

3-10 機構共通研究施設（分子科学研究所関連）

統合バイオサイエンスセンター

渡 辺 芳 人（教授）（相関分子科学第一研究部門兼務）＊）

A-1) 専門領域：生物有機化学、生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) 高原子価状態にあるヘム酵素および鉄ポルフィリン錯体による基質酸化の分子機構
- b) 人工ヘム酵素の分子設計
- c) 非ヘム酸化酵素のモデル系構築および不安定酸化活性種のキャラクタリゼーション
- d) 水溶液中での金属－ハイドライド錯体の合成と基質還元反応の開拓

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 酸化反応に関与するヘム酵素であるペルオキシダーゼ、カタラーゼやシトクロームP-450は、compound Iと呼ばれる酸化活性種を用いて様々な酸化反応を行っている。本研究では、酸素の運搬・貯蔵機能を機能とするミオグロビンの蛋白質骨格を利用して、compound Iを作成し、様々な基質酸化の素過程を研究している。今年度は、スルフィドに対する酸素添加過程で不斉選択性がどのような理由で進行するのか検討を行った。特に、酸化反応における遷移状態の構造と類似するアミン類の不斉選択的なヘムへの結合過程の研究によって、上記酸素添加過程における不斉認識機構を初めて明らかにした。
- b) カタラーゼによる過酸化水素の水と酸素への分解は、生体系を活性酸素種から防御するための重要な反応である。カタラーゼでは活性種であるcompound Iの生成速度と過酸化水素の分解反応速度がほぼ同じであることと、その速度が非常に速い($1 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)のために、分子レベルでの機構解明がほとんど行われていなかった。そこで、ミオグロビンのcompound Iを用いることによって素過程の詳細な検討を行い、過酸化水素の分解にはイオン反応とラジカル反応の二つが存在し、前者の過程は一般酸塩基触媒であるヒスチジンの関与が必須であることを明らかにした。
- c) ヘム酵素と同じ機能をヘム以外の鉄や銅錯体を利用して行う酵素を非ヘム酵素と呼ぶ。本研究では、非ヘム酵素の活性中心モデルの構築を行い、酸素分子活性化機構解明を目的とした研究を行っている。今年度は、水酸基を軸配位子として有することが推定されている単核非ヘム鉄酵素であるリポキシゲナーゼのモデルとして、水酸基を有するモデル錯体の合成を行い、水酸基の詳細なキャラクタリゼーションに成功した。さらに、二核鉄ビスオキソ中間体から過炭酸が生成することを見出した。
- d) 水溶液中で種々の化学反応を触媒的に進行させることは、環境調和型のプロセスとして重要と考えられる。本研究では、水溶液中で安定な金属－ハイドライド錯体の合成と、有機化合物のハイドライド還元への展開を目指した研究を行っている。今年度は、硝酸還元酵素の機能モデル錯体を合成し、硝酸還元酵素と同じ様な反応経路によって硝酸を還元することに成功した。さらに、反応中間体の結晶化による構造決定にも成功し、詳細な反応機構を解明した。

B-1) 学術論文

- A. WADA, S. OGO, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, Y. WATANABE, K. JITSUKAWA and H. MASUDA**, “Reactivity of Hydrogen peroxide Bound to a Mononuclear Non-Heme iron Site,” *Inorg. Chem.* **41**, 616–618 (2002).
- K. HASHIMOTO, S. NAGATOMO, S. FUJINAMI, H. FURUTACHI, S. OGO, M. SUZUKI, A. UEHARA, Y. MAEDA, Y. WATANABE and T. KITAGAWA**, “A New Mononuclear Iron(III) Complex Containing a Peroxocarbonate Ligand,” *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 1201–1205 (2002).
- S. OGO, H. NAKAI and Y. WATANABE**, “pH-Dependent H₂-Activation Cycle to Reduction of Nitrate Ion by Metal Complexes,” *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 597–601 (2002).
- S. OGO, T. ABURA and Y. WATANABE**, “pH-Dependent Transfer Hydrogenation of Ketones with HCOONa as a Hydrogen Donor Promoted by (η^6 -C₆Me₆)Ru Complexes,” *Organometallics* **21**, 2964–2969 (2002).
- S. KATO, H. YANG, T. UENO, S. OZAKI, G. N. PHILLIPS, JR., S. FUKUZUMI and Y. WATANABE**, “Asymmetric Sulfoxidation and Amine Binding by H64D/V68A and H64D/V68S Mb: Mechanistic Insight into the Chiral Discrimination Step,” *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8506–8507 (2002).
- H. NAKAI, S. OGO and Y. WATANABE**, “pH-Dependent Cross-Coupling Reactions of Water-Soluble Organic Halides with Organoboron Compounds Catalyzed by the Organometallic Aqua Complex [(SCS)Pd^{II}(H₂O)]⁺ (SCS = C₆H₃-2,6-(CH₂SBut)₂),” *Organometallics* **21**, 1674–1678 (2002).
- S. OGO, R. YAMAHARA, M. ROACH, T. SUENOBU, M. AKI, T. OGURA, T. KITAGAWA, H. MASUDA, S. FUKUZUMI and Y. WATANABE**, “Structural and Spectroscopic Features of a *cis* (Hydroxo)-Fe^{III}-(Carboxylato) Configuration as an Active Site Model for Lipoxygenases,” *Inorg. Chem.* **41**, 5513–5530 (2002).

