

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685040

研究課題名(和文)新規高精度赤外分光光度計の開発とそれを用いた巨大膜蛋白質のプロトンポンプ反応追跡

研究課題名(英文)Real-time observation of proton-pumping of membrane protein complexes using a novel high-sensitivity IR spectrometer

研究代表者

久保 稔(Kubo, Minoru)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90392878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の反応を生理条件下で実時間観測できる赤外分光装置を開発し、それを巨大膜タンパク質に応用することを目的とした。光源にフェムト秒赤外レーザーを用いて高感度の赤外分光装置を製作する一方、ケージド化合物を用いて反応を制御するフロー・フラッシュ計測系を開発した。マイクロ流路フローセルを使用し、試料消費を抑えたフロー計測系を実現した。フロー・フラッシュ計測系を時間分解可視分光装置に組み込み、NO還元酵素に応用した結果、この膜タンパク質の酵素反応をマイクロ秒の時間分解能で観測することに成功した。現在、フロー・フラッシュ計測系を時間分解赤外分光装置に組み込み、酵素反応の赤外分光観測を進めている。

研究成果の概要(英文)：This project aims to establish time-resolved IR spectroscopic techniques for observing reactions of membrane protein complexes under physiological conditions in real time. High-sensitivity IR spectrometer was constructed using a femtosecond IR laser as the light source. On the other hand, a flow-flash measurement system was developed to control reactions, which are triggered by the photolysis of caged compounds. Micro-channel flow cell was used to obtain a spectrum with minimal sample consumption. The flow-flash system was installed into time-resolved UV-visible absorption spectrometer and tested on NO reductase. We successfully observed the enzymatic reaction of this membrane protein with microsecond time resolution. Flow-flash time-resolved IR spectroscopy is ongoing.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：赤外分光法 時間分解振動分光法 ヘムタンパク質 膜タンパク質 チトクロム酸化酵素 プロトンポンプ 一酸化窒素還元酵素 フェムト秒レーザー

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の反応機構を解明するためには、タンパク質の構造変化を実時間で計測し、機能部位のプロトン化状態や水素結合ネットワークの変化を捕らえる必要がある。この目的に適した実験手法の一つが、赤外分光法である。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、これまで限られた系にしか適用されてこなかった。

そこで、水溶液中(生理条件下)のタンパク質の構造変化を精度良く観測できる高感度の時間分解赤外分光装置の開発を目指した。光源に高輝度のフェムト秒赤外レーザーを使用し、検出器にはマルチチャンネル MCT 検出器を用いた。H21-22 年度には科研費・若手 B の支援を受けて、巨大膜タンパク質・チトクロム酸化酵素の CO 光解離の系(光サイクル反応系)の時間分解スペクトルを測定できるところまで進めた。試料セルには回転セルを用いた。

### 2. 研究の目的

巨大膜タンパク質の反応(特に繰り返し測定が困難な不可逆反応)の観測を可能とする高感度の時間分解赤外分光装置を開発する。装置を、チトクロム酸化酵素(好気呼吸酵素)の O<sub>2</sub>還元/プロトンポンプ反応と一酸化窒素還元酵素(嫌気呼吸酵素)の NO 還元反応の観測に応用し、生命活動に本質的な「呼吸」の分子機構を解明する。

### 3. 研究の方法

赤外分光用フローセルを開発し、若手 B で開発した時間分解赤外分光装置をフロー型に発展・汎用化させる。フローセルは、一度反応した試料を排出し、フレッシュな未反応試料を導入するための試料セルである。

### 4. 研究成果

若手 B で開発した時間分解赤外分光装置の精度を高めるべく、徹底的なノイズ解析・ノイズ対策、また測定アルゴリズムの工夫を行なった。その結果、水の強いバックグラウンド吸収存在下でも(OD>2)、高精度測定(30 μOD)が可能となった。しかも、その高精度スペクトルの取得に必要な積算時間は、わずか数十秒で十分であった。測定の高感度化・短時間化により、フロー測定への期待が高まった。

そこで次にフローセルの開発を進めた。幅 0.2 mm×深さ 0.02 mm の CaF<sub>2</sub> 製マイクロ流路フローセルを開発した。深さは赤外光路長に相当する。一方、幅は赤外パルスの焦点径(φ 0.01 mm 程度)よりもやや大きくした。

基質の導入法については、二液混合法を含めて幾つかの手法を検討した。その内の一つは、シリンジからセルに至る流路(PEEK チューブ)の途中をガス透過性に優れたシリコンチューブに繋ぎ換え、そこから基質ガス(O<sub>2</sub>や NO)を導入するという方法である。

