

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*・坂口美幸*
(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. *, Sakaguchi, 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、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*
(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. *
(*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上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、細胞膜内および細胞膜表面に局在する膜蛋白質および生理活性ペプチドによる物質輸送、シグナル伝達、膜構造の制御等の分子機構により維持されている。細胞膜内部および表面における生理的機能制御の機構に関する知見を得るために、固体 NMR をはじめとする分光学的手法を用いて細胞内シグナル伝達、プロトン輸送および脂質膜チャネル形成に関与する蛋白質およびペプチドの脂質膜中における動的構造の解析を行う。生理的機能の発現条件をモデル化した系における、蛋白質およびペプチド

-脂質膜複合体の動的構造の応答に関する知見から、生理的機能制御の基盤となるメカニズムを探索する。

発表論文 List of Publication

- I-1 T. Tano (大阪大), K. Mieda, H. Sugimoto (大阪大), T. Ogura, S. Itoh (大阪大), A copper complex supported by an N₂S-tridentate ligand inducing efficient heterolytic O-O bond cleavage of alkyhydroperoxide, *Dalton Trans*, **43**, 4871-4877 (2014)
- I-2 R. Nishimura (筑波大), T. Shibata (筑波大), I. Ishigami, T. Ogura, H. Tai (奈良先端大), S. Nagao (奈良先端大), T. Matsuo (奈良先端大), S. Hirota (奈良先端大), O. Shoji (名古屋大), Y. Watanabe (名古屋大), K. Imai (法政大), S. Neya (千葉大), A. Suzuki (長岡技術大), Y. Yamamoto (筑波大), Electronic control of discrimination between O₂ and CO in myoglobin lacking the distal histidine residue, *Inorg. Chem.*, **53**, 1091-1099 (2014)
- I-3 S. Nagatomo (筑波大), M. Nagai (法政大), T. Ogura, T. Kitagawa, Near-UV circular dichroism and UV resonance Raman spectra of tryptophan residues as a structural marker of proteins, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 9343-9353 (2013)
- I-4 H. Kang (Ewha Womans Univ.), J. Cho (DGIST), K. B. Cho (Ewha Womans Univ.), T. Nomura, T. Ogura, W. Nam (Ewha Womans Univ.), Mononuclear manganese-peroxo and bis (mu-oxo) dimanganese complexes bearing a common N-methylated macrocyclic ligand, *Chemistry*, **19**, 14119-14125 (2013)
- I-5 T. Tano (大阪大), Y. Okubo (大阪大), A. Kunishita (大阪大), M. Kubo, H. Sugimoto (大阪大), N. Fujieda (大阪大), T. Ogura, S. Itoh (大阪大), Redox properties of a mononuclear copper(II)-superoxide complex, *Inorg. Chem.*, **52**, 10431-10437 (2013)
- I-6 西村 龍 (筑波大) ・柴田友和 (筑波大) ・太 虎林 (奈良先端大) ・石上 泉 ・柳澤幸子 ・小倉尚志 ・根矢三郎 (千葉大) ・鈴木秋弘 (長岡技術大) ・山本泰彦 (筑波大) : ヘム鉄の電子密度の変化がデオキシミオグロビンのFe-His配位結合に及ぼす影響、日本化学会第94春季年会 (名古屋)、一般口頭、2014
- I-7 T. Abe (大阪大), T. Ogura, Y. Morimoto (大阪大), H. Sugimoto (大阪大), N. Fujieda (大阪大), S. Itoh (大阪大) : Peroxide-reactivity of copper complexes supported by tridentate ligands having cyclic-diamine frameworks, 日本化学会第94春季年会 (名古屋)、一般口頭、2014
- I-8 中島 聡 ・久保 稔 ・石上 泉 ・新澤-伊藤恭子 ・吉川信也 ・小倉尚志 : 時間分解振動分光法によるチトクローム酸化酵素の反応初期過程、日本化学会第94春季年会 (名古屋)、一般口頭、2014
- I-9 S. Nagatomo, M. Nagai, T. Ogura, T. Kitagawa, "Some basic properties of near-UV circular dichroism and UV resonance Raman spectra of tryptophan residues as a structural marker of

