

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*・太田雄大*
(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.*, Ohta, T.*
(*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た。それを用いて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 分光学的手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

Spectroscopic 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、CD、ラマン、NMR 等の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 S. Hong (Ewha Womans Univ.), B. Wang (Ewha Womans Univ.), M. S. Seo (Ewha Womans Univ.), Y. M. Lee (Ewha Womans Univ.), M. J. Kim (Ewha Womans Univ.), H. R. Kim (KRICT), T. Ogura, R. Garcia-Serres (LCBM), M. Clemancey (LCBM), J. M. Latour (LCBM), W. Nam (Ewha Womans Univ.): Highly reactive nonheme iron(III) iodosylarene complexes in alkane hydroxylation and sulfoxidation reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 53, 6388-6392 (2014)
- I-2 K. Hirata (理研), K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita (大阪大), K. Tono (JASRI), G. Ueno (理研), T. Hikima (理研), H. Murakami (理研), Y. Inubushi (理研), M. Yabashi (理研), T. Ishikawa (理研), M. Yamamoto (理研), T. Ogura, H. Sugimoto (理研), J. R. Shen (岡山大), S. Yoshikawa, H. Ago (理研): Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL, *Nat. Methods*, 11, 734-736 (2014)
- I-3 R. Nishimura (筑波大), T. Shibata (筑波大), H. Tai (奈良先端大), I. Ishigami, S. Yanagisawa, T. Ogura, S. Neya (千葉大), A. Suzuki (長岡技術大), Y. Yamamoto (筑波大): Effect of the Electron Density of the Heme Fe Atom on the Fe-Histidine Coordination Bond in Deoxy Myoglobin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 87, 905-911 (2014)
- I-4 T. Abe (大阪大), Y. Morimoto (大阪大), T. Tano (大阪大), K. Mieda, H. Sugimoto (大阪大), N. Fujieda (大阪大), T. Ogura, S. Itoh (大阪大): Geometric control of nuclearity in copper(I)/dioxygen chemistry, *Inorg. Chem.*, 53, 8786-8794 (2014)
- I-5 R. Nishimura (筑波大), D. Matsumoto (筑波大), T. Shibata (筑波大), S. Yanagisawa, T. Ogura, H. Tai (奈良先端大), T. Matsuo (奈良先端大), S. Hirota (奈良先端大), S. Neya (千葉大), A. Suzuki, Y. Yamamoto (筑波大): Electronic control of ligand-binding preference of a myoglobin mutant, *Inorg. Chem.*, 53, 9156-9165 (2014)
- I-6 M. Kawai (茨城大), T. Yamaguchi (茨城大), S. Masaoka (分子研), F. Tani (九州大), T. Kohzuma (茨城大), L. Chiang (Simon Fraser Univ.), T. Storr (Simon Fraser Univ.), K. Mieda, T. Ogura, R. K. Szilagy (Montana State Univ.), Y. Shimazaki (茨城大): Influence of ligand flexibility on the electronic structure of oxidized Ni(III)-phenoxide complexes, *Inorg. Chem.*, 53, 10195-10202 (2014)
- I-7 T. Nomura, S. Yanagisawa, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura: Effects of proton motive force on the structure and dynamics of bovine cytochrome *c* oxidase in phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 53, 6382-6391 (2014)

