

### 3-11 岡崎共通研究施設（分子科学研究所関連）

#### 岡崎統合バイオサイエンスセンター

木 下 一 彦（教授）（関連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

A-3) 研究活動の概略と主な成果

a) たんぱく質ないしRNAでできた分子機械はたった一分子で見事な機能を発揮する。その仕掛けを探ることが我々の研究目標である。分子機械は確率的に働く（次の瞬間に何をするのかをサイコロを振って決める）ため、複数の分子機械の動きを同期させることができない。したがって、どうしても個々の分子機械の働く所を直接観察し、必要なら1個1個の分子機械を直接操作する必要がある。我々は、光学顕微鏡の下で「生きた」分子機械を相手に解析を続けている。主な成果として、回転分子モーターF<sub>1</sub>-ATPaseの回転が3ヶ所の活性部位におけるATP分解反応とどのように共役するかが分かりつつある。同モーターを磁気ピンセットで逆回転させることによりATPが合成されることを証明できた。すなわち、このモーターは可逆な化学-力学エネルギー変換機械であり、逆行は中央のローターサブユニットの回転角というたった一つのパラメーターを操作するだけで実現できることが分かった。

B-1) 学術論文

K. KINOSITA, Jr., K. ADCHI and H. ITOH, "Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase: How an ATP-Driven Molecular Machine May Work," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 245–268 (2004).

H. ITOH, A. TAKAHASHI, K. ADCHI, H. NOJI, R. YASUDA, M. YOSHIDA and K. KINOSITA, Jr., "Mechanically Driven ATP Synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase," *Nature* **427**, 465–468 (2004).

T. NISHIZAKA, K. OIWA, H. NOJI, S. KIMURA, E. MUNHEYUKI, M. YOSHIDA and K. KINOSITA, Jr., "Chemomechanical Coupling in F<sub>1</sub>-ATPase Revealed by Simultaneous Observation of Nucleotide Kinetics and Rotation," *Nature Struct. Mol. Bio.* **11**, 142–148 (2004).

M. YUSUF ALI, K. HOMMA, A. HIKIKOSHI IWANE, K. ADCHI, H. ITOH, K. KINOSITA, Jr., T. YANAGIDA and M. IKEBE, "Unconstrained Steps of Myosin VI Appear Longest among Known Molecular Motors," *Biophys. J.* **86**, 3804–3810 (2004).

B-4) 招待講演

木下一彦, 「F<sub>1</sub>-ATPaseの回転機構: ATP駆動のたんぱく質分子機械が働く仕組み」, 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 2003年12月.

木下一彦, 「How two-foot molecular motors may walk」, Symposium on Mysteries about the Sliding Filament Mechanism in Muscle Contraction: Fifty Years after its Proposal, 東京, 2004年3月.

木下一彦,「歩くモーター、回るモーター:揺らぎと化学反応、どちらが因でどちら」,JST・平成16年度「ソフトナノマシン」領域会議,名古屋,2004年10月.

木下一彦,「たんぱく質分子機械の仕掛けを光学顕微鏡で覗く」,第43回玉城嘉十郎教授記念公開学術講演会,京都,2004年10月.

木下一彦,「一分子生理学で化学-力学エネルギー変換の仕組みを探る」,日本顕微鏡学会第49回シンポジウム,名古屋,2004年11月.

木下一彦,「10年後の一分子生理学」,第42回日本生物物理学会年会,京都,2004年12月.

**K. KINOSITA, Jr.**, “Single-Molecule Physiology of Protein Machines,” Nano-science and technology: Frontiers and opportunities, Taichung (Taiwan), December 2003.

**K. KINOSITA, Jr.**, “Mechano-chemical coupling in  $F_1$ -ATPase,” NCBS Symposium on “Molecules, Machines and Networks,” Bangalore (India), January 2004.

**K. KINOSITA, Jr.**, “How an ATPase driven molecular machine works,” 39th Winter Seminar Biophysical Chemistry, Molecular Biology and Cybernetics of Cell Functions, Klosters (Switzerland), January 2004.

