

## 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\*・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., 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 などに加え、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\*・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., 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産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クロシナーゼも研究対象である。

### 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 Publication

- I-1 Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Satoru Nakashima and Takashi Ogura, An intermediate conformational state during ligand binding to cytochrome *c* oxidase detected by time-resolved resonance Raman analyses of heme peripheral groups, *Chem. Lett.*, 2012, 2, 178–180., selected as an EC (Editor's Choice) Paper
- I-2 Takahiko Kojima, Kazuya Nakayama, Miyuki Sakaguchi, Takashi Ogura, Kei Ohkubo and Shunichi Fukuzumi, Photochemical Activation of Ruthenium(II)-Pyridylamine Complexes Having a Pyridine-*N*-Oxide Pendant toward Oxygenation of Organic Substrates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 17901–17911.
- I-3 Jaeheung Cho, Jaeyoung Woo, Jung Eun Han, Minoru Kubo, Takashi Ogura and Wonwoo Nam, Chromium(V)-oxo and chromium(III)-superoxo complexes bearing a macrocyclic TMC ligand in hydrogen atom abstraction reactions, *Chem. Sci.*, 2011, 2, 2057–2062.
- I-4 Masato Murakami, Dachao Hong, Tomoyoshi Suenobu, Satoru Yamaguchi, Takashi Ogura and Shunichi Fukuzumi, Catalytic Mechanism of Water Oxidation with Single-Site Ruthenium-Heteropolytungstate Complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 11605–11613.
- I-5 Takahiko Kojima, Kazuya Nakayama, Kenichiro Ikemura, Takashi Ogura and Shunichi Fukuzumi, Formation of a Ruthenium(IV)-Oxo Complex by Electron-Transfer Oxidation of a Coordinatively Saturated Ruthenium(II) Complex and Detection of Oxygen-Rebound Intermediates in C-H Bond Oxygenation, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 11692–11700.
- I-6 Samir F. El-Mashtoly, Minoru Kubo, Satoru Nakashima, Toru Shimizu, and Teizo Kitagawa, Structural Dynamics of *Ec*DOS Heme Domain Revealed by Time-Resolved Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy, 2011, 2, 2212 – 2217.
- I-7 Kenji Kanaori, Yusuke Tajiri, Antonio Tsuneshige, Izumi Ishigami, Takashi Ogura, Kunihiro Tajima, Saburo Neya and Takashi Yonetani, T-quaternary structure of oxy human adult hemoglobin in the presence of two allosteric effectors, L35 and IHP, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics*, 2011, 1807, 1253 – 1261.
- I-8 Tetsuro Tano, Mehmed Z. Ertem, Satoru Yamaguchi, Atsushi Kunishita, Hideki Sugimoto, Nobutaka Fujieda, Takashi Ogura, Christopher J. Cramer and Shinobu Itoh, Reactivity of Copper(II)-Alkylperoxo Complexes, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 10326 –10336.
- I-9 Yu Jin Choi, Kyung-Bin Cho, Minoru Kubo, Takashi Ogura, Kenneth D. Karlin, Jaeheung Cho and Wonwoo Nam, Spectroscopic and computational characterization of Cu<sup>II</sup>–OOR (R = H or cumyl) complexes bearing a Me<sub>6</sub>-tren ligand, *Dalton Trans.*, 2011, 40, 2234–2241.

