

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
Ogura, T., Yamaguchi, S., Nakashima, S., Kubo, 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、F₁F₀-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, S.

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 固体 NMR 分光法による膜表在性蛋白質-生体膜複合体の構造 と機能の解析

Structure and Function of Membrane-Binding Protein at the Lipid Bilayer Surface Studied by the Solid State NMR Spectroscopy

辻 暁
Tuzi, S.

細胞内情報伝達系などの重要な細胞機能に関わる蛋白質の多くは細胞膜表面に局在し、生体膜上で機能しているが、膜との相互作用の様式、膜上における構造、膜面に対する配向など、脂質膜上における蛋白質の構造的特徴は十分に明らかにされていない。脂質結合ドメインを主な対象として、固体 NMR 分光法による脂質二重膜 - 蛋白質複合体の解析手法の開発と、生体膜表面における膜結合性蛋白質ドメインの構造的特徴の解析を行う。

発表論文 List of Publications

- I-1 Kaoru Honda (金沢大), Jaeheung Cho (金沢大), Takahiro Mtsumoto (金沢大), Jungyun Roh (金沢大), Kideki Furutachi (金沢大), Takehiko Tosha (岡崎統合バイオ), Minoru Kubo, Shuhei Fujinami (金沢大), Takashi Ogura, Teizo Kitagawa (岡崎統合バイオ) and Masatatsu Suzuki (金沢大), Oxidation Reactivity of a Bis(μ -oxo) Dinickel(III) Complexes: Arene Hydroxylation of the Supporting Ligand, *Angewandte Chemie, Int. Ed.*, 2009, 121, 3354-3357.
- I-2 Atsushi Kunishita (阪市大), Minoru Kubo, Hideki Sugimoto (阪市大), Takashi Ogura, Kazunobu Sato (阪市大), Takeji Takui (阪市大) and Shinobu Itoh (阪大), Mononuclear Copper (II)-Superoxo Complexes that Mimic the Structure and Reactivity of the Active Centers of PHM and D β M, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 2788-2789.
- I-3 Fukumura, E. (阪大), Sugimoto, H. (理研), Misumi, Y., Ogura, T. and Shiro, Y. (理研), Cooperative Binding of L-Trp to Human Tryptophan 2, 3-Dioxygenase: Resonance Raman Spectroscopic Analysis, *J. Biochem.*, 2009, 145, 505-515.
- I-4 Lee, Y.-M. (Ewha Womans Univ.), Dhuri, S. N. (Ewha Womans Univ.), Sawant, S. C. (Ewha Womans Univ.), Cho, J. (Ewha Womans Univ.), Kubo, M., Ogura, T., Fukuzumi, S. (阪大) and Nam, W. (Ewha Womans Univ.), Water as an Oxygen Source in the Generation of Mononuclear Nonheme Iron(IV) Oxo Complexes, *Angewandte Chemie, Int. Ed.*, 2009, 121, 1835-1838.
- I-5 Aoyama, H. (理研), Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., Hirata, K. (阪大), Yamashita, E. (阪大), Tsukihara, T., Ogura, T. and Yoshikawa, S., A peroxide bridge between Fe and Cu ions in the O₂ reduction site of fully oxidized cytochrome *c* oxidase could suppress the proton pump, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106, 2165-2169.
- I-6 Kunishita, A. (阪市大), Kubo, M., Ishimaru, H., Ogura, T., Sugimoto, H. (阪市大) and Itoh, S. (阪市大), H₂O₂-Reactivity of Copper(II) Complexes Supported by TPA Ligands with 6-Phenyl Substituents, *Inorganic Chemistry*, 2008, 47, 12032-12039.
- I-7 Inosako, M. (阪市大), Kunishita, A. (阪市大), Shimokawa, C. (阪市大), Teraoka, T. (阪市大), Kubo, M., Ogura, T., Sugimoto, H. (阪市大) and Itoh, S. (阪市大), Reaction of β -Diketimate Copper(II) Complexes and Na₂S₂, *Dalton Trans.* 2008, 6250 - 6256.

