

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770128  
 研究課題名（和文） NMR・MM 法による炭酸脱水酵素機能に重要な His 残基の挙動解析と触媒機構解明  
 研究課題名（英文） NMR and MM Analysis of Tautomerization of His64 Coupled to Ionization of Zinc-bound Solvent during Proton Transfer in Carbonic Anhydrase  
 研究代表者  
 島原 秀登 (SHIMAHARA HIDETO)  
 北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・助教  
 研究者番号：40313704

研究成果の概要： NMR データを解析することにより「一般に His 残基の互変異性平衡は水素結合に支配される」との規則性を見出し、それによって同法により得られた「炭酸脱水酵素の機能に重要な His 残基の互変異性平衡定数は 1.0 である」との結果が示す水素結合の特異性を明らかとした。その結合様式を既知 X 線構造と比較し、かつ計算化学解析によって検証した結果、当分野において長く懸案であった触媒反応にみられるプロトン移動の機構を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,200,000	150,000	1,350,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード: タンパク質 酵素 機能 ヒスチジン 互変異性 触媒 反応機構 プロトン移動

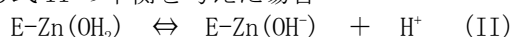
## 1. 研究開始当初の背景

広範な生理的プロセスを機能調節する CA は、生体内 pH 調節、イオン輸送、水-電解質バランス、炭酸分泌吸収、骨吸収、眼内圧調節、腎酸性化、脳発育などに関わり、その酵素機能の不良によって、骨形成異常大理石症候群、緑内障、呼吸性アシドーシス、てんかん、メニエール氏症候群を誘発させることが病態生理学見地から知られている。このような生理的反応は呼吸・代謝によって生じた二酸化炭素を血液や細胞質液に溶解させるため、式 I に示すような触媒反応に依存する。



酵素非存在生理的 pH 条件下で  $10^{-2}\text{s}^{-1}$  (右向き) と遅いこの反応は human CAII isozyme (hCAII) 存在下  $10^6\text{s}^{-1}$  まで加速される。その触媒効率 ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}=1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) は酵素と基質の衝突頻度に匹敵する値であるので本酵素は最も進化した酵素とされる。反応の基本過程は電子移動反応に関与しないルイス酸として作用する Zn(II) の特徴から亜鉛結合 OH<sup>-</sup> の生成を伴うものが受け入れられ、この機構によって各反応段階の特色が説明されている。しかしながらその最終段階にあたるプロトン (H<sup>+</sup>) の放出は速い反応速度  $10^6\text{s}^{-1}$  を説明することが不可能とされている。その理由