- I-10 Takashi Ogura, Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto and Yoshitsugu Shiro, Resonance Raman study on CO-bound indoleamine 2, 3-dioxygenase, The Third Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, May 31 – June 4, 2011, Parry Sound, Canada.
- I-11 Takashi Ogura, Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh and Shinya Yoshikawa, Microsecond Protein Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase as Studied with Resonance Raman Spectroscopy, The Third Asian Spectroscopy Conference, Nov. 28 – Dec. 1, 2011, Xiamen, China.
- I-12 Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa and Takashi Ogura, Protein Dynamics and Reaction Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase as Studied by Resonance Raman Spectroscopy, The Third Asian Spectroscopy Conference, Nov. 28 – Dec. 1, 2011, Xiamen, China.
- I-13 石上 泉・西垣 武・中島 聡・伊藤=新澤 恭子・吉川信也・小倉尚志、CO 光解離をトリガーとしたチトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクスの追跡、第 38 回生体分子科学討論会、平成 23 年 6 月 23～24 日、筑波大学、茨城県
- I-14 NOMURA Takashi, YANAGISAWA Sachiko, SHINZAWA-ITOH Kyoko, YOSHIKAWA Shinya OGURA Takashi, Resonance Raman Study on Cytochrome *c* Oxidase Reconstituted in Phospholipid Vesicles、第 49 回日本生物物理学会年会、平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫県
- I-15 Izumi Ishigami, Takeshi Nishigaki, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, Protein Dynamics and Reaction Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase: Resonance Raman Spectroscopy、第 49 回日本生物物理学会年会、平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫県
- I-16 Miyuki Sakaguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, The chemical nature of the bridging ligand at the oxygen reduction site of the resting oxidized cytochrome *c* oxidase、第 49 回日本生物物理学会年会、平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫県
- I-17 Takeshi Nishigaki, Izumi Ishigami, Satoru Nakashima, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, Protein Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase upon CN- Photolysis as Studied with Resonance Raman Spectroscopy、第 49 回日本生物物理学会年会、平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫県
- I-18 西村 龍・松本大地・西山康太郎・柴田友和・深谷昌史・太 虎林・長尾 聡・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・荘司長三・渡辺芳人・山本泰彦、へム鉄の電子密度がミオグロビンの自動酸化に与える影響の解明、錯体化学会第 61 回討論会、平成 23 年 9 月 17 日～19 日、岡山理科大学、岡山県

- I-19 Shingo Ohzu, Yuichiro Hirai, Kazuya Nakayama, Miyuki Sakaguchi, Kenichiro Ikemura, Tomoya Ishiuka, Takashi Ogura, Shunichi Fukuzumi and Takahiko Kojima, Oxidations of Hydrocarbons by Ruthenium-Pyridylamine Complexes as Catalysts with use of Water as an Oxygen Source、第 44 回酸化反応討論会、平成 23 年 11 月 4 日～5 日、吹田市、大阪府
- I-20 坂口美幸・片山幸江・藤井 浩・島田秀夫・小倉尚志、チトクロム *c* 酸化酵素におけるヘム *a* 側鎖ヒドロキシフェルネシルエチル基の共鳴ラマン線の帰属、日本化学会第 92 回春季年会、平成 24 年 3 月 25 日～28 日、慶応大学日吉キャンパス、神奈川県
- II-1 久保 稔・山口 悟・望月正雄・伊藤=新澤 恭子・吉川信也・小倉尚志・中島 聡、フェムト秒レーザーを用いた高感度時間分解赤外分光装置の開発と蛋白質水溶液への応用、日本分光学会年次講演会、平成 23 年 11 月 30 日～12 月 2 日、理研横浜研、神奈川県
- II-2 久保 稔・山口 悟・望月正雄・伊藤=新澤 恭子・吉川信也・小倉尚志・中島 聡、水溶液中のタンパク質の高感度時間分解赤外分光測定、第 5 回分子科学討論会、平成 23 年 9 月 20 日～23 日、札幌コンベンションセンター、北海道
- III-1 柳澤幸子・杉本 宏・城 宣嗣・小倉尚志、共鳴ラマン分光法によるインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼの光学異性依存的基質相互作用の検出、第 38 回生体分子科学討論会、平成 23 年 6 月 23 日～24 日、筑波大学、茨城県
- III-2 Masayuki Hara, Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Takashi Ogura, Resonance Raman Study on Ligand-Bound Forms of Indoleamine 2, 3 – Dioxygenase、第 49 回日本生物物理学会年会、平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫県
- III-3 Sachiko Yanagisawa, Hiroshi Sugimoto, Yoshitsugu Shiro, Takashi Ogura, Resonance Raman Study on CO-bound Indoleamine 2, 3 – Dioxygenase with Tryptophan、平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス、兵庫県
- IV-1 N. Tokuda, K. Kawai, Y. H. Lee (Osaka University), T. Ikegami (Osaka University), S. Yamaguchi, H. Yagisawa, Y. Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and S. Tuzi, Membrane-induced alteration of the secondary structure in the SWAP-70 pleckstrin homology domain, *J. Biochem.*, 2012, *151*, 391-401.
- IV-2 Satoru Tuzi, Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami (Osaka University), Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan) and Hitoshi Yagisawa, Changes in the secondary structure of the SWAP-70 PH domain induced at the lipid bilayer surface, The 10th JBS Biofrontier Symposium: International Symposium New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011, 平成 23 年 11 月 14 日～16 日、福岡県
- IV-3 Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami, Hitoshi, Yagisawa (Osaka University), Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and Satoru Tuzi, A solid-state NMR study of structural alteration and

