

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・柳澤幸子・北川禎三*・中島 聡*・太田雄大*
(ピコバイオロジー研究所蛋白質振動分光学研究部門*)

Ogura, T., Yanagisawa, S., Kitagawa, T. *, Nakashima, S. *, Ohta, T. *
(*Division of Protein Vibrational Spectroscopy, Picobiology Institute)

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 などに加え、ミオグロビンなどのヘムタンパク質、ヘムをセンサーとして持つタンパク質や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 Infrared Light Source and Its Application to Enzyme Reactions

小倉尚志・中島 聡*
(ピコバイオロジー研究所蛋白質振動分光学研究部門*)

Ogura, T., Nakashima, S. *
(*Division of Protein Vibrational Spectroscopy, Picobiology Institute)

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た。それを用いて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。特にチトクロム *c* 酸化酵素による酸素還元反応とプロトンポンプ反応の共役機構の解明を目指す。

III 酸素添加酵素の反応機構の解明

Resonance Raman Elucidation of Reaction Mechanism of Oxygenases

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行う。二核銅を活性中心に持つチロシナーゼも研究対象である。

IV 核共鳴非弾性散乱分光による鉄含有生体分子の

振動構造解析

Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Studies of Iron-containing Biomolecules

太田雄大*
Ohta, T.

核共鳴非弾性散乱分光法 (NRVS) は、原子核の共鳴準位のエネルギーに近い x 線を試料に照射し、固体のフォノンもしくは分子振動の生成・消滅をともなう原子核励起をおこさせることにより、振動の様子を調べる分光法である。金属蛋白質の振動分光法としては、共鳴ラマン分光法もしくは赤外吸収分光法が主たる手法であったが、NRVS は選択則無くすべての鉄原子の振動モードの観測を可能にするため、従来の分光法では得られなかった知見が得られる。本分光法を用いて、鉄蛋白質の分子機構の解明を目指す。

発表論文 List of Publication

- I-1 B. Wang (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), W.-Y. Tcho (Ewha Womans Univ), S. Tussupbayev (Institute for Basic Science), S.-T. Kim (Institute for Basic Science), Y. Kim (Korea Basic Science Institute), M. S. Seo (Ewha Womans Univ), K.-B. Cho (Ewha Womans Univ), Y. Dede (Gazi University), B. C Keegan (University of Nevada), T. Ogura, S. H. Kim* (Korea Basic Science Institute), T. Ohta, M.-H. Baik (KAIST), K. Ray (Humboldt-Universität zu Berlin), J. Shearer (University of Nevada), W. Nam (Ewha Womans Univ),: Synthesis and Reactivity of a Mononuclear Non-Haem Cobalt (IV)-oxo Complex, *Nature Communications*, 8, 14839 (2017)
- I-2 B. Shin (DGIST), K. D. Sutherlin (Stanford Univ), T. Ohta, T. Ogura, E. I. Solomon (Stanford Univ), J Cho (DGIST): Reactivity of a Cobalt(III)–Hydroperoxo Complex in Electrophilic Reactions, *Inorganic Chemistry*, 55 (23), 12391–12399 (2016)
- I-3 T. Ohta, P. Nagaraju (中部大), J.-G. Liu (ECUST), T. Ogura, and Y. Naruta (中部大): The Secondary Coordination Sphere and Axial Ligand Effects on Oxygen Reduction Reaction by Iron Porphyrins: a DFT Computational Study, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21 (5-6), 745–755 (2016)
- I-4 P. Nagaraju (中部大), T. Ohta, J.-G. Liu (ECUST), T. Ogura, and Y. Naruta* (中部大): The Secondary Coordination Sphere Controlled Reactivity of a Ferric-Superoxo Heme: Unexpected Conversion to a Ferric Hydroperoxo Intermediate by Reaction with a High-spin Ferrous Heme, *Chemical Communications*, 52 (45), 7213-7216 (2016)
- I-5 M. Sakaguchi, T. Kimura (理研), T. Nishida, T. Tosha (理研), H. Sugimoto (理研), Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, G. Ueno (理研), H. Murakami (理研), H. Ago (理研), M. Yamamoto (理研), T. Ogura, Y. Shiro (理研), M. Kubo (理研): A Nearly on-axis Spectroscopic System for Simultaneously Measuring UV-visible Absorption and X-ray Diffraction in the SPring-8 Structural Genomics Beamline, *J. Synchrotron Radiat.*, 23, 334-338 (2016)
- I-6 T. Kishima (九州大), T. Matsumoto (九州大), H. Nakai (九州大), S. Hayami (熊本大), T. Ohta, S. Ogo (九州大): A High-Valent Iron(IV) Peroxo Core Derived from O₂, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 724-727 (2016)
- I-7 Z. N. Zahran (中部大, Tanta Univ.), E. A. Mohamed (中部大), T. Ohta, Y. Naruta (中部大): Electrocatalytic Water Oxidation by a Highly Active and Robust α -Mn₂O₃Thin Film Sintered on a Fluorine-Doped Tin Oxide Electrode, *ChemCatChem*, 8, 532-535 (2016)
- I-8 Y. Kanai (筑波大), R. Nishimura (筑波大), K. Nishiyama (筑波大), T. Shibata (筑波大), S. Yanagisawa, T. Ogura, T. Matsuo (奈良先端大), S. Hirota (奈良先端大), S. Neya (千葉大), A. Suzuki (長岡技術大), Y. Yamamoto (筑波大): Effects of Heme Electronic Structure and Distal Polar Interaction on Functional and Vibrational Properties of Myoglobin, *Inorg. Chem.*, 55, 1613-1622 (2016)
- I-9 H. Sugimoto (大阪大), M. Sato (大阪大), K. Asano (大阪大), T. Suzuki (大阪大), K. Mieda, T. Ogura,

