

平成24年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書 〔追跡評価用〕

◆記入に当たっては、「平成24年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書等記入要領」を参照してください。

平成24年 4月26日現在

研究代表者 氏名	北川 禎三	所属研究機関・ 部局・職	分子科学研究所・名誉教授
研究課題名	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		
課題番号	14001004		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 北川 禎三（分子科学研究所・名誉教授） 研究分担者 水谷 泰久（大阪大学・大学院理学研究科・教授） 内田 毅（北海道大学・大学院理学研究院・助教）		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成14年度	132,000 千円
平成15年度	71,000 千円
平成16年度	57,000 千円
平成17年度	55,200 千円
平成18年度	46,000 千円
総計	361,200 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)～(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

北川 禎三：

平成 18 年 3 月に分子科学研究所を定年退職し、4 月より豊田理化学研究所 (公益法人) のフェローとなり、「蛋白質高次構造と機能」の研究を続行した。具体的には、アロステリック蛋白質の典型であるヒトヘモグロビンと、アロステリック効果を機能に利用するガスセンサー蛋白質の幾つかについて、ターゲット分子の検出とその検出情報の伝達機構や、ダイナミクスを共鳴ラマン分光法で調べる研究を続けている。具体的には、O₂-センサー蛋白質の、*Bacillus* 菌の HemAT、大腸菌の DOS、ヒト脳にあり CO センサー転写酵素の NPAS2、血管内皮細胞にあり血管の膨張収縮に寄与する NO センサーの sGC の共鳴ラマン分光の研究を継続している。その代表的な結果を、終了後の発表論文リストに記載した。

豊田理化学研究所は狭くて、多くの実験装置を設置するスペースが無いので、分担者が専門的に扱っていた装置は分担者の新任地に移転し、それを使いつつ研究を進展させた。それ以外の実験装置は、兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー研究所に寄付した。実際は兵庫県が好意的に、兵庫県科学技術支援センターのビルに 200 平方メートルのスペースを用意して下さり、そこに全装置を移転させた。以前に私の研究室で助手をしていて、現在は同大学の教授をしている小倉尚志博士が全装置を管理し、稼働させている。私は、客員教授として、同大学の GCOE 活動に協力してきた。

岡崎では、日本のラマン分光実験のセンターとして全国から多くの人々が測定に来ていたが、その機能は兵庫県立大学でも保持されていて、日本の大学のみならず、韓国からも学生を連れて測定に来ている。したがって、ピコバイオロジー研究所の主たる活動の一つとして、特別推進研究で設置した装置群は活躍しており、これが平成 24 年度開始の大学院リーディングプログラム採択の一つの因子として寄与した。

私は、豊田理化学研究所の任期 (4 年) 終了後、平成 22、23 年度はピコバイオロジー研究所の特任教授として務め、蛋白質アロステリック効果の構造化学的研究を展開しつつ、平成 24 年度からは、客員教授として若手研究者の育成に協力している。幾つかの新学術領域研究や大学の GCOE 活動のアドバイザーとしても活動している。これ迄の研究活動を総合して評価して下さい、平成 24 年 2 月には、学術振興会-インド DST による、Mizushima-Raman Lectureship Award を、また 7 月には国際ポルフィリン-フタロシアニン学会より Eraldo Antonini Award for Lifetime Contributions to the Understanding of Hemes を受賞した。

水谷 泰久：

平成 18 年 4 月から阪大理学研究科教授として、特別推進研究分担者の時代に行った研究を進展させている。具体的には、ピコ秒時間分解ラマン分光装置を更に感度の高いものに改良するとともに、以前の可視光共鳴ラマンスペクトルだけでなく、紫外光共鳴ラマンスペクトルをピコ秒の時間分解能で観測できる装置を製作した。これに類する装置は国際的にも無いので、非常にユニークな情報を世界に発信している。また、特定領域研究「分子高次系機能解明のための分子科学-先端計測法の開拓による素過程の理解」の班長としてグループをリードし、日本の分子科学全体の発展のために寄与している。

内田 毅：

平成 18 年から北海道大学理学研究科化学専攻の助教として転任し、特別推進研究で使っていたラマン分光装置を移転して、北大でラマン分光の実験を出来るようにセットアップした。それらの装置を利用し、ヒトの脳にあって一酸化炭素濃度を関知し、バイオリズムを決める蛋白質の一つである Neuronal PAS2 と云う蛋白質の気体センシング機構を明らかにした。さらに、気体分子以外にも金属イオンをセンスする蛋白質のシグナル応答機構を上記のラマン分光装置を用いて明らかにした。それらが評価され、平成 18 年度には日本化学会第 86 春季年会「若い世代の特別講演会」特別講演賞、平成 20 年度には「気体センサーヘム蛋白質の動作機構の解明」という理由で日本化学会北海道支部奨励賞を受賞した。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