B-3) 総説、著書

- Y. WATANABE**, “Rational Molecular Design of a Catalytic Site: Engineering of Catalytic Functions to the Myoglobin Active Site Framework,” *Ind. J. Chem.* **41**, 86–87 (2002).
- Y. WATANABE**, “Constriction of Heme Enzymes: Four Approaches,” *Curr. Opin. Chem. Biol.* 208–216 (2002).
- R. YAMAHARA, S. OGO, H. MASUDA and Y. WATANABE**, “(Catecholata)iron(III) Complexes: Structural and Functional Models for the Catechol-Bound iron(III) Form of Catechol Dioxygenase,” *J. Inorg. Biochem.* **88**, 284–294 (2002).

B-4) 招待講演

- Y. WATANABE**, “Molecular Design of Peroxide-Dependent Monooxygenase (Peroxigenase) by Utilizing a Framework of Myoglobin,” Activation of Dioxygen and Homogeneous catalytic oxidation (ADHOC 2002), Emory (USA), 2002年6月.
- Y. WATANABE**, “Molecular Design of Peroxide-Dependent Monooxygenase,” Second International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Kyoto (Japan), 2000年6月.
- Y. WATANABE**, “Introduction of P450, Peroxidase, and catalase Activities into Myoglobin by Site Directed Mutagenesis,” 2002年分子研COEコンファレンス, 岡崎, 2000年11月.
- 渡辺芳人**, 「Introduction of P450, Peroxidase, and Catalase Activities into Myoglobin by Site-Directed Mutagenesis」, ポルフィリンミニシンポジウム, 福岡, 2002年11月.
- 渡辺芳人**, 「BiomimeticからCreationへ」, 日本化学会第82秋季年会, 大阪, 2002年9月.

B-5) 受賞、表彰

渡辺芳人, 日本化学会学術賞 (2000).

B-6) 学会および社会的活動

学協会役員、委員

触媒学会生体関連触媒研究会幹事 (1988-).

基礎生物工学会幹事 (1994-).

日本化学会生体機能関連化学部会幹事 (1997-).

日本化学会東海支部常任幹事 (1999-2000).

日本化学会将来構想委員会 (2001-).

日本化学会学術情報部門会議 (2002-).

学会の組織委員

第二回International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines組織委員 (2000-).

文部科学省、学術振興会等の役員等

日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員(1999-2000).

学会誌編集委員

Journal of Inorganic Biochemistry, Editorial Board (1997-).

European Journal of Inorganic Chemistry, International Advisory Board (2000-).

Journal of Biological Inorganic Chemistry, Editorial Board (2001-).

B-7) 他大学での講義、客員

富山大学工学部, 「生物無機化学」, 2002年1月31-2月1日.

名古屋工業大学工学部, 「生物無機化学」, 2002年12月16-17日.

C) 研究活動の課題と展望

酸化反応を触媒するヘム酵素の反応機構に関する基礎研究から, 活性中心を構成するアミノ酸の役割を分子レベルで明らかとしてきた。こうした研究成果に基づいて, 人工的なヘム酵素の構築を現在目指している。具体的には, ミオグロビンを人工酵素構築のためのビルディングブロックとして利用し, 酵素活性発現に必要なアミノ酸を適切に配置することによって, 目的とするヘム酵素を合成する試みを行っている。現時点では, 高い光学選択性を有する一原子酸素添加酵素の構築に成功しているが, 反応の多様性, 非天然型補欠分子族導入による生体系にはない化学反応を触媒する人工酵素への展開も進めており, 金属-シッフ塩基錯体(Fe, Mn, Cr)をミオグロビンのヘムと置換した人工金属蛋白質の結晶構造の解析にも成功している。こうした研究から, 蛋白質内空間が化学反応を行うナノスケール反応場として利用可能であることが分かってきている。現在, 8ナノメートル程度の空間を提供するフェリチンなどの蛋白質への金属クラスターの導入による機能化などの研究へと進めている。

