

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)
(久保 稔は平成 24 年 9 月まで)

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*・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)
(久保 稔は平成 24 年 9 月まで)

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チ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 H. Sugimoto, S. Tatemoto, K. Toyota, K. Ashikari, M. Kubo, T. Ogura, S. Itoh: Oxo-sulfido- and oxo-selenido-molybdenum(VI) complexes possessing a dithiolene ligand related to the active sites of hydroxylases of molybdoenzymes: low temperature preparation and characterisation, *Chem. Commun. (Camb.)*, 49, 4358-4360 (2013)
- I-2 R. Nishimura, T. Shibata, H. Tai, I. Ishigami, T. Ogura, S. Nagao, T. Matsuo, S. Hirota, K. Imai, S. Neya, A. Suzuki, Y. Yamamoto: Relationship between the electron density of the heme Fe atom and the vibrational frequencies of the Fe-bound carbon monoxide in myoglobin., *Inorg Chem.*, 52, 3349-3355 (2013)
- I-3 H. Sugimoto, K. Hatakeda, K. Toyota, S. Tatemoto, M. Kubo, T. Ogura, S. Itoh: A new series of bis(ene-1,2-dithiolato)tungsten(IV), -(V), -(VI) complexes as reaction centre models of tungsten enzymes: preparation, crystal structures and spectroscopic properties, *Dalton Trans.*, 42, 3059-3070 (2013)
- I-4 A. D. Nugraheni, S. Nagao, S. Yanagisawa, T. Ogura, S. Hirota: Interaction of dimeric horse cytochrome *c* with cyanide ion, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 18, 383-390 (2013)
- I-5 M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, M. Moriyama, T. Ogura, K. Kihira, S. Yoshikawa: Resonance Raman spectral properties of FMN of bovine heart NADH:ubiquinone oxidoreductase suggesting a mechanism for the prevention of spontaneous production of reactive oxygen species, *Biochemistry*, 52, 98-104 (2013)
- I-6 A. Yokoyama, J. E. Han, J. Cho, M. Kubo, T. Ogura, M. A. Siegler, K. D. Karlin, W. Nam: Chromium(IV)-peroxo complex formation and its nitric oxide dioxygenase reactivity, *J. Am Chem. Soc.*, 134, 15269-15272 (2012)
- I-7 L. Chiang, A. Kochem, O. Jarjayes, T. J. Dunn, H. Vezin, M. Sakaguchi, T. Ogura, M. Orio, Y. Shimazaki, F. Thomas, T. Storr: Radical localization in a series of symmetric Ni(II) complexes with oxidized salen ligands, *Chemistry*, 18, 14117-14127 (2012)
- I-8 D. Shiga, Y. Hamano, M. Kamei, Y. Funahashi, H. Masuda, M. Sakaguchi, T. Ogura, T. Tanaka: Tuning the geometries of a de novo blue copper protein by axial interactions, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 17, 1025-1031 (2012)
- I-9 S. F. El-Mashtoly, M. Kubo, Y. Gu, H. Sawai, S. Nakashima, T. Ogura, S. Aono, T. Kitagawa: Site-specific protein dynamics in communication pathway from sensor to signaling domain of oxygen sensor protein, HemAT-Bs: Time-resolved Ultraviolet Resonance Raman Study, *J. Biol. Chem.*, 287, 19973-19984 (2012)

