

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・柳澤幸子・北川禎三*・中島 聡*・久保 稔*
(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., Yamaguchi, S., Yanagisawa, S., Kitagawa, T. *, Nakashima, S. *, Kubo, M. *
(*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、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*
(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., Yamaguchi, S., Nakashima, S. *, Kubo, M. *
(*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、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 酸素添加酵素の反応機構の解明

Resonance Raman Elucidation of Reaction Mechanism of Dioxygenases

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。

IV 固体 NMR 分光法を用いた生体膜表面における細胞生理機能の

制御機構の解析

Solid State NMR Study on the Structural Basis of the Cellular Functions Localized at the Membrane Surface

辻 暁
Tuzi, S.

細胞の生理的機能は、刺激に応じた細胞内のシグナル伝達により制御されている。このようなシグナル伝達経路の中継、シグナルの変換、生理的機能との結合等は、多くの場合、細胞膜や細胞内小器官の脂質膜表面で行われている。グアニンヌクレオチド交換因子等、細胞内シグナル伝達機構に関与する蛋白質を対象として、蛋白質中の脂質膜結合ドメインの脂質膜表面での構造と動きを固体 NMR 分光法をはじめとする分光学的手法により明らかにし、生体膜上での生理的機能制御の基盤となるメカニズムを探究する。

発表論文 List of Publications

- I-1 Nobutaka Fujieda, Takuya Ikeda, Michiaki Murata, Sachiko Yanagisawa, Shigetoshi Aono, Kei Okubo, Satoshi Nagao, Takashi Ogura, Shun Hirota, Shunichi Fukuzumi, Yukihiro Nakamura, Yoji Hata, and Shinobu Itoh, Post-translational His-Cys Cross Linkage Formation in Tyrosinase Induced by Copper(II)-Peroxo Species, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, *133*, 1180–1183.
- I-2 B. Pal and T. Kitagawa, Differences between two active forms of CO-bound soluble guanylate cyclase in the presence of activators and substrate and their populations revealed by resonance Raman spectroscopy, *Ind. J. Chem.*, 2011, *50A*, 395-400.
- I-3 M. Hiramatsu, M. Lu, Y. Goto, and T. Kitagawa, The β -sheet structure pH dependence of the core fragments of β_2 -microglobulin amyloid fibrils, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2010, *83*, 495-504.
- I-4 B. Pal and T. Kitagawa, Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase; A new perspective to the mechanism of activation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, *397*, 375-379.
- I-5 B. Pal, B., Tanaka, S. Takenaka, and T. Kitagawa, Resonance Raman spectroscopic investigation of structural changes of CO-heme in soluble guanylate cyclase generated by effectors and substrate, *J. Raman Spectrosc.*, 2010, *41*, 1178-1184.
- I-6 Kenichi Kitanishi, Kazuo Kobayashi, Yuriko Kawamura, Izumi Ishigami, Takashi Ogura, Kyosuke Nakajima, Jotaro Igarashi, Atsunari Tanaka, and Toru Shimizu, Important Roles of Tyr43 at the Putative Heme Distal Side in Oxygen Recognition and Stability of the Fe(II)-O₂ Complex of YddV, a Globin-coupled Heme-based Oxygen Sensor Diguanylate Cyclase, *Biochemistry*, 2010, *49*, 10381–10393.
- I-7 Jaeheung Cho, Ritimukta Sarangi, Hye Yeon Kang, Jung Yoon Lee, Minoru Kubo, Takashi Ogura, Edward Solomon and Wonwoo Nam, Synthesis, Structural and Spectroscopic Characterization, and Reactivities of Mononuclear Cobalt(III)-Peroxo Complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, *132*, 16977–16986.
- I-8 Takahiko Kojima, Yuichirou Hirai, Tomoya Ishizuka, Yoshihito Shiota, Kazunari Yoshizawa, Kenichiro Ikemura, Takashi Ogura, and Shunichi Fukuzumi, A Low-Spin Ruthenium(IV)-Oxido Complex : Does the Spin State Have an Impact on the Reactivity?, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, *49*, 8449-8453.
- I-9 Sun Hee Kim, Hyejin Park, Mi Sook Seo, Minoru Kubo, Takashi Ogura, Jan Klajn, Daniel T. Gryko, Joan SelverstoneValentine, and Wonwoo Nam, Reversible O-O Bond Cleavage and Formation between Mn(IV)-Peroxo and Mn(V)-Oxo Corroles, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14030–14032.
- I-10 Miyuki Sakaguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Takashi Ogura, A Resonance Raman Band Assignable to the O–O Stretching Mode in the Resting Oxidized State of Bovine