**K. KINOSITA, Jr.**, “Mechano-Chemical Coupling in  $F_1$ -ATPase,” Symposium “Life Sciences on the Nanometer Scale-Physics Meets Biology,” Regensburg (Germany), March 2004.

**K. KINOSITA, Jr.**, “Single-Molecule Physiology on Linear and Rotary Motors,” Wilhelm und Else Heraeus-Stiftung 322. WE-Heraeus-Seminar, Physikzentrum Bad Honnef (Germany), April 2004.

**K. KINOSITA, Jr.**, “ $F_1$ -ATPase: a rotary motor-generator,” ELSO 2004 Meeting, Nice (France), September 2004.

**K. KINOSITA, Jr.**, “Single-molecule Experiments on the Rotary Motor  $F_1$ -ATPase,” The annual ALW/FOM/VvBF&BT meeting, Werelt (The Netherlands), September 2004.

#### B-7) 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.

##### 科学研究費の研究代表者、班長等

特定領域研究「生物分子モーターの1分子計測と1分子操作」 研究代表者 (1997-2000).

特別推進研究「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」 研究代表者 (2000-2004).

特別推進研究「一分子生理学による生体分子機械の動作機構の解明」 研究代表者 (2004- ).

#### B-8) 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- .

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- .

#### B-10)外部獲得資金

特定領域研究,「生物分子モーターの1分子計測と1分子操作」,木下一彦 (1997年-2000年).

戦略的基礎研究(CREST),「一方向性反応のプログラミング基盤」,木下一彦 (1996年-2001年).

特別推進研究,「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」,木下一彦 (2000年-2004年).

特別推進研究,「一分子生理学による生体分子機械の動作機構の解明」,木下一彦 (2004年-).

#### C) 研究活動の課題と展望

分子モーターの動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 ) ( 相関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
- c) 新規な気体分子センサータンパク質の単離とその性質の解明

A-3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 一酸化炭素を生理的なエフェクターとする転写調節因子 CooA は、これまで、紅色非硫黄光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* 由来のもの (Rr-CooA) しか報告されていなかった。我々は、好熱性一酸化炭素酸化細菌 *Carboxydothemus hydrogenoformans* 中に、Rr-CooA のホモログタンパク質 (Ch-CooA) が存在していることを明らかにし、Ch-CooA の構造と機能の解明を行った。Ch-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検討した結果、Ch-CooA 中に含まれるヘムは Rr-CooA の場合とは異なった配位構造を有していること、Ch-CooA の酸化還元電位は Rr-CooA に比べ 500 mV 以上も正にシフトしていることが明かとなった。現在は、これら性質の違いがどのような生理的意義を有しているかについて検討を行っている。
- 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。本年度は、共鳴ラマンスペクトル法を用い、HemAT による酸素センシング機構の解明を行った。その結果、HemAT 中のヘムに酸素分子が結合した酸素化型 HemAT では、ヘムポケットに存在する 70 番目のチロシン、ならびに 95 番目のトレオニンと酸素分子との間で異なった相互作用を示す 3 種のコンフォーマーが存在することが明かとなった。また、95 番目のトレオニンは酸素分子の選択的センシングに、70 番目のチロシンは酸素分子をセンシングした後のシグナル伝達に関与していると考えられる。さらに、HemAT が関与するシグナル伝達機構の解明を目的として、HemAT、ならびに HemAT からシグナルを受容するシグナル伝達タンパク質である CheA および CheW タンパク質から構成される *in vitro* 活性測定系の構築も試みている。
- c) 新規なセンサータンパク質として、硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* 中に含まれる DcrA タンパク質を対象とした研究を行っている。DcrA は、HemAT と同様、走化性制御系におけるシグナルトランスデューサータンパク質であるが、現在のところ、どのような外部シグナルをセンシングしているかは不明である。本年度は、膜タンパク質である DcrA のペリプラズムドメイン (DcrA-N) のみを発現させ、得られた DcrA-N の諸性質の解明を行った。その結果、DcrA-N はタンパク質部分と共有結合した c 型ヘムを含む、新規なヘムタンパク質であることが分かった。これまでに報告されているヘム含有型センサータンパク質はすべて、b 型ヘムをセンサーの活性中心として有しており、μ 型ヘムを活性中心とするセンサータンパク質は DcrA が初めての例である。DcrA-N 中に含まれるヘムは、酸化型では第 6 配位子として水分子が配位した 6 配位高スピン構造をとる。ところがヘム鉄が還元された還元型 DcrA-N では、2 つのアミノ酸残基が配位した 6 配位低スピン型となる。また、還元型 DcrA-N は配位飽和な状態にあるにも関わらず、CO と容易に反応し、CO 結合型を生成することが分かった。

