

## 分子動力学研究部門

### 北川 禎 三 (教授)

A-1) 専門領域：振動分光学、生物物理化学

A-2) 研究課題

- a) 生体系における酸素活性化機構
- b) タンパク質高次構造による機能制御と紫外共鳴ラマン分光
- c) タンパク質高次構造及びそのダイナミクス
- d) ポルフィリン励起状態の構造及びそのダイナミクス
- e) 振動分光学の新テクニックの開発
- f) 呼吸系及び光合成反応中心における電子移動/プロトン輸送のカップリング機構
- g) NO レセプター蛋白の構造と機能
- h) タンパク質のフォルディング/アンフォルディングの初期過程

A-3) 研究活動の概略と主な成果

時間分解共鳴ラマン分光法を主たる実験手法とし、反応中間体や励起状態のように寿命の短い分子種の振動スペクトルを観測することにより、反応する分子の動的構造や振動緩和を解明して、反応あるいは機能との関係を明らかにする方向で研究を進めている。扱う物質としては金属タンパク質とそのモデル化合物が主で、次のように分類される。

- a) 生体系における酸素活性化機構。O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O を触媒するチトクロム酸化酵素，O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O + SO を触媒するチトクロム P-450，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O を触媒するペルオキシダーゼ等のヘム環境の特色，その反応中間体である高酸化ヘムの Fe<sup>IV</sup>=O 伸縮振動の検出等，この分野の国際的フロンティアをつくっている。小倉助手のチトクロム酸化酵素による O<sub>2</sub> 還元機構の研究は1993年の化学会進歩賞受賞の栄誉に輝いた。また総研大生でこの仕事をしていた廣田君（現名大助手）は井上賞を受賞した。
- b) タンパク質高次構造による機能制御と紫外共鳴ラマン分光。ヘモグロビンの4次構造を反映するラマン線を見つけ帰属した。また200 nm 付近のレーザー光でラマン散乱を測定できる実験系を製作し、タンパク質の高次構造の研究に応用した。1分子が約300残基からなるタンパク分子中の1個のチロシンやトリプトファンのラマンスペクトルの抽出に成功し、それが4次構造変化の際にどのように変化しているかを明らかにした。
- c) 時間分解法によるタンパク質動的構造の解明。ミオグロビン CO 付加体の光解離・再結合過程をナノ秒可視ラマン分光で追跡した。多数の人工変異体を用いた研究を進めつつある。時間分解紫外共鳴ラマンも同時に調べている。フィトクロムの研究では水谷助手が井上賞を受賞した。光合成反応中心タンパク等も取り扱っている。1997年には、水谷助手のミオグロビンのピコ秒時間分解ラマンの研究成果が雑誌 *Science* に掲載された。
- d) 金属ポルフィリン励起状態のダイナミクスのピコ秒時間分解ラマンが現在の仕事の中心、振動緩和の測定で振動エネルギー再分配に新しい発見をして1999年に *J. Chem. Phys.* に印刷された。ポルフィリンの一重項、三重項励起状態をナノ秒ラマンで調べる一方、金属ポルフィリンダイマーの励起状態 π-π 相互作用をピコ秒ラマンで見つけた。数ピコ秒で起こる振動エネルギー再分布にモード選択性もみつけている。

- e) 新しい原理を用いたフーリエ変換ラマン分光計の試作 ,及び CCDを用いたスキヤニング・マルチチャンネルラマン分光器の試作 ,紫外共鳴ラマン用回転セル ,酵素反応中間体測定用フローラマン装置の製作 ,ナノ秒温度ジャンプ装置の製作 ,ダイオードレーザーを光源とする高感度赤外分光法の開発。
- f) 有機溶媒中のキノン ,及びその還元体の紫外共鳴ラマン分光とバクテリア光合成反応中心タンパク中のキノン A , B の共鳴ラマンスペクトルの観測。キノンの中性形 ,電気還元したアニオン形のラマンスペクトルの溶媒依存性の解明 ,同位体ラベルユビキノンの解析に向かっている。キノンを電子供与体とする呼吸系末端酸化酵素であるチトクロム bo についても研究を進めている。
- g) ウシ肺から可溶性グアニレートシクラーゼを単離・精製し ,その共鳴ラマンスペクトルを観測した。反応生成物のサイクリック GMP が NO の親和性を制御することを初めて指摘した。この研究を行った院生の富田氏は1997年度の総研大長倉賞 ,及び1998年度井上賞を受賞した。
- h) ナノ秒温度ジャンプ法を用いてウシのリボヌクレアーゼAの熱アンフォルディングのナノ秒時間分解ラマンの測定に成功。タンパク質のナノ秒温度ジャンプでは世界で初めてのデータである。

