盤となるメカニズムを探究する。

発表論文 List of Publications

- I-1 Nakane, D. (名工大), Kuwasako, S. (名工大), Tsuge, M. (名工大), Kubo, M., Funahashi, Y. (名工大), Ozawa, T. (名工大), Ogura, T. and Masuda, H. (名工大), A square-planar Ni(II) complex with an N₂S₂ donor set similar to the active centre of nickel-containing superoxide dismutase and its reaction with superoxide, Chem. Commun., 2010, 46, 2142-2144.
- I-2 Hirohito Ishimaru, Hiroshi Fujii (岡崎統合バイオ) and Takashi Ogura, Resonance Raman Study of a High-valent Fe=O Porphyrin Complex as a Model for Peroxide Compound II, Chem. Lett., 2010, 39, 332—333.
- I-3 Liu, J. G. (九大), Ohta, T. (九大), Yamaguchi, S., Ogura, T., Sakamoto, S. (九大), Maeda,

- Y. (九六) and Naruta, Y. (九六) , Spectroscopic Characterization of a Hydroperoxo-Heme Intermediate: Conversion of a Side-On Peroxo to an End-On Hydroperoxo Complex, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 9262—9267., selected as a VIP (Very Important Paper)
- I-5 Cho, J. (Ewha Woman's Univ.) , Sarangi, R. (Ewha Woman's Univ.) , Annaraj, J. (Ewha Woman's Univ.) , Kim, S. Y. (Ewha Woman's Univ.) , Kubo, M., Ogura, T., Solomon, E. I. (Stanford Univ.) and Nam, W. (Ewha Woman's Univ.) , Geometric and electronic structure and reactivity of a mononuclear 'side-on' nickel(III)–peroxo complex, *Nature Chemistry*, 2009, 1, 568—572.
- I-6 引田理英・森山昌和・小倉尚志・伊藤-新澤 恭子・吉川信也、共鳴ラマン分光法によるウシ心筋ミトコンドリア呼吸鎖NADH - ユビキノン酸化還元酵素のFMNと鉄 - 硫黄クラスターの構造解析、第36回生体分子科学討論会、平成21年6月19日～20日、札幌
- I-7 Takashi Ogura, Invited Talk, Structure and Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, ICBIC14 (The 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry), July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-8 Izumi Ishigami, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Takashi Ogura, Time-Resolved Resonance Raman Study on Structural Relaxation Process of Cytochrome *c* Oxidase Following Photolysis of Carbonmonoxide, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-9 Miyuki Sakaguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Hiroshi Fujii and Takashi Ogura, A New Resonance Raman Marker Band of Cytochrome *c* Oxidase, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-10 Hiroshi Aoyama (RIKEN), Kazumasa Muramoto, Kyoko Shinzawa-Itoh, Kunio Hirata (JASRI), Eiki Yamashita (Osaka Univ.), Tomitake Tsukihara (Osaka Univ.), Takashi Ogura and Shinya Yoshikawa
X-ray Structure and Function of Peroxide Bridge between Fe and Cu in the O₂ Reduction Site of the Fully Oxidized Cytochrome *c* Oxidase, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-11 Takahiro Kojima (Tsukuba Univ.), Yuichiro Hirai (Osaka Univ.), Yasuhisa Mizutani (Osaka Univ.), Kenichiro Ikemura, Takashi Ogura, Yoshihito Shiota (Kyushu Univ.), Kazunari Yoshizawa (Kyushu Univ.) and Shunichi Fukuzumi (Osaka Univ.), Reactivity of Ru(IV)-Oxo Complexes Derived from Proton-Coupled Electron Transfer of Ru(II)-Aqua Complexes, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-12 Takashi Tozuka (Nagoya Inst. Tech.), Yuji Kajita (Nagoya Inst. Tech.), Minoru Kubo, Takashi Ogura, Yasuhiro Funahashi (Nagoya Inst. Tech.), Tomohiro Ozawa (Nagoya Inst. Tech.) and Hideki Masuda (Nagoya Inst. Tech.), Accurate Design of Copper-containing Oxidase Active Centers with a S-containing Ligand, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-13 Atsushi Kunishita (Osaka Univ.), Hideki Sugimoto (Osaka Univ.), Minoru Kubo, Takashi Ogura, Takeji Takui (Osaka City Univ.) and Shinobu Itoh (Osaka Univ.), Structure and