- proteins", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- I-10 T. Nomura, S. Yanagisawa, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, "Resonance Raman Study of Cytochrome *c* Oxidase Reconstituted in Phospholipids Vesicles", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- I-11 M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, "Resonance Raman analysis on heme-heme interaction of cytochrome *c* oxidase", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- I-12 M. Hikita, A. Yamamoto, T. Maeda, K. Shinzawa-Itoh, T. Ogura, S. Yoshikawa, "Spectroscopic characterization of the interaction of azide with the redox-active metal sites of fully oxidized cytochrome *c* oxidase", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- I-13 S. Nagatomo (筑波大), M. Nagai (法政大), T. Ogura, T. Kitagawa: タンパク質中のトリプトファン残基の近紫外円二色性と紫外共鳴ラマンスペクトルの特性、第51回日本生物物理学会年会(京都)、ポスター、2013
- I-14 M. Hikita, A. Yamamoto, T. Maeda, K. Shinzawa-Itoh, T. Ogura, S. Yoshikawa: 完全酸化型チトクロム *c* 酸化酵素の酸化還元活性金属中心とアザイドの相互作用の分光学的研究、第51回日本生物物理学会年会(京都)、ポスター、2013
- I-15 M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura: Interaction Between Heme and Heme-Cu Binuclear Center in Cytochrome *c* Oxidase: 第51回日本生物物理学会年会(京都)、ポスター、2013
- I-16 H. Ago (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), H. Murakami (理研), T. Tosha (理研), T. Hisano (理研), M. Kubo (理研), H. Sugimoto (理研), Y. Shiro (理研), M. Yamamoto (理研), E. Yamashita (大阪大), J. R. Shen (岡山大), K. Shinzawa-Ito, K. Kato, M. Hatanaka, S. Takemura, N. Yano, T. Ogura, S. Yoshikawa, T. Tsukihara: High-resolution femtosecond crystallography at SACLA, a challenge of reducing the X-ray radiation damage on super molecular assemblies, 11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation (BSR), Grand Elysée Hotel Hamburg, Germany, 一般口頭, 2013
- I-17 Y. Yamamoto (筑波大), R. Nishimura (筑波大), T. Shibata (筑波大), H. Tai (奈良先端大), I. Ishigami, T. Ogura, S. Nagao (奈良先端大), T. Matsuo (奈良先端大), S. Hirota (奈良先端大), K. Imai (法政大), S. Neya (千葉大), A. Suzuki (長岡技術大): Mechanism for