#### B-1) 学術論文

**S. AKIYAMA, T. FUJISAWA, K. ISHIMORI, I. MORISHIMA and S. AONO**, “Activation Mechanisms of Transcriptinal Regulator CooA Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering,” *J. Mol. Biol.* **42**, 5133–5142 (2004).

**T. OHTA, H. YOSHIMURA, S. YOSHIOKA, S. AONO and T. KITAGAWA**, “Oxygen Sensing Mechanism of HemAT from *B. subtilis*: A Resonance Raman Spectroscopic Study,” *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15000–15001 (2004).

#### B-3) 総説、著書

**S. AONO, H. NAKAJIMA, T. OHTA and T. KITAGAWA**, “Resonance Raman and ligand binding analysis of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT from *Bacillus subtilis*,” *Methods in Enzymology*, **381**, 618–628 (2003).

#### B-4) 招待講演

**S. AONO**, “Biochemical and biophysical properties of the CO-sensor protein CooA,” The 1<sup>st</sup> Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, April 2004.

**S. AONO**, “Structure and function relationships of the heme-based sensor proteins,” 2<sup>nd</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-II), Goa (India), December 2004.

青野重利, 「気体分子センサーとして機能するヘムタンパク質の構造と機能」, 日本生物物理学会第42回年会, 京都, 2004年12月.

#### B-7) 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- ).

#### B-10) 外部獲得資金

奨励研究(A), 「アンモニア酸化反応に関与する新規な金属酵素中の活性点構造とその性質に関する研究」, 青野重利 (1995年).

重点領域研究(A), 「特殊反応場触媒」, 「金属蛋白質中に含まれる遷移金属クラスターの生体特殊反応場による機能制御」, 青野重利 (1995年-1996年).

重点領域研究(A), 「天然超分子」, 「DNA認識能を有する蛋白質超分子機能の金属イオンによる制御機構に関する研究」, 青野重利 (1995年-1996年).

チバ・ガイギー科学振興財団 研究奨励金, 「一酸化炭素による遺伝子発現の制御: COセンサーとして機能するヘムを含む新規なDNA結合転写調節蛋白質の構造と機能に関する研究」, 青野重利 (1996年).

特定領域研究(A), 「生体金属分子科学」, 「遷移金属含有型転写調節因子による遺伝子発現調節機構に関する研究」, 青野重利 (1996年-1999年).

住友財団 基礎科学研究助成, 「一酸化炭素をエフェクターとする新規な転写調節因子の生物無機化学的研究」, 青野重利 (1997年).

旭硝子財団 奨励研究助成, 「一酸化炭素による遺伝子発現の調節に関与する新規な転写調節因子CooAに関する研究」, 青野重利 (1998年).

特定領域研究(A),「標的分子デザイン」,「一酸化炭素をエフェクターとする転写調節因子の一酸化炭素応答およびDNA認識機構」,青野重利 (1998年-2000年).

基盤研究(C),「シグナルセンサーとしてのヘムを有する転写調節因子の構造と機能に関する研究」,青野重利 (2000年-2001年).

特定領域研究,「生体金属センサー」,「一酸化炭素センサーとして機能する転写調節因子CooAの構造と機能」,青野重利 (2000年-2004年).

基盤研究(B),「ヘムを活性中心とする気体分子センサータンパク質の構造と機能」,青野重利 (2002年-2003年).

萌芽研究,「気体分子センサータンパク質の構造機能解析とそのバイオ素子への応用」,青野重利 (2002年-2003年).