- Heart Cytochrome *c* Oxidase, *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, 42, 241-243.
- I-11 Yukie Katayama, Kunitoshi Shimokata, Makoto Suematsu, Takashi Ogura, Tomitake Tsukihara, Shinya Yoshikawa and Hideo Shimada, Cell-free synthesis of cytochrome *c* oxidase, a multicomponent membrane protein, *J. Bioenergetics and Biomembranes*, 2010, 42, 235-240.
- I-12 T. Tano, Y. Doi, M. Inosako, A. Kunishita, M. Kubo, H. Ishimaru, T. Ogura, H. Sugimoto, and S. Itoh, Nickel(II) Complexes of tpa Ligands with 6-Phenyl Substituents (Ph₆tpa). Structure and H₂O₂-Reactivity, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2010, 83, 530-538.
- I-13 Miyuki Sakaguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, Resonance Raman Evidence for Heme-heme interaction in Cytochrome *c* Oxidase, 第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、宮城県
- I-14 Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, Structural Relaxation of Cytochrome *c* Oxidase after CO photolysis: Assignment of a Heme Peripheral Raman Mode, 第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、宮城県
- I-15 石丸裕士・藤井 浩・小倉尚志、ペルオキシダーゼ反応中間体モデル錯体の共鳴ラマンスペクトル、第 60 回錯体化学討論会、平成 22 年 9 月 27 日～30 日、大阪府
- I-16 太農哲朗・山口 悟・小倉尚志・杉本秀樹・藤枝伸宇・伊東 忍、単核銅(II)アルキルペルオキシ錯体の性質に及ぼす配位子の効果、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-17 村上将人・洪 達超・末延知義・山口 悟・小倉尚志・福住俊一、単核ルテニウムヘテロポリタングステン酸錯体を触媒とする水の酸化反応機構、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-18 石上 泉・西垣 武・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による CO 光解離後のチトクロム *c* 酸化酵素の構造緩和過程の追跡、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-19 野村高志・柳澤幸子・伊藤-新澤 恭子・吉川信也・小倉尚志、リン脂質小胞に再構成したチトクロム *c* 酸化酵素の共鳴ラマン分光、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-20 石丸裕士・藤井 浩・小倉尚志、高酸化型鉄ポルフィリンの共鳴ラマンスペクトル:軸配位子の陰性度及び 2 位の嵩高さが Fe=O 伸縮振動に及ぼす影響、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-21 西村 龍・柴田友和・長尾 聡・深谷昌史・太 虎林・長友重紀・松尾貴史・廣田 俊・鈴木秋弘・今井清博・石上 泉・小倉尚志・根矢三郎・山本泰彦、ヘム鉄の電子密度の変化を通じたミオグロビンの機能調節機構の解明、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-22 藤枝伸宇・池田拓也・藪田真太郎・柳澤幸子・小倉尚志・伊東 忍、CuA 近傍のアミノ酸残基へ部位特異的変異導入をしたチロシナーゼにおけるペルオキシ活性酸素種の特異性評価、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県

