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

青野重利（教授）（2002年5月1日着任）

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) 新規なセンサータンパク質DcrAの単離とその性質の解明
- d) ヘムを活性中心とする新規な脱水酵素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) 好熱性一酸化炭素酸化細菌*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*中に含まれるCooAホモログタンパク質(Ch-CooA)の結晶化条件を検討し、その単結晶を得た。得られた結晶を用いたX線結晶構造解析により、分子中のヘムにイミダゾールが結合したイミダゾール結合型Ch-CooAの構造解明に成功した。分子中のヘムには、His82およびイミダゾールが軸配位子として配位していた。イミダゾールは、CO結合型Ch-CooAにおいてCOが結合するサイトに結合しており、その結果、還元型ヘムに配位していたN末端はヘムから解離し、ヘム鉄からは約16オングストローム離れたところに位置していることが分かった。これまでに報告されている*Rodospirillum rubrum*由来のCooA(Rr-CooA)の還元型における構造と、今回得られた構造を比較した結果、イミダゾール結合型Ch-CooA中のヘムは、ヘムの α - γ メソ軸回りに180度、軸配位子の配位軸回りに30度回転していることが明かとなった。軸配位子の配位軸回りの回転は、イミダゾール結合に際し、還元型ヘムの第6配位子であるN末端がヘムから解離したことによって誘起されたものと考えられる。N末端領域に存在するMet5のカルボニル酸素とイミダゾール間に水素結合が形成されていることも分かった。この水素結合の存在により、ヘムから解離したN末端領域のコンフォメーション変化、およびヘムの回転、移動が抑制されていると推定される。CooAの生理的なエフェクターであるCOがヘムに配位した場合には、上記のような水素結合による抑制は存在しないと考えられるため、イミダゾールが配位した場合よりもより大きくヘムが回転（あるいは移動）するものと思われる。
- 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、昨年度に引き続き、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、His86とヘムのプロピオン酸基との間で特異的な水素結合が形成されていることが分かった。また、酸素以外の気体分子(COおよびNO)がヘムに結合した場合には、His86とヘムのプロピオン酸基との間の水素結合は形成されないことも分かった。His86をAlaに置換したH86A変異体を用いて同様の測定を行った結果、本変異体では当然のことながら86番残基とプロピオン酸基との間の水素結合は形成されない。さらに野生型で観測されるヘムに配位した酸素分子とThr95との間の水素結合が、本変異体では形成されていないことが分かった。このことは、HemATへの酸

素結合により、まずHis86とヘムのプロピオン酸基との間で特異的な水素結合が形成されることでCEループ(His86が存在している部分)のコンフォメーション変化が誘起され、それがThr95が位置するEヘリックスの構造変化へとつながっていることを示している。このような一連の構造変化は、酸素が結合した場合にのみ誘起される。なぜならば、COやNOが結合した場合には、構造変化の引き金となるHis86とヘムのプロピオン酸基との間の水素結合形成が起こらないため、一連の構造変化も起こらないものと考えられる。

- 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タンパク質の発現系の構築を行い、その性質についての検討を行った。本年度は、昨年度に引き続き、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。大腸菌を用いたDcrA-Nの発現に際しては、DcrAがタンパク質部分に共有結合したc型ヘムを含むと予想されることから、c型ヘムの生成に必要なアクセサリタンパク質を共発現させた発現系を用いた。その結果、DcrA-Nはタンパク質部分と共有結合したc型ヘムを含む成熟型として得られることが分かった。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、c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。DcrA-Nの電気化学的酸化還元滴定を行い、その酸化還元電位を測定したところ、 -250 mV (vs. NHE)という、非常に低い酸化還元電位を示した。この値は、DcrA-Nと同様なc型ヘムを有する通常のチトクロムcの値に比べ、約500 mVも低い値である。DcrAが酸素、あるいは酸化ストレスのセンサーとして機能するため、このような低い酸化還元電位を有しているものと推定される。
- d) アルドキシム脱水酵素はアルドキシムの脱水反応によりニトリルを生成する反応を触媒する新規なヘム含有酵素である。本年度は、*Bacillus* sp. OxB-1株由来のアセトアルドキシム脱水酵素(OxB)の構造機能相関の解明を目的とした研究を行った。OxBはモノマー構造を有しており、酵素1分子中に1分子のb型ヘムを有している。Hisが軸配位したヘムは、酸化型ではさらに水分子が配位した6配位高スピン構造を、還元型ではHis配位の5配位高スピン構造を有していることが分かった。本酵素は、分子中のヘムが還元型である場合が活性型であり、ヘムが酸化型の場合には不活性型であることが分かった。興味深いことに、活性型酵素のみならず、不活性型酵素にもOxBの基質であるフェニルアセトアルドキシムが結合することが分かった。基質はOxB中のヘムに配位するが、ヘムが酸化型の場合と還元型の場合では、基質の配位様式が異なっていることが明らかとなった。すなわち、不活性型である酸化型ヘムには基質の酸素原子がヘム鉄に配位するのに対し、活性型である還元型ヘムには基質の窒素原子がヘム鉄に配位することが分かった。また、基質周辺のヘムポケットに存在するHis306が触媒残基として機能することにより、ヘムに配位した基質の脱水反応が進行することが分かった。