#### B-1) 学術論文

**T. KOHZUMA, T. INOUE, F. YOSHIZAKI, Y. SASAKAWA, K. ONODERA, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, S. UZAWA, Y. ISOBE, Y. SUGIMURA, M. GOTOWDA and Y. KAI,** “The structure and unusual pH-dependence of plastocyanin from the fern *Dryopteris crassirhizoma*: The protonation of an active-site histidine is hindered by  $\pi$ - $\pi$  interactions,” *J. Biol. Chem.* **274**, 11817 (1999).

**S. NAKASHIMA, S. TANIGUCHI, T. OKADA, A. OSUKA, Y. MIZUTANI and T. KITAGAWA,** “Evidence for  $\pi$ - $\pi$  interactions in the  $S_1$  state of Zn porphyrin dimers revealed by picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy,” *J. Phys. Chem. A* **46**, 9184 (1999).

**S. KAMINAKA, Y. IMAMURA, M. SHINGU, T. KITAGAWA and T. TOYODA,** “Studies of bovine enterovirus structure by ultraviolet resonance Raman spectroscopy,” *J. Virol. Methods* **77**, 117 (1999).

**A. WADA, S. OGO, Y. WATANABE, M. MUKAI, T. KITAGAWA, K. JITSUKAWA, H. MASUDA and H. EINAGA,** “Synthesis and characterization of novel alkylperoxo mononuclear iron(III) complexes with a tripodal pyridylamine ligand: A model for peroxo intermediates in reactions catalyzed by non-heme iron enzymes,” *Inorg. Chem.* **38**, 3592 (1999).

**T. IWASE, C. VAROTSIS, K. SHINZAWA-ITOH, S. YOSHIKAWA and T. KITAGAWA,** “Infrared evidence for CuB ligation of photodissociated CO of cytochrome *c* oxidase at ambient temperatures and accompanied deprotonation of a carboxyl side chain of protein,” *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1415 (1999).

**T. TOMITA, S. HIROTA, T. OGURA, J. S. OLSON and T. KITAGAWA,** “Resonance Raman investigation of Fe-N-O structure of nitrosylheme in myoglobin and its mutants,” *J. Phys. Chem. B* **103**, 7044 (1999).

**S. NAGATOMO, M. NAGAI, A. TSUNESHIGE, T. YONETANI and T. KITAGAWA,** “UV resonance Raman studies of  $\alpha$ -nitrosyl hemoglobin derivatives: Relation between the  $\alpha 1$ - $\beta 2$  subunit interface interactions and the Fe-histidine bonding of  $\alpha$  heme,” *Biochemistry* **38**, 9659 (1999).

**N. SUZUKI, T. HIGUCHI, Y. URANO, K. KIKUCHI, H. UEKUSA, Y. OHASHI, T. UCHIDA, T. KITAGAWA and T. NAGANO,** “Novel Iron Porphyrin-alkanethiolate complex with intramolecular NH...S hydrogen bond: Synthesis, spectroscopy and reactivity,” *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11571 (1999).

**S. ITOH, H. BANDO, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA and S. FUKUZUMI**, "Aliphatic hydroxylation by a bis( $\mu$ -oxo)dinickel(III) complex," *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8945 (1999).

**M. NAGAI, H. WAJCMAN, A. LAHARY, T. NAKATSUKASA, S. NAGATOMO and T. KITAGAWA**, "Quaternary structure sensitive tyrosine residues in human hemoglobin: UV resonance Raman studies of mutants at  $\alpha$ 140,  $\beta$ 35, and  $\beta$ 145 tyrosine," *Biochemistry* **38**, 1243 (1999).

**Y. MIZUTANI, Y. UESUGI and T. KITAGAWA**, "Intramolecular vibrational energy redistribution and intermolecular energy transfer in the (d,d) excited state of nickel octaethylporphyrin," *J. Chem. Phys.* **111**, 8950 (1999).