東レ科学研究助成金,「気体分子による生体機能制御のケミカルバイオロジー」,青野重利 (2003年).

基盤研究(B),「生体機能制御に関与する気体分子センサータンパク質の構造と機能」,青野重利 (2004年-2006年).

#### 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を始めとし,気体分子センサー機能を有する新規な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。

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非ヘム金属酵素反応中間体モデルの合成
- b) シアンイオンをプローブとした金属酵素の活性中心の構造と機能の相関
- c) 亜硝酸還元酵素の反応機構の研究
- d) 位置特異的ミューテーションを用いた基質配向制御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。これまでの研究により、緑色の鉄3価フェノキシラジカル錯体、青色の鉄3価ジフェノキシラジカル錯体の合成、同定に成功した。これらの錯体の反応性を研究した結果、スルフィド、アルコールを2電子酸化することが明らかになった。一方、これらの錯体ではオレフィンを酸化することができなかった。
- 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。シアンイオンをプローブとしてヘムタンパク質(ペルオキシダーゼやFixL)の活性中心の特性と機能との関わりを研究した。活性中心の近位側、遠位側での水素結合ネットワークと機能との相関が観測され、本手法が機能検索プローブとして有用であることを示すことができた。
- c) 地中のバクテリアの中には、嫌気条件で硝酸イオンを窒素に還元する一連の酵素が存在する。これらの過程で、亜硝酸イオンを一酸化窒素に還元する過程を担う酵素が亜硝酸還元酵素である。銅イオンを活性中心にもつ本酵素の反応機構をモデル錯体から研究した。種々の三脚型配位子を用いて、銅1価亜硝酸( $\text{NO}_2$ )錯体の合成を行った。これらの錯体の反応性および構造決定に成功した。さらにこれらの中間体から一酸化窒素生成過程を低温ストップフローにより追跡したところ、5 msの寿命の反応中間体を同定することができた。
- d) 酵素は、高い反応選択性を示すことがよく知られている。活性中心近傍のアミノ酸残基を新たに設計する。その結果、活性を維持したまま酵素の反応選択性を100%変換することに成功した。これまでの研究でも同様な試みが行われているが、選択性が悪かったり、活性が低く問題を残していた。我々の手法では、活性を保持したままの選択性の制御が可能になった。基質の配向が設計どおりになっているかを、基質複合体酵素の立体構造解析を行った。その結果、基質は本来の配向から90度回転した配向で酵素と結合しており、設計どおりであることが確かめられた。

B-1) 学術論文

H. FUJII, X. ZHANG and T. YOSHIDA, "Essential Amino Acid Residues Controlling the Unique Regioselectivity of Heme Oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4466–4467 (2004).

B-4) 招待講演

H. FUJII, "<sup>13</sup>C-NMR Signals of Iron Bound Cyanide Ions in Ferric Heme Proteins: A Sensitive Probe to Study an Active Site Environment of Heme Protein," Third International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines, New Orleans (U. S. A. ), July 2004.

藤井 浩, 「生命をささえる分子の世界 金属酵素のしくみを探る」, 第81回国研セミナー, 岡崎, 2004年6月.

藤井 浩, 「生体内の酵素がもつナノ反応場の機能制御機構の解明と新規反応場の分子設計」, 第24回表面科学講演大会, 東京, 2004年11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。また、これらの研究を通して得られた知見を発展させ、酵素機能変換法の新概念を確立できるよう研究を進めたいと考える。

## 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)  $\beta_2$ 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と赤外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或いは顕微鏡サイズの蛋白質構造体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会合による高次構造変化を解明して、構造と機能との関係を明らかにする研究を進めている。扱う物質としては金属タンパク質とアミロイド化蛋白質が主で、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。現在は、小分子を検出するセンサー蛋白のセンシング及びシグナリング機構の解明の研究にもこの方法を用いている。
- 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(現兵庫県立大教授)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荣誉に輝いた。その研究成果が「分子細胞生物学」第4版(H. Lodishら著、野田春彦ら訳、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(現京葉大助教授)はその学位論文に対し井上賞を受賞した。現在は、バクテリアのシトクロム酸化酵素数種について、外国と共同研究を進めている。