※)2002年4月1日名古屋大学大学院理学研究科教授

木 下 一 彦 (教授) (相関分子科学第一研究部門兼務)

A-1) 専門領域：生物物理学

A-2) 研究課題：

a) 一分子生理学の立ち上げ: 一個の分子機械の機能と構造変化の直接観察

B-4) 招待講演

木下一彦, 「体の中にくるくる回るモーターがある」, JST第6回基礎研究報告会, 東京, 2002年2月.

K. KINOSITA, Jr., “How an ATP-driven molecular machine may work: Clues from single-molecule physiology,” 46th Annual Meeting of the Biophysical Society, San Francisco (U. S. A.), February 2002.

木下一彦, “Single-Molecule Physiology: How Molecular Machines May Work,” Okazaki Lectures (Asian Winter School), 岡崎, 2002年3月.

K. KINOSITA, Jr., “Rotary mechanism of F_1 -ATPase,” Gordon Research Conference: Muscle: Contractile Proteins, New London (U. S. A.), June 2002.

K. KINOSITA, Jr., “Single-molecule physiology under an optical microscope: How molecular machines may work,” The Heraeus-Seminar 282 Bad Honnef 2002, Physikzentrum Bad Honnef (Germany), June 2002.

木下一彦, 「 F_1 -ATPaseのステップ回転: ATP駆動の分子機械の働く仕組み」, 第29回生体分子化学討論会, 岡崎, 2002年7月.

木下一彦, 「一分子の生理学」, 第20回麻酔メカニズム研究会, 大阪, 2002年7月.

K. KINOSITA, Jr., “Single-molecule physiology under an optical microscope: How molecular machines may work,” Society for Developmental Biology 61st Annual Meeting, Wisconsin (U. S. A.), July 2002.

K. KINOSITA, Jr., “Single-molecule physiology under an optical microscope: How molecular machines may work,” 293th Wilhelm und Else Heraeus Seminar, Marburg (Germany), September 2002.

木下一彦, 「一分子生理学: 分子機械の働く仕組み」, 第75回日本生化学会大会, 京都, 2002年10月.

木下一彦, “Single-molecule physiology under an optical microscope: How molecular machines may work,” 2002年分子研COEコンファレンス, 岡崎, 2002年11月.

木下一彦, “Chemo-mechanical coupling in a rotary molecular motor revealed by single-molecule physiology,” 北海道大学電子科学研究所十周年記念シンポジウム, 札幌, 2002年12月.

B-6) 学会および社会的活動

学会の組織委員

日本細胞生物学会評議委員 (1999-).

AAAS (American Association for the Advancement of Science) Fellow (2001-).

文部科学省、学術振興会等の役員等

日本学術会議生物物理学研連委員.

B-7) 他大学での講義、客員

慶應義塾大学理工学部, 客員教授, 「生物物理学」, 2001年4月 -.

東京大学医学部, 非常勤講師, 2001年4月 -.

早稲田大学理工学部, 客員非常勤講師「総合生命理工学特論」, 2001年9月 -.

京都大学大学院薬学研究科, 講師, 2002年4月 -.

C) 研究活動の課題と展望

分子モーターの働きを説明する理論的モデルの構築を試みる予定である。

青 野 重 利（教授）（関連分子科学第一研究部門兼務）＊）

A-1) 専門領域：生物無機化学

A-2) 研究課題：

- a) 一酸化炭素センサータンパク質 CooA の構造と機能に関する研究
- b) 酸素センサータンパク質 HemAT の構造と機能に関する研究

A-3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 紅色非硫黄光合成細菌中に含まれる転写調節因子CooAは、一酸化炭素代謝反応に関与する酵素系の発現を転写レベルにおいて制御している。CooAは一酸化炭素を生理的なエフェクターとして利用しており、一酸化炭素存在下においてのみ、転写活性化因子としての活性を獲得する。CooAは、一酸化炭素センサー部位として、プロトヘムを有しており、ヘムに一酸化炭素が結合することにより活性化される。このような特異な性質を有するCooAの構造活性相関を解明することを目的とし、CooAの大量発現系の構築、精製したCooAの活性中心の構造、反応機構を遺伝子工学的手法および物理化学的手法を用いて明らかにした。
- b) 枯草菌中に含まれるHemATは、本細菌の酸素に対する走化性制御系において酸素センサーとして機能するシグナルトランスデューサータンパク質である。本研究では、大腸菌におけるHemAT大量発現系の構築に成功した。また、各種分光学的測定により、HemAT中に含まれるヘムの諸性質を明らかにした。

B-1) 学術論文

S. AONO, T. KATO, M. MATSUKI, H. NAKAJIMA, T. OHTA, T. UCHIDA and T. KITAGAWA, “Resonance Raman and Ligand Binding Studies of the Oxygen Sensing Signal Transducer Protein HemAT from *Bacillus subtilis*,” *J. Biol. Chem.* **277**, 13528–13538 (2002).