- T. Matsumoto ((株)リガク), L. J. Giles (Univ. of New Mexico), A. Pokhrel (Univ. of New Mexico), M. L. Kirk (Univ. of New Mexico), S. Itoh (大阪大): A Model for the Active-Site Formation Process in DMSO Reductase Family Molybdenum Enzymes Involving Oxido-Alcoholato and Oxido-Thiolato Molybdenum(VI) Core Structures, *Inorg. Chem.*, 55, 1542-1550 (2016)
- I-10 K. Shinzawa-Itoh, H. Shimomura, S. Yanagisawa, S. Shimada, R. Takahashi, M. Oosaki, T. Ogura, T. Tsukihara; Purification of Active Respiratory Supercomplex from Bovine Heart Mitochondria Enables Functional Studies, *J. Biol. Chem.*, 291, 4178-4184 (2016)
- I-11 H. Fujii (奈良女子大), D. Yamaki (首都大東京), T. Ogura, M. Hada (首都大東京): The Functional Role of the Structure of the Dioxo-isobacteriochlorin in the Catalytic Site of Cytochrome *cd*₁ for the Reduction of Nitrite, *Chem. Sci.*, 7, 2896-2906 (2016)
- I-12 M. Kodera (同志社大), S. Ishiga (同志社大), T. Tsuji (同志社大), K. Sakurai (同志社大), Y. Hitomi (同志社大), Y. Shiota (九州大学), P. K. Sajith (九州大学), K. Yoshizawa (九州大学), K. Mieda, T. Ogura: Formation and High Reactivity of the anti-Dioxo Form of High-Spin μ -Oxodioxodiiron(IV) as the Active Species That Cleaves Strong C-H Bonds, *Chemistry*, 22, 5924-5936 (2016)
- I-13 M. Nagai (法政大), Y. Nagai (法政大), Y. Aki (法政大), H. Sakurai (法政大), N. Mizusawa (法政大), T. Ogura, T. Kitagawa, Y. Yamamoto (筑波大), S. Nagatomo (筑波大): Heme orientation of cavity mutant hemoglobins (His F8 \rightarrow Gly) in either α or β subunits; Circular dichroism, ¹H NMR, and resonance Raman studies. *Chirality*, 28, 585-592 (2016).
- I-14 Hong, S. (Ewha Womans Univ), Lee, Y. (Ewha Womans Univ), M., Sankaralingam (Ewha Womans Univ), M., Vardhaman (Ewha Womans Univ), A. K., Park (Ewha Womans Univ), Y. J., Cho (Ewha Womans Univ), K. B., Ogura, T., Sarangi, R., Fukuzumi, S., and Nam, W. (Ewha Womans Univ) A Manganese(V)-Oxo Complex: Synthesis by Dioxygen Activation and Enhancement of Its Oxidizing Power by Binding Scandium Ion, *J. Am. Chem. Soc.* 138, 8523-8532. (2016)
- I-15 Sekino, M., Furutachi, H., Tasaki, K., Ishikawa, T., Mori, S., Fujinami, S., Akine, S., Sakata, Y., Nomura, T., Ogura, T., Kitagawa, T., and Suzuki, M. New mechanistic insight into intramolecular arene hydroxylation initiated by (μ -1,2-peroxo)diiron(III) complexes with dinucleating ligands, *Dalton Trans* 45, 469-473. (2016)
- I-16 Shimoyama, Y., Ishizuka, T., Kotani, H., Shiota, Y., Yoshizawa, K., Mieda, K., Ogura, T., Okajima, T., Nozawa, S., and Kojima, T. A Ruthenium(III)-Oxyl Complex Bearing Strong Radical Character, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 14041-14045. (2016)
- I-17 S. Nagatomo (筑波大), M. Okumura (筑波大), K. Saito (筑波大), T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai (法政大): Interrelationship among the Fe-His bond strength, oxygen affinities and intersubunit hydrogen-bonding changes upon ligand binding in β subunit of human hemoglobin; the alkaline Bohr effect. *Biochemistry* 56, 1261-1273 (2017)

