

## I 金属タンパク質の振動分光研究

### Raman Spectroscopy of Metalloproteins

久保 稔・柳澤幸子・北川禎三

Kubo, M., Yanagisawa, S., Kitagawa, T.

活性中心に Fe や Cu などの遷移金属を有する金属タンパク質は、アミノ酸残基が金属イオンの電子状態を精緻に制御することによって機能している。本研究では、金属タンパク質の機能メカニズムを明らかにするために、活性中心や基質・リガンドの構造、電子状態を振動分光解析する。ミトコンドリア呼吸系膜タンパク質複合体や種々のヘムタンパク質、チロシナーゼ、ヒドロゲナーゼ、金属タンパク質のモデル錯体等を研究対象とする。

## II SACLA を用いた酵素反応の時分割構造解析

### Time-Resolved Structural Analysis of Enzymatic reactions using SACLA

久保 稔・柳澤幸子

Kubo, M., Yanagisawa, S.

酵素反応の可視化は、生命科学研究における大きな夢の一つである。この実現に向けて本研究では、X線自由電子レーザー-SACLA と、光により基質小分子を放出するケージド化合物を組み合わせた時分割 X線結晶構造解析を行ない、酵素反応を原子レベルで追跡する。チトクロム P450<sub>nor</sub> やチトクロム *c* 酸化酵素等が研究対象である。

## III ストップフローラマン分光法による 二原子酸素添加酵素の反応解析

### Stopped-Flow Raman Reaction Analysis of Dioxygenase

久保 稔・柳澤幸子

Kubo, M., Yanagisawa, S.

インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) 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するヘム酵素で

ある。IDO の反応機構を解明するために、ストップフローラマン分光装置を開発し、ヘム中間体や基質中間体を捕捉する。

## 発表論文 List of Publication

- I-1 Yuka Kawahara-Nakagawa, K.N., Satoru Nakashima, Shota Inoue, Takehiro Ohta, Takashi Ogura, Yasuteru Shigeta, Katsuyuki Fukutani, Tatsuhiko Yagi and Yoshiki Higuchi: New assay method based on Raman spectroscopy for enzymes reacting with gaseous substrates, *Protein Science*, 28, 663-670, (2019)
- I-2 Mio Sekino(金沢大), Hideki Furutachi(金沢大), Kyosuke Tasaki(金沢大), Takanao Ishikawa(金沢大), Shohei Fujinami(金沢大), Shigehisa Akine(金沢大), Yoko Sakata(金沢大), Masatatsu Suzuki(金沢大), T. Nomura, T. Ogura, and T. Kitagawa: Crystal Structure of Bis( $\mu$ -hydroxo)diiron(II) Complex with a Dinucleating Ligand Having a Butyl Linker, *X-ray Structure Analysis Online*, 35, 5-7. (2019)
- I-3 Yuichi Yasuda(金沢大), Hideki Furutachi(金沢大), Yosuke Hayashi (金沢大), Kana Ishizaki(金沢大), Shuhei Fujinami(金沢大), Shigehisa Akine(金沢大), Masatatsu Suzuki(金沢大), Shigenori Nagatomo(筑波大), and Teizo Kitagawa: Crystal Structure of  $\mu$ -Phenoxo- $\mu$ -benzoate-bridged Dinuclear Fe(II) Complex with a Dinucleating Ligand Having a Sterically Bulky Imidazolyl Group, *X-ray Structure Analysis Online*, 35, 11-13, (2019)
- I-4 Chen Li, Tatsuhito Nishiguchi, Kyoko Shinzawa-Itoh, Shinya Yoshikawa, Takashi Ogura, and Satoru 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*, 1859, 1045-1050, (2018)
- I-5 Miho Watanabe(筑波大), Yuki Kanai(筑波大), Shunpei Nakamura(筑波大), Ryu Nishimura(筑波大), Tomokazu Shibata(筑波大), Atsuya Momotake(筑波大), Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Takashi Matsuo(奈良先端大), Shun Hirota(奈良先端大), Saburo Neya(千葉大), Akihiro Suzuki(長岡高専), and Yasuhiko Yamamoto(筑波大): Synergistic Effect of Distal Polar Interactions in Myoglobin and Their Structural Consequences, *Inorg. Chem.*, 57, 14269-14279, (2018)
- I-6 Ryosuke Shinomiya(筑波大), Yuya Katahira(筑波大), Haruka Araki, Tomokazu Shibata(筑波大), Atsuya Momotake(筑波大), Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Akihiro Suzuki(長岡高専), Saburo Neya(千葉大), Yasuhiko Yamamoto(筑波大): Characterization of Catalytic Activities and Heme Coordination Structures of Heme-DNA Complexes Composed of Some Chemically Modified Hemes and an All Parallel-Stranded Tetrameric G-Quadruplex DNA Formed from d(TTAGGG), *Biochemistry*, 57, 5930-5937, (2018)
- I-7 Yasuyuki Matoba(広島大), Shogo Kihara(広島大), Naohiko Bando(広島大), Hironari Yoshitsu(広島大), Miyuki Sakaguchi, Kure'e Kayama, Sachiko Yanagisawa, Takashi Ogura, Masanori Sugiyama(広島大): Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr98 residue in the caddie protein, *PLoS Biol*, 16, (12), e3000077, (2018)
- I-8 Minoru Kubo: Time-resolved IR analysis of the catalytic reaction pathway of NO reductase. The international symposium on Bioinorganic Chemistry (Okazaki), 2018 (招待講演)

- II-1 久保稔 X線自由電子レーザーを用いたタンパク質のダイナミクス計測. 神戸大学先端融合研究環ワークショップ“非共有結合系の分子科学:計測技術から探る生体分子科学の新展開”(神戸) 2019 (招待講演)
- II-2 久保稔 X線自由電子レーザーによる蛋白質の時分割・無損傷結晶構造解析. 光学 47, 431-434 (2018) (解説)
- II-3 久保稔 動的な構造生物学研究と創薬貢献への展望. 神戸大学・徳島大学・兵庫県立大学合同シンポジウム“産学連携による国際的卓越研究拠点の創設とその未来”(神戸)、2018 (招待講演)
- II-4 久保稔 構造生物学における SACLA 時分割構造解析の展望と課題. SPring-8 シンポジウム“時間軸でみる SPring-8/SACLA の利用研究”(姫路) 2018 (招待講演)
- II-5 久保稔 時分割 XFEL 構造解析による蛋白質機能サイト間の相互作用ダイナミクスの観測. 蛋白研セミナー“生体分子内情報伝達機構の新展開”(吹田) 2018 (招待講演)
- II-6 久保稔 SACLA 時分割構造解析の展望と課題. 蛋白研セミナー“構造生物学と計算科学の融合による動的構造生物学の新しい展開”(吹田) 2018 (招待講演)
- II-7 Minoru Kubo Time-resolved XFEL crystallography for capturing reaction intermediates of respiratory metalloenzymes. 15th Conference of the Asian Crystallographic Association and 32nd Conference of the Society of Crystallographers in Australia and New Zealand (AsCA 2018/Crystal32), (Auckland) 2018 (招待講演)

## 大学院生命理学研究科

### 博士前期課程

魚崎凌生: ストップフロー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解明

高坂瞭汰: ケージド酸素を用いたチトクロム *c* 酸化酵素の時分割結晶構造解析

### 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 平成 30 年度兵庫県立大学特別研究助成金

研究課題 ストップフローラマン分光法を用いたタンパク質の構造ダイナミクス研究

研究代表者 柳澤幸子

### 2 科学研究費補助金 (2017 年 4 月～2020 年 3 月) 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低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