- I-23 藪田真太郎・池田拓也・柳澤幸子・藤枝伸宇・小倉尚志・伊東 忍、CuB 近傍のアミノ酸残基へ部位特異的変異を導入したチロシナーゼにおけるペルオキシ活性酸素種の特性評価、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- I-24 Yuko Misumi, Katsuhiko Yoshii, Ikuko Sagami, Hideo Shimada, Teizo Kitagawa and Takashi Ogura, Structural Analysis of Transcriptional Factor NPAS2 by Resonance Raman Spectroscopy, 第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、宮城県
- II-1 Minoru Kubo, Satoru Yamaguchi, Masao Mochizuki, Shinua Yoshikawa, Takashi Ogura, Satoru Nakashima, Femtosecond-Laser-Based Highly-Sensitive Time-Resolved IR Spectrometer for Studying Enzyme Reactions under Physiological Conditions, 第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、宮城県
- II-2 久保 稔・山口 悟・望月正雄・吉川信也・小倉尚志・中島 聡、高輝度フェムト秒レーザーを用いた時間分解赤外分光装置の開発、分子科学討論会 2010、平成 22 年 9 月 14 日～17 日、大阪府
- III-1 Sachiko Yanagisawa, Masaki Horitani, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Norihiro Okada, and Takashi Ogura, Resonance Raman study on the oxygenated and the ferryl-oxo species of indoleamine 2, 3-dioxygenase during catalytic turnover, *Faraday Disc.*, 2011, *148*, 239 – 247.
- III-2 Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro and Takashi Ogura, A Specific Interaction of L-Tryptophan with CO of CO-Bound Indoleamine 2,3-Dioxygenase Identified by Resonance Raman Spectroscopy, *Biochemistry*, 2010, *49*, 10081-10088.
- III-3 Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro and Takashi Ogura, Resonance Raman study on the oxygenated and the ferryl-oxo species of indoleamine 2, 3-dioxygenase, 第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、宮城県
- III-4 柳澤幸子・杉本 宏・城 宜嗣・小倉尚志、CO 結合型インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼへの Trp の光学異性体依存的相互作用の検出:共鳴ラマン分光法、日本化学会第 91 春季年会、平成 23 年 3 月 29 日、神奈川県
- III-5 柳澤幸子・杉本 宏・城 宜嗣・小倉尚志、インドールアミンジオキシゲナーゼの共鳴ラマンスペクトル、第 37 回生体分子科学討論会、平成 22 年 6 月 18 日～19 日、山口県
- III-6 Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, and Takashi Ogura, Distinct binding geometries of CO to L-Trp- and D-Trp-bound indoleamine 2, 3-dioxygenase as probed with resonance Raman spectroscopy, *Faraday Discussions 148, Spectroscopy, Theory and Mechanisms in Bioinorganic Chemistry*, July 5-7, 2010.
- III-7 Sachiko Yanagisawa, Masaki Horitani, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Evan H. Appelman and Takashi Ogura, Resonance Raman study on the oxygenated and the ferryl-oxo species of indoleamine 2, 3-dioxygenase during catalytic turnover, *Faraday Discussions 148*,

