

タンパク質の部位特異的同位体標識化研究

Site-specific Isotope Labeling of Proteins

島田秀夫・片山幸江（特任）・網中良太（特任）

Shimada, H., Katayama Y., Aminaka, R.

生物は細胞によって構成され、細胞の活動は、多種の酵素・タンパク質の働きによって支えられている。酵素・タンパク質は、固有のアミノ酸配列と立体構造をもつため、機能を説明するためには、アミノ酸残基各原子の空間での位置と電子状態を決定する必要がある。前者は、X線構造解析により、後者は、振動分光測定によって、その情報がもたらされる。生体系では水の強い吸収のため、振動分光測定は難しい。ピコバイオロジー研究所は、水の強い吸収に関わらず、測定ができる装置を開発している。一方、タンパク質に含まれる同種の数多くのアミノ酸残基由来の振動スペクトルは、それぞれ同位体シフトによって識別される。我々は以下に述べる酵素の機能メカニズムを理解するために必須であるアミノ酸残基の部位特異的同位体標識システムを確立する。

細胞呼吸系の末端に位置し、酸素分子を還元し水分子を形成するとともに水素イオンをミトコンドリア内膜（細菌では細胞膜）の内側から外側に能動輸送するチトクロム *c* 酸化酵素と、酸素分子の O-O 結合を還元的に開裂し、その一原子を有機物質に導入して生体機能物質を合成するチトクロム P450 の反応機構をそれぞれ研究している。これら酵素の部位特異的同位体標識における、最大の課題は、無細胞系で正常タンパク質を効率よく合成し、高い収率で精製するシステムの確立である。

発表論文 List of Publications

- 1 Shimada, H., Shimokata, K. (World Intec), Aminaka, R., Katayama, Y., Muramoto, K. Tsukihara, T., Yoshikawa, S.: Mutagenesis Studies on the Functional Roles of Possible Proton Transfer Pathways in Bovine Heart Cytochrome *c* Oxidase, 14th International Conference in Biological Inorganic Chemistry, July 25-30, Nagoya, Japan (2009), in JBIC 14, supplement 1, S12, July (2009).

- 2 Ogura, T., Ikemura, K., Ishigami, I., Kubo, M., Yamaguchi, S., Nakashima, S., Shimada, H., Shinzawa-Itoh, K., and Yoshikawa, S.: Structure and dynamics of cytochrome *c* oxidase as studies with resonance Raman, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, July 25-30, Nagoya, Japan (2009), in JBIC 14, supplement 1, S13, July (2009).
- 3 Shimada, H., Katayama, Y., Ogura, T., Tsukihara, T., Yoshikawa, S.: Site-directed isotope labeling of cytochrome *c* oxidase, 第 46 回日本生物物理学会、シンポジウム [Elucidation of Protein Functions at the Atomic Level with X-ray structural, Vibrational spectroscopic, Molecular biological and Theoretical analyses] (徳島) (2009)
- 4 ウシ (サブユニット I) / ヒト雑種チトクロム *c* 酸化酵素の HeLa 細胞発現系: ミトコンドリアにおけるミトコンドリアおよび核由来タンパク質の発現誘導、下方国稔(World Intec)、網中良太・末松 誠(慶應大)・月原富武・吉川信也・島田秀夫、第 82 回日本生化学会 (神戸) (2009)
- 5 Katayama, Y., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., and Shimada, H.: Synthesis of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase in the *E. coli* cell-free system, 第 47 回日本生物物理学会 (徳島) (2009)
- 6 Aminaka, R., Shimokata, K. (World Intec) , Itoh, M., Katayama, Y., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., and Shimada, H.: The functional analysis of hydrogen bond network in bovine heart cytochrome *c* oxidase by mutagenesis, 第 47 回日本生物物理学会 (徳島) (2009)
- 7 Sakurai, K., Hayashi, T. (大阪大), Tsukihara, T., Shimada, H.: Substrate *α*-camphor binding induces structural change of cytochrome P450cam, 第 47 回日本生物物理学会 (徳島) (2009)
- 8 Sakurai, K., Harada, K. (大阪大), Shimokata, K. (World Intec), Hayashi, T. (大阪大), Shimada, H.: Mechanism of the water exclusion from the active site of cytochrome P450cam, 第 47 回日本生物物理学会 (徳島) (2009)
- 9 網中良太・下方国稔(World Intec)・伊藤真衣・片山幸江・月原富武・吉川信也・島田秀夫: ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素の X 線構造が示唆する水形成用プロトン輸送系の機能解析、第 6 回「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」公開シンポジウム (大阪) (2009)
- 10 島田秀夫・下方国稔(World Intec)・網中良太・片山幸江・月原富武・吉川信也: ミトコンドリアから核への新規シグナル伝達系、第 6 回「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」公開シンポジウム (大阪) (2009)
- 11 網中良太・下方国稔 (World Intec)・伊藤真衣・片山幸江・月原富武・吉川信也・島田秀夫: 細菌チトクロム *c* 酸化酵素の変異体解析が支持するプロトンポンプ経路の変異に対応したウシ心筋酵素部位の変異体解析、生体エネルギー研究会第 35 回討論会 (旭川) (2009)
- 12 島田秀夫・下方国稔 (World Intec)・網中良太・末松 誠(慶應大)・月原富武・吉川信也: HeLa 細胞でのミトコンドリアから核への情報伝達 生体エネルギー研究会第 35 回討論会 (旭川) (2009)

科学研究費補助金等

1 文部科学省研究費補助金（平成 21～23 年度）基盤研究(B) 課題番号:21370073

研究課題 分子生物学的手法によるウシと細菌のチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ
機構の研究

研究代表者 島田秀夫

2 文部科学省研究費補助金（平成 20～21 年度）特定領域研究 課題番号:20051023

研究課題 ウシチトクロム酸化酵素のプロトン輸送系の変異体解析

研究代表者 島田秀夫

3 文部科学省委託業務ターゲットタンパク研究プログラム（平成 19～21 年度）

委託業務 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

業務主任者 吉川信也

業務担当責任者 島田秀夫（平成 20 年 9 月 30 日までは慶應大で当該プログラムの業務主任
者）