B-1) 学術論文

S. YOSHIOKA, K. KOBAYASHI, H. YOSHIMURA, T. UCHIDA, T. KITAGAWA and S. AONO, "Biophysical Properties of a c-Type Heme in Chemotaxis Signal Transducer Protein DcrA," *Biochemistry* **44**, 15406–15413 (2005).

K. KOBAYASHI, S. YOSHIOKA, Y. KATO, Y. ASANO and S. AONO, "Regulation of Aldoxime Dehydratase Activity by Redox-Dependent Change in the Coordination Structure of the Aldoxime-Heme Complex," *J. Biol. Chem.* **280**, 5486–5490 (2005).

S. INAGAKI, C. MASUDA, T. AKAISHI, H. NAKAJIMA, S. YOSHIOKA, T. OHTA, T. KITAGAWA and S. AONO, "Spectroscopic and Redox Properties of a CooA Homologue from *Carboxydothemus hydrogenoformans*," *J. Biol. Chem.* **280**, 3269–3274 (2005).

B-4) 招待講演

S. AONO, "Molecular mechanism of gene regulation by the heme-based CO sensor protein," Molecule-Based Information Transmission and Reception: Application of Membrane Protein Biofunction (MB-ITR2005), Okazaki (Japan), March 2005.

S. AONO, "Molecular mechanism of functional regulation for the heme-based sensor proteins," 12th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC 12), Ann Arbor (U.S.A.) July–August 2005.

B-7) 学会および社会的活動

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 (2005-).

日本学術振興会国際事業委員会書面審査員 (2005-).

学会誌編集委員

J. Biol. Inorg. Chem., Editorial Advisory Board (2002-2004).

B-8) 他大学での講義、客員

広島大学理学部, 非常勤講師, 2005年4月-2006年3月.

B-10) 外部獲得資金

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關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).

東レ科学技術研究助成金,「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).

特定領域研究「配位空間の化学」,「タンパク質配位空間を利用した気体分子センシングとシグナル伝達」, 青野重利 (2003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 - 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。COセンサータンパク質CooAに関しては,その結晶構造の解明に成功したが これは生理的には不活性型の構造であった。今後は 活性型および標的DNAとの複合体の構造解明を目指して研究を進める予定である。酸素センサータンパク質HemATに関しては 酸素の選択的センシング機構に関してはかなりなところまで明らかになってきたので 今後さらに研究を進め HemATが関与するシグナル伝達機構の全貌解明を目指したい。また CooA HemAT以外の新規なヘム含有型センサ - タンパク質を始めとし これまでに無い新規な機能を有する金属タンパク質の構造・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) (1998 年 3 月 1 日 着 任)

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) 亜硝酸還元酵素の反応機構の研究
- c) 小分子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
- 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。立体障害を導入した新規サレン鉄錯体を合成した。1電子、2電子酸化生成物を種々の物理化学的手法により検討した。その結果、サレン鉄錯体では、鉄イオンが酸化されず、配位子のサレンがフェノキシラジカルに酸化されることがわかった。
- b) 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。銅1価亜硝酸錯体とプロトンとの反応を低温ストップフローにより追跡した結果、反応中間体の検出に成功した。速度論解析から構造を推定し、新たな反応機構を提唱することができた。
- c) 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。シアニオンをプローブとしてFixLを研究した。その結果、活性中心近傍のアルギニン残基の役割を明らかにすることができた。
- 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。酵素の活性中心にある基質結合に関わるアミノ酸残基に着目し、基質の中で反応させたい部位が活性サイトに来るような酵素を設計し、作成した。この手法に従い、酵素選択性を持たない酵素に選択性を持たせることに成功した。

B-1) 学術論文

M. KUJIME and H. FUJII, "Synthesis of Sterically Hindered Tris(4-imidazolyl)carbinol Ligands and Their Copper(I) Complexes Related to Metalloenzymes," *Tetrahedron Lett.* **46**, 2809–2812 (2005).