チトクロム酸化酵素のラマン測定で実績のある手法である(*J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 5443)。しかし試験測定の結果、常温での実験は困難であることが判明した。そこで低温測定系(<4 °C)の開発を進めると同時に、ケージド化合物(ケージド O<sub>2</sub>やケージド NO)を用いたフロー・フラッシュ測定法を検討した。

ケージド化合物とは、パルス光照射により基質を放出する化合物である。フロー・フラッシュ測定では、パルス光照射によって反応を開始し、分光測定後、フローにより試料を交換する。との間の時間間隔を変えながら、上記手順を繰り返すことで時間分解データが得られる。

ケージド NO については、高効率な化合物(*J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997) 3840)が市販で入手可能である。そこでケージド NO を用いて、ナノ秒紫外レーザーのパルス照射により NO を放出させるフロー・フラッシュ計測系を開発した。このフロー・フラッシュ計測系を、時間分解可視分光装置に組み込み、一酸化窒素還元酵素の酵素反応をマイクロ秒の時間分解能で実時間観測することに成功した(成果は第 14 回日本蛋白質科学会年会にて発表予定、2014 年 6 月 27 日)。現在、フロー・フラッシュ計測系を時間分解赤外分光装置に組み込み、酵素反応の赤外分光観測を進めている。チトクロム酸化酵素の反応観測に必要なケージド O<sub>2</sub>は、既報の化合物(*Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2630)をベースに開発中である。

### 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 10 件)

下記 10 件、査読有。

- [1] Kubo, M., Nakashima, S., Yamaguchi, S., Ogura, T., Mochizuki, M., Kang, J., Tateno, M., Shinzawa-Itoh, K., Kato, K., Yoshikawa, S. Effective pumping-proton collection facilitated by a copper site (Cu<sub>B</sub>) of bovine heart cytochrome *c* oxidase, revealed by a newly developed time-resolved infrared system. (2013) *J. Biol. Chem.* Vol. 288, 30259-30269 (Selected for *JBC Bioenergetics* Most-Read Articles). doi: 10.1074/jbc.M113.473983
- [2] Tano, T., Okubo, Y., Kunishita, A., Kubo, M., Sugimoto, H., Fujieda, N., Ogura, T., Itoh, S. Redox properties of a mononuclear copper(II)-superoxide complex. (2013) *Inorg. Chem.* Vol. 52, 10431-10437. doi: 10.1021/ic401261z
- [3] Sugimoto, H., Tatemoto, S., Toyota, K., Kubo, M., Ogura, T., Itoh, S. Oxo-sulfido- and oxo-selenido-molybdenum(VI) complexes possessing dithiolene ligand