- I-8 Ikemura, K., Mukai, M. (JBIC), Shimada, H., Tsukihara, T., Yamaguchi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. and Ogura, T., Red-Excitation Resonance Raman Analysis of the $\nu_{\text{Fe-O}}$ Mode of Ferryl-Oxo Hemoproteins, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 14384-14385.
- I-9 Kunishita, A. (阪市大), Scanlon, J. D., Ishimaru, H., Honda, K. (阪市大), Ogura, T., Suzuki, M. (金沢大), Cramer, C. J. and Itoh, S. (阪市大), Reactions of Copper(II)-H₂O₂ Adducts Supported by Tridentate Bis(2-pyridylmethyl)amine Ligands: Sensitivity to Solvent and Variations in Ligand Substitution, Inorg. Chem., 2008, 47, 8222-8232.
- I-10 石上 泉・中島 聡・新澤伊藤恭子・吉川信也・小倉尚志：時間分解共鳴ラマン分光法を用いたチトクロム *c* 酸化酵素の CO 光乖離後の構造緩和過程の追跡、第 35 回生体分子科学討論会 (赤穂郡)、2008.
- I-11 小倉尚志：ウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素のプロトンポンプ反応、特定領域研究 (高次系分子科学) ミニ公開シンポジウム「プロトンポンプを考える」(大阪) 2008.
- I-12 劉 劉剛(九大)・太田雄大(九大)・小倉尚志・成田吉徳(九大) : Selective preparation of superoxo, peroxy and hydroperoxy species relating to heme-containing oxygenase and peroxidase, 第 58 回錯体化学討論会、2008.
- I-13 Sachiko Yanagisawa, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Takashi Ogura: ブタ心筋ミトコンドリア中のチトクロム *c* 酸化酵素の共鳴ラマンスペクトル、第 46 回日本生物物理学会年会 (福岡) 2008.
- I-14 Takashi Ogura, Sachiko Yanagisawa, Kenichiro Ikemura, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Hideo Shimada: Resonance Raman Spectroscopy of Cytochrome *c* Oxidase, The 4th Asian Bioinorganic Chemistry Conference (Jeju, Korea) Nov. 10 – 13, 2008.
- I-15 Kenichiro Ikemura, Minoru Kubo, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Hideo Shimada and Takashi Ogura: Assignment of the Oxygen-Isotope-Sensitive Resonance Raman Band at 356-cm⁻¹ of the P-Intermediate of Cytochrome *c* Oxidase to an O=Fe-N Bending Mode, The 4th Asian Bioinorganic Chemistry Conference (Jeju, Korea) Nov. 10 – 13, 2008.
- I-16 池村賢一郎・久保 稔・島田秀夫・伊藤新澤恭子・吉川信也・小倉尚志：チトクロム *c* 酸化酵素の P 反応中間体に現れる酸素同位体敏感ラマン線 (356 cm⁻¹) の帰属決定、日本化学会第 89 春季年会 (船橋)、2009.
- I-17 池村賢一郎・向井政博 (JBIC)・島田秀夫・月原富武・山口 悟・伊藤新澤恭子・吉川信也・小倉尚志: フェリルオキシ型ヘムタンパク質の赤色励起共鳴ラマン分光、日本化学会第 89 春季年会 (船橋)、2009.
- I-18 石上 泉・中島 聡・伊藤新澤恭子・吉川信也・小倉尚志：時間分解共鳴ラマン分光法を用いたチトクロム *c* 酸化酵素の CO 光乖離後の構造緩和過程の追跡、日本化学会第 89 春季年会 (船橋)、2009.
- III-1 I. Kawamura, J. Tanabe, M. Ohmine, S. Yamaguchi, S. Tuzi, and A. Naito: Participation of the BC loop in the correct folding of bacteriorhodopsin as revealed by solid-state NMR, Photochem. Photobiol., **85**, 624-630 (2009)
- III-2 I. Kawamura, H. Yoshida, Y. Ikeda, S. Yamaguchi, S. Tuzi, H. Saitô, N. Kamo, and A. Naito: Dynamics change of phoborhodopsin and transducer by activation: study using D75N mutant of the receptor by site-directed solid-state ¹³C NMR, Photochem. Photobiol., **84**, 921-930 (2008).
- III-3 徳田尚美・八木澤 仁・福井泰久・辻 暁：脂質膜上における局所構造の特徴に基づく pleckstrin homology domain-脂質膜間相互作用の解析、第47回NMR討論会 (筑波 2008)
- III-4 田島可奈・川村 出・和田昭盛・西川大英・辻 暁・内藤 晶：固体NMRを用いた¹³C標識レチナールのタンパク質中での光照射および圧力印加による異性化メカニズムの解析、第47回NMR討論会 (筑波 2008)