は、みかけ  $pK_a7$  の亜鉛配位水分子に支配される式 II の平衡を考えた場合



全平衡定数が  $10^{-7}M$  でかつ逆反応が拡散律速 ( $\sim 10^{11}M^{-1}s^{-1}$ ) であるため正反応は速くとも  $10^4s^{-1}$  以上の速度では進行不可能とされるからである。実際の酵素ではさらに反応は促進され、これが実現されるために亜鉛配位水の脱  $H^+$  化に  $H_2O$  及び  $OH^-$  以外の緩衝液成分が関与することが確かめられている。希薄緩衝液中、反応速度-緩衝液  $pK_a$  依存曲線 (brønsted plot) が  $pK_a7.6 \pm 0.6$  で折れ曲がるとの結果が得られ、かつ同位体効果による解析が行われたところ、活性部位入口に位置する His64 側鎖が溶媒と亜鉛配位水の間で  $H^+$  を受け渡す役割を担うことにより  $10^6s^{-1}$  という速度を達成させる説が提唱された。この  $H^+$  受け渡しの機能と関連させるために多くの異なった条件下にある hCAII 結晶構造が X 線解析により明らかにされている。その構造は Zn(II) が His94, 96, 119 の三つのヒスチジンイミダゾール側鎖と  $H_2O$  または  $OH^-$  で配位された四面体構造をとり、周りを広範な水素結合ネットワークが取り囲む活性部位構造の様子を示す。活性部位入口の His64 は (a) in と (b) out という二つのコンフォメーション ( $pH7.8$  では「in」) をとることが pH 依存的 X 線解析から示され、水素の位置と窒素炭素間の差を同定不能な X 線解析の特性を補うため、水分子酸素の相対配置に関する詳細な解析によって His64N81 窒素が亜鉛に向いていることが示された。また  $^1H-NMR$  解析によって His64 の  $pK_a7.1$  が明らかとなり「in」が中性型であることが示唆された。これに対して T200S 変異体では  $pH8.0$  において活性を完全に維持した状態で「out」をとり、野生型もまた  $pH5.7$  で (b)「out」をとることから「in」と「out」の間の首振り運動が  $H^+$ 64 の N81 に受け渡された生成物  $H^+$  がスウィング運動の後に溶液に放出される) という仮説が提案された。研究開始当初、その最終段階は上述の首振り運動によって  $H^+$  が放出される以外にその方法が考えられず、その説が尤もらしいとされていた。しかしスウィング運動の速さが  $10^6s^{-1}$  に匹敵するとの説明を行うためにイミダゾール基でなく Phe・Tyr 側鎖の回転速度が引用されている。この類推は水素結合能及び回転対称性の違いから不相当であると考えられ、また「in」、「out」の両方が  $H^+$  を受け渡すために必要な動的な安定状態にあるとの説を支持する証拠がなく、スウィングというよりむしろ振動だろうとの動力学的計算結果が提出されていた。従って N81 がプロトネーション

された後、イミダゾリウムとなった His64 が「out」に向きを変えると考えることに問題が生じていると考えられた。そこで、この問題を解決するために、NMR 法を用いて His64 の側鎖に結合する水素にかかる構造情報を得ると着想するに至った。

## 2. 研究の目的

代表者は His64 に他の His 残基にない特別な挙動があるだろうかとの単純な問に端を発し、溶液状態多核  $^{15}N/^1H-NMR$  法を用いて His64 の互変異性平衡・酸塩基平衡を定量化し、計算化学的手法 (QM 又は MM) を用いてその挙動の解析することにより  $H^+$  放出経路を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究は以下 A~F により行った。

**A. 遺伝子操作** 1. 大腸菌 BL21 (DE3) 株による炭酸脱水酵素の大量発現系構築 2. アンピシリンスクリーニング法によるヒスチジン要求性 BL21 (DE3) 株の作成 3. P1 ファージを用いたセリン-グリシンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ欠損遺伝子導入によるグリシン-ヒスチジン二重要求性 BL21 (DE3) 株の作成 4. 作成した要求性菌株による炭酸脱水酵素の大量発現系構築 5. 大腸菌大量発現系による炭酸脱水酵素のアミノ酸残基の  $^{15}N$ ,  $^{13}C$  選択標識

**B. 蛋白質調製** 1. 炭酸脱水酵素阻害剤を用いたアフィニティクロマトカラムの作成 2. アフィニティクロマトグラフィー、ゲル濾過法による炭酸脱水酵素の精製 3. C4 カラムを用いた逆相 HPLC 法と SDS-ゲル電気泳動法による精製度の確認 4. 超遠心分析法を用いた分子量決定に基づく溶液状態化学量論の確認 5. ジピコリン酸を用いたアポ炭酸脱水酵素の作成 6. 4-nitrophenyl acetate を用いた酵素加水分解速度の確認