B-3) 総説、著書

青野重利, 「ヘムを活性中心とするセンサータンパク質の構造と機能」, *生物物理* **42**, 230–235 (2002).

青野重利, 「微生物におけるCOの受容システム」, *医学のあゆみ* **201**, 733–736 (2002).

青野重利, 「一酸化炭素による遺伝子発現制御——COセンサーとして機能する転写調節因子CooAの構造と機能」, *化学と生物* **40**, 206–210 (2002).

B-4) 招待講演

S. AONO, “Signal transduction and gene regulation by hemeproteins that sense gas molecules,” 2nd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP2), Kyoto (Japan), July 2002.

B-6) 学会および社会的活動

学会誌編集委員

J. Biol. Inorg. Chem., Editorial Advisory Board (2002-).

C) 研究活動の課題と展望

これまでの研究において、一酸化炭素、酸素などの気体分子が生理的なエフェクター分子として機能するセンサータンパク質が、ヘムを活性中心として含む、これまでに例のない新規なヘムタンパク質であることを明らかにしてきた。今後は、これらのヘム含有型センサータンパク質の構造・活性相関の解明を目指して研究を進めたい。

＊)2002年5月1日着任

藤 井 浩（助教授）（分子スケールナノサイエンスセンター兼務）

A-1) 専門領域：生物無機化学、物理化学

A-2) 研究課題：

- a) 酸化反応に関与する金属酵素反応中間体モデルの合成
- b) 磁気共鳴法による金属酵素の小分子活性化機構の研究
- c) ヘムオキシゲナーゼの酸素活性化機構の研究
- d) アミノ酸の位置特異的ミューテーションによる酵素機能変換

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 生体内には、活性中心に金属イオンをもつ金属酵素と呼ばれる一群のタンパク質が存在する。これらの中で酸化反応に関与する金属酵素は、その反応中に高酸化状態の反応中間体を生成する。この高酸化状態の反応中間体は、酵素反応を制御するキーとなる中間体であるが、不安定なため詳細が明らかでない。酸化反応に関わる金属酵素の機能制御機構を解明するため、それらのモデル錯体の合成を行った。メシチル基をもつ新規サレン配位子を用いて鉄錯体を合成した結果、カテコールジオキシゲナーゼの活性中心と同じ構造を持つ錯体を初めて合成することができた。その物性から、活性中心の構造と酵素反応の関わりを示すことができた。また、この錯体を低温下で酸化することにより、酵素反応中間体モデルを構築できた。
- b) 自然界にある窒素や酸素などの小分子は、金属酵素により活性化され、利用される。活性中心の金属イオンに配位した小分子は、配位する金属イオンの種類、配位子、構造によりその反応性を大きく変化させる。このような多様な反応性を支配する電子構造因子がなにかを解明するため、磁気共鳴法により研究を行っている。金属イオンやそれに配位した小分子を磁気共鳴法により直接観測して、電子構造と反応性の関わりを解明することを試みている。タンパク質由来の配位子の役割を解明するため、ヘムタンパク質に配位したシアニドイオンの¹³C-NMRシグナルの検出を試みた。その結果、非常に大きく高磁場シフトした領域にシグナルの検出に成功した。さらにこのシグナルの化学シフトと構造との相関を調べたところ、ヘムに配位する軸配位子の状態を知るプローブとなることがわかった。
- c) 金属酵素が作る反応場の特色と機能との関わりを解明するため、ヘムオキシゲナーゼを題材にして研究を行っている。ヘムオキシゲナーゼは、肝臓、脾臓、脳などに多く存在し、ヘムを代謝する酵素である。肝臓、脾臓の本酵素は、胆汁色素合成に関与し、脳に存在する本酵素は情報伝達に関与していると考えられている。本酵素の研究は、これら臓器から単離される酵素量が少なく、その構造、反応など不明な点を多く残している。最近、本酵素は大腸菌により大量発現することができるようになり、種々の物理化学的測定が可能になった。本研究では、大腸菌発現の可溶性酵素と化学的に合成したヘム代謝中間体を用いて本酵素による酸素の活性化およびヘムの代謝機構の研究を行っている。本酵素の酸素活性化中間体である過酸化水素付加体の構造をENDORにより研究した。その結果、反応に関与する第2のプロトンが存在することがわかった。
- d) 我々多くの動物は、生命エネルギー合成に酸素を利用しているが、酸素の乏しいところで生育する菌類やバクテリアなどは窒素をエネルギー合成に利用している。これらの菌類やバクテリアは、酸素の代わりに硝酸イオンを電子受容体として利用している。硝酸イオンは、菌体内のさまざまな金属酵素により亜硝酸イオン、一酸化窒素、亜酸化窒素と還元されて、最終的に窒素になる。これらの菌類は、この反応過程で環境破壊につながる窒素酸化物を分解す

