

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。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 核共鳴非弾性散乱分光による鉄含有生体分子の 振動構造解析

Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Studies of Iron-containing Biomolecules

太田雄大*
Ohta, T.

核共鳴非弾性散乱分光法 (NRVS) は、原子核の共鳴準位のエネルギーに近い x 線を試料に照射し、固体のフォノンもしくは分子振動の生成・消滅をともなう原子核励起をおこさせることにより、振動の様子を調べる分光法である。金属蛋白質の振動分光法としては、共鳴ラマン分光法もしくは赤外吸収分光法が主たる手法であったが、NRVS は選択則無くすべての鉄原子の振動モードの観測を可能にするため、従来の分光法では得られなかった知見が得られる。本分光法を用いて、鉄蛋白質の分子機構の解明を目指す。

発表論文 List of Publication

- I-1 S. Nagatomo (筑波大), M. Okumura (筑波大), K. Saito (筑波大), T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai (法政大) : Interrelationship among the Fe-His bond strength, oxygen affinities and intersubunit hydrogen-bonding changes upon ligand binding in β subunit of human hemoglobin; the alkaline Bohr effect. *Biochemistry* 56, 1261-1273 (2017)
- I-2 S. Paria (大阪大), T. Ohta, Y. Morimoto (大阪大), H. Sugimoto (大阪大), T. Ogura, and S. Itoh (大阪大), "Structure and Reactivity of Copper Complexes Supported by a Bulky Tripodal N4 Ligand: Copper(I)/Dioxygen Reactivity and Formation of a Hydroperoxide Copper(II) Complex", *Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie*, 644 (14), 780-789 (2018).
- I-3 S. Paria (大阪大), Y. Morimoto (大阪大), T. Ohta, S. Okabe (大阪大), H. Sugimoto (大阪大), T. Ogura, and S. Itoh (大阪大), "Copper(I)-Dioxygen Reactivity in the Isolated Cavity of a Nanoscale Molecular Architecture", *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2018 (19), 1976-1983 (2018).
- I-4 Y. Morimoto (大阪大), Y. Takagi (大阪大), T. Saito (広島市大), T. Ohta, T. Ogura, N. Tohnai (大阪大), M. Nakano (大阪大), and S. Itoh (大阪大), "A Bis(μ -oxido)dinickel(III) Complex with a Triplet Ground State", *Angewandte Chemie International Edition*, 57 (26), 7640-7643 (2018).
- I-5 H. Kitagishi (同志社大), D. Shimoji (同志社大), T. Ohta, R. Kamiya (同志社大), Y. Kudo (同志社大), A. Onoda (大阪大), T. Hayashi (大阪大), J. Weiss (CNRS, Strasbourg), J. A. Wytko (CNRS, Strasbourg), and K. Kano (同志社大), "A Water-Soluble Supramolecular Complex that Mimics the Heme/Copper Hetero-Binuclear Site of Cytochrome c Oxidase", *Chemical Science*, 9(7), pp. 1989-1995 (2018).
- I-6 M. Guo (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), R. Gupta (Ewha Womans Univ), M. S. Seo (Ewha Womans Univ), T. Ohta, H.-H. Wang (South China Univ of Tech), H.-Y. Liu (South China Univ of Tech), S. N. Dhuri (Goa Univ), R. Sarangi (Stanford Univ), S. Fukuzumi (Ewha Womans Univ), and W. Nam (Ewha Womans Univ), "Dioxygen Activation and O-O Bond Formation Reactions by Manganese Corroles" *Journal of the American Chemical Society*, 139(44), pp. 15858-15867 (2017).
- I-7 S. Hong (Ewha Womans Univ), X. Lu (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), M. S. Seo (Ewha Womans Univ), T. Ohta, T. Ogura, M. Clémancey (Université Grenoble Alpes), P. Maldivi (Université Grenoble Alpes), J.-M. Latour (Université Grenoble Alpes), R. Sarangi (Stanford Univ), and W. Nam (Ewha Womans Univ), "Achieving One-Electron Oxidation of a Mononuclear Nonheme Iron(V)-Imido Complex", *Journal of the American Chemical Society*, 139(41), pp. 14372-14375 (2017).
- I-8 H. Noh (DGIST), D. Jeong (DGIST), T. Ohta, T. Ogura, J. S. Valentine (UCLA), and J. Cho (DGIST), "Distinct Reactivity of a Mononuclear Peroxocobalt (III) Species towards Activation of Nitriles", *Journal of the American Chemical Society*, 139(32), pp. 10960-10963 (2017).

