

## 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、それら細胞の活動は、多種類の酵素・タンパク質の働きによって支えられている。それぞれの酵素・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、機能メカニズム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、必要な情報がもたらされる。しかし、機能部位アミノ酸残基の振動スペクトルは、他の部位の同種のアミノ酸残基のものと識別され難い。機能部位アミノ酸残基を標識して起こるスペクトルの同位体シフトによって識別され得る。部位特異的にアミノ酸を同位体標識するためには、無細胞系タンパク質合成系によりタンパク質を合成し、しかも天然型に匹敵する機能をもつ標品を調製する必要がある。下記に示す膜タンパク質複合体の場合、無細胞系での機能発現が最も難しい。

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）を横切って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 の機能メカニズムをそれぞれ研究している。アミノ酸残基の働きを明らかにすることを目指している。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。長年の努力の結果、細菌のチトクロム *c* 酸化酵素の機能発現に成功した。

### 発表論文 List of Publication

- 1 Katayama, Y., Shimokata, K., Suematsu, M., Ogura, T., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., and Shimada, H., Cell-free synthesis of cytochrome *c* oxidase, a multicomponent membrane protein, *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 235-240 (2010)
- 2 Aminaka, R., Shimokata, K., Itoh, M., Katayama, Y., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., Shimada, H., "Mutagenesis studies on D-pathway function of bovine heart cytochrome *c* oxidase", 16th European Bioenergetics Conference, Poland, July, 2010

- 3 Proton pumping pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Ito, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, and Hideo Shimada 第 48 回日本生物物理学会 仙台 9 月 2010
- 4 Characterization of histidine-tagged cytochrome P450cam and its synthesis in a cell-free system Yukie Katayama, Miyuki Yoshiya, Keisuke Sakurai and Hideo Shimada 第 48 回日本生物物理学会 仙台 9 月 2010
- 5 Substrate binding excludes water cluster from active site of cytochrome P450cam – mutation analysis of water expelling system Rie Fujii, Keisuke Sakurai, Kunitoshi Shimokata, Katsuyoshi Harada, Takashi Hayashi, Hideo Shimada 第 48 回日本生物物理学会 仙台 9 月 2010
- 6 Structural analysis of transcriptional factor NPAS2 by resonance Raman spectroscopy Yuko Misumi, Ikuko Sagami, Yukie Katayama, Hideo Shimada, Teizo Kitagawa, Takashi Ogura 第 48 回日本生物物理学会 仙台 9 月 2010
- 7 Mutagenesis analysis of a putative pathway for water forming proton in bovine heart cytochrome *c* oxidase Ryohta Aminaka, Kunitoshi Shimokata, Mai Itoh, Yukie Katayama, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa, Hideo Shimada 第 36 回生体エネルギー研究会 大阪 11 月 2010

## 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 22～24 年度）若手研究 B 課題番号 22770155  
 研究課題 変異体を用いたウシチトクロム c 酸化酵素の水素結合ネットワークの機能解析  
 研究代表者 網中良太
- 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 22～23 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