- III-5 川村 出・田辺純子・西尾拓道・辻 暁・内藤 晶； 固体NMRによるバクテリオロドプシンのレチナル異性化に依存したTyr残基の動的構造変化の解析、第47回NMR討論会（筑波 2008）
- III-6 N. Uekama, T. Aoki, T. Maruoka, S. Kurisu, A. Hatakeyama, M. Okada, H. Yagisawa, K. Nishimura, and S. Tuzi: Influence of membrane curvature on the structure of the membrane-associated pleckstrin homology domain of phospholipase C- δ 1, The 46th annual meeting of the biophysical society of Japan (Fukuoka 2008)
- III-7 Y. Narukawa, J. Tanabe, I. Kawamura, S. Tuzi, and A. Naito: Conformational changes of bacteriorhodopsin in the vicinity of Asp involving in proton pumping as studied by solid-state NMR, The 46th annual meeting of the biophysical society of Japan (Fukuoka 2008)
- III-8 K. Tajima, I. Kawamura, S. Tuzi, and A. Naito: Interaction of aromatic amino acid residues with retinal in bacteriorhodopsin as disclosed by solid-state NMR, The 46th annual meeting of the biophysical society of Japan (Fukuoka 2008)
- III-9 I. Kawamura, J. Tnabe, T. Nishino, S. Tuzi, and A. Naito: Solid-state NMR studies of backbone conformations at Tyr as a probe of retinal-protein interaction in the dark-adapted bacteriorhodopsin, The 46th annual meeting of the biophysical society of Japan (Fukuoka 2008)
- III-10 A. Kira, M. Tanio, I. Kawamura, S. Tuzi, H. Saito, and A. Naito: The role of kinked structures in the B and C α -helices of bacteriorhodopsin in proton transfer, as studied by solid-state NMR, The 46th annual meeting of the biophysical society of Japan (Fukuoka 2008)

大学院生命理学研究科

博士後期課程

池村賢一郎：高酸化型ヘムタンパク質の活性部位の振動分光学的

石丸裕士：フェリルオキシ型ヘムの $n \cdot \text{Fe}=\text{O}$ ラマン線の励起プロファイルと反応性の解析

博士前期課程

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：脂質膜表面において誘起される Pleckstrin Homology ドメインの構造変化とドメイン - 脂質膜間相互作用の解析

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

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 19～20 年度）基盤研究（B） 課題番号：19350089

研究課題 ガスセンサーヘムタンパク質の特異的リガンド識別と検出情報伝達機構の構造化学

研究分担者 小倉尚志（研究代表者 北川禎三）

- 2 科学研究費補助金（平成 20～21 年度）特定領域研究 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 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 ターゲットタンパク研究プログラム（平成 19～21 年）
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）
- 5 科学研究費補助金（平成 19～20 年度）特定領域研究 課題番号：19036031
研究課題 固体 NMR 分光法による生体膜表面に局在する細胞内情報伝達システムの分子機構の解析
研究代表者 辻 暁
- 6 科学研究費補助金（平成 20～21 年度）若手研究(B) 研究課題番号：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 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 20 年度）奨励研究
研究課題 フェムト秒レーザーを用いた超高感度時間分解赤外分光装置の開発
研究代表者 久保 稔