**Y. MIZUTANI, Y. UESUGI and T. KITAGAWA**, "Vibrational energy relaxation in the (d,d) excited state of nickel octaethylporphyrin," *Laser Chem.* **19**, 275 (1999).

**S. ITOH, M. TAKI, S. TAKAYAMA, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, N. SAKURADA, R. ARAKAWA and S. FUKUZUMI**, "Oxidation of benzyl alcohol with  $\text{Cu}^{\text{II}}$  and  $\text{Zn}^{\text{II}}$  complexes of the phenoxyl radical as a model of the reaction of galactose oxidase," *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **38**, 2774 (1999).

#### B-4) 招待講演

**T. KITAGAWA**, "Cooling Behavior of the Fe-histidine Bond of Heme Heated by Photodissociation of Carbonmonoxy Myoglobin," Intrl. Conf. Time-Resolved Vibrational Spectroscopy, Tucson (Arizona), May 1999.

**T. KITAGAWA**, "Time-Resolved Resonance Raman Investigation of Fast Responses of the Heme Moiety upon Photodissociation of Carbonmonoxy Myoglobin," Intrl. Workshop on Efficient Energy Localization and Transduction in Life, Soft Matter and New Artificial Materials, Los Alamos (New Mexico), June 1999.

**T. KITAGAWA**, "Time-Resolved Resonance Raman Study on Terminal Oxidases," Bioenergetic Mechanisms in Multi-center Redox Enzymes, Heraklion (Crete), June 1999.

**T. KITAGAWA**, "Cooling Dynamics of CO-photodissociated Myoglobin," Telluride Workshop on Protein Dynamics Telluride, Colorado, July 1999.

**T. KITAGAWA**, "Vibrational Relaxation of Electronically Excited Metalloporphyrin in Protein Matrix and Organic Solvents Probed by Pico-second Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy," 19th Intl. Conf. Photochemistry, Duke Univ., Durham (North Carolina), August 1999.

**T. KITAGAWA**, "Structures of Heme-Oxygen Intermediates of Terminal Oxidases: Comparison between Bovine Cytochrome *c* Oxidase and *E. Coli* Cytochrome bo," 4th Workshop on Molecular Biometallics, November 1999.

**Y. MIZUTANI**, "Fast Protein Dynamics Probed by Vibrational Spectroscopy," The 24th Taniguchi International Symposium on "Old and New Views of Protein Folding," Chiba (Japan), March 1999.

**Y. MIZUTANI**, "A Role of Solvent in Vibrational Energy Relaxation of Metalloporphyrins," 26th International Conference on Solution Chemistry, Fukuoka (Japan), July 1999.

**Y. MIZUTANI**, "Fast Protein Dynamics Probed by Time-resolved Raman Spectroscopy: Ultrafast Dynamics of Myoglobin Triggered by CO Photolysis," Symposium on "Protein Dynamics Studied by Advanced Spectroscopic Methods," Kobe (Japan), November 1999.

北川禎三, 「時間分解共鳴ラマン分光法によるヘム蛋白及び金属ポルフィリンの振動緩和の研究」, 分子構造総合討論会, 大阪.

北川禎三, 「立体構造ダイナミックスを測定する」, 第 14 回「大学と科学」公開シンポジウム, 生物の働きを生み出すタンパク質のかたち, 神戸.

北川禎三, 「呼吸酵素の構造と機能」, 第 17 回物性物理化学研究会「物性物理化学の基礎と創薬の道のり」, 京都.

北川禎三, 「時間分解共鳴ラマン分光法によるチトクロム c 酸化酵素の反応機構の解明」, 構造生物学国際シンポジウム, 大阪.

水谷泰久, 「ヘム蛋白質における高速現象」, 分子研研究会「分子及び分子小集団の超高速動力学」, 岡崎.

水谷泰久, 「液相の時間分解振動分光 - 光化学反応とそれに伴う緩和過程を中心に - 」, 第 39 回分子科学夏の学校(講師), 山梨.

#### B-5) 受賞、表彰

北川禎三, 日本化学会学術賞(1988).

小倉尚志, 日本化学会進歩賞(1993).

水谷泰久, 井上研究奨励賞(1995).