るため、環境保全の面で最近大きな注目を集めている。我々は、これら一連の酵素の中で、亜硝酸還元酵素に焦点をあて研究を行っている。菌体から本酵素を単離する研究は古くから行われているが、不明な点が多い。本研究では、本酵素の機能発現機構を解明する目的で、ミオグロビンという酸素貯蔵タンパク質をミューテーションにより亜硝酸還元酵素へ機能変換することを行っている。

B-1) 学術論文

R. DAVYDOV, V. KOFMAN, H. FUJII, T. YOSHIDA, M. IKEDA SAITO and B. M. HOFFMAN, “Catalytic Mechanism of Heme Oxygenase Through EPR and ENDOR of Cryoreduced Oxy-Heme Oxygenase and its Asp140 Mutants,” *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1798 (2002).

H. FUJII, “¹³C-NMR Signal Detection of Iron Bound Cyanide Ions in Ferric Cyanide Complexes of Heme Proteins,” *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5936 (2002).

H. FUJII and Y. FUNAHASHI, “Trigonal Bipyramidal Ferric Aqua Complex with Sterically Hindered Salen Ligand as a Model for Active Site of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase,” *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 3638 (2002).

B-3) 総説、著書

H. FUJII, “Electronic structure and reactivity of high-valent oxo iron porphyrins,” *Coord. Chem. Rev.* **226**, 51 (2002).

H. FUJII, “Oxygen activation mechanism of heme oxygenase,” *Chemical Industry* (in Japanese) **53**, 18 (2002).

B-4) 招待講演

H. FUJII, “Catalytic Mechanism of Heme Oxygenase: Role of Highly Conserved Aspartate for Oxygen Activation,” Second International Conference Of Porphyrins and Phthalocyanines, Kyoto (Japan), June 2002.

藤井 浩, 「ヘムオキシゲナーゼによる酸素分子の活性化機構とそれによるヘムの代謝」, 学術創成研究研究会, 岡崎, 2002年12月.

C) 研究活動の課題と展望

これまで生体内の金属酵素の構造と機能の関わりを、酵素反応中間体の電子構造から研究してきた。金属酵素の機能をより深く理解するためには、反応中間体の電子状態だけでなく、それを取り囲むタンパク質の反応場の機能を解明することも重要であると考え。これまでの基礎研究で取得した知見や手法を活用し、酵素タンパクのつくる反応場の特質と反応性の関係を解明していきたいと考える。さらにこれらの研究成果を基礎に、遺伝子組み替えによるアミノ酸置換の手法を用いて、金属酵素の機能変換および新規金属酵素の開発を行いたい。

北 川 禎 三（教授）（分子動力学研究部門兼務）

A-1) 専門領域：振動分光学，生物物理化学

A-2) 研究課題：

- a) 蛋白質の超高速ダイナミクス
- 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) 生体系における酸素活性化機構
- d) 金属ポルフィリン励起状態の振動緩和及び構造緩和
- 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
- i) センサーヘム蛋白質のセンシング及び情報伝達機構
- j) DNAフォトリアーゼのDNA修復機構の解明
- k) β_2 ミクログロブリンのアミロイド形成機構の解明