- I-9 M. Sekino (金沢大), H. Furutachi (金沢大), R. Tojo (金沢大), A. Hishi (金沢大), H. Kajikawa (金沢大), T. Suzuki (金沢大), K. Suzuki (金沢大), S. Fujinami (金沢大), S. Akine (金沢大), Y. Sakata (金沢大), T. Ohta, S. Hayami (熊本大), and M. Suzuki (九州大), “New Mechanistic Insight into Intramolecular Aromatic Ligand Hydroxylation and Benzyl Alcohol Oxidation Initiated by Well-defined (μ -peroxo) Diiron (III) Complex”, *Chemical Communications*, 53(63), pp. 8838-8841 (2017).
- I-10 S. Hong (Ewha Womans Univ), K. D. Sutherlin (Stanford Univ), A. K. Vardhaman (Ewha Womans Univ), J. J. Yan (Stanford Univ), S. Park (Ewha Womans Univ), Y.-M. Lee (Ewha Womans Univ), S. Jang (Ewha Womans Univ), X. Lu (Ewha Womans Univ), T. Ohta, T. Ogura, E. I. Solomon (Stanford Univ), and W. Nam (Ewha Womans Univ), “A Mononuclear Nonheme Iron (V)-Imido Complex”, *Journal of the American Chemical Society*, 139(26), pp. 8800-8803 (2017).
- I-11 Zhang, M. (奈良先端大), T. Nakanishi(奈良先端大), M. Yamanaka(奈良先端大), S. Nagao(奈良先端大), S. Yanagisawa, Y. Shomura, N. Shibata, T. Ogura, Y. Higuchi, and S. Hirota(奈良先端大), Rational Design of Domain-Swapping-Based c-Type Cytochrome Heterodimers by Using Chimeric Proteins. *Chembiochem*, 18(17): p. 1712-1715 (2017).
- I-12 Shimada, A., M. Kubo (理研), S. Baba(高度研), K. Yamashita (理研), K. Hirata (理研), G. Ueno (理研), T. Nomura (理研), T. Kimura (神戸大), K. Shinzawa-Itoh, J. Baba, K. Hatano, Y. Eto, A. Miyamoto, H. Murakami(高度研), T. Kumasaka(高度研), S. Owada (理研), K. Tono(高度研), M. Yabashi(高度研), Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, M. Sakaguchi, T. Ogura, R. Komiyama (慶応大), J. Yan (慶応大), E. Yamashita (蛋白研), M. Yamamoto (理研), H. Ago (理研), S. Yoshikawa, and T. Tsukihara, A nanosecond time-resolved XFEL analysis of structural changes associated with CO release from cytochrome c oxidase. *Sci Adv*, 3(7): p. e1603042. (2017).
- I-13 Tsuji, T. (同志社大), A.A. Zaoputra (同志社大), Y. Hitomi (同志社大), K. Mieda, T. Ogura, Y. Shiota (九州大), K. Yoshizawa (九州大), H. Sato (株式会社リガク), and M. Kodera (同志社大), Specific Enhancement of Catalytic Activity by a Dicopper Core: Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol with Hydrogen Peroxide. *Angew Chem Int Ed Engl*, 56(27): p. 7779-7782. (2017).
- I-14 Nagatomo, S.(筑波大), K. Saito(筑波大), K. Yamamoto (福井大), T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai (法政大), Heterogeneity between Two α Subunits of $\alpha_2\beta_2$ Human Hemoglobin and O₂ Binding Properties: Raman, (1)H Nuclear Magnetic Resonance, and Terahertz Spectra. *Biochemistry*, 56(46): p. 6125-6136. (2017).
- I-15 Abe, T. (阪大), Y. Morimoto (阪大), K. Mieda, H. Sugimoto (阪大), N. Fujieda (阪大), T. Ogura, and S. Itoh (阪大), Geometric effects on OO bond scission of copper(II)-alkylperoxide complexes. *J Inorg Biochem*, 177: p. 375-383. (2017).