- I-8 H. Kotani (筑波大), S. Kaida (筑波大), T. Ishizuka (筑波大), M. Sakaguchi, T. Ogura, Y. Shiota (九州大), K. Yoshizawa (九州大, 京都大), T. Kojima (筑波大): Formation and characterization of a reactive chromium(v)-oxo complex: mechanistic insight into hydrogen-atom transfer reactions, *Chem. Sci.*, 6, 945-955, (2015)
- I-9 T. Hayashi (大阪大), Y. Asano (大阪大), Y. Shintani (大阪大), H. Aoyama (大阪大), H. Kioka (大阪大), O. Tsukamoto (大阪大), M. Hikita, K. Shinzawa-Itoh, K. Takafuji (大阪大), S. Higo (大阪大), H. Kato (大阪大), S. Yamazaki (国立循環器病研究センター), K. Matsuoka (大阪大), A. Nakano (国立循環器病研究センター), H. Asanuma (京都府立医科大), M. Asakura (国立循環器病研究センター), T. Minamino (大阪大), Y. Goto (NCNP), T. Ogura, M. Kitakaze (国立循環器病研究センター), I. Komuro (東京大学), Y. Sakata (大阪大), T. Tsukihara, S. Yoshikawa, S. Takashima (大阪大): Higd1a is a positive regulator of cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 1553-1558 (2015)
- I-10 T. Tsugawa (金沢大), H. Furutachi (金沢大), M. Marunaka (金沢大), T. Endo (金沢大), K. Hashimoto (金沢大), S. Fujinami (金沢大), S. Akine (金沢大), Y. Sakata (金沢大), S. Nagatomo (筑波大), T. Tosha (理研), T. Nomura, T. Kitagawa, T. Ogura, M. Suzuki (九州大): Oxidation Reactivity of a Structurally and Spectroscopically Well-defined Mononuclear Peroxocarbonato-Iron(III) Complex, *Chem. Lett.*, 44, 330-332 (2015)
- I-11 西村 龍 (筑波大)・西山康太郎 (筑波大)・松本大地 (筑波大)・柴田友和 (筑波大)・石上 泉・小倉尚志・太 虎林 (奈良先端大)・長尾 聡 (奈良先端大)・松尾貴史 (奈良先端大)・廣田 俊 (奈良先端大)・荘司長三 (名古屋大)・渡辺芳人 (名古屋大)・今井清博 (法政大)・根矢三郎 (千葉大)・鈴木秋弘 (長岡高専)・山本泰彦 (筑波大): 酸素結合型ミオグロビンにおける量子化学的共鳴を通じた酸素親和性および自動酸化反応速度の調節、第41回生体分子科学討論会、九州大学西新プラザ (福岡)、一般口頭、2014
- I-12 川合 穂 (茨城大)・山口峻英 (茨城大)・正岡重行 (分子研)・谷 文都 (九州大)・高妻孝光 (茨城大)・Linus Chiang (Simon Fraser Univ.)・Tim Storr (Simon Fraser Univ.)・小倉尚志・Robert K. Szilagyi (Montana State Univ.)・島崎優一 (茨城大): Ni(III)-salen 錯体の一電子酸化体の電子状態、錯体化学第64回討論会、中央大学後楽園キャンパス (東京)、ポスター、2014
- I-13 小倉久司 (金沢大)・坂本貴裕 (金沢大)・古舘英樹 (金沢大)・藤波修平 (金沢大)・秋根茂久 (金沢大)・酒田陽子 (金沢大)・鈴木正樹 (九州大)・野村高志・小倉尚志: 二核銅(II)ペルオキシ錯体の架橋骨格による酸化反応性の制御、錯体化学第64回討論会、中央大学後楽園キャンパス (東京)、ポスター、2014
- I-14 関野実緒 (金沢大)・田崎京佑 (金沢大)・石川敬直 (金沢大)・古舘英樹 (金沢大)・藤波修平 (金沢大)・鈴木正樹 (九州大)・秋根茂久 (金沢大)・酒田陽子 (金沢大)・野村高志・小倉尚志: 酸素活性種を含む二核鉄錯体の合成と酸化反応性、錯体化学第64回討論会、中央大学後楽園キャンパス (東京)、ポスター、2014