**C. NMR 測定** 1.  $^1H/^{15}N$   $^1H/^{13}C$  相関 NMR 測定法 (HMQC 法) を用いた炭酸脱水酵素内ヒスチジンシグナルの検出 2.  $^{15}N$ ,  $^{13}C$  二重標識法を酵素の Gly63-His64 に適用した His64 アミド窒素のシグナル帰属 3. HNC0, HNCA, HCCH, HCCCH, HSQC 法を用いた His64 アミド窒素一側鎖イミダゾール窒素間の共有結合特異的帰属 4. 核オーバーハウザー効果 (NOE) 法による配位ヒスチジン側鎖シグナルの帰属 5. 低磁場 ( $^1H$ , 10-16ppm) 領域における亜鉛配位/酵素内部ヒスチジンシグナルの観察 6. 配位ヒスチジンのイミダゾール環の N-H 結合の  $^1J$  カップリング定数の決定と低障壁水素結合 (LBHB) に関する情報取得 7. 基質アナログ中間体 (酵素阻害剤複合体) 形成時の His64 挙動観察

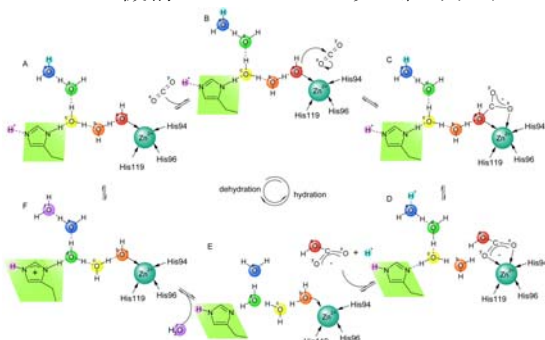
D. データ解析 1. ヒスチジン標識アポ炭酸脱水酵素を用いた金属配位ヒスチジンのシグナル帰属 2. 酵素内ヒスチジン側鎖シグナルの pH 依存性の検出 3. 結晶構造データとケミカルシフトの pH 依存性情報に基づくヒスチジンシグナルの同定 4. Henderson-Hasselbalch 式を用いた最小二乗フィッティングによる酸塩基平衡定数 ( $pK_a$ ) の決定 5.  $^{15}N$  ケミカルシフト pH 依存性曲線を用いたヒスチジンの互変異性平衡定数 ( $K_T$ ) 算出方法の確立 6. 炭酸脱水酵素ヒスチジンの互変異性平衡定数 ( $K_T$ ) の決定

E. X 線構造と比較解析, 量子化学計算による検証 1. 蛋白質データベース (PDB) に登録されている本酵素構造 (2CBA) から活性部位を抽出 2. QM 法による酵素活性化に関する静電的相互作用, 水素結合相互作用の観察 2. 提唱触媒機構とスウィング運動機構間エネルギー差の算出

F. 総括 (得られた構造情報と機能の相関) と論文・総説等の執筆 1. 低分子ヒスチジンアナログの NMR データを用いて互変異性平衡定数 ( $K_T$ ) を算出し, 規則性を見出す. 2. 「炭酸脱水酵素活性部位亜鉛-His64 間を繋ぐ水架橋水素結合は形成と切断が生ずる」ことを導く. 3. 「水架橋内水素結合の形成と切断が His64 の互変異性とシンクロナイズすることによって生成物プロトンの移動」を描く. ここでは, 互変異性と亜鉛結合水のイオン化がカップルし, 水素結合切断時に架橋内水分子が移動する可能性を示唆した.

#### 4. 研究成果

NMR 法により炭酸脱水酵素の His64 は互変異性平衡において際立つ特徴をもつたのこを発見した ( $K_T=1.0$ ). 低分子解析から「互変異性平衡は水素結合 (HB) に支配される」との規則性, つまり N $\delta$ 1 と水素供与基の間に水素結合が形成されると N $\delta$ 1-H 異性体が生じ, そのような結合がないと N $\epsilon$ 2-H 異性体が生じるという経験則を見出した. これら二つの発見を結晶構造に適用することによって, 亜鉛-水分子-His64 間水架橋に HB 形成/崩壊の変換過程が存在することを指摘した. これを従来のピンポン機構にパズルのように組み入れた