T. MATSUI, A. NAKAJIMA, H. FUJII, K. M. MATERA, C. T. MIGITA, T. YOSHIDA and M. IKEDA-SAITO, "O₂- and H₂O₂-Dependent Verdoheme Degradation by Heme Oxygenase. Reaction Mechanisms and Potential Physiological Roles of the Dual Pathway Degradation," *J. Biol. Chem.* **280**, 36833–36840 (2005).

T. KURAHASHI, Y. KOBAYASHI, S. NAGATOMO, T. TOSHA, T. KITAGAWA and H. FUJII, "Oxidizing Intermediates from the Sterically Hindered Salen Iron Complexes Related to the Oxygen Activation by Nonheme Iron Enzymes," *Inorg. Chem.* **44**, 8156–8166 (2005).

B-4) 招待講演

藤井 浩, 「一原子酸素添加酵素における酸素分子活性化の化学」, チトクロームP450研究会, 神戸, 2005年7月.

藤井 浩, 「モデル錯体や発現酵素を使った金属酵素機能発現メカニズムの解明とその応用」, 生体関連化学若手フォーラム, 岡崎, 2005年9月.

H.FUJII, "¹³C and ¹⁵N NMR of Iron Bound Cyanide Ions of Ferric Heme Proteins: Useful Probe for Studying Hydrogen Bonding Networks in the Active Site," Seventh International Conference of Peroxidases, Fukuoka (Japan), September 2005.

B-8) 他大学での講義、客員

名古屋市立大学薬学部, 大学院特別講義, 「磁気共鳴を用いた金属酵素の研究 原理と応用」, 2005年6月29日.

B-10) 外部獲得資金

奨励研究(A), 「ヘム酵素の軸配位子が多様な酵素機能を制御する機構の解明」, 藤井 浩 (1997年-1999年).

重点領域研究(公募) 生体金属分子科学, 「チトクロームc酸化酵素反応中間体モデル錯体の構築と反応機構の研究」, 藤井 浩 (1997年-1998年).

上原記念生命科学財団 研究奨励金, 「ヘムオキシゲナーゼにおける反応特異性およびヘム代謝機構の研究」, 藤井 浩 (1999年).

重点領域研究(公募) 生体金属分子科学, 「¹⁷O-NMRによる銅-酸素錯体の配位した酸素の電子構造と反応性の研究」, 藤井 浩 (1999年).

内藤財団 科学奨励金, 「ヘムオキシゲナーゼによる位置特異的ヘム代謝機構の解明」, 藤井 浩 (2000年).

基盤研究(C), 「合成ヘムとミオグロビン変異体による亜硝酸還元酵素モデルの構築と反応機構の研究」, 藤井 浩 (2000年-2002年).

基盤研究(B), 「単核非ヘム酵素反応中間体として的高酸化オキソ錯体の合成と反応性の研究」, 藤井 浩 (2002年-2004年).

基盤研究(B), 「立体構造にもとづく基質結合サイトの再構築による酵素反応選択性の制御」, 藤井 浩 (2004年-2007年).
大幸財団 海外学術交流助成金, 「第3回ポルフィリンとフタロシアニンに関する国際会議での研究発表」, 藤井 浩 (2004年).

特定領域研究(公募) 配位空間, 「金属酵素のナノ反応空間における基質の配向および反応選択性の制御」, 藤井 浩 (2005年-2006年).

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に研究を進めたいと考える。

北川 禎 三 (教授) (1983年4月1日着任)

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) 振動分光学の新技术の開発
- 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。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 $Fe^{IV}=\dot{O}$ 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に向かって研究を展開した。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*₃ 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(東北大助手を経て、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、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。O₂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

の蛋白質の#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

X. ZHANG, H. FURUTACHI, S. FUJINAMI, S. NAGATOMO, Y. MAEDA, Y. WATANABE, T. KITAGAWA and M. SUZUKI, “Structural and Spectroscopic Characterization of (μ -Hydroxo or μ -Oxo)(μ -Peroxo)Diiron(III) Complexes: Models for Peroxo Intermediates of Non-Heme Diiron Proteins,” *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 826–827 (2005).

H. FURUTACHI, K. HASHIMOTO, S. NAGATOMO, T. ENDO, S. FUJINAMI, Y. WATANABE, T. KITAGAWA and M. SUZUKI, “Reversible O–O Bond Cleavage and Formation of a Peroxo Moiety of a Peroxocarbonate Ligand Mediated by an Iron(III) Complex,” *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4550–4551 (2005).

