

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成果が雑誌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栄誉に輝いた。その研究成果が「分子細胞生物学」第4版(H. Lodishら著、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 H₂O₂: 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 α 1- β 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の解明」, 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 Ⅱ「未解明鍵物質」班長 (2000-2002).

基盤研究 A Ⅱ (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

- 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
- 生体NOの合成及び反応機構:時間分解赤外分光
- 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
- 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
- 生体における酸素活性化機構
- ヘムを含むセンサー蛋白質のセンシングと機能実行メカニズム
- 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
- 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,蛋白質の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。