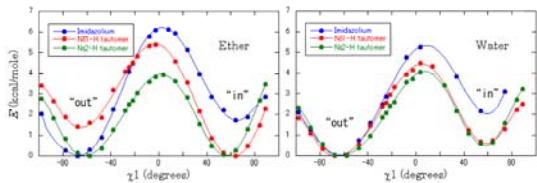


ところ, 図に示すように配向変化に依存しない H<sup>+</sup>放出機構が描かれた (Shimahara, *JBC*, 2007, 282, 9646, received 2006/10/13, revised 2007/01/02). これは本酵素研究重鎮 Silverman の総説 (*Acc. Chem. Res.*, 2007, 408, 669) に引用され, そこでは「His64 互変異性変化が H<sup>+</sup>移動機構に関与する」ことが受入れられた (但し, 「His64 配向変化が H<sup>+</sup>放出に関与する」との主張は変えていない). これら一連の出来事により本研究成果の重大性が広く認められ, 2007 年 12 月第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会合同大会において口頭発表に採択され, 大きな反響が得られた. その会の後すぐに株式会社化学同人によって「化学」の最新のトピックスへの執筆が依頼された. 一方, 2007 年 9 月日本炭酸脱水酵素研究会学術集会においては学術奨励賞を受賞するに至り, 2008 年 9 月に同研究会特別講演, 同年 12 月同研究会誌総説執筆を行い, 2009 年 2 月に同会評議員に選出されるに至った. 2008 年第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同年会でもまた口頭発表に採択され, 「酵素金属結合水は水素結合相互作用によってヒスチジン残基の互変異性を支配する」ことがヘム含有等他の金属酵素研究にまで波紋を拡げるに至った.

これまで他の追随を受けずに「His64 配向変化が H<sup>+</sup>放出に関与する」と主張してきた Silverman を共著者とする結晶構造グループは, 筆者の研究報告と同時期に幾つかの報告を行っている. 例えば, Fisher ら (*Biochemistry*, 2007 46, 2930, received 2006/12/01, revised 2006/12/21)) は, 1.05 Å の X 線結晶構造解析によって His64 の側鎖の水素にかかる電子密度を検出し, His64 の「in」配向が N $\delta$ 1-H 異性体であり, 「out」配向は N $\epsilon$ 2-H 異性体であると同定したと報告し, その中で配向変化が互変異性とシンクロナイズすることでプロトン移動が起こると考察する. そのシンクロナイズは, 一見, NMR 結果である水架橋の形成と切断を説明する尤もらしい説のように見えるかもしれない. しかし, 解析データをみると「out」配向の N $\delta$ 1 原子の電子密度が「in」配向の C $\delta$ 2 原子それと重なるため, 解像度が高くても互変異性の判断は不可能であるだろう. しかもこの帰属は, 「out」配向が (低い pH で観測される電子密度が高く, かつこれが pH 上昇とともに減少し, 代わって「in」配向のそれが増加することから,) 正荷電のイミダゾリウムイオンであるというこれまで広く受け入れられてきた結果と矛盾する. さらに, 活性部位を最も精密に表現することで定評でありかつ上記と同じ pH 7.8 で決定された構造 (PDB: 2CBA) における His64 配向変化にかかる平均占有度は, 「in」0.7 に対し「out」0.2 であると既に報告されている

(Håkansson *JMB*, 1992, 227,1192). 仮に Fisher らの見解が正しいとするならばこの占有度の比が互変異性の割合と一致することになり、これは筆者が報告した互変異性平衡定数が 1.0 (pH 非依存的) であることと矛盾する。論文提出の日付と互変異性が他で語られたことがなかったことから判断すると、あたかも筆者の論文提出を察知し慌てて提出したかのようなのであるが、これは筆者の論文の反響の一つと考えられる。