- I-16 Shimada S, Oosaki M, Takahashi R, Uene S, Yanagisawa S, Tsukihara T, Shinzawa-Itoh K. 'A unique respiratory adaptation in *Drosophila* independent of supercomplex formation'. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* Feb;1859(2):154-163. (2018)
- I-17 北川禎三：高次構造によるタンパク質の機能制御：ヒトヘモグロビンの協同的O₂結合と四次構造変化、佐賀大学理工学部 集中講義、2017
- I-18 北川禎三：Unusual heme structure of soluble guanylate cyclase revealed with resonance Raman spectroscopy, 佐賀大学理工学部 特別講演、(2017)
- I-19 T. Ohta, P. Nagaraju (中部大), Y. Naruta (中部大): Efficient Oxygen Reduction Catalysis of Fe-Porphyrins, 5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC 2017), Kolkata, India, 招待講演、(2017)
- I-20 S. Yanagisawa, A. Yamasaki, T. Nakao, S. Shimada, H. Shimomura, K. Shinzawa-Itoh, and T. Ogura, 'Resonance Raman study on respiratory Supercomplex from bovine heart mitochondria,' 6th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2017/5/23~27 招待講演
- II-1 Li, C., T. Nishiguchi, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Ogura, and S. Nakashima, Performance of a time-resolved IR facility for assessment of protonation states and polarity changes in carboxyl groups in a large membrane protein, mammalian cytochrome c oxidase, under turnover conditions in a sub-millisecond time resolution. *Biochim Biophys Acta*, 2018.
- III-1 S. Yanagisawa, M. S. Deshpande(奈良先端大), S. Hirota(奈良先端大), T. Nakagawa(ユニソク) and T. Ogura, 'Improved stopped-flow time-resolved resonance Raman spectroscopy device for studying enzymatic reactions,' *J. Raman Spectrosc.*, 48, 680-687, (2017)
- III-2 Matoba, Y. (広島大), S. Kihara, Y. Muraki, N. Bando, H. Yoshitsu, T. Kuroda, M. Sakaguchi, K. Kayama, H. Tai, S. Hirota, T. Ogura, and M. Sugiyama, Activation Mechanism of the *Streptomyces* Tyrosinase Assisted by the Caddie Protein. *Biochemistry*, 2017. 56(41): p. 5593-5603.
- IV-1 太田雄大, 「核共鳴非弾性散乱分光による鉄蛋白質活性中心の構造化学とダイナミクス」, 第11回 SPRUC核共鳴散乱研究会 (名古屋工業大学), 2018年3月2日 招待講演
- IV-2 T. Ohta, "Structural Basis and Dynamics for Gas Recognition of Myoglobin: A Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Study", Ewha Bioinorganic Chemistry Symposium 2017 (Seoul, Korea), 2017年12月2日 招待講演
- IV-3 太田雄大, 「核共鳴非弾性散乱分光により解き明かす鉄蛋白質活性点の構造化学とダイナミクス」, 第55回日本生物物理学会年会 (熊本大学), 2017年9月19日 招待講演
- IV-4 T. Ohta, "Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopic Study of Diatomic Gas Sensing Mechanism of

Myoglobin”, The 254th American Chemical Society National Meeting (Washington DC, USA), 2017年8月20日 招待講演

大学院生命理学研究科

博士前期課程

中尾知美：呼吸鎖超複合体中末端酵素の構造解析

西畑佳晃：時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロム *c* 酸化酵素の動的構造解析

村上裕紀：ケージド酸素化合物の時間分解結晶構造解析への応用

山内 舜：蛋白質赤外測定のための超薄型フローセルシステムの開発

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 28～29 年度）新学術領域研究（研究領域提案型） 課題番号: 16H00848
研究課題 液滴衝突法による微量タンパク質の反応追跡
研究代表者 小倉尚志
- 2 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）基盤研究(C) 課題番号:15K05393
研究課題 新規時間分解振動分光法によるチトクロム酸化酵素のプロトンポンプ共役機構の探求
研究代表者 中島 聡
- 3 科学研究費補助金（平成 27～29 年度）若手研究(B) 課題番号:15K21295
研究課題 ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系超複合体形成は末端酵素の反応性に影響を与えるか？
研究代表者 柳澤幸子
- 4 科学研究費補助金（平成 28～30 年度）基盤研究(C) 課題番号:16K05850
研究課題 核共鳴非弾性散乱分光によるセンサー蛋白質の気体感知機構の解明
研究代表者 太田 雄大
- 5 科学研究費補助金（平成 29～31 年度）基盤研究(C) 課題番号: 17K05606
研究課題 ヘモグロビン共同性発現へのタンパク質の大振幅ゆらぎと停波数振動の寄与の実験的検証
研究代表者 長友重紀（筑波大学）
研究分担者 北川禎三