廣田 俊, 井上研究奨励賞(1996).

富田 毅, 総研大長倉賞(1997).

富田 毅, 井上研究奨励賞(1998).

#### B-6) 学会および社会的活動

##### 学協会役員、委員

IUPAC Associate Members of Commission on Biophysical Chemistry (1996.1-).

日本分光学会東海支部幹事(1986.4-1991.3).

日本分光学会評議員(1987-).

日本化学会東海支部代議員(1986-1988).

日本化学会東海支部幹事(1988-1990).

日本化学会化学展 92 企画委員会副委員長(1991).

日本化学会賞推薦委員(1994).

日本化学会学会賞選考委員(1998), 委員長(1999).

日本生化学会評議員.

日本化学会東海支部副支部長(1999).

##### 学会の組織委員

International Conference on Raman Spectroscopy, International Steering Committee (1988-1994).

International Conference on Time Resolved Vibrational Spectroscopy, International Organizing Committees (1989-).

11th International Conferens on Photobiology, Symposium organizer (1992).

Vth Intrl. Conf. on Time-resolved Vibrational Spectroscopy(Tokyo), Local Organizing Committee (1991).

Symposium on Recent Developments in Vibrational Spectroscopy, International Chemical Congress of Pacific Basin Societes (one of organizers).

Co-organization: US-Japan Symposium on "Ligand Binding to Myoglobin and Hemoglobin" Rice University, Houston, March, 1-5 (1997).

Co-organization: US-Japan Symposium on "Proton Coupled Electron Transfer" Kona, Hawaii, Nov. 11-15 (1998).

#### 文部省、学術振興会等の役員等

文部省学術審議会科研費分科会理工系小委員会委員(1997-1998).

日本学術会議化学研究連絡委員会委員(1997-).

文部省学術審議会専門委員会科研費審査委員(1991-1993, 1995-).

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員(1992-1993, 1994-1995, 1996-1997, 1998-1999).

日本学術振興会国際科学協力委員会委員(1998-).

日本学術振興会未来開拓事業委員会複合領域専門委員(1998-).

科学技術庁研究開発局評価委員(1994).

#### 学術雑誌編集委員

*Journal of Physical Chemistry*, Advisory Board (1993-1997).

*Chemical Physics*, Advisory Board (1993-).

*Journal of Molecular Liquids*, Editorial Board (1993-).

*Asian Journal of Physics*, Advisory Board (1991-).

*Biospectroscopy*, Editorial Board (1993-).

*Journal of Raman Spectroscopy*, Advisory Board (1995-).

*Journal of Biological Inorganic Chemistry*, Advisory Board (1995-1997).

*Journal of Biological Inorganic Chemistry*, Editorial Board (1999-).

#### 科学研究費の研究代表者、班長等

重点研究「生物無機」班長(1991-1993).

総合研究(B)班長(1994, 1995).

重点研究「生体金属分子科学」領域代表者(1996-1999).

#### B-7) 他大学での講義

大阪大学工学研究科, 応用化学, 精密化学専攻集中講義, 1999年4月.

大阪大学工学研究科応用物理学専攻特別講義, 1999年9月.

総合研究大学院大学光科学専攻講義, 1999年5月.

総合研究大学院大学機能分子, 構造分子科学専攻集中講義, 1999年12月.

#### C) 研究活動の課題と展望

- a) チトクロム酸化酵素における電子移動とプロトン輸送とのカップリング機構の解明
- b) 生体 NO の合成及び反応機構: 時間分解赤外分光
- c) 鉄ポルフィリン及びヘムタンパク質の光還元機構: ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光
- d) 光合成反応中心タンパク質のキノン B における電子移動/プロトン輸送のカップリング: 紫外共鳴ラマン分光
- e) タンパク質の速いダイナミクスとそれに対するアミノ酸置換の効果: 時間分解共鳴ラマン分光

- f) 生体における酸素活性化機構
- g) 金属ポルフィリン電子励起状態における振動緩和：ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光
- h) ナノ秒温度ジャンプ装置の制作とそれを用いた蛋白質フォールディング/アンフォールディングの追跡  
以上のテーマを中心に時間分解振動分光の手法をシャープに生かした研究を進めて行きたい。
- i) タンパク質の高感度赤外分光