- 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 $\pi$ - $\pi$ 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、サブナノ秒時間分解紫外共鳴ラマン測定系の製作等。
- 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が残っている。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  $b_0$  についても2004年に研究報告を *J. Biol. Chem.* に出した。
- g) ウシ肺から可溶性グアニレートシクラゼを単離・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(現米国NIH博士研究員)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種類になり、活性は200倍近くなる。COとYC-1の協同効果がある。そのCOは普通の測定条件では光解離しないように見え、YC-1無しの場合と様子が異なる。YC-1の結合モードについて詳しい解析をした。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、 $O_2$ 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。 $O_2$  センサーについては、大腸菌のDos、細菌のHemATについて、COについては脳のNPAS2、細菌のCooA等について現在集中的に研究を展開している。
- 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 $\beta_2$ 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。こ

の蛋白の#11-21残基でフィブリルをつくらせたものについては既に報告したが #20-41残基や#76-91残基,それらの混合物でつくったフィブリルについても測定を進める。特に,高次構造形成に誘導減少があるかどうかを明らかにするためにシード効果を調べ,分子間相互作用の実質を解明していく。

#### B-1) 学術論文

**H. HIRAMATSU, Y. GOTO, H. NAIKI and T. KITAGAWA**, “Core Structure of Amyloid Fibril Proposed from IR-Microscope Linear Dichroism,” *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3008–3009 (2004).

**T. OHTA, H. YOSHIMURA, S. YOSHIOKA, S. AONO and T. KITAGAWA**, “Oxygen Sensing Mechanism of HemAT from *Bacillus subtilis*: A Resonance Raman Spectroscopic Study,” *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15000–15001 (2004).

**T. EGAWA, N. SUZUKI, T. DOKOH, T. HIGUCHI, H. SHIMADA, T. KITAGAWA and Y. ISHIMURA**, “Vibronic Coupling between Soret and Higher Energy Excited States in Iron(II) Porphyrins: Raman Excitation Profiles of  $A_{2g}$  Modes in the Soret Region,” *J. Phys. Chem. A* **108**, 568–577 (2004).

**T. OHTA, E. PINAKOULAKI, T. SOULMANE, T. KITAGAWA and C. VAROTSIS**, “Detection of a Photosatable Five-Coordinate Heme  $a_3$ -Fe-CO Species and Functional Implications of His384/ $\alpha 10$  in CO-Bound  $ba_3$ -Cytochrome *c* Oxidase from *Thermus Thermophilus*,” *J. Phys. Chem. B* **108**, 5389–491 (2004).

**Y. JIN, M. NAGAI, Y. NAGAI, S. NAGATOMO and T. KITAGAWA**, “Heme Structures of Five Variants of Hemoglobin M Probed by Resonance Raman Spectroscopy,” *Biochemistry* **43**, 8517–8527 (2004).

**E. SATO, I. SAGAMI, T. UCHIDA, A. SATO, T. KITAGAWA, J. IGARASHI, J. S. OLSON and T. SHIMIZU**, “Soul in Mouse Eyes Is a Novel Hexameric Heme-Binding Protein with Characteristic Optical Absorption, Resonance Raman Spectral and Heme Binding Properties,” *Biochemistry* **43**, 14189–14198 (2004).

**K. KOMIYAMA, H. FURUTACHI, S. NAGATOMO, A. HASHIMOTO, H. HAYASHI, S. FUJINAMI, M. SUZUKI and T. KITAGAWA**, “Dioxygen Reactivity of Copper(I) Complexes with Tetradentate Tripodal Ligands Having Aplyphatic Nitrogen Donors: Synthesis, Structures, and Properties of Peroxo and Superoxo Complexes,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **77**, 59–72 (2004).

**Y. MATSUDA, T. UCHIDA, H. HORI, T. KITAGAWA and H. ARATA**, “Structural Characterization of a Binuclear Center of a Cu-Containing NO Reductase Homologue from *Roseobacter Denitrificans*: EPR and Resonance Raman Studies,” *Biochim. Biophys. Acta* **1656**, 37–45 (2004).