K. ITOH, H. HAYASHI, H. FURUTACHI, T. MATSUMOTO, S. NAGATOMO, T. TOSHA, S. TERADA, S. FUJINAMI, M. SUZUKI and T. KITAGAWA, “Synthesis and Reactivity of a (μ -1,1-Hydroperoxo)(μ -Hydroxo)Dicopper(II) Complex: Ligand Hydroxylation by a Bridging Hydroperoxo Ligand,” *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5212–5223 (2005).

H. HIRAMATSU, Y. GOTO, H. NAIKI and T. KITAGAWA, “Structural Model of the Amyloid Fibril Formed by β_2 -Microglobulin #21-31 Fragment Based on Vibrational Spectroscopy,” *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 7988–7989 (2005).

Y. J. MO, D. L. JIANG, M. UYEMURA, T. AIDA and T. KITAGAWA, “Energy Funneling of IR Photons Captured by Dendritic Antennae and Acceptor Mode Specificity: Anti-Stokes Resonance Raman Studies on Iron(III) Porphyrin Complexes with a Poly(Aryl Ether) Dendrimer Framework,” *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10020–10027 (2005).

S. INAGAKI, C. MASUDA, T. AKAISHI, H. NAKAJIMA, S. YOSHIOKA, T. OHTA, B. PAL, T. KITAGAWA and S. AONO, “Spectroscopic and Redox Properties of a CooA Homologue from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*,” *J. Biol. Chem.* **280**, 3269–3274 (2005).

K. MATSUURA, S. YOSHIOKA, T. TOSHA, H. HORI, K. ISHIMORI, T. KITAGAWA, I. MORISHIMA, N. KAGAWA and M. R. WATERMAN, “Structural Diversities of Active Site in Clinical Azole-Bound Forms between Sterol 14 α -Demethylases (Cyp51s) from Human and *Mycobacterium tuberculosis*,” *J. Biol. Chem.* **280**, 9088–9096 (2005).

T. UCHIDA, E. SATO, A. SATO, I. SAGAMI, T. SHIMIZU and T. KITAGAWA, “CO-Dependent Activity-Controlling Mechanism of Heme-Containing CO-Sensor Protein, Neuronal PAS Domain Protein,” *J. Biol. Chem.* **280**, 21358–21368 (2005).

Z. Q. LI, B. PAL, S. TAKENAKA, S. TSUYAMA and T. KITAGAWA, “Resonance Raman Evidence for the Presence of Two Heme Pocket Conformations with Varied Activities in CO-Bound Bovine Soluble Guanylate Cyclase and Their Conversion,” *Biochemistry* **44**, 939–946 (2005).

Y. NAGANO, J. G. LIU, Y. NARUTA and T. KITAGAWA, “UV Resonance Raman Study of Model Complexes of the Cu_B Site of Cytochrome *c* Oxidase,” *J. Mol. Struct.* **735-736**, 279–291 (2005).

K. OINUMA, H. KUMITA, T. OHTA, K. KONISHI, Y. HASHIMOTO, H. HIGASHIBATA, T. KITAGAWA, Y. SHIRO and M. KOBAYASHI, “Stopped-Flow Spectrophotometric and Resonance Raman Analyses of Aldoxime Dehydratase Involved in Carbon-Nitrogen Triple Bond Synthesis,” *FEBS Lett.* **579**, 1394–1398 (2005).

S. YAMAGUCHI, A. KUMAGAI, S. NAGATOMO, T. KITAGAWA, Y. FUNAHASHI, T. OZAWA, K. JITSUKAWA and H. MASUDA, “Synthesis, Characterization, and Thermal Stability of New Mononuclear Hydrogenperoxocopper(II) Complexes with N₃O-Type Tripodal Ligands Bearing Hydrogen-Bonding Interaction Sites,” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 116–124 (2005).

R. KOUDO, H. KUROKAWA, E. SATO, J. IGARASHI, T. UCHIDA, I. SAGAMI, T. KITAGAWA and T. SHIMIZU, “Spectroscopic Characterization of the Isolated Heme-Bound PAS-B Domain of Neuronal PAS Domain Protein 2 (NPAS2) Associated with Circadian Rhythms,” *FEBS J.* **272**, 4153–4162 (2005).

S. NAGATOMO, M. NAGAI, Y. MIZUTANI, T. YONETANI and T. KITAGAWA, “Quaternary Structures of Intermediately Ligated Hemoglobin and Influences from Strong Allosteric Effectors; Resonance Raman Investigation,” *Biophys. J.* **89**, 1203–1213 (2005).