- Reactivity of Mononuclear Copper(II)-Superoxo Complexes Supported by N₃-Tridentate Ligands, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-14 Jin-Gang Liu (Kyushu Univ.), Takehiro Ohta (Kyushu Univ.), Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura and Yoshinori Naruta (Kyushu Univ.), Preparation of Low-spin End-on Ferric-Peroxo and Ferric-Hydroperoxo Species by a Heme Model Complex Bearing an Imidazole Tail, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-15 Susumu Kyuda (Kanazawa Univ.), Yoshimi Kawade (Kanazawa Univ.), Hideki Furutachi (Kanazawa Univ.), Shuhei Fujinami (Kanazawa Univ.), Masatatsu Suzuki (Kanazawa Univ.), Takehiko Tosha (IMS), Teizo Kitagawa (IMS), Minoru Kubo and Takashi Ogura, C-H Bond Activation by Peroxodiiron(III) Complexes, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-16 Jaeheung Cho (Ewha Woman's Univ.), Ritimukta Sarangi (Ewha Woman's Univ.), Jamespondi Annaraj (Ewha Woman's Univ.), Sung Yeon Kim (Ewha Woman's Univ.), Minoru Kubo, Takashi Ogura, Edward I. Solomon (Stanford Univ.) and Wonwoo Nam (Ewha Woman's Univ.), Contribution of the Supporting Ligands to NiO₂ Intermediates, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-17 Eiko Fukumura (Osaka Univ.), Hiroshi Sugimoto (RIKEN), Yuko Misumi, Takashi Ogura and Yoshitsugu Shiro (RIKEN), Cooperative L-Trp Binding to Human Tryptophan 2, 3-Dioxygenase Revealed by Resonance Raman Spectroscopy, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- I-18 Takashi Ogura, Invited talk, Ultraviolet resonance Raman spectroscopy for functioning proteins, Symposium on "Elucidation of Protein Functions at the Atomic Level with X-ray structural, Vibrational spectroscopic and Molecular biological and Theoretical analyses", 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- I-19 Hideo Shimada, Yukie Katayama, Takashi Ogura, Tomitake Tsukihara and Shinya Yoshikawa, Site-directed isotope labeling of cytochrome *c* oxidase, Symposium on "Elucidation of Protein Functions at the Atomic Level with X-ray structural, Vibrational spectroscopic and Molecular biological and Theoretical analyses", 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- I-20 Miyuki Sakaguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Hiroshi Fujii and Takashi Ogura, Resonance Raman Marker Bands of Hydroxyfarnesylethyl Substituent of Cytochrome *c* Oxidase, 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- I-21 Izumi Ishigami, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Takashi Ogura, Structural Relaxation Process of Cytochrome *c* Oxidase Following Photolysis of Carbonmonoxide, 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- I-22 Masahide Hikita, Masakazu Moriyama, Takashi Ogura, Kyoko Shinzawa-Itoh and Shinya