- I-18 北川禎三：高次構造によるタンパク質の機能制御：ヒトヘモグロビンの協同的O₂結合と四次構造変化、佐賀大学理工学部 集中講義、2017
- I-19 北川禎三：Unusual heme structure of soluble guanylate cyclase revealed with resonance Raman spectroscopy, 佐賀大学理工学部 特別講演、2017
- I-20 長友重紀（筑波大）・齋藤一弥（筑波大）・長井雅子（法政大）・小倉尚志・北川禎三：四量体ヒトヘモグロビンにおける2つの α 鎖に特有のFe-His結合と四次構造との関連、第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議、2016
- I-21 T. Ohta, P. Nagaraju (中部大), Y. Naruta (中部大): Efficient Oxygen Reduction Catalysis of Fe-Porphyrins, 5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC 2017), Kolkata, India, 招待講演、2017
- I-22 T. Ohta, P. Nagaraju (中部大), Y. Naruta (中部大): 2nd Coordination Sphere Controlled Oxygen Reduction Reaction Catalyzed by a Bio-inspired Iron Porphyrin, 9th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-9), Nanjing, China, 招待講演、2016
- I-23 中島 聡・中川 善之・伊藤-新澤 恭子・吉川 信也・小倉 尚志：チトクローム酸化酵素の反応サイトの時間分解ラマン分光法による動的構造解析、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場（福岡市）、ポスター、2016
- I-24 中川善之・伊藤-新澤 恭子・吉川信也・中島 聡・小倉尚志：時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクローム *c* 酸化酵素のCO光解離に伴う構造ダイナミクスの研究、日本化学会第96春季年会、同志社大学京田辺キャンパス（京田辺市）、一般口頭、2016
- I-25 青柳裕大・西口達人・伊藤-新澤 恭子・吉川信也・中島 聡・小倉尚志：チトクローム酸化酵素の水素結合状態変化の酸素還元反応への影響、日本化学会第96春季年会、同志社大学京田辺キャンパス（京田辺市）、ポスター、2016
- I-26 K. Nishikawa, S. Inomata, Y. Kawahara, K. Fukutani, T. Yagi, T. Ogura, and Higuchi, Y. (2016) A new method of assaying the hydrogenase activity by means of Raman spectroscopy, In 11th International Hydrogenase Conference, Marseille, France.
- II-1 中島 聡・中川 善之・Li Chen・伊藤-新澤 恭子・吉川 信也・小倉 尚志：時間分解振動分光法によるチトクローム *c* 酸化酵素のプロトンポンプ共役機構の研究、第43回生体分子科学討論会2016、名古屋大学 野依記念学術交流館（名古屋市）、一般口頭、2016
- II-2 S. Nakashima, C. Li, T. Nishiguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura: The Coupling Mechanism Between Proton Pumping and Oxygen Reduction Reaction in Cytochrome *c* Oxidase, 鐘山賓館（南京市）中華人民共和国, 招待講演, 2016
- III-1 S. Yanagisawa, M. S. Deshpande(奈良先端大), S. Hirota(奈良先端大), T. Nakagawa(ユニソク) and T. Ogura, 'Improved stopped-flow time-resolved resonance Raman spectroscopy device for studying enzymatic reactions,' *J. Raman Spectrosc.*, 48, 680-687, 2017