- ligand discrimination in myoglobin, International Conference on BioInorganic Chemistry ICBIC-16, Grenoble, France, 招待講演, 2013
- I-18 小倉尚志:チトクロムc酸化酵素の高効率プロトンポンプを可能にするタンパク質構造ダイナミクス: 振動分光法、第13回日本蛋白質科学会年会(鳥取)、招待講演、2013
- I-19 小倉尚志: 酵素反応中に見られる感応性化学種の振動分光法による捕捉と精密構造解析、感応性化学種が拓く新物質科学第2回公開シンポジウム(福岡)、一般口頭、2013
- I-20 坂口美幸・新澤-伊藤恭子・吉川信也・小倉尚志: 休止酸化型チトクロムc酸化酵素の酸化還元部位の化学構造、感応性化学種が拓く新物質科学第2回公開シンポジウム(福岡)、ポスター、2013
- I-21 廣田 俊(奈良先端大)・Ari Dwi Nugraheni(奈良先端大)・山城信裕(奈良先端大)・安藤勇輝(奈良先端大)・長尾 聡(奈良先端大)・Zhonghua Wang(奈良先端大)・柳澤幸子・小倉尚志: ドメインスワップしたシトクロムc多量体の形成および安定性に影響を及ぼす因子、第40回生体分子科学討論会(吹田)、一般口頭、2013
- I-22 Zhiqi Cong(分子研・岡崎統合バイオ)・柳澤幸子・倉橋拓也(分子研・岡崎統合バイオ)・小倉尚志・藤井 浩(分子研・岡崎統合バイオ): ハロペルオキシダーゼの活性反応中間体としての鉄3価へム次亜塩素酸錯体の電子構造と反応性、第40回生体分子科学討論会(吹田)、一般口頭、2013
- I-23 T. Ogura: Identification of functionally important conformational changes in cytochrome c oxidase, The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, 招待講演, 2013
- I-24 M. Sakaguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura: Interaction Between Heme and Heme-Cu Binuclear center in Cytochrome c oxidase, The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, ポスター, 2013
- I-25 T. Nomura, S. Yanagisawa, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura: Resonance Raman Study on Cytochrome c Oxidase Reconstituted in the Phospholipids Vesicles, The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, ポスター, 2013
- II-1 M. Kubo, S. Nakashima, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, J. Kang, M. Tateno, K. Shinzawa-Itoh, K. Kato, S. Yoshikawa, Effective pumping proton collection facilitated by a copper site (Cu_B) of bovine heart cytochrome c oxidase, revealed by a newly developed time-resolved infrared system, *J. Biol. Chem.*, **288**, 30259-30269 (2013)
- II-2 西口達人・引田理英・新澤-伊藤恭子・吉川信也・中島 聡・小倉尚志: チトクロムc酸化酵素の酸化還元反応の時間分解赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発、日本化学会第94春季年会(名古屋)、一般口頭、2014

- II-3 T. Ogura, S. Nakashima, M. Kubo, S. Yamaguchi, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, "Dynamics of the functional elements in proton pumping machinery of cytochrome *c* oxidase as studied by innovative infrared spectroscopy", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, 招待講演, 2014
- II-4 S. Nakashima, M. Kubo, I. Ishigami, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, "Initial reaction dynamics of bovine heart cytochrome *c* oxidase revealed by time-resolved vibrational spectroscopy", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- II-5 T. Nishiguchi, M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, S. Nakashima, T. Ogura, "Development of the flow system with an artificial oxygen lung aimed at measuring time-resolved IR spectra of the oxygen reduction reaction of cytochrome *c* oxidase", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- II-6 T. Nishiguchi, M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, S. Nakashima, T. Ogura: チトクロム *c* 酸化酵素の酸素還元反応における赤外吸収測定を目的とした酸素肺フローシステムの開発、第51回日本生物物理学会年会（京都）、ポスター、2013
- II-7 M. Kubo, S. Nakashima, S. Yamaguchi, T. Ogura, M. Mochizuki, J. Kang, M. Tateno, K. Shinzawa-Itoh, K. Kato, S. Yoshikawa: Real time observation of water-channel closure controlled by Cu_B in bovine cytochrome *c* oxidase using a novel high-sensitivity infrared system", International Conference on BioInorganic Chemistry ICBIC-16, Grenoble, France, 一般口頭, 2013
- III-1 S. Yanagisawa, M. Hara, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura, "Fine-tuning of the reactivity of indoleamine 2,3-dioxygenase identified by resonance Raman spectroscopy", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- III-2 Kure'e. Kayama, S. Yanagisawa, H. Sugimoto, Y. Shiro, T. Ogura, "Ultraviolet Resonance Raman Study on Indoleamine 2,3-Dioxygenase", 1st International Picobiology Institute Symposium, Conference Hall, SACLA Experimental Facility Harima Campus, RIKEN, ポスター, 2014
- III-3 S. Yanagisawa, M. Hara, H. Sugimoto (理研), Y. Shiro (理研), T. Ogura: インドールアミン2,3 ジオキシゲナーゼの基質トリプトファンの検出-紫外共鳴ラマン分光法、第51回日本生物物理学会年会（京都）、ポスター、2013