- related to the active sites of hydroxylases of molybdoenzymes: Low temperature preparation and characterization. (2013) *Chem. Commun.* Vol. 49, 4358-4360 (Selected for Cover Picture). doi: 10.1039/C2CC35345H
- [4] Sugimoto, H., Hatakeda, K., Toyota, K., Tatemoto, S., **Kubo, M.**, Ogura, T., Itoh, S. A new series of bis(ene-1,2-dithiolato)tungsten(IV), -(V), -(VI) complexes as reaction centre models of tungsten enzymes: preparation, crystal structures and spectroscopic properties. (2013) *Dalton Trans.* Vol. 42, 3059-3070. doi: 10.1039/c2dt32179c
- [5] Kobayashi, Y., Okubo, K., Nomura, T., **Kubo, M.**, Fujieda, N., Sugimoto, H., Fukuzumi, S., Goto, K., Ogura, T., Itoh, S. Copper(I)-dioxygen reactivity in a sterically demanding tripodal tetradentate tren ligand. Formation and reactivity of a mononuclear copper(II) end-on superoxo complex. (2012) *Eur. J. Inorg. Chem.* (29), 4574-4578 (Selected for Cover Picture). doi: 10.1002/ejic.201290089
- [6] Yokoyama, A., Han, J. E., Cho, J., **Kubo, M.**, Ogura, T., Siegler, M. A., Karlin, K. D., Nam, W. Chromium(IV)-peroxo complex formation and its nitric oxide dioxygenase reactivity. (2012) *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 134, 15269-15272. doi: 10.1021/ja307384e
- [7] **Kubo, M.**, Okuyama, O., Kitagawa, T., Shigeta, Y. DFT analysis of low-frequency heme vibrations in soluble guanylate cyclase: Raman mode enhancement by propionate-protein interactions. (2012) *Chem. Lett.* Vol. 41, 860-862. doi:10.1246/cl.2012.860
- [8] El-Mashtoly, S. F., **Kubo, M.**, Gu, Y., Sawai, H., Nakashima, S., Ogura, T., Aono, S., Kitagawa, T. Site-specific protein dynamics in communication pathway from sensor to signaling domain of oxygen sensor protein, HemAT-Bs: Time-resolved ultraviolet resonance Raman study. (2012) *J. Biol. Chem.* Vol. 287, 19973-19984. doi: 10.1074/jbc.M112.357855
- [9] Cho, J., Woo, J., Han, J. E., **Kubo, M.**, Ogura, T., Nam, W. Chromium(V)-oxo and chromium(III)-superoxo complexes bearing a macrocyclic TMC ligand in hydrogen atom abstraction reactions. (2011) *Chem. Sci.* Vol. 2, 2057-2062. doi: 10.1039/C1SC00386K
- [10] El-Mashtoly, S. F., **Kubo, M.**, Nakashima, S., Shimizu, T., Kitagawa, T. Structural dynamics of EcDOS heme domain revealed by time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy. (2011) *J. Phys. Chem. Lett.* Vol. 2, 2212-2217. doi: 10.1021/jz201017y
- [学会発表](計 10 件)
- [1] **久保稔** X線結晶構造解析と振動分光法の併用によるタンパク質の動的精密構造解析.大阪大学蛋白質研究所セミナー“結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線”,大阪,2014年2月8日(招待講演).
- [2] 木村哲就, 當舎武彦, 城宜嗣, **久保稔** Development of micro-channel flow-flash method for time-resolved spectroscopic study of enzymatic reactions.日本生物物理学会,第51回年会,京都,2013年10月28日.
- [3] **Kubo, M.**, Nakashima, S., Yamaguchi, S., Ogura, T., Mochizuki, M., Kang, J., Tateno, M., Shinzawa-Itoh, K., Kato, K., Yoshikawa, S. Development of a high-sensitivity time-resolved infrared spectrometer and its application to cytochrome *c* oxidase in aqueous solution. *International Conference on Structural Genomics-Structural Life Science (ICSG-2013-SLS)*, Sapporo (Japan), July 29-August 1, 2013.
- [4] **Kubo, M.**, Nakashima, S., Yamaguchi, S., Ogura, T., Mochizuki, M., Kang, J., Tateno, M., Shinzawa-Itoh, K., Kato, K., Yoshikawa, S. Real time observation of water-channel closure controlled by Cu<sub>B</sub> in bovine cytochrome *c* oxidase using a novel high-sensitivity infrared system. *16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC-16)*, Grenoble (France), July 22-26, 2013.
- [5] **久保稔** 酵素反応の観測を可能にする振動分光技術の開発と展望.第13回日本蛋白質科学会年会,ワークショップ“蛋白質機能を化学的に理解するために”,鳥取,2013年6月12日(招待講演).
- [6] **久保稔**, 中島聡, 望月正雄, 伊藤-新澤 恭子, 吉川信也, 小倉尚志 Time-resolved IR analyses of proteins using a novel pulse flow system synchronized with pump/probe lasers.日本生物物理学会,第50回年会,名古屋,2012年9月24日.
- [7] **久保稔**, 山口悟, 望月正雄, 伊藤-新澤 恭子, 吉川信也, 小倉尚志, 中島聡 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と蛋白質水溶液への応用.平成23年度日本分光学会年次講演会,横浜,2011年12月2日(若手講演賞受賞).
- [8] **久保稔** タンパク質の低振動コヒーレンス—Revisited—.大阪大学蛋白質研究所セミナー“タンパク質科学の未来を語る:実験・理論研究者の対話”,大阪,2011年11月21日(招待講演).
- [9] **久保稔**, 山口悟, 望月正雄, 伊藤-新澤 恭子, 吉川信也, 小倉尚志, 中島聡 水

溶液中のタンパク質の高感度時間分解  
赤外分光測定．第5回分子科学討論会，  
札幌，2011年9月20日．

- [10] 久保 稔 High-sensitivity time-resolved  
infrared analyses of proteins, functioning in  
aqueous solution．日本生物物理学会，第  
49回年会シンポジウム “Sail on Quantum  
Structural Biology !”，姫路，2011年9月17  
日（招待講演）．

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

久保 稔 (KUBO, Minoru)  
理化学研究所・放射光科学総合研究セン  
ター・研究員  
研究者番号：9 0 3 9 2 8 7 8