

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：24506  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21750022  
 研究課題名（和文） 超高感度時間分解赤外分光装置の開発と生体系プロトンポンプ機構の解明  
 研究課題名（英文） Development of highly-sensitive time-resolved IR spectrometer to study the proton-pumping mechanisms of biomolecules  
 研究代表者  
 久保 稔（KUBO MINORU）  
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教  
 研究者番号：90392878

研究成果の概要（和文）：タンパク質のプロトンポンプ機構を解明するために、生理条件下（室温・水溶液中）のタンパク質に適用可能な超高感度ナノ秒時間分解赤外分光装置を開発した。本装置はウシ心筋チトクロム *c* 酸化酵素に応用され、このタンパク質の持つ水チャネルの動的ゲーティング機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A new highly-sensitive IR spectrometer that can measure nanosecond time-resolved IR spectra of proteins under physiological conditions has been developed to study the proton-pumping mechanisms of proteins. The spectrometer has been applied to bovine cytochrome *c* oxidase. The dynamic regulation mechanism of water channel gate of this protein is elucidated.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：赤外分光法、時間分解振動分光法、タンパク質、プロトンポンプ、チトクロム酸化酵素、フェムト秒レーザー

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のプロトンポンプ機構を解明するためには、X線結晶構造解析では通常決定できない水素原子の位置を高精度で決定し、プロトン移動や水素結合ネットワークの変化を実験で捕らえることが必要となる。アミノ酸残基のプロトン化や水素結合の生成・消滅を部位特異的に検出できる強力な手法に赤外分光法がある。しかし、タンパク質の赤外分光は、水の強い赤外吸収が問題とな

るため極めて困難であり、これまで非常に限られた系にしか応用されてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生理条件下（室温・水溶液中）のタンパク質に適用可能な超高感度の時間分解赤外分光装置を新規開発し、タンパク質のプロトンポンプ機構を解明することである。

装置の第一の応用として、チトクロム *c* 酸

化酵素のプロトンポンプ機構を解明する。チトクロム *c* 酸化酵素は、われわれが呼吸で取り入れた酸素を水にまで還元すると共に、その反応で得られる自由エネルギーを用いて、プロトンをポンプする。1920年代に発見されて以来、生体エネルギー分野で常に挑戦的な研究課題であり続けてきたタンパク質である。

### 3. 研究の方法

光源にフェムト秒赤外レーザー光を使用した。フェムト秒パルス光は、従来の光源(黒体輻射光源)とは桁違いの輝度を持っており、水の赤外吸収に負けない赤外光透過を実現する。検出器には、マルチチャンネル MCT 検出器を用いた。これにより、多波長同時測定が可能となった。

### 4. 研究成果

装置を完成させ、室温・水溶液中のチトクロム酸化酵素の CO 光解離にともなうタンパク質の構造変化を観測した。光路長 50  $\mu\text{m}$  の回転セルで実験し(これまでの常識を覆した光路長) COOH 基の赤外吸収信号のわずか 0.01 % の変化を高精度検出することに成功した。しかもスペクトルの測定時間はわずか 1 分であった(これまでの装置では何時間もかかる)。

またタンパク骨格由来の信号(Amide I)の解析から、チトクロム酸化酵素の水チャンネルの開閉が、活性中心の一つである  $\text{Cu}_B$  でのリガンド脱着と同期して起こることが明らかとなった。

次の課題は、フローセルを用いて、酸素還元反応と共役したプロトンポンプを観測することである。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