- function of the PH domain induced at the lipid bilayer surface, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011: the 50th memorial annual meeting of the nuclear magnetic resonance society of Japan, 平成 23 年 11 月 15 日～18 日、神奈川県
- IV-4 Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami (Osaka University), Hitoshi, Yagisawa, Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and Satoru Tuzi, Conformational alteration of SWAP-70 PH domain induced at the membrane surface, The 49th annual meeting of the biophysical society Japan, 平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県
- IV-5 Naomi Tokuda, Katsuhisa Kawai, Young-Ho Lee (Osaka University), Takahisa Ikegami (Osaka University), Hitoshi, Yagisawa, Yasuhisa Fukui (National Health Research Institutes, Taiwan), and Satoru Tuzi, A solid-state NMR study of structural alteration and function of the PH domain induced at the lipid bilayer surface, The international symposium on nuclear magnetic resonance 2011: the 50th memorial annual meeting of the nuclear magnetic resonance society of Japan, 平成 23 年 11 月 15 日～18 日、神奈川県
- IV-6 Miyako Horigome (Yokohama National University), Hirohide Nishikawa (Yokohama National University), Izuru Kawamura (Yokohama National University), Satoru Tuzi and Akira Naito (Yokohama National University), Local structure and dynamics changes at Tyr residues in Bacteriorhodopsin corresponding to two retinal isomers by solid-state NMR, The 49th annual meeting of the biophysical society Japan, 平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県
- IV-7 Ryota Miyasa (Yokohama National University), Izuru Kawamura (Yokohama National University), Satoru Tuzi, Akira Naito (Yokohama National University), Trapping M-intermediate of D96N-bR as studied by in-situ photo-irradiated solid-state NMR, The 49th annual meeting of the biophysical society Japan, 平成 23 年 9 月 16 日～18 日、兵庫県

## 大学院生命科学研究科

### 博士後期課程

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：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

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

## 博士前期課程

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

原 雅行：共鳴ラマン分光法による二原子酸素添加酵素の構造解析

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 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 23～25 年度）若手研究（B） 課題番号:23770152  
研究課題 チトクロム酸化酵素反応機構全容の解明を目指す反応中間体の吸収スペクトルの決定  
研究代表者 柳澤幸子
- 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 23～25 年度）基盤研究（C） 課題番号：2355022  
研究課題 時間分解振動分光法による膜蛋白質プロトン輸送ダイナミクスの解明  
研究代表者 中島 聡
- 7 科学研究費補助金（平成 23～25 年度）若手研究(A) 課題番号:23685040  
研究課題 新規高精度赤外分光光度計の開発とそれを用いた巨大膜蛋白質のプロトンポンプ反応追跡  
研究代表者 久保 稔