- I-10 S. A. Wilson, J. Chen, S. Hong, Y. M. Lee, M. Clemancey, R. Garcia-Serres, T. Nomura, T. Ogura, J. M. Latour, B. Hedman, K. O. Hodgson, W. Nam, E. I. Solomon: [Fe(IV) horizontal lineO(TBC)(CH₃CN)]²⁺: comparative reactivity of iron(IV)-oxo species with constrained equatorial cyclam ligation, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 11791-11806 (2012)
- I-11 T. J. Dunn, L. Chiang, C. F. Ramogida, M. I. Webb, D. Savard, M. Sakaguchi, T. Ogura, Y. Shimazaki, T. Storr: Non-innocent ligand behaviour of a bimetallic Cu complex employing a bridging catecholate, *Dalton Trans.*, **41**, 7905-7914 (2012)
- I-12 A. Takahashi, D. Yamaki, K. Ikemura, T. Kurahashi, T. Ogura, M. Hada, H. Fujii: Effect of the axial ligand on the reactivity of the oxoiron(IV) porphyrin π -cation radical complex: higher stabilization of the product state relative to the reactant state, *Inorg. Chem.*, **51**, 7296-7305 (2012)
- I-13 Z. Cong, S. Yanagisawa, T. Kurahashi, T. Ogura, S. Nakashima, H. Fujii: Synthesis, characterization, and reactivity of hypochloritoiron(III) porphyrin complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20617-20620 (2012)
- I-14 M. Kodera, Y. Kawahara, Y. Hitomi, T. Nomura, T. Ogura, Y. Kobayashi: Reversible O-O bond scission of peroxodiiron(III) to high-spin oxodiiron(IV) in dioxygen activation of a diiron center with a bis-tpa dinucleating ligand as a soluble methane monooxygenase model, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13236-13239 (2012)
- I-15 S. Ohzu, T. Ishizuka, Y. Hirai, H. Jiang, M. Sakaguchi, T. Ogura, S. Fukuzumi, T. Kojima: Mechanistic insight into catalytic oxidations of organic compounds by ruthenium(IV)-oxo complexes with pyridylamine ligands, *Chemical Science*, **3**, 3421 (2012)
- I-16 Y. Kobayashi, K. Ohkubo, T. Nomura, M. Kubo, N. Fujieda, H. Sugimoto, S. Fukuzumi, K. Goto, T. Ogura, S. Itoh: Copper(I)-Dioxygen Reactivity in a Sterically Demanding Tripodal Tetradentate tren Ligand: Formation and Reactivity of a Mononuclear Copper(II) End-On Superoxo Complex, *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2012**, 4574-4578 (2012)
- I-17 T. Ogura: Resonance Raman Applications in Investigations of Cytochrome *c* Oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 575-578 (2012)
- I-18 S. Yanagisawa, H. Fujii, S. Neya, T. Ogura, T. Kitagawa: Effects of Heme Rotation around the Heme Normal by 90 °on Resonance Raman Spectra of Heme Proteins; Observation for Heme Oxygenase, 23rd International Conference on Raman Spectroscopy, August 2012, Bangalore, India.
- I-19 T. Ogura, I. Ishigami, T. Nishigaki, S. Nakashima, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa: Cooperative Dynamics of the Two Hemes in Cytochrome *c* Oxidase upon Ligand Binding

Identified by Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy, The 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 2012, Jeju, Korea.

- I-20 引田理英・新澤-伊藤恭子・森山昌和・小倉尚志・木平清人・吉川信也：「ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達複合体 I に含まれる FMN の共鳴ラマンスペクトル」、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月、草津市（滋賀県）
- I-21 平野智也・河原由佳・人見 穰・小寺政人・小林義男・野村高志・小倉尚志：「カルボン酸含有二核化配位子(BPG2E)を用いたパーオキシ二核鉄(III)錯体の O-O 結合の開裂と基質酸化活性」、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月、草津市（滋賀県）
- I-22 小倉尚志：「生体配位化学における高解像度の虫眼鏡：振動分光法」、分子研研究会「生体配位化学の最前線と展望」、2013 年 2 月、岡崎市（愛知県）
- I-23 丸山夏未・安芸弥生・長井幸史・今井清博・長友重紀・小倉尚志・北川禎三・長井雅子：「ヒトヘモグロビンの酸素結合機能における近位ヒスチジンの役割」、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月、福岡市（福岡県）
- I-24 I. Ishigami, T. Nishigaki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa S. Nakashima, T. Ogura: An Intermediate Conformation of Cytochrome *c* Oxidase in the Ligand-Free State Identified by Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy, The 50th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- I-25 M. Sakaguchi, Y. Katayama, H. Fujii, H. Shimada, T. Ogura: The assignment of the resonance Raman bands of heme a peripheral substituents in cytochrome *c* oxidase, The 50th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- I-26 Y. Aki, Y. Nagai, K. Imai, S. Nagatomo, T. Ogura, T. Kitagawa, M. Nagai: Substitution effects of Gly for the proximal His of α subunit of human hemoglobin on the structure and oxygen binding function, The 50th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- I-27 S. Yanagisawa, H. Fujii, S. Neya, T. Ogura, T. Kitagawa: Effects of Heme Rotation around the Heme Normal by 90° on Resonance Raman Spectra of Heme Proteins; Observation for Heme Oxygenase, The 50th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- I-28 T. Ogura: Molecular Science of the Proteins in Organelles, Physiological Molecular Science of Membrane Proteins, 高次系分子科学 成果公開シンポジウム, May 2012, Tokyo, Japan.
- II-1 T. Ogura: Protein Dynamics of Cytochrome *c* Oxidase Studied by Time-Resolved Resonance Raman and Infrared Spectroscopy: Coupling between O₂ Reduction and