- III-2 S. Yanagisawa, K. Kayama, H. Sugimoto (理研), Y. Shiro and T. Ogura: Detection of tryptophan as bound substrate in the indoleamine 2,3-dioxygenase intermediate model, ICPP-9, 中国, 南京, 招待講演, 2016

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 青柳裕大：時間分解分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の反応初期過程の追跡
山口祥弘：結晶チトクロム *c* 酸化酵素の時間分解構造解析
渡部明莉：酵素反応解析のための微量高速混合器の開発
中尾知美：呼吸鎖超複合体中末端酵素の構造解析
西畑佳晃：時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の動的構造解析
村上裕紀：ケージド酸素化合物の時間分解結晶構造解析への応用
山内 舜：蛋白質赤外測定のための超薄型フローセルシステムの開発

博士課程（5年一貫）

- Li Chen：時間分解赤外分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクスと反応機構
河原由佳：振動分光法による細胞内二原子分子の可視化をもとにした信号伝達機構の研究

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 28～29 年度）新学術領域研究（研究領域提案型）課題番号: 16H00848
研究課題 液滴衝突法による微量タンパク質の反応追跡
研究代表者 小倉尚志
- 2 科学研究費補助金（平成 27～28 年度）新学術領域研究（研究領域提案型）課題番号: 15H00960
研究課題 酵素に結合した感応性化学種の振動分光法による選択的検出と反応機構
研究代表者 小倉尚志
- 3 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）基盤研究(C) 課題番号:15K05393
研究課題 新規時間分解振動分光法によるチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ共役機構の探求
研究代表者 中島 聡
- 4 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）若手研究(B) 課題番号:15K21295
研究課題 ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系超複合体形成は末端酵素の反応性に影響を与えるか？
研究代表者 柳澤幸子

- 5 X線自由電子レーザー重点戦略課題についての委託事業（平成 24～28 年度）
委託業務題目 無損傷・動的結晶構造解析による生体エネルギー変換過程の可視化
（ポンプ・プローブ法を用いたチトクロム酸化酵素反応中間体の無損傷高分解能
構造解析に関する研究）
業務主任者 小倉尚志
- 6 戦略的国際研究交流推進事業費補助金（平成 26～28 年度）
研究課題 分子性金属システムによる酸素と窒素の化学のための戦略的国際研究網の構築
担当研究者 小倉尚志、太田雄大
- 7 科学研究費補助金（平成 28～30 年度）基盤研究(C) 課題番号:16K05850
研究課題 核共鳴非弾性散乱分光によるセンサー蛋白質の気体感知機構の解明
研究代表者 太田 雄大