以下、全て査読有。

- [1] Barabanschikov, A., Demidov, A., Kubo, M., Champion, P. M., Zhao, J., Sturhahn, W., Alp, E. E., Sage, J. T. Spectroscopic identification of reactive porphyrin motions. (2011) *J. Chem. Phys.* In press.
- [2] Choi, Y. J., Cho, K.-B., Kubo, M., Ogura, T., Karlin, K. D., Cho, J., Nam, W. Spectroscopic and computational characterization of  $\text{Cu}^{\text{II}}$ -OOR (R = H or Cumyl) complexes bearing a  $\text{Me}_6\text{-tren}$  ligand. (2011) *Dalton Trans.* Vol. 40, 2234-2241 (Special Issue, New Talent Asia).
- [3] Aki, Y., Nagai, M., Nagai, Y., Imai, K., Aki, M., Sato, A., Kubo, M., Nagatomo, S., Kitagawa, T. Differences in coordination states of substituted tyrosine residues and quaternary structures among hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy. (2010) *J. Biol. Inorg. Chem.* Vol. 15, 147-158.
- [4] Benabbas, A., Ye, X., Kubo, M., Zhang, Z., Maes, E. M., Montfort, W. R., Champion, P. M. Ultrafast dynamics of diatomic ligand binding to nitrophorin 4. (2010) *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 132, 2811-2820.
- [5] Sawant, S. C., Wu, X., Cho, J., Cho, K.-B., Kim, S. H., Seo, M. S., Lee, Y.-M., Kubo, M., Ogura, T., Shaik, S., Nam, W. Water as an oxygen source: Synthesis, characterization, and reactivity studies of a mononuclear nonheme manganese(IV) oxo complex. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed.* Vol. 49, 8190-8194.
- [6] Cho, J., Sarangi, R., Kang, H. Y., Lee, J. Y., Kubo, M., Ogura, T., Solomon, E. I., Nam, W. Synthesis, structural and spectroscopic characterization, and reactivities of mononuclear cobalt(III)-peroxo complexes. (2010) *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 132, 16977-16986.
- [7] Kim, S. H., Park, H., Seo, M. S., Kubo, M., Ogura, T., Klajn, J., Gryko, D. T., Valentine, J. S., Nam, W. Reversible O-O bond cleavage and formation between Mn(IV)-peroxo and Mn(V)-oxo corroles. (2010) *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 132, 14030-14032.
- [8] Nakane, D., Kuwasako, S., Tsuge, M., Kubo, M., Funahashi, Y., Ozawa, T., Ogura, T., Masuda, H. A square-planar Ni(II) complex with an  $\text{N}_2\text{S}_2$  donor set similar to the active centre of nickel-containing superoxide dismutase and its reaction with superoxide. (2010) *Chem. Commun.* Vol. 46, 2142-2144.
- [9] Tano, T., Doi, Y., Inosako, M., Kunishita, A., Kubo, M., Ishimaru, H., Ogura, T., Sugimoto, H., Itoh, S. Nickel(II) complexes of TPA ligands with 6-phenyl substituents  $\text{Ph}_n\text{TPA}$ . Structure and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -reactivity. (2010) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 83, 530-538 (Selected Paper).
- [10] Cho, J., Sarangi, R., Annaraj, J., Kim, S. Y., Kubo, M., Ogura, T., Solomon, E. I., Nam, W. Geometric and electronic structure and reactivity of a mononuclear "side-on" nickel(III)-peroxo complex. (2009) *Nature Chem.* Vol. 1, 568-572.
- [11] Lee, Y.-M., Dhuri, S. N., Sawant, S. C., Cho, J., Kubo, M., Ogura, T., Fukuzumi, S., Nam, W. Water as an oxygen source in the generation of mononuclear nonheme iron(IV)-oxo complexes. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.* Vol. 48, 1803-1806.

- [12] Honda, K., Cho, J., Matsumoto, T., Roh, J., Furutachi, H., Toshi, T. **Kubo, M.**, Fujinami, S., Ogura, T., Kitagawa, T., Suzuki, M. New oxidation reactivity of a bis( $\mu$ -oxo)-dinickel(III) complex: Arene hydroxylation of the supporting ligand. (2009) *Angew. Chem. Int. Ed.* Vol. 48, 3304-3307.
- [13] Inosako, M., Kunisita, A., **Kubo, M.**, Ogura, T., Sugimoto, H., Itoh, S. ( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -disulfido)dinickel(II) complexes supported by 6-methyl-TPA ligands. (2009) *Dalton Trans.* 9410-9417 (Selected Paper for Cover Picture).
- [14] Kunishita, A., Doi, Y., **Kubo, M.**, Ogura, T., Sugimoto, H., Itoh, S. Ni(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reactivity in bis[(pyridin-2-yl)methyl]amine tridentate ligand system. Aromatic hydroxylation reaction by bis( $\mu$ -oxo)dinickel(III) complex. (2009) *Inorg. Chem.* Vol. 48, 4997-5004.
- [15] Kunishita, A., **Kubo, M.**, Sugimoto, H., Ogura, T., Sato, K., Takui, T., Itoh, S. Mononuclear copper(II)-superoxo complexes that mimic the structure and reactivity of the active centers of PHM and D $\beta$ M. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 131, 2788-2789.

〔学会発表〕(計2件)

- [1] 久保稔「高輝度フェムト秒レーザーを用いた時間分解赤外分光装置の開発」第4回分子科学討論会、2010年9月14日、大阪大学豊中キャンパス。
- [2] 久保稔「フェムト秒レーザーを用いた高感度時間分解赤外分光装置の開発：酵素反応の生理条件下での測定を目指して」第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日、東北大学川内北キャンパス。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 稔 (KUBO MINORU)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：90392878

### (2) 研究分担者

なし。

### (3) 連携研究者

なし。