

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 レセプター蛋白質の構造と機能
- 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また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質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 $Fe^{IV}=\dot{O}$ 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 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_{03} 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 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。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 a₃-Fe-CO Species and Functional Implications of His384/α10 in CO-Bound ba₃-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 Aliphatic 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 2α 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_B-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_{cam} 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 2nd 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), 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).

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,「蛋白質動的な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質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: 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,その蛋白質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質の構造変化,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いきたい。