- III-4 柳澤幸子・原 雅行・杉本 宏（理研）・城 宜嗣（理研）・小倉尚志：基質結合型インドールアミン2,3 ジオキシゲナーゼの基質の検出-紫外共鳴ラマン分光法、第40回生体分子科学討論会（吹田）、一般口頭、2013
- III-5 S. Yanagisawa, M. Hara, H. Sugimoto（理研）, Y. Shiro（理研）, T. Ogura: Detection of tryptophan as bound substrate in indoleamine 2,3-dioxygenase, The 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC-4), Parry Sound, Canada, 招待講演, 2013
- IV-1 H. Itoh-Watanabe（横浜国大）, M. Kamihira-Ishijima, N. Javkhlantugs（横浜国大）, R. Inoue（横浜国大）, Y. Itoh（横浜国大）, H. Ento（横浜国大）, S. Tuzi, H. Saito, K. Ueda（横浜国大）, A. Naito（横浜国大）; Role of aromatic residues in amyloid fibril formation of human calcitonin by solid-state ^{13}C NMR and molecular dynamics simulation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 8890-8901 (2013)
- IV-2 T. Nakai, Y. Sugano（東工大）, M. Shoda（東工大）, H. Sakakibara（阪大）, K. Oiwa（阪大）, S. Tuzi, T. Imai（京大）, J. Sugiyama（京大）, M. Takeuchi, D. Yamauchi, Y. Mineyuki; Formation of highly twisted ribbons in a carboxymethylcellulase gene-disrupted strain of a cellulose-producing bacterium, *J. Bacteriol.* **195**, 958-964 (2013)
- IV-3 Kotono Akai, Michikazu Tanio（分子研）, Katsuyuki Nishimura（分子研）, Satoru Tuzi, “Role of tryptophan residues in membrane association of the SWAP-70 PH domain”, The 51th annual meeting of the biophysical society Japan (Kyoto), ポスター, 2013
- IV-4 Akira Naito（横浜国大）, Ryoko Miyasa（横浜国大）, Arisu Shigeta（横浜国大）, Izuru Kawamura（横浜国大）, Satoru Tuzi, Kyosuke Oshima（横浜国大）, “Trap of photo-intermediate and structural change of bacteriorhodopsin D96N mutant as revealed by in situ photoirradiation solid-state NMR”, The 51th annual meeting of biophysical society Japan (Kyoto), ポスター, 2013
- IV-5 Arisu Shigeta（横浜国大）, Ryota, Miyasa（横浜国大）, Miyako Horigome（横浜国大）, Izuru Kawamura（横浜国大）, Takashi Okitsu（横浜国大）, Akimori, Wada（横浜国大）, Satoru Tuzi, Akira Naito（横浜国大）, “Structural changes in the photo excited process in 13-cis, 15-syn retinal of Bacteriorhodopsin studied by in situ photoirradiation SS-NMR”, The 51th annual meeting of biophysical society Japan (Kyoto), ポスター, 2013

- IV-6 内藤 晶 (横浜国大)、宮佐亮太 (横浜国大)、重田安里寿 (横浜国大)、川村 出 (横浜国大)、辻 暁; In-situ 光照射固体 NMR によるバクテリオロドプシン D96N 変異体の光中間体の捕捉とタンパク質構造変化の解析、第 86 回日本生化学会大会 (横浜)、ポスター、2013

大学院生命理学研究科

博士後期課程

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

博士前期課程

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

萱間紅絵：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と反応機構

西口達人：赤外分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の構造解析と反応機構

5 年一貫博士課程

Li Chen：時間分解赤外分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクスと反応機構

科学研究費補助金等

- 科学研究費補助金 (平成 25~26 年度) 新学術領域研究 (研究領域提案型) 課題番号: 25109540
研究課題 酵素反応中に見られる感応性化学種の振動分光法による捕捉と精密構造解析
研究代表者 小倉尚志
- 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
- 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
- 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
- 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