

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.

生物を構成する細胞の活動は、酵素・タンパク質の機能によって支えられている。酵素・タンパク質の機能は、機能中心アミノ酸残基の働きの結果である。しかし、その働きの実態は、推測されているに過ぎない。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）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、酸素分子の一原子を有機物質に導入する反応を触媒するチトクロム P450 の、それぞれの機能中心アミノ酸残基の働きの実態を研究するために、触媒反応中のそれら残基を振動分光法により観測することを目指している。酵素分子は、数多くのアミノ酸残基によって構成され、機能部位アミノ酸残基と同種のものが多数含まれる。したがって、個々の残基に由来する吸収帯を検出することは難しい。しかし、特定部位を、機能に影響を与えない同位体標識化すると、同位体シフトによって、その残基に由来するシグナルが検出可能となる。無細胞タンパク質合成系を利用した部位特異的同位体標識化試料の大量調製、特に膜タンパク質複合体であるチトクロム *c* 酸化酵素の調製法の研究を行っている。

発表論文 List of Publication

- 1 Ikemura, K., Mukai, M., 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 Hemoprotein, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 14384-14385 (2008)
- 2 Hayashi, T., Harada, K., Sakurai, K., Shimada, H., and Hirota, S.: A Role of the Heme-7-Propionate Side Chain in Cytochrome P450cam as a Gate for Regulating the Access of Water Molecules to the Substrate-Binding Site, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 1398-1400 (2009)
- 3 Sakurai, K., Shimada, H., Hayashi, T., and Tsukihara, T.: Substrate binding induces structural changes in cytochrome P450cam, *Acta. Cryst.* F65, 80-83 (2009)
- 4 Shimokata, K., Katayama, Y., Suematsu, M., Tsukihara, T., Yoshikawa, S., and Shimada,

- H.: Mutations of possible proton-transfer pathways of bovine heart cytochrome *c* oxidase, EBEC, Dublin, Ireland, July (2008)
- 5 Katayama, Y., Shimokata, K., Suematsu, M., Tsukihara, T., Ogura, T., Yoshikawa, S., and Shimada, H.: Synthesis of functional *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase by *Escherichia coli* cell-free coupled transcription/translation system, EBEC, Dublin, Ireland, July (2008)
 - 6 Yoshikawa, S., Tsukihara, T., Shimada, H., Shinzawa-Itoh, K., Muramoto, K., and Aoyama, H.: Evidence for the H-channel proton pump in bovine cytochrome *c* oxidase, EBEC, Dublin, Ireland, July (2008)
 - 7 Sakurai, K., Harada, K., Shimada, H., and Hayashi, T.: Roles of Heme-6-Propionate Side Chain in Monooxygenase Cytochrome P450cam, IUCr2008, Osaka, Japan, Aug, (2008)
 - 8 Ikemura, K., Kubo, M., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Shimada, H., Ogura, T.: 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, AsBIC, Jeju Island, Korea, November (2008)
 - 9 Hayashi, T., Harada, K., Sakurai, K., Shimada, H., Evaluation of Functional Role of Heme-propionate Side Chains in Cytochrome P450CAM, AsBIC, Jeju Island, Korea, November (2008)
 - 10 Ogura, T., Yanagisawa, S., Ikemura, K., Shinzawa-Itoh, Yoshikawa, S., and Shimada, H.: Resonance Raman Spectroscopy of Cytochrome *c* Oxidase, AsBIC, Jeju Island, Korea, November (2008)
 - 11 下方国稔 (Word Intec)・網中良太・片山幸江・末松 誠 (慶應大)・月原富武・吉川信也・島田秀夫: ウシチトクロム *c* 酸化酵素のプロトン輸送経路の変異体解析、日本生体エネルギー研究会 第 34 回討論会『細胞、情報とエネルギー変換』東京、11 月 (2008)
 - 12 島田秀夫: 赤外分光解析が示すミオグロビン酸素結合部位立体構造の動的相互変換、グローバル COE 研究集会「ヘモグロビン—この未知なるもの—」11 月、上郡、兵庫 (2008)
 - 13 片山幸江・下方国稔 (Word Intec)・末松 誠 (慶應大)・小倉尚志・月原富武・吉川信也・島田秀夫: チトクロム *c* 酸化酵素の大腸菌無細胞転写翻訳系での機能発現、第 34 回討論会『細胞、情報とエネルギー変換』東京、11 月 (2008)
 - 14 片山幸江・末松 誠 (慶應大)・月原富武・吉川信也・島田秀夫: Cell-free synthesis of a soluble conjugated protein, cytochrome P450cam from *Pseudomonas putida*, 第 46 回日本生物物理学会 福岡 12 月 (2008)
 - 15 櫻井啓介 (大阪大)・原田勝好 (大阪大)・下方国稔 (Word Intec)・林 高史 (大阪大)・島田秀夫: Roles of Asp297 in the vicinity of the active site of cytochrome P450cam in substrate binding, 第 46 回日本生物物理学会 福岡 12 月 (2008)
 - 16 下方国稔 (Word Intec)・網中良太・片山幸江・月原富武・吉川信也・島田秀夫: ウシチトクロム *c* 酸化酵素の水素結合ネットワーク D-pathway の変異体解析の現状、特定領域研究「生

体超分子構造」第5回公開シンポジウム、12月、筑波（2008）

- 17 下方国稔（Word Intec）・網中良太・片山幸江・月原富武・吉川信也・島田秀夫： ヒト培養細胞でのウシ・ヒト雑種チトクロム *c*酸化酵素の強制発現：ミトコンドリアの融合促進と呼吸系酵素群の誘導、特定領域研究「生体超分子構造」第5回公開シンポジウム、12月、筑波（2008）

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省研究費補助金（平成20年度）特定領域研究 課題番号 18054030
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
- 2 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20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 サブテーマ「ミトコンドリアチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ機構の分子生物学的研究」
業務主任者 島田秀夫（平成20年9月30日までは慶應大での業務、それ以降は本学の業務担当責任者）