これと同時期に Silverman の計算グループに属する Maupin ら (*Biochemistry* 2007, 46, 2938, received 2006/10/18, revised 2006/12/01) は QM/MM (ONIOM) 法を用いてエネルギー-His64 $\chi_1$  角度依存変化を観察し、亜鉛結合水の脱プロトン化が His64 の配向変化と一致すると報告した。彼らは遷移状態理論によって配向変化にかかる活性化エネルギーから算出した速度が酵素反応速度を上回るため、配向変化が触媒に関わることが可能と結論した(これは筆者の論文の submit 直後であることから、おそらく筆者が論文内で Phe-Tyr 側鎖の回転速度から His64 の回転速度を類推することはおかしいと指摘したことに対する布石であったろうと筆者は憶測する)。最近、筆者は彼らの計算機実験を再現/確認するために、PDB:2CBA から G63-H64-A65 のみを抽出し、QM 計算を行った。蛋白質環境を反映するとされる Ether 溶媒環境においてエネルギー-His64 $\chi_1$  角度依存曲

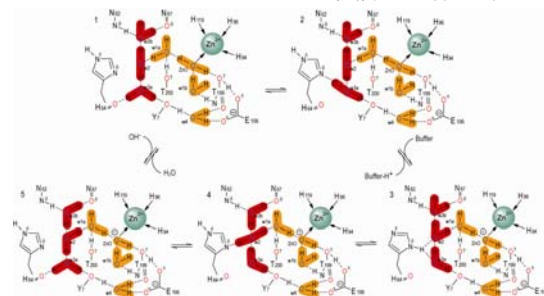


線を作成した(上左図)結果、彼らが報告した配向変化にかかるエネルギー障壁と同じ値をもつよく似た依存曲線を得た。モデルの構造を考えると、そのエネルギー障壁は主鎖と側鎖の重なりから生じるものであるだろう。青線のイミダゾリウム型は「in」状態より「out」の状態が安定であることを示す。赤線と緑線は、それぞれ中性型の N $\delta$ 1-H 異性体と N $\epsilon$ 2-H 異性体であり、N $\delta$ 1-H 異性体において「in」の状態が安定であるとの特徴を示す。これはバルク pH の変化によって同方向に配向が変化する従来の X 線解析結果と一致する。一方、より親水的な環境(上右図)においては、どれも「out」状態が安定である。左右の図を比較すると、N $\delta$ 1-H 異性体の安定な状態が「out」へ変化することでプロトンーションによる配向の変化は起こらないことを示す。これは His64 の配向変化は His64 が置かれる環境の親水度(又は疎水度)に起因することを示唆する。実際、His64 の周りの残基をより疎水的に変えた変異体(Y7F, N62L)では、「in」

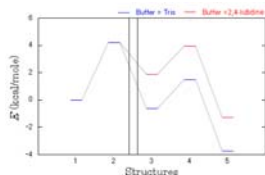
配向が観察され、より親水的に変えた変異体(T200S)では「out」配向が観察される。N67L は「out」配向が観察されるが、これは例外ではない。この変異によって H64 と L67 の間に位置する N62 が H64 に密接に近づき H64 の親水性が増す。従って、「配向変化は溶媒 pH の変化と His64 周りの親水性(疎水性)に支配される」と結論づけられる。これは同時に、モデルは亜鉛結合水のない系であることから、配向変化が亜鉛結合水の脱プロトン化に依存しないことを示唆する。現在、筆者はこれらの結果を論文にまとめる。

上記 Fisher と Maupin の報告が行われた後、他の計算グループ(Riccardi ら)が H<sup>+</sup>移動機構は配向変化でなく静電的作用によるとの報告した(*Biochemistry*, 2008, 47, 2369)。その中でプロトン移動が行われる際 His64 の「in」配向の状態において必要な活性化エネルギーは「out」配向のそれと比較して差がないことを挙げている。この結果は筆者の考えと一致する。その Riccardi らは、亜鉛と His64 の間の H<sup>+</sup>移動について「proton hole」説(His64 に隣接する水の水素がまず His64 に移動し、その水分子の H<sup>+</sup>が欠乏したところへ亜鉛により近い水の水素が段階的に移動するとの説)を以前より提唱していた。筆者は上の触媒機構図で彼らの過去の説である「concerted mechanism」説(架橋内の水のすべての水素が同時に移動する説)を筆者の論文中で紹介した。どちらの説を用いても筆者の説に影響はなかったが、筆者は発表当時彼らの新たな「proton hole」説を知らずにいたために、安易に片方の説のみを引用してしまった。論文中彼らはこれらの説の違いは trivial なことでないとしていて、引用漏れは筆者の反省すべき点であり、執筆中の論文にこれを盛り込む。