- I-15 片桐一貴 (金沢大)・古舘英樹 (金沢大)・藤波修平 (金沢大)・鈴木正樹 (九州大)・秋根茂久 (金沢大)・酒田陽子 (金沢大)・野村高志・小倉尚志：フルオロ基を含む二核化配位子を有する二核鉄(III)ペルオキシ錯体の合成および酸化反応性の研究、錯体化学第64回討論会、中央大学後楽園キャンパス (東京)、ポスター、2014
- I-16 S. Hashihara (筑波大), M. Okumura (筑波大), S. Nagatomo (筑波大), M. Nagai (法政大), T. Ogura, T. Kitagawa, M. Hishida (筑波大), Y. Yamamura (筑波大), K. Saito (筑波大)：ハーフメトHb Mにおける酸素親和性と正常鎖、異常鎖の配位状態との関係、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (北海道)、ポスター、2014
- I-17 S. Nagatomo (筑波大), Y. Nagai (法政大), Y. Aki (金沢大), H. Sakurai (金沢大), N. Maruyama (法政大), K. Imai (法政大), N. Mizusawa (法政大), T. Ogura, T. Kitagawa, M. Nagai (法政大, 金沢大)： α 鎖あるいは β 鎖の近位ヒスチジンがグリシンに置換された変異ヘモグロビンの機能と構造、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (北海道)、ポスター、2014
- I-18 R. Nishimura (筑波大), D. Matsumoto (筑波大), T. Shibata (筑波大), S. Yanagisawa, T. Ogura, H. Tai (奈良先端大), T. Matsuo (奈良先端大), S. Hirota (奈良先端大), S. Neya (千葉大), A. Suzuki (長岡高専), Y. Yamamoto (筑波大)：一酸化炭素よりも酸素に対して高い親和性を示すミオグロビンの創製、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター (北海道)、ポスター、2014
- I-19 坂口美幸・木村哲就 (理研)・上野 剛 (理研)・城 宜嗣 (理研)・小倉尚志・久保 稔 (理研)：X線回折計と共存した同軸・同時可視吸収分光装置の開発、平成26年度日本結晶学会年会、東京大学農学部 (東京)、ポスター、2014
- I-20 T. Ogura：Vibrational Spectroscopic Investigation of Molecular Mechanisms of Aerobic Respiration, *Advances in Live Single-Cell Thermal Imaging and Manipulation*, 沖縄科学技術大学院大学シーサイドハウス(OIST) (沖縄)、招待講演、2014
- I-21 中川善之・伊藤-新澤恭子・吉川信也・中島 聡・小倉尚志：時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロムc酸化酵素の反応ダイナミクスの研究、日本化学会第95回春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部 (千葉)、ポスター、2015
- I-22 柳澤幸子・デシュパンデ メガ スプハシュ (奈良先端大)・廣田 俊 (奈良先端大)・中川達央 (株) ユニソク)・小倉 尚志：ストップフロー共鳴ラマン分光法によるミオグロビンヘム近傍構造変化の追跡、日本化学会第95回春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部 (千葉)、ポスター、2015
- II-1 S. Nakashima, T. Ogura, T. Kitagawa: Infrared and Raman spectroscopic investigation of the reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1847, 86-97 (2015)
- II-2 中島 聡・久保 稔・石上 泉・新澤-伊藤恭子・吉川信也・小倉尚志：チトクロム酸化酵素の反応初期過程での共役機構、第6回日本生物物理学会 中国四国支部大会、とりぎん文化会館 (鳥取)、一般口頭、ポスター、2014

- II-3 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でみたチトクローム酸化酵素の反応初期過程での共役機構、第41回生体分子科学討論会、九州大学西新プラザ（福岡）、一般口頭、2014
- II-4 T. Ogura, S. Nakashima, M. Kubo, S. Yamaguchi, M. Mochizuki, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa: Cooperative Structural Dynamics of Proton Pumping Elements in Cytochrome *c* Oxidase as Studied by Innovative Infrared Spectroscopy, 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8), Istanbul, Turkey, 招待講演, 2014
- II-5 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：チトクローム*c*酸化酵素の酸素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、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター（北海道）、ポスター、2014
- II-6 S. Nakashima, M. Kubo, I. Ishigami, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura: チトクローム酸化酵素の反応初期過程における共役機構の解明、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター（北海道）、ポスター、2014
- II-7 小倉尚志: 金属中心-タンパク質間の情報伝達ダイナミクス：赤外分光法による検出、分子研研究会「生物無機化学の最先端と今後の展望：金属と生体分子の作用機序解明とモデル化および応用への展開」、分子科学研究所 岡崎コンファレンスセンター（愛知）、招待講演、2015
- II-8 西口達人・李 辰・伊藤-新澤恭子・吉川信也・中島 聡・小倉尚志：チトクローム*c*酸化酵素の反応初期過程の研究、日本化学会第95回春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部、(千葉)、一般口頭、2015
- III-1 萱間紅絵・柳澤幸子・杉本 宏 (理研)・城 宜嗣 (理研)・小倉尚志：インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼの反応機構の解析、第6回日本生物物理学会 中国四国支部大会、とりぎん文化会館（鳥取）、一般口頭、ポスター、2014
- III-2 S. Yanagisawa, M. Hara, K. Kayama, H. Sugimoto (理研), Y. Shiro (理研), T. Ogura: Visible and UV resonance Raman study on indoleamine 2,3-dioxygenase, 8th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8), Istanbul, Turkey, 招待講演, 2014
- III-3 萱間紅絵・柳澤幸子・杉本 宏 (理研)・城 宜嗣 (理研)・小倉尚志：紫外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三者複合体中間体モデルの研究、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター（北海道）、ポスター、2014
- III-4 柳澤幸子・原 雅行・杉本 宏 (理研)・城 宜嗣 (理研)・小倉尚志：紫外共鳴ラマン分光法による酵素に結合した基質の構造解析、第52回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター（北海道）、ポスター、2014
- IV-1 内藤 晶 (横浜国大)・伊藤 (渡邊) ひかり (横浜国大)・Namsrai Javkhlantugs (横浜国大)・近藤正志 (横浜国大)・中越雅道 (横浜国大)・川村 出 (横浜国大)・辻 暁・斉藤 肇・内藤 晶 (横浜国大): 固体 NMR と TEM によるヒトカルシトニンにおけるアミロイド線維形成と阻害機構の