- Spectroscopy, Theory and Mechanisms in Bioinorganic Chemistry, July 5-7, 2010.
- III-8 Takashi Ogura, Sachiko Yanagisawa, Norihiro Okada, Masaki Horitani, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro and Evan H. Appelman, Resonance Raman Identification of a FeIV=O Type Reaction Intermediate During Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Reaction, The XXIIth International Conference on Raman Spectroscopy, August 8-13, 2010.
- III-9 小倉尚志、インドールアミンジオキシゲナーゼの反応中間体活性部位の構造解析：共鳴ラマン分光法、大阪大学蛋白質研究所セミナー：蛋白質の機能 - 構造相関解明のための精密構造解析とその方法 ～水素原子から細胞まで～、平成22年10月6日～7日、大阪府
- III-10 Takashi Ogura, Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto and Yoshitsugu Shiro, Interaction between Substrate and Dioxygen in the Enzyme/Substrate/Dioxygen Ternary Complex of Indoleamine Dioxygenase as Probed with Resonance Raman Spectroscopy, 第48回日本生物物理学会年会、平成22年9月20日～22日、宮城県
- IV-1 S. Tuzi, N. Tokuda, K. Kawai, Y. Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan) , H. Yagisawa; Conformational alterations of the pleckstrin homology domains at the lipid bilayer surface, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu 2010).
- IV-2 徳田尚美・八木澤 仁・福井泰久 (National Health Research Institutes, Taiwan) ・辻 暁、固体 NMR 分光法による PH ドメインの脂質膜表面における構造変化の解析、第 83 回日本生化学会大会、平成 22 年 12 月 7 日～10 日、神戸
- IV-3 徳田尚美・川合克久・八木澤 仁・福井泰久 (National Health Research Institutes, Taiwan) ・辻 暁、固体 NMR による脂質膜表面において誘起される SWAP-70 PH ドメインの構造変化および機能の解析、第 49 回 NMR 討論会、平成 22 年 11 月 15 日～17 日、東京
- IV-4 上釜奈緒子 (分子研) ・辻 暁・西村勝之 (分子研)、不飽和脂質を含有するバイセルに関する固体 NMR を用いた研究、第 49 回 NMR 討論会、平成 22 年 11 月 15 日～17 日、東京
- IV-5 H. Nishikawa (横浜国大) , K. Tajima (横浜国大) , I. Kawamura (横浜国大) , A. Wada (横浜国大) , S. Tuzi, A. Naito (横浜国大)、 Pressure effect on retinal isomerization in bacteriorhodopsin as studied by solid state NMR、第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、仙台
- IV-6 M. Horigome (横浜国大) , I. Kawamura (横浜国大) , S. Tuzi, A. Naito (横浜国大)、 Structural change and dynamics at Tyr residues in Bacteriorhodopsin corresponding to two isomers of retinal as revealed by solid-state NMR、第 48 回日本生物物理学会年会、平成 22 年 9 月 20 日～22 日、仙台

大学院生命理学研究科

博士後期課程

石丸裕士：振動分光法によるヘムモデル化合物の構造解析

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：固体 NMR 分光法による PH ドメインの脂質膜界面における構造転移および機能の解析

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

博士前期課程

野村高志：振動分光法によるプロトンポンプタンパク質の構造解析

石川 実：赤外分光法によるプロトンポンプ反応の追跡

岡田昇大：ヘム酵素の反応機構解明のための構造解析

西垣 武：時間分解共鳴ラマン分光法によるタンパク質構造変化の追跡

馬場剛史：酵素反応活性の理論解析

科学研究費補助金等

1 科学研究費補助金（平成 21～23 年度）基盤研究(C) 課題番号:21570171

研究課題 共鳴ラマン分光法によるチトクロム C 酸化酵素のプロトン輸送機構の解明

研究代表者 小倉尚志

2 科学研究費補助金（平成 22～23 年度）特定領域研究（高次系分子科学） 課題番号:22018026

研究課題 膜タンパク質の生理分子科学

研究代表者 小倉尚志

3 科学研究費補助金（平成 22～24 年度）基盤研究(C) 課題番号:22570191

研究課題 生体膜上における PIP3 結合蛋白質ドメインの高次構造転移と情報伝達機能の制御

研究代表者 辻 暁

4 科学研究費補助金（平成 22～23 年度）若手研究(B) 課題番号:22770154

研究課題 水溶液中におけるチトクロム c 酸化酵素の時間分解赤外分光法

研究代表者 山口 悟

5 科学研究費補助金（平成 21～23 年度）基盤研究(B) 課題番号:21350098

研究課題 ヘム蛋白質のアロステリック効果における情報伝達の構造化学

研究代表者 北川禎三

6 科学研究費補助金（平成 21～22 年度）若手研究(B) 課題番号:21750022

研究課題 超高感度時間分解赤外分光装置の開発と生体系プロトンポンプ機構の解明

研究代表者 久保 稔