- Yoshikawa, Structural analysis of FMN and iron-sulfur clusters of the bovine heart NADH-ubiquinone oxidoreductase by resonance Raman spectra, 第47回生物物理学会年会、平成21年10月30日～11月1日、徳島
- I-23 Kaoru Mieda, Minoru Kubo, Kyoko Shinzawa-Itoh, Takashi Ogura and Shinya Yoshikawa, Non-Resonance Raman Investigations of Bovine Mitochondrial F_0F_1 -ATP synthase, 第47回生物物理学会年会、平成21年10月30日～11月1日、徳島
- I-24 Takashi Ogura, Satoru Nakashima, Izumi Ishigami, Kyoko Shinzawa-Itoh and Shinya Yoshikawa, Invited Talk, Protein Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC-2009), November 4-7, 2009, Tata Institute of Fundamental Research, Mumbai, India.
- I-25 石丸裕士・藤井 浩 (岡崎統合バイオ)・小倉尚志、高酸化型鉄ポルフィリンの共鳴ラマンスペクトル: Fe=O 伸縮振動数の軸配位子依存性、日本化学会第90春季年会、平成22年3月26日(金)～29日(月)、東大阪 (近畿大学本部キャンパス)
- III-1 Yanagisawa, S., Yotsuya, K., Hashiwaki, Y., Horitani, M. (RIKEN), Sugimoto, H. (RIKEN), Shiro, Y. (RIKEN), Appelman, E. H. (Argonne National Lab.) and Ogura, T., Identification of the Fe-O₂ and the Fe=O Heme Species for Indoleamine 2, 3-Dioxygenase during Catalytic Turnover, Chem. Lett., 2010, 39, 36—37., selected as an EC (Editor's Choice) Paper.
- III-2 柳澤幸子・四ッ谷景子・橋脇裕美・堀谷正樹 (理研)・杉本 宏 (理研)・城 宜嗣 (理研)・小倉尚志、第36回生体分子科学討論会、平成21年6月19日～20日、札幌
- III-3 Sachiko Yanagisawa, Keiko Yotsuya, Masaki Horitani (RIKEN), Hiroshi Sugimoto (RIKEN), Yoshitsugu Shiro (RIKEN), Yumi Hashiwaki and Takashi Ogura, Detection of the Iron-Oxygen Stretching Raman Mode for Human Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in the Oxygenated Form, ICBIC14, July 26-30, 2009, Nagoya.
- III-4 Sachiko Yanagisawa, Invited Talk, Detection of the Iron-Oxygen Stretching Raman Mode for Human Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in the Oxygenated Form, International Workshop on Metalloprotein Functions, July 31-Aug 1, 2009, Kamigori, Hyogo.
- III-5 Sachiko Yanagisawa, Keiko Yotsuya, Yumi Hashiwaki, Masaki Horitani (RIKEN), Hiroshi Sugimoto (RIKEN), Yoshitsugu Shiro (RIKEN) and Takashi Ogura, Detection of Two Oxygen-Isotope Sensitive Resonance Raman Bands for Human Indoleamine 2, 3-Dioxygenase, 第47回生物物理学会年会、平成21年10月30日～11月1日、徳島
- III-6 柳澤幸子・堀谷正樹 (理研)・杉本 宏 (理研)・城 宜嗣 (理研)・Appelman, Evan H. (アルゴンヌ国立研)・小倉尚志、代謝回転中インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼの酸素化型およびフェリルオキソ種の検出、日本化学会第90春季年会、平成22年3月26日(金)～29日(月)、東大阪 (近畿大学本部キャンパス)
- IV-1 H. Saitô, A. Kira (横浜国大), T. Arakawa, M. Tanio (三菱生命研), S. Tuzi, and A. Naito (横