NMR 情報を加味した X 線結晶構造と H<sup>+</sup>移動の相関解析にかかる興味の対象は、「結晶構造の座標上では His64 の配向変化を用いなければ、亜鉛-His64 間水架橋の切断を示すことは不可能だろうか」との単純な問いである。筆者は、この解を得るために、上記 2CBA より抽出した活性部位モデル(ZnY7N62G63H64A65 N67H94H96H119E106T199T200 約 140 原子)に QM 計算手法を適用し、X 線結晶構造では観測されない水素原子の位置を探索し、水素が安定に存在しうる最適化構造(水素以外の結晶構造で観測されている座標は固定)を決定した。この構造を用いて水架橋の形成と切断



を判断したところ、水架橋の原子間距離 2.7-3.3 Å (O-O, O-N) と水素結合が絶えず存在しそうな距離であるにも関わらず、水素の位置が変化するだけで(配向変化なし) His64 とそれが隣接する水分子の間に水素結合の形成(「in」配向/Nδ1-H 異性体と「in」配向/Ne2-H 異性体の両モデル)と切断(「in」配向/Ne2-H 異性体モデル)の両状態が存在することを見出した。特に「in」配向/Ne2-H 異性体モデルについて、水架橋の切断状態(水素結合数 16)は形成状態(水素結合数 17)と比較してエネルギー的により安定(〜3 kcal/mol)であった。これらの挙動は NMR 解析結果と一致する。水架橋の切断状態を基に H<sup>+</sup> 移動にかかる水素の位置を探索したところ、上図のように配向変化に依存しないスキームが得られた。この図において配向変化して H<sup>+</sup> が放出されるならば、図中の構造 3 と 4 の間に His64 がシング運動し外部の水に H<sup>+</sup> を渡すことになる。これは、下図の配向変化に依存しないエネルギーダイアグラムの 3 と 4 の間に、上述の配向変化にかかる主鎖と側鎖の重なりから生じるエネルギー障壁が加わることを意味しており、配向変化に依存する H<sup>+</sup> 放出はそれに依存しないより非効率的である。これにより、たとえ X 線結晶構造を用いたとしても、配向変化のない機構によって H<sup>+</sup> が放出される可能性が高いと結論する。



一方、阻害剤を用いた NMR 実験においては CA-スルホンアミド系阻害剤複合体と CA アニオン系阻害剤複合体を比較すると予測通り NMR 時間軸上の交換遅速が異なっていた。特に前者複合体では互変異性平衡定数が僅かに低下した。ここに筆者が見出した上述の経験則を当てはめると、亜鉛-His64 間の水素結合相互作用が阻害剤のない状態と比較して幾分低いことが示唆される。現在、これらの情報を酵素阻害剤複合体の結晶構造に当てはめ、水素結合相互作用が弱められる要因を探索している。しかしながら、報告されている複合体構造の解像度が低いため、その考察が十分に出来ない。そこで自らその複合体を結晶化し構造を決定することを計画している。そこでは、0.5〜0.85 Å という荷電の状態を観察できるほどの高解像度で構造を決定する最先端の研究手法を適用し、His64 の状態を(阻害剤ありなし条件)解析する予定である。もしかすると、懸案の His64 の配向/荷電に係る問題を解決するための詳細な情報が得られるかもしれない。研究開始当初 His64 上に fix した水素を検出することを目的として超低温条件(〜-50 度)で NMR 測定を行うことを予定していたが、実験室の都合上これを行うことが出来なかった。その