**K. OINUMA, T. OHTA, K. KONISHI, Y. HASHIMOTO, H. HIGASHIBATA, T. KITAGAWA and M. KOBAYASHI**, “Heme Environment in Aldoxime Dehydratase Involved in Carbon-Nitrogen Triple Bond Synthesis,” *FEBS Lett.* **568**, 44–48 (2004).

**B. PAL, Z. LI, T. OHTA, S. TAKENAKA, S. TSUYAMA and T. KITAGAWA**, “Resonance Raman Study on Synergistic Activation of Soluble Guanylate Cyclase by Imidazole, YC-1 and GTP,” *J. Inorg. Biochem.* **98**, 824–832 (2004).

**T. OGURA and T. KITAGAWA**, “Resonance Raman Characterization of the P Intermediate in the Reaction of Bovine Cytochrome *c* Oxidase,” *Biochim. Biophys. Acta* **1655**, 290–297 (2004).

**J. IGARASHI, A. SATO, T. KITAGAWA, T. YOSHIMURA, S. YAMAUCHI, I. SAGAMI and T. SHIMIZU**, “Activation of Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Kinase (HRI) Activation by Nitric Oxide Is Induced by the Formation of a Five-Coordinate NO-Heme Complex: Optical Absorption, Electron Spin Resonance and Resonance Raman Spectral Studies,” *J. Biol. Chem.* **279**, 15752–15762 (2004).

**E. PINAKOULAKI, T. OHTA, T. SOULIMANE, T. KITAGAWA and C. VAROTSIS**, “Simultaneous Resonance Raman Detection of the Heme  $a_3$ -Fe-CO and Cu<sub>B</sub>-CO Species in CO-Bound  $ba_3$ -Cytochrome *c* Oxidase from *Thermus Thermophilus*,” *J. Biol. Chem.* **279**, 22791–22794 (2004).

**T. EGAWA, T. HISHIKI, Y. ICHIKAWA, Y. KANAMORI, H. SHIMADA, S. TAKAHASHI, T. KITAGAWA and Y. ISHIMURA**, “Refolding Processes of Cytochrome P450<sub>cam</sub> from Ferric and Ferrous Acid Forms to the Native Conformation,” *J. Biol. Chem.* **279**, 32008–32017 (2004).

**K. KONISHI, K. ISHIDA, K. OINUMA, T. OHTA, Y. HASHIMOTO, H. HIGASHIBATA, T. KITAGAWA and M. KOBAYASHI**, “Identification of Crucial Histidines Involved in Carbon-Nitrogen Triple Bond Synthesis by Aldoxime Dehydratase,” *J. Biol. Chem.* **279**, 47619–47625 (2004).

**T. UCHIDA, J. M. STEVENS, O. DALTRUP, E. M. HARVAT, L. HONG, S. J. FERGUSON and T. KITAGAWA**, “The Interaction of Covalently Bound Heme with the Cytochrome *c* Maturation Protein Ccme,” *J. Biol. Chem.* **279**, 51981–51988 (2004).

**T. UCHIDA, T. MOGI, H. NAKAMURA and T. KITAGAWA**, “Role of Tyr288 at the Dioxygen Reduction Site of Cytochrome *bo* Studied by Stable Isotope Labeling and Resonance Raman Spectroscopy,” *J. Biol. Chem.* **279**, 53613–53620 (2004).

**S. TERAMAE, T. OSAKO, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, S. FUKUZUMI and S. ITOH**, “Dinuclear Copper-Dioxygen Intermediates Supported by Polyamine Ligands,” *J. Inorg. Biochem.* **98**, 746–757 (2004).

**A. WADA, Y. HONDA, S. YAMAGUCHI, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, K. JITSUKAWA and H. MASUDA**, “Steric and Hydrogen-Bonding Effects on the Stability of Copper Complexes with Small Molecules,” *Inorg. Chem.* **43**, 5725–5735 (2004).