- 浜国大); Suppressed or recovered intensities analysis in site-directed ^{13}C NMR: assessment of low-frequency fluctuations in bacteriorhodopsin and D85N mutants revisited, *Biochim Biophys Acta*. 1798, 167-76 (2010).
- IV-2 N. Uekama (分子研), T. Aoki, T. Maruoka, S. Kurisu, A. Hatakeyama, S. Yamaguchi, M. Okada, H. Yagisawa, K. Nishimura (分子研), and S. Tuzi: Influence of membrane curvature on the structure of the membrane-associated pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ 1, *Biochim Biophys Acta*. 1788, 2575-83 (2009).
- IV-3 Naomi Tokuda, Hitoshi Yagisawa, Yasuhisa Fukui, Satoru Tuzi: A solid state ^{13}C NMR study of the SWAP-70 PH domain at the membrane surface, The 6th Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists (Nagasaki 2009).
- IV-4 徳田尚美・八木澤 仁・福井泰久・辻 暁、脂質二重膜界面による膜結合性蛋白質ドメイン (PH ドメイン) の構造と機能の制御: 固体 NMR による解析、第 58 回高分子討論会、平成 21 年 9 月 16 日~18 日、熊本
- IV-5 N. Tokuda, H. Yagisawa, Y. Fukui and S. Tuzi, A solid state NMR study of the structure and function of the SWAP-70 PH domain induced at the membrane interface, 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- IV-6 H. Nishikawa, K. Tajima, I. Kawamura, A. Wada, S. Tuzi and A. Naito, Pressure induced retinal isomerization in bacteriorhodopsin as studied by solid-state NMR, 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- IV-7 I. Kawamura, M. Horigome, J. Tanabe, M. Omine, S. Tuzi and A. Naito, Conformational changes at Tyr residues in Bacteriorhodopsin as studied by high-resolution ^{13}C solid-state NMR, 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- IV-8 N. Uekama, K. Kawai, M. Okada, H. Yagisawa, S. Tuzi and K. Nishimura, Development of planer lipid bilayers system using bicelle for structural characterization of membrane bound proteins by solid state NMR, 第 47 回生物物理学会年会、平成 21 年 10 月 30 日~11 月 1 日、徳島
- IV-9 徳田尚美・八木澤 仁・福井泰久・辻 暁、脂質膜界面における PH ドメインの構造および機能の解析、第 48 回 NMR 討論会、平成 21 年 11 月 10 日~12 日、福岡
- IV-10 上釜奈緒子、辻 暁、西村勝之、固体 NMR を用いた不飽和脂質を含有するバイセルに関する研究、第 48 回 NMR 討論会、平成 21 年 11 月 10 日~12 日、福岡

大学院生命理学研究科

博士後期課程

石丸裕士：高酸化型ヘムタンパク質モデル化合物の振動分光学的研究

石上 泉：共鳴ラマン分光法によるタンパク質構造ダイナミクスの追跡

徳田尚美：固体 NMR 分光法による PH ドメインの脂質膜界面における構造転移および機能の解析

博士前期課程

三角裕子：CO センサータンパク NPAS2 の振動分光法による構造解析

坂口美幸：共鳴ラマン分光法による呼吸鎖電子伝達系膜タンパク質の構造解析

野村高志：振動分光法によるプロトンポンプタンパク質の構造解析

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 21～23 年度）基盤研究(C) 課題番号:21570171
研究課題 共鳴ラマン分光法によるチトクロム C 酸化酵素のプロトン輸送機構の解明
研究代表者 小倉尚志
- 2 科学研究費補助金（平成 20～21 年度）特定領域研究（高次系分子科学） 課題番号:20050029
研究課題 オルガネラ内タンパク質の分子科学
研究代表者 小倉尚志
- 3 科学研究費補助金（平成 20～21 年度）特定領域研究（生体超分子） 課題番号:20051026
研究課題 不安定な呼吸酵素・気体分子複合体の調製と振動分光学的解析
研究分担者 小倉尚志（研究代表者 永野真吾）
- 4 科学研究費補助金（平成 21～23 年度）基盤研究(B) 課題番号:21350098
研究分担者 小倉尚志（研究代表者 北川禎三）
- 5 ターゲットタンパク研究プログラム（平成 19～21 年度）
研究課題 ミトコンドリア呼吸の作用機序の全容の解明を目指す高分解能立体構造解析と機能解析
研究分担者 小倉尚志（研究代表者 吉川信也）
- 6 科学研究費補助金（平成 20～21 年度）若手研究(B) 課題番号:20770125
研究課題 超高感度時間分解赤外分光システムの開発 ～プロトンポンプ機構の解明～
研究代表者 山口 悟
- 7 科学研究費補助金（平成 21～22 年度）若手研究(B) 課題番号:21750022
研究課題 超高感度時間分解赤外分光装置の開発と生体系プロトンポンプ機構の解明
研究代表者 久保 稔
- 8 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 21 年度）奨励研究
研究課題 超高感度赤外分光装置の開発 - 時間分解測定に向けた装置の改良 -
研究代表者 久保 稔
- 9 科学研究費補助金 特別研究員奨励費 課題番号:19・10787
研究課題 振動分光法による生体超分子中のアミノ酸残基の機能解析
研究代表者 柳澤幸子