ためこれも含めて今後の研究課題としたい。

今秋、3 年ぶりに開催される国際学会(8th International Conference on the Carbonic Anhydrases)における Silverman の講演(New insight into the catalytic mechanism of CAs)に注目が集まる。彼は自説を曲げないとの見方が強い。その理由は学会オーガナイザーの一人である Prof. Supuran (Italy) は電子メールのやりとりの中で、「Silverman is deeply dishonest person」であると指摘し、今後の研究展開及び指針に注意を促しているからである。彼らに直接会って見なければその真偽はわからないが、Silverman がかなり強情であることは間違いなさそうである。筆者もまた日本炭酸脱水酵素研究会幹事の西森功博士に推薦され本学会に発表登録を既に行い、自費出張と心もとない状況ではあるが炭酸脱水酵素研究に存在する派閥等の雰囲気を確認するつもりでいる。Silverman は著名な人物であるので、筆者は細心の注意を払いこの論争の終止符を打つ。

最後に、古くからヒスチジンによる一般酸・塩基触媒特性はそのイミダゾール側鎖の酸塩基平衡によると述べられてきた。しかし、その特性は互変異性平衡が深く関わっていることを炭酸脱水酵素の触媒機構は示す。本研究で発見した His 残基の互変異性平衡の規則性は、様々な H<sup>+</sup> 移動が関わる生物系全般に応用されることが可能である。今後同様に His 残基の互変異性を支配する水素結合相互作用を読み解くことによって、他の多くの酵素反応機構が解明されると期待される。

## 5. 主な発表論文等(研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 7 件)

- ① 島原秀登, Review "Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase, Japanese Journal of the Carbobic Anhydrase Research 1, 39-49, 2008, 査読有
- ② 島原秀登, 長尾秀実, 生物系のプロトトランスファ, 化学 63 巻, 64-65, 2008, 査読無, 執筆依頼
- ③ 島原秀登, 生物系のプロトトランスファに関する理論的解析-酵素触媒機構の解明-, 北陸先端科学技術大学院大学共有計算サーバ使用成果報告 2007 18-19, 2008, 査読無
- ④ 島原秀登, 吉田卓也, 水上卓, 中沢隆, 長尾秀実, 大久保忠恭, 小林祐次(他 2 名, 1 番目), Tautomerism of histidine 64 associated with proton transfer in catalysis of Carbonic Anhydrase, FASEB Journal, 22 巻, 611.23, 2008, 査読無
- ⑤ 山本哲徳, 水上卓, 島原秀登, 長尾秀実(他 4 名, 6 番目), Theoretical Study of Free Energy in Docking Stability of Azurin(II)-Cytochrome c551(II) Complex System,

AIP Conference Proceedings, 982 巻, 784-787  
2008, 査読無

⑥西川佳吾, 水上卓, 島原秀登, 長尾秀実  
(他 4 名, 6 番目), Free Energy Calculation of  
Docking Structure of Azurin(I)-Cyto- chrome  
c551(III) Complex Systems by using the  
Energetic Representation, AIP Conference  
Proceedings, 982 巻, 780-783, 2008, 査読無

⑦島原秀登, 吉田卓也, 中沢隆, 大久保忠恭,  
小林祐次(他 10 名, 1 番目), Tautomerism of  
histidine 64 associated with proton-transfer in  
catalysis of carbonic anhydrase, J Biol Chem,  
282 巻, 9646-56, 2007, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

①島原秀登, 酵素金属結合水は水素結合相互  
作用によってヒスチジン残基の互変異性を支配  
する一亜鉛含有炭酸脱水酵素の水架橋で起こ  
る“切断”と“再構成”によるプロトトランスファ,

第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本  
生化学会大会合同年会, 2008.12.09-12, 神戸