**M. TAKI, H. HATTORI, T. OSAKO, S. NAGATOMO, M. SHIRO, T. KITAGAWA and S. ITOH**, “Model Complexes of the Active Site of Galactose Oxidase. Effects of the Metal Ion Binding Sites,” *Inorg. Chim. Acta* **357**, 3369–81 (2004).

**S. YAMAGUCHI, A. WADA, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, K. JITSUKAWA and H. MASUDA**, “Thermal Stability of Mononuclear Hydroperoxocopper(II) Species. Effects of Hydrogen Bonding and Hydrophobic Field,” *Chem. Lett.* **33**, 1556–1557 (2004).

#### B-4) 招待講演

北川禎三, 「共鳴ラマン分光法によるセンサー蛋白質の機能発現機構の解明: ミニシンポジウム『生物に学ぶ化学』」, 九大先導物質化学研究所, 2004年3月.

北川禎三, 「共鳴ラマン分光法によるセンサー蛋白質の構造化学的研究」, 第84化学会年会依頼講演「生体分子光科学の新展開」, 関学大, 2004年3月.

北川禎三, 「共鳴ラマン分光法によるガスセンサーヘム蛋白質の構造化学的研究」, 森島 績教授退官記念講演会, ウェスチングミヤコホテル, 2004年6月.

北川禎三, 「ヘム蛋白質の構造と機能」, 岡崎高校文化祭(スーパーサイエンススクール事業)講演会, 岡崎高校, 2004年9月.

北川禎三, 「生物と重金属イオン」, 城西大学理学部化学科セミナー, 2004年10月.

北川禎三, 「共鳴ラマン分光法によるセンサーヘム蛋白質の構造化学: 可溶性グアニレートシクラーゼの最近の関心事」, 分子研究会「物理化学から生命科学を展望する～分子組織体から細胞へ～」, 岡崎コンファレンスセンター, 2004年12月.

T. KITAGAWA, "Resonance Raman Investigation on Structural Mechanism of Sensing and Transduction of Information in Gas Sensory Proteins," Plenary Lecture in the 2<sup>nd</sup> Asian Conference of Biological Inorganic Chemistry, Hotel Cidade de Goa, Goa, December 2004.

#### B-6) 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-7) 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).  
日本化学会理事 (2002-2003).  
日本化学会副会長 (2003-2004).

##### 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), Loca1 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).

Organizer: AsBIC-1 “The First Asian Meeting of Bioinorganic Chemistry,” Okazaki, March 7-10 (2003).

Chairman of International Steering Committee of “Asian Conference on Biological Inorganic Chemistry.”

#### 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).

さきがけ研究アドバイザー (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 )(2002-2004).

井上科学技術振興財団選考委員 (2004- ).

#### 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 (2001-2004).

*Chemistry Letters*, 編集委員 (2003- ).

#### 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).

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-10)外部獲得資金

特定領域研究(A),「生物無機科学における構造と特異機能の研究」, 北川禎三 (1991年-1993年).

基盤研究(B),「振動分光学による生体NO作用機能の解明」, 北川禎三 (1995年-1996年).

基盤研究(B),「ナノ秒ジャンプ法を用いた蛋白質高次構造変化の時間振動分光学的研究」, 北川禎三 (1997年-1999年).

特定領域研究(A),「生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学」, 北川禎三 (1996年-1999年).

研究成果公開促進費 第15回大学と科学シンポジウム,「生物と金属」, 北川禎三 (2000年).

特定領域研究(A),「未解明生物現象を司る鍵化学物質」, 北川禎三 (2000年-2002年).

基盤研究(A),「時間分解振動分光法による蛋白質高次構造変化の機能に果す役割」, 北川禎三 (2001年).

基盤研究(S),「時間分解紫外共鳴ラマン法によるセンサー蛋白質の環境感知, 情報伝達及び機能発現機能の解明」, 北川禎三 (2002年).

特別推進研究,「蛋白質動的高次構造検出法の開発及びそれを用いた蛋白質構造・機能相関の解明」, 北川禎三 (2002年-2006年).

#### 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) 蛋白質の分子内情報伝達機構の構造化学: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顕微赤外分光: $\beta_2$ 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シード効果を調べる。
- 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。