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) ピコ秒時間分解ラマンによるタンパク質超高速ダイナミクス：ミオグロビンCO付加体の光解離・再結合過程をピコ秒可視ラマン分光で追跡した。The Chemical Records 第1巻にそのまとめ論文が掲載されている。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。1997年には，水谷助手（現神戸大助教授）のミオグロビンのヘム冷却過程の研究結果が雑誌Scienceに掲載された。水谷博士はその一連の研究が評価されて森野研究奨励賞を受賞した。光合成反応中心タンパク等も取り扱っている。これからは，センサー蛋白の情報伝達機構の解明に研究を展開する予定である。
- 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) 生体系における酸素活性化機構： $O_2 \rightarrow H_2O$ を触媒するチトクロム酸化酵素， $O_2 \rightarrow H_2O + SO$ を触媒するチトクロムP-450， $H_2O_2 \rightarrow H_2O$ 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 $Fe^{IV}=O$ 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（現東大助教授）のチトクロム酸化酵素による O_2 還元機構の研究は1993年の化学会進歩賞受賞の榮譽に輝いた。その研究成果が「分子細胞生物学」第4版（H. Lodish 著，野田春彦訳，東京化学同人）のような教科書に掲載されるにいたっている。また総研大生でこの仕事をしていた廣田君（現京都薬大助教授）は井上賞を受賞した。

- d) 金属ポルフィリン励起状態のダイナミクス：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、BCSJ の Account 論文として掲載されるにいたっている。
- 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を用いたスキャンニング・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、高分子量蛋白質の高分解能紫外共鳴ラマンスペクトル測定装置の製作。
- 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君（現東北大助手）は1997年度の総研大長倉賞、及び1998年度井上賞を受賞した。CO結合体に2種の分子形があり、YC-1のようなエフェクターを入れると分子形は1種類になることがわかった。昆虫細胞を用いて本酵素を大量発現させ、その共鳴ラマンスペクトルを調べる方向に研究を展開中。
- 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。高速ミキシングセルを用い、アポミオグロビンのマイクロ秒域のフォルディング中間体を紫外共鳴ラマンで検出する事に初めて成功した。
- i) 環境因子としてCO, NO, O₂等の2原子分子を特異的に検出し、合目的の生理的応答をつくり出すセンサー蛋白質のうちでヘムをもつものに対象を絞り、各蛋白質が2原子分子を識別するメカニズム、検出後にそれを機能発生部位に伝達するメカニズムを時分割紫外共鳴ラマン分光法を用いて明らかにする。
- j) DNAの損傷を受けた部分を光の作用で修復する酵素を大腸菌でクローニングし、それを大量発現する。その蛋白に補酵素であるFADやMTHFを結合させた時の蛋白の構造変化を紫外共鳴ラマン法で検出すると共に、その蛋白が損傷を受けたDNAと相互作用する様子を調べる。更にそこへ青色光を照射してDNAが修復される途中の構造を検出して、そのメカニズムを明らかにしていく。
- k) 免疫蛋白の抗原結合部位に相当する β_2 ミクログロブリンは透析治療を長く続けた患者の血液中に集積され、突然アミロイド線維を形成する。そのアミロイド線維の顕微偏光赤外スペクトルを測定して、線維中の蛋白分子の構造を論じる。また、紫外共鳴ラマン分光法によりこの分子のモノマーとフィブリル状態の構造の違いを明らかにする。

B-1) 学術論文

K. SATO, S. NAGATOMO, C. DENNISON, T. NIIZKI, T. KITAGAWA and T. KOHZUMA, “UV Resonance Raman and NMR Spectroscopic Studies on the pH Dependent Metal Ion Release from Pseudoazurin,” *Inorg. Chim. Acta* **339**, 383 (2002).