②島原秀登, QM・NMR 法による炭酸脱水酵素  
の機能に重要な His 残基の挙動解析と触媒機  
構解明, 日本生物物理学会第 46 回年会,  
2008.12.03-05, 福岡

③島原秀登, 特別講演「炭酸脱水酵素の触媒  
機構」, 第四回炭酸脱水酵素研究会学術集会,  
2008.09.20, 東京

④島原秀登, Tautomerism of histidine 64  
associated with proton transfer in catalysis of  
Carbonic Anhydrase, Experimental Biology 2008,  
2008.04.05-09, San Diego, America

⑤西川佳吾, 自由エネルギー計算による  
Azurin(I)-Cytochrome c551(III)複合体のドッキ  
ング構造安定性に関する研究, 第 45 回日本生  
物物理学会, 2007.12.21-23, 横浜

⑥Purqon Acep, Free Energy Calculation of  
Spaghetti-like Nanoclusters by Using the  
Energetic Representation, 第 45 回日本生物物  
理学会, 2007.12.21-23, 横浜

⑦島原秀登, Carbonic Anhydrase の反応機構  
- His64 の互変異性とプロトトランスファ機能の  
相関 -, 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80  
回日本生化学会大会合同大会, 2007.12.11-15,  
横浜

⑧野田勝紀, ヒトヒストンシャペロン hNAP-1 の in  
vitro, in vivo における機能解析, 第 30 回日本分  
子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合  
同大会, 2007.12.11-15, 横浜

⑨西川佳吾, 分子生物学的シミュレーションに  
よるアズリン-シトクロム c551 複合体のドッキ  
ング構造に関する研究, 第 21 回分子シミュレ  
ーション討論会, 2007.11.26-28, 金沢

⑩島原秀登, 炭酸脱水酵素 II の触媒機構 -  
His64 の互変異性とプロトトランスファ機能の相  
関 -, 第 3 回日本炭酸脱水酵素研究学術集会  
学術奨励賞受賞, 2007.09.22, 東京

⑪島原秀登, NMR Approach to His-64 Involved  
in Proton-Transfer Mechanism in Catalysis of  
Carbonic Anhydrase, Shimahara, H., Yoshida,  
T., Nakazawa, T., Ohkubo, T., & Kobayashi, Y.,  
12th European Conference on the Spectroscopy  
of Biological Molecules, 2007.09.01-06, Paris,  
France

⑫野田勝紀, MS を用いたスクレオソームにおけ  
るヒストン H2A-H2B 二量体交換速度測定, 第 7  
回日本タンパク質学会年会, 2007 5.24-5.26,  
仙台

[その他]

ホームページ

[http://www.jaist.ac.jp/profiles/info.php?profile\\_id=161](http://www.jaist.ac.jp/profiles/info.php?profile_id=161)

学術奨励賞

<http://www.jaist.ac.jp/news/award/2007/0927.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島原 秀登 (SHIMAHARA HIDETO)  
北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリア  
ルテクノロジーセンター・助教  
研究者番号: 40313704

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者

大久保 忠恭 (OHKUBO TADAYASU)

大阪大学・薬学部・准教授

研究者番号: 90272997

吉田 卓也 (YOSHIDA TAKUYA)

大阪大学・薬学部・助教

研究者番号: 00294116

小林 祐次 (KOBAYASHI YUJI)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 20127228

中沢 隆 (NAKAZAWA TAKASHI)

奈良女子大学・理学部・准教授

研究者番号: 30175492

崎山 文夫 (SAKIYAMA FUMIO)

大阪大学・名誉教授

研究者番号: 40029947

長尾 秀実 (NAGAO HIDEKI)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号: 30291892

水上 卓 (MIZUKAMI TAKU)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサ  
イエンス研究科・助教

研究者番号: 50270955

杉森 公一 (SUGIMORI KIMIKAZU)

金城大学・非常勤研究員

研究者番号: なし