- H⁺-Pumping, 23rd International Conference on Raman Spectroscopy, August 2012, Bangalore, India.
- II-2 S. Nakashima, M. Kubo, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa: Proton Pump Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase Elucidated by Highly Sensitive Time-Resolved IR Spectroscopy, The 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 2012, Jeju, Korea.
- II-3 小倉尚志:「チトクロム *c* 酸化酵素によるプロトンポンプ反応の研究:時間分解赤外および共鳴ラマン分光法」、分子研研究会「生物物質科学の展望」、2013年1月、岡崎市(愛知県)
- II-4 小倉 尚志:「巨大タンパク質内での反応を観る:時間分解赤外および共鳴ラマン分光法」、第1回分光イノベーションシンポジウム、2012年11月 東京都
- II-5 M. Kubo, S. Nakashima, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa T. Ogura, T. Kitagawa: Time-Resolved IR Analyses of Proteins Using a Novel Pulse Flow System Synchronized with Pump/Probe Lasers, The 50th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- III-1 S. Yanagisawa, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura: Resonance Raman study on indoleamine 2,3-dioxygenase: Control of reactivity by substrate-binding, *Chemical Physics*, 419, 178-183 (2013)
- III-2 S. Yanagisawa, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, Takashi Ogura: Dioxygenation reaction of indoleamine 2,3-dioxygenase as studied by resonance Raman spectroscopy, The 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, July 2012, Jeju, Korea.
- III-3 柳澤幸子・原 雅之・杉本 宏・城 宜嗣・小倉尚志:「インドールアミン 2, 3-ジオキシゲナーゼの共鳴ラマンスペクトル:基質結合による反応性の調節」、日本化学会第93春季年会、2013年3月、草津市(滋賀県)
- III-4 M. Hara, S. Yanagisawa, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura: Ultraviolet Resonance Raman Study on Indoleamine 2, 3-Dioxygenase, The 50th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- III-5 柳澤 幸子・原 雅行・杉本 宏・城 宜嗣・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反応機構の研究」、第39回生体分子科学討論会、2012年6月、仙台市(宮城県)
- IV-1 T. Nakai, Y. Sugano, M. Shoda, H. Sakakibara, K. Oiwa, S. Tuzi, T. Imai, J. Sugiyama, M. Takeuchi, D. Yamauchi, Y. Mineyuki: Formation of highly twisted ribbons in a carboxymethylcellulase gene-disrupted strain of a cellulose-producing bacterium, *J. Bacteriol.*, 2013, 195, 958-964.
- IV-2 N. Tokuda, M. Tanio, K. Nishimura, T. Kohno, D. Yokogawa, T. Ikegami, S. Tuzi:

Conformational properties of the Def6 PH domain located at the lipid bilayer surface, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.

- IV-3 I. Kawamura, M. Horigom, H. Nishikawa, K. Tajima, T. Okitsu, A. Wada, S. Tuzi, T. Iwasa, A. Naito: Thermal and pressure induced structural and dynamics changes of bacteriorhodopsin as studied by solid-state NMR, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- IV-4 R. Miyasa, I. Kawamura, S. Tuzi, A. Naito: Conformational change in M-intermediate of D96N-bR as studied by in-situ photo-irradiated solid-state NMR, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, September 2012, Nagoya, Aichi, Japan.
- IV-5 川村 出・堀籠美也子・西川大英・田島加奈・沖津貴志・和田昭盛・辻 暁・岩佐達郎・内藤 晶:「固体 NMR を用いた温度および圧力に対するバクテリオロドプシンの構造変化の解析」、第 5 1 回 NMR 討論会、2012 年 11 月、岡崎市 (愛知県)
- IV-6 宮佐亮太・川村 出・辻 暁・内藤 晶:「In-situ 光照射固体 NMR によるバクテリオロドプシン光中間体の捕捉」、第 5 1 回 NMR 討論会、2012 年 11 月、岡崎市 (愛知県)
- IV-7 内藤 晶・堀籠美也子・西川大英・川村 出・辻 暁・沖津貴志・和田昭盛:「熱および圧力により応答するバクテリオロドプシンの構造変化の解析」、第 1 2 回日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月、名古屋市 (愛知県)

大学院生命理学研究科

博士後期課程

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

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

赤井琴乃: 芳香族側鎖を介する PH ドメイン-脂質膜間相互作用の解析

科学研究費補助金等

1 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

2 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

- 3 科学研究費補助金（平成 24～26 年度）基盤研究(B) 課題番号:24360086
研究課題 紫外共鳴ラマン分光法によるヘム蛋白質高次構造変化の検出と蛋白質機能制御機構の解明
研究代表者 北川 禎三
- 4 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
- 5 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
- 6 特別研究員奨励費（平成 23～24 年度）DC2 7254
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ポンプ機構の解明
研究代表者 坂口 美幸
- 7 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 24～25 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
業務主任者 小倉 尚志