

### 3-1 生体分子

#### 北川 禎三（教授）

- 1) 専門領域：生物無機化学、振動分光学
- 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
- 3) 研究活動の概略と主な成果：
  - 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 200nm 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上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<sub>2</sub>→H<sub>2</sub>O を触媒するチトクロム酸化酵素、O<sub>2</sub>→H<sub>2</sub>O+S<sub>0</sub> を触媒するチトクロム P-450、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>→H<sub>2</sub>O を触媒するペルオキシダーゼ等ヘム

酵素のヘム環境の特色, その反応中間体である高酸化ヘムの  $\text{FeIV}=\text{O}$  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(現姫工大教授)のチトクロム酸化酵素による  $\text{O}_2$  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俊君(現京薬大助教授)はその学位論文に対し井上賞を受賞した。現在は、バクテリアのチ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, 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  $\text{bo}_3$  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、現在 NIH 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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。

#### 4) 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<sub>2g</sub> Modes in the Soret Region." *J. Phys. Chem. A* **108**, 568–577 (2004).

**T. Ohta, E. Pinakoulaki, T. Soulmene, T. Kitagawa, and C. Varotsis**, "Detection of a Photosatable Five-Coordinate Heme a<sub>3</sub>-Fe-CO Species and Functional Implications of His384/-10 in CO-Bound ba<sub>3</sub>-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 2- 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<sub>3</sub>-Fe-CO and CuB-CO Species in CO-Bound ba<sub>3</sub>-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 P450cam 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. Daltrop, 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. Nagamura 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).
- 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.* (2004).
- Z. 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 (2004).

5) 著書、総説

**B. Pal, and T. Kitagawa.** "Interactions of Soluble Guanylate Cyclase with Diatomics as Probed by Resonance Raman Spectroscopy." *J. Inorg. Biochem.* **99**, 267-279 (2005).

6) 国際会議発表リスト

**T. Uchida, E. Sato, A. Sato, I. Sagami, T. Shimidzu, and T. Kitagawa,** "Resonance Raman Characterization of the Heme A Domain of the Newly Discovered CO-dependent Gene Regulatory Protein, NPAS2", the 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, April 2004.

**D. Okuno, T. Iwase, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, and T. Kitagawa,** "FTIR Study of Proton Pumping Mechanism of Bovine Cytochrome c Oxidase", the 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, April 2004.

**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, Goa (India), December 2004.

**T. Ohta,** "Reaction Mechanism of NO Reduction by a Heme-Copper Oxidase" Poster presentation in the 2nd Asian Conference of Biological Inorganic Chemistry, Goa (India), December 2004.

**H. Hiramatsu, Y. Goto, H. Naiki and T. Kitagawa,** "Amyloid fibril structure of b2-microglobulin and its fragments elucidated from IR-microscope linear dichroism", 1st Italian-Japanese Workshop "Dialysis-related amyloidosis: from molecular mechanisms to therapies", Pavia, Italy December 2004.

**T. Kitagawa,** "Resonance Raman Studies of Heme-based Gas Sensory Proteins," COE Conference of Nagoya Univ., Sympojion of Nagoya Univ., January 2005.

**C. Varotsis,** "Time-resolved step-scan FTIR and resonance Raman studies of ba3-oxidoreductase from *Thermus thermophilus*." Molecule-Based Information Transmission and Reception -Application of Membrane Protein Biofunction-(MB-ITR2005), Satellite Symposium: Surface and Interface in Nano-Bioelectronics (Biotronics2005), 岡崎コンファレンスセンター, March 2005.

7) 招待講演

**T. Ohta,** "Resonance Raman Investigation on the Sensing and Signaling Mechanisms of the Oxygen Sensing Signal Transducer Protein HemAT-Bs from *Bacillus subtilis*"

The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama (Japan), April 2004.

平松弘嗣「顕微赤外直線偏光二色性測定によるアミロイドフィブリル構造の研究」、サーモニコレーユーズミーティング、大阪、2004年6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、ウエ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。

内田毅、北川禎三「CO濃度を閏知し、遺伝子の発現を制御するセンサー蛋白質（NPAS2）の制御メカニズムに関する研究」分子研研究会「生体金属分子科学の展望」、岡崎、2004年10月。

内田毅「PASドメインを含むヘム蛋白質の振動分光学」、21世紀COE「計算科学フロンティア」研究会「自然が創ったナノ実験室：イエロープロテインの科学」名古屋大学理学部、2004年10月。

平松弘嗣「偏光顕微赤外分光によるアミロイド蛋白質フィブリル化会合体の構造化学的研究」、大阪大学蛋白研セミナー、2004年11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。

内田毅「振動分光学が明らかにするタンパク質のしくみ」、分子科学研究所、分子研研究会、2005年1月

#### 8) 学会および社会的活動

IUPAC Associate Members of Commission on Biophysical Chemistry

日本分光学会評議員

日本生化学会評議員

日本化学会副会長

#### 9) 他大学での非常勤講師、客員教授

九州大学 客員教授

富山大学 非常勤講師