- 解明、第 53 回 NMR 討論会（大阪）、一般口頭、2014
- IV-2 大島恭介 (横浜国大)・重田安里寿 (横浜国大)・榎野 義輝 (横浜国大)・川村 出 (横浜国大)・沖津貴志 (神戸薬科大)・和田昭盛 (神戸薬科大)・辻 暁・内藤 晶 (横浜国大): In-situ 光照射 – 固体 NMR によるバクテリオロドプシン Y185F 変異体の光サイクルと O – 中間体の解析、第 53 回 NMR 討論会（大阪）、ポスター、2014
- IV-3 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 (神戸薬科大), Akimori Wada (神戸薬科大), Satoru Tuzi, Akira Naito (横浜国大): Structural changes in the photoexcited process in retinal of Bacteriorhodopsin studied by in-situ photoirradiation solid-state NMR, The 52nd annual meeting of biophysical society Japan, Hokkaido, ポスター, 2014
- IV-4 Kyosuke Oshima (横浜国大), Arisu Shigeta (横浜国大), Yoshiteru Makino (横浜国大), Izuru Kawamura (横浜国大), Takashi Okitsu (神戸薬科大), Akimori Wada (神戸薬科大), Satoru Tuzi, Akira Naito (横浜国大): Characterization of O-like intermediate trapped in Y185F mutant in Bacteriorhodopsin by in-situ photo-irradiation solid-state NMR, The 52nd annual meeting of biophysical society Japan, Hokkaido, ポスター, 2014
- IV-5 神田直樹・柳澤幸子・小倉尚志・辻 暁: ハチ毒メリチンの細胞毒性に關与する中性脂質膜中における会合体形成過程の分光学的解析、化学会第95春季年会（千葉）、一般口頭、2015

大学院生命理学研究科

博士前期課程

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

中川善之：チトクロム *c* 酸化酵素の構造ダイナミクスに基づくプロトン輸送機構の研究

渡邊祥子：紫外共鳴ラマン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

博士課程（5年一貫）

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

河原由佳：振動分光法による細胞内二原子分子の可視化をもとにした信号伝達機構の研究

科学研究費補助金等

- 1 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

- 2 科学研究費補助金（平成 26～27 年度）新学術領域研究（研究領域提案型）課題番号: 26104532
研究課題 酵素反応追跡のためのピコリットルインクジェットによる新規高速混合器の試作
研究代表者 小倉尚志
- 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 24～26 年度）基盤研究(C) 課題番号:24550080
研究課題 マルチ銅酵素モデル錯体の創製と分光学的研究
研究代表者 太田雄大
- 5 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: 25109535
研究課題 生体エネルギー変換反応の要となる感応性化学種の分光学的研究
研究代表者 太田雄大
- 6 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 24～28 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
- 7 戦略的国際研究交流推進事業費補助金（平成 26～28 年度）
研究課題 分子性金属システムによる酸素と窒素の化学のための戦略的国際研究網の構築
担当研究者 小倉尚志・太田雄大