J. M. STEVENS, T. UCHIDA, O. DALTRUP and S. J. FERGUSON, “Covalent Cofactor Attachment to Proteins: Cytochrome *c* Biogenesis,” *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 792–795 (2005).

B-4) 招待講演

北川禎三, 「からだで活躍する金属イオン: 金属と人の暮らしの化学」, 総合研究大学院大学第7回先導科学科学術講演会「生命・光」, 総研大葉山本部共通棟講義室, 2005年2月.

北川禎三, 「生物学・生理学・分子科学・生命環境科学を統合するバイオサイエンス新領域の開拓」, 総研大協同研究報告会, 統計数理研究所, 2005年4月.

T. KITAGAWA, Y. -J. MO, D. -L. JIANG, M. UYEMURA and T. AIDA, “Anti-Stokes Resonance Raman Evidence for Energy Funneling of IR Photons Captured by Dendritic Antennae on Iron(III)-Porphyrin Complexes with Poly(aryl ether) Dendrimer Framework,” 12th Intl. Conf. on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy, NIST, Gaithersburg (U.S.A.), May 2005.

北川禎三, 「センサー蛋白質の情報検出及び伝達メカニズム」, 生化学若い研究者の会京都支部, キャンパスプラザ京都, 2005年6月.

北川禎三, 「ヘム蛋白質における情報伝達と動的構造」, JTS研究会「分子系の構造と電子状態」, SPring-8 中央管理棟講堂, 2005年9月.

T. KITAGAWA, “Resonance Raman Investigation of the P Intermediate of Bovine Cytochrome *c* Oxidase and a Model of Its Cu_B-Heme Dinuclear Center,” Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt (Germany), June 2005.

T. KITAGAWA, “Resonance Raman Investigation of Effects of YC-1 and GTP on Structure of CO-bound Heme of Soluble Guanylate Cyclase,” 2nd Intl. Conf. of cGMP Generators, Effectors, and Therapeutic Implications, Potsdam (Germany), June 2005.

T. KITAGAWA, Y. -J. MO, D. -L. JIANG and T. AIDA, “Energy funneling of IR photons captured by dendritic antennae on iron(III)porphyrin complexes with a poly(aryl ether) dendrimer framework probed by anti-Stokes resonance Raman spectroscopy,” ICMAT & IUMRS-ICAM 2005 Conference, Singapore Convention and exhibition Center (Singapore), July 2005.

T. KITAGAWA, “Effects of YC-1 and GTP on NO-bound heme structure of soluble guanylate cyclase,” 12th Intl. Conf. on Biological Inorganic Chemistry, Ann Arbor (U.S.A.), July 2005.

T. KITAGAWA, “Resonance Raman investigation of dynamical properties of heme proteins in relation to signal transduction by gas sensor proteins,” Inst. of Chem. Academia, Sinica (Taiwan), October 2005.

T. KITAGAWA, “Structural changes in the heme moiety upon binding of YC-1 and GTP to soluble guanylate cyclase,” 3rd Taiwan Bioinorg. Chem. Symp., Kaohsiung (Taiwan), October 2005.

T. KITAGAWA, “Unique applications of resonance Raman spectroscopy to metalloporphyrins,” Dept. of Chem. Natl. Taiwan Univ. (Taiwan), October 2005.

T. KITAGAWA, “Structural chemistry of cytochrome *c* oxidase; What have been solved and unsolved on its reaction mechanism?” COE International Symposium 2005 and ‘Assembly and Reconstitution of Membrane Proteins and Cellular Molecular Machineries,’ Osaka Univ. (Japan), November 2005.

T. KITAGAWA, B. PAL, Z. LI, S. TAKENAKA and S. TSUYAMA, “Rapid recombination of CO in the activated form of CO-bound soluble guanylyl cyclase,” Symposium (#230) on ‘Structures, Dynamics, and Function of Biomolecules and Water,’ Pacificchem, Honolulu (U.S.A.), December 2005.

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).

平松弘嗣, William F. Meggers Award (2005).

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 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).
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).
さきか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).
日本学術会議第20期会員 (2005-2008).
日本学術振興会理工系科研費審査委員会 (2006).

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 (2003-2004).

Bulletin of Chemical Society of Japan, Advisory Board (2005-).

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 (2002-2006).

B-8) 他大学での講義

北川禎三, 大阪大学理学研究科, 「生体分子の振動分光学」, 2005年7月12日-13日.

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:高酸化状態中間体の構造決定
- 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行きたい。