- T. OSAKO, S. NAGATOMO, Y. TACHI, T. KITAGAWA and S. ITOH**, “Low-Temperature Stopped-Flow Studies on the Reactions of Copper(II) Complexes and H_2O_2 : The First Detection of a Mononuclear Copper(II)-Peroxo Intermediate,” *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 4325 (2002).
- S. OGO, R. YAMAHARA, M. ROACH, T. SUENOBU, M. AKI, T. OGURA, T. KITAGAWA, H. MASUDA, S. FUKUZUMI and Y. WATANABE**, “Structural and Spectroscopic Features of a *cis*(hydroxo)- Fe^{III} -(carboxylato) Configuration as an Active Site Model for Lipoxygenases,” *Inorg. Chem.* **41**, 5513 (2002).
- Y. MIZUTANI and T. KITAGAWA**, “Vibrational Energy Relaxation of Metalloporphyrins in a Condensed Phase Probed by Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **4**, 623 (2002).
- A. WADA, S. OGO, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, Y. WATANABE, K. JITSUKAWA and H. MASUDA**, “Reactivity of Hydroperoxide Bound to a Mononuclear Non-Heme Iron Site,” *Inorg. Chem.* **41**, 616 (2002).
- S. AONO, T. KATO, M. MATSUKI, H. NAKAJIMA, T. OHTA, T. UCHIDA and T. KITAGAWA**, “Resonance Raman and Ligand Binding Studies of the Oxygen-Sensing Signal Transducer Protein HemAT from *Bacillus Subtilis*,” *J. Biol. Chem.* **277**, 13528 (2002).
- M. AKI, T. OGURA, Y. NARUTA, T. H. LE, T. SATO and T. KITAGAWA**, “UV Resonance Raman Characterization of Model Compounds of Tyr244 of Bovine Cytochrome *c* Oxidase in Its Neutral, Deprotonated Anionic, and Deprotonated Neutral Radical Forms: Effects of Covalent Binding between Tyrosine and Histidine,” *J. Phys. Chem. A* **106**, 3436 (2002).
- N. HARUTA and T. KITAGAWA**, “Time-Resolved UV Resonance Raman Investigation of Protein Folding Using a Rapid Mixer: Characterization of Kinetic Folding Intermediates of Apomyoglobin,” *Biochemistry* **41**, 6595 (2002).
- K. HASHIMOTO, S. NAGATOMO, S. FUJINAMI, H. FURUTACHI, S. OGO, S. SUZUKI, A. UEHARA, Y. MAEDA, Y. WATANABE and T. KITAGAWA**, “A New Mononuclear Iron(III) Complex Containing a Peroxocarbonate Ligand,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 1202 (2002).
- H. HAYASHI, K. UOZUMI, S. FUJINAMI, S. NAGATOMO, K. SHIREN, H. FURUTACHI, M. SUZUKI, A. UEHARA and T. KITAGAWA**, “Modulation of the Copper-Dioxygen Reactivity by Stereochemical Effect of Tetradentate Tripodal Ligands,” *Chem. Lett.* 416 (2002).
- S. HIROTA, Y. MIZOGUCHI, O. YAMAUCHI and T. KITAGAWA**, “Observation of an Isotope-Sensitive Low-Frequency Raman Band Specific to Metmyoglobin,” *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**, 217 (2002).
- T. KITAGAWA, N. HARUTA and Y. MIZUTANI**, “Time-Resolved Resonance Raman Study on Ultrafast Structural Relaxation and Vibrational Cooling of Photodissociated Carbonmonoxy Myoglobin,” *Biopolymers* **67**, 207 (2002).
- Y. MIZUTANI and T. KITAGAWA**, “Mode Dependence of Vibrational Energy Redistribution in Nickel Tetraphenylporphyrin Probed by Picosecond Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy: Slow IVR to Phenyl Peripherals,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **75**, 965 (2002).
- S. NAGATOMO, Y. JIN, M. NAGAI, H. HORI and T. KITAGAWA**, “Changes in the Abnormal α -Subunit upon CO-Binding to the Normal β -Subunit of Hb M Boston: Resonance Raman, EPR and CD Study,” *Biophys. Chem.* **98**, 217 (2002).
- S. NAGATOMO, M. NAGAI, N. SHIBAYAMA and T. KITAGAWA**, “Differences in Changes of the $\alpha 1$ - $\beta 2$ Subunit Contacts between Ligand Binding to the α and β Subunits of Hemoglobin A: UV Resonance Raman Analysis Using Ni-Fe Hybrid Hemoglobin,” *Biochemistry* **41**, 10010 (2002).

A. SATO, Y. SASAKURA, S. SUGIYAMA, I. SAGAMI, T. SHIMIZU, Y. MIZUTANI and T. KITAGAWA, “Stationary and Time-Resolved Resonance Raman Spectra of His77 and Met95 Mutants of the Isolated Heme Domain of a Direct Oxygen Sensor from *E. coli*,” *J. Biol. Chem.* **277**, 32650 (2002).

M. TAKI, S. TERAMAE, S. NAGATOMO, Y. TACHI, T. KITAGAWA, S. ITHO and S. FUKUZUMI, “Fine-Tuning of Copper(I)-Dioxygen Reactivity by 2-(2-Pyridyl)ethylamine Bidentate Ligands,” *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6367 (2002).

B. VENKATESH, H. HORI, G. MIYAZAKI, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA and H. MORIMOTO, “Coordination Geometry of Cu-Porphyrin in Cu(II)–Fe(II) Hybrid Hemoglobins Studied by Q-Band EPR and Resonance Raman Spectroscopies,” *J. Inorg. Biochem.* **88**, 310 (2002).

B-4) 招待講演

Y. MIZUTANI and T. KITAGAWA, “Vibrational Energy Redistribution of Heme in Proteins Probed by Picosecond Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy,” XVIIIth Intl. Conf. on Raman Spectrosc., Budapest (Hungary), August 2002.

T. KITAGAWA, “Time-resolved Resonance Raman Study on Vibrational and Structural Relaxations of Carbonmonoxy Myoglobin,” 2002 COE Conf. IMS on ‘Dynamical Structures and Molecular Design of Metalloproteins,’ Okazaki, November 2002.

北川禎三, 「振動分光法をシャープに活かした生体分子科学研究を目指して」, 第81回日本化学会年会(受賞講演), 東京, 2002年3月.

北川禎三, 「蛋白質が働くメカニズムをレーザー光で解明する」, 分子科学フォーラム, 岡崎, 2002年6月.

北川禎三, 「レーザー分光法による蛋白質超高速ダイナミクス解明」, 第82回日本化学会秋季年会(依頼講演), 大阪, 2002年9月.

北川禎三, 「酸素分子センサー蛋白, HemATの情報感知機構」, 『未解明生物現象を司る鍵化学物質』(特定領域研究公開シンポジウム), 大阪, 2002年9月.

北川禎三, 「ヘム蛋白質の最近の研究展開:センサー蛋白の環境検出機構にせまる」, 第75回日本生化学会大会, パースペクティブレクチャー, 京都, 2002年10月.

北川禎三, 「溶液中での大きな分子の振動緩和とモード依存性」, 分子研研究会「複雑凝集系の分子科学」, 岡崎, 2002年11月.

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).

北川禎三, 日本分光学会賞(1996).

富田 毅, 総研大長倉賞(1997).

富田 毅, 井上研究奨励賞(1998).

水谷泰久, 森野研究奨励賞(2001).

北川禎三, 日本化学会賞(2002).

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).

日本化学会東海支部支部長 (2000).

中部化学連合討論会実行委員長 (2000).

日本化学会東海支部監査役 (2001-2002).

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 Intr1. Conf. on Time-resolved Vibrational Spectroscopy (Tokyo), Local Organizing Committee (1991).

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

Co-organization: Symposium in International Chemical Congress of Pacific Basin Societies “Raman Spectroscopy: Coming Age in the New Millennium” Hawaii, Dec 14-18 (2000).

Co-organization: 10th International Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy, Okazaki, May 21-25 (2001).

Organizer: 2002 IMS COE Conference “Dynamical Structures and Molecular Design of Metalloproteins”, Nov. 18-21 (2002).

文部科学省、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 (1997-1999).

文部省学術審議会専門委員会科研費審査委員 (1991-1993, 1995-1998, 2000-).

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, 2000-2001).

日本学術振興会国際科学協力委員会委員 (1998-2000).

日本学術振興会未来開拓事業委員会複合領域専門委員 (1998-2001).

科学技術庁研究開発局評価委員 (1994).

さきがけ研究専門員 (生体分子の形と機能:2000-, 光と制御:2003-).

大学評価 工学部評価専門委員 (2002-2003).

文部科学省21世紀教育・研究COE選考委員(化学・材料部門)(2002).

学会誌編集委員

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 (1999-2002).

Journal of Inorganic Biochemistry, Editorial Board (2001-).

科研費の班長、研究代表者等

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).

特定領域研究(A)「未解明鍵物質」班長 (2000-2002).

基盤研究(A)(2001-2002).

基盤研究(S)(2002).

特別推進研究 (2002-).

B-7) 他大学での講義

北川禎三, 名古屋大学工学部, 一般教養, 2002年12月.

C) 研究活動の課題と展望

- a) タンパク質高次構造の速いダイナミクスとそのセンサー蛋白質における重要性:時間分解共鳴ラマン分光
- b) 生体NOの合成及び反応機構:時間分解赤外分光
- c) 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
- d) 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
- e) 生体における酸素活性化機構
- f) ヘムを含むセンサー蛋白のセンシングと機能実行メカニズム
- g) 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
- h) タンパク質の高感度赤外分光: β_2 ミクログロブリンを材料とし, アミロイド化による配向フィブリルの偏光赤外測定により, 蛋白の2次構造を明らかにすると共にフィブリル化のきっかけをつくるものを探す。

- i) DNAフォトリアーゼによるDNA修復機構:大腸菌のフォトリアーゼをクローニングし,その蛋白を大腸菌で作らせて,紫外共鳴ラマンスペクトルを調べる。補酵素結合による蛋白の構造変化, DNAとの結合様式, 青色光照射による光修復機構の解明を目指す。

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。