論文発表は3—3に記すので、ここには海外における招待講演を中心に現在からさかのぼって記す。

北川禎三：

- 1) 7th International Conference on Porphyrin and Phthalocyanine (平成 24 年 7 月、場所 ; Jeju, Korea) Lecture for Eraldo Antonini Award for Lifetime Contributions to the Understanding of Hemes. 'Structural Features in Functions of Heme Proteins Revealed by Resonance Raman Spectroscopy'
- 2) 14th National Symposium in Chemistry (平成 24 年 2 月、場所 ; Indian Institute for Interdisciplinary Science and Technology) Mizushima-Raman Lecture 'Picobiological Features in Functions of Heme Proteins Revealed by Resonance Raman Spectroscopy'
- 3) Tata Institute Special Event for International Year of Chemistry (平成 24 年 1 月、場所 ; Tata Institute for Fundamental Research) 'Heavy Metal Ions Actively Working in Human Bodies'
- 4) Tata Institute, Chemistry Department Seminar (平成 24 年 1 月) 'Structural Features of Allosteric Effects in Proteins Revealed by Resonance Raman Spectroscopy'
- 5) Indian Institute of Science, Department Seminar of Inorganic Chemistry (平成 24 年 2 月) 'Structural Mechanism of Sensing and Communication in Gas Sensor Proteins Revealed by Resonance Raman Spectroscopy'
- 6) Indian Association for the Cultivation of Science, Chemistry Department Seminar (平成 24 年 2 月) 'Picobiological Features in Functions of Heme Proteins Revealed by Resonance Raman Spectroscopy'
- 7) 15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (平成 23 年 8 月、場所 ; University of British Columbia, Canada) 'Ultraviolet Time-resolved Resonance Raman Investigation of Structural Dynamics of HemAT-Bs following CO Photodissociation'
- 8) 22th International Conference on Raman Spectroscopy (平成 22 年 8 月、場所 ; Boston Park Plaza Hotel, USA) 'Evaluation of Inter-subunit Interactions in Half-ligated Human Adult Hemoglobin Based on the Single Residue UVRR Spectra'
- 9) 6th International Conference on Porphyrin and Phthalocyanine (平成 22 年 7 月、場所 ; Hyatt Regency Hotel Albuquerque) 'Structural Chemistry of Information Communication in Oxygen Sensor Protein, EcDOS, Revealed with Resonance Raman Spectroscopy'
- 10) 5th Asian Conference on Biological Inorganic Chemistry (平成 22 年 11 月、場所 ; 高雄、台湾) 'Subunit Interaction-based Evaluation of the Quaternary Structure of Hemoglobin and Its Relation with the Heme Strain Probed by Resonance Raman Spectroscopy'
- 11) Department Seminar and Cumulated Class Lectures for 15 hours at Jilin University, China (平成 21 年 2 月、場所、長春、中国)

水谷泰久：

- 1) 23rd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2012) (平成 24 年 8 月、場所 ; Bangalore, India) 'Vibrational energy flow in hemeproteins'
- 2) Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics (平成 23 年 8 月、場所 ; Colorado, USA) 'Watching energy flow in hemeproteins'
- 3) The 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology (平成 23 年 7 月、場所 ; 奈良) 'Protein dynamics of photosensory proteins as studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy'
- 4) Pacificchem 2010 (平成 22 年 12 月、場所 ; Honolulu, USA) 'Elucidation of ultrafast protein dynamics by picosecond time-resolved visible and ultraviolet resonance Raman spectroscopy'
- 5) Pacificchem 2010 (平成 22 年 12 月、場所 ; Honolulu, USA) 'Protein dynamics of sensory proteins as studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy'
- 6) 22nd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2010) (平成 22 年 8 月、場所 ; Boston, USA) 'Primary Protein Responses to Chromophore Isomerization of Photosensory Proteins'
- 7) The 6th Asian Conference on Ultrafast Phenomena (平成 22 年 1 月、場所 ; Taipei, Taiwan) 'Primary protein responses to chromophore isomerization: picosecond time-resolved resonance Raman studies'
- 8) 3e cycle lecture tour in Switzerland: Protein dynamics and function (平成 21 年 10 月、場所 ; Universität Baselほかスイス国内の大学3校) 'Hemoglobin allostery: dynamics and function'ほか4講演
- 9) Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics (平成 21 年 8 月、場所 ; Colorado, USA) 'Primary protein responses of after ligand dissociation and chromophore isomerization: time-resolved resonance Raman studies'
- 10) 28th Annual Pittsburgh Conference Lectures (平成 20 年 4 月、場所 ; Pittsburgh, USA) 'Hemoglobin allostery: dynamics and function'および 'Picosecond protein dynamics revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy'

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

北川禎三：

基盤研究 (B) 平成 18-19 年度 19,700 千円 「ガスセンサー蛋白質の特異的リガンド識別と検出、情報伝達機構の構造化学」

基盤研究 (B) 平成 21-23 年度 18,900 千円 「ヘム蛋白質のアロステリック効果における情報伝達の構造化学」

基盤研究 (B) 平成 24-26 年度 18,330 千円 「紫外共鳴ラマン分光法によるヘム蛋白質高次構造変化の検出と蛋白質機能制御機構の解明」

水谷泰久：

特定領域研究 平成 19-23 年度 76,030 千円 「時間分解共鳴ラマン分光法によるタンパク質アロステリック機構の動的構造基盤の解明」

特定領域研究 平成 19 年度 1,900 千円 「ガスセンサータンパク質の化学反応と信号伝達」

基盤研究 (B) 平成 20-22 年度 14,700 千円 「タンパク質内エネルギー散逸の時空間マッピング」

挑戦的萌芽研究 平成 21-22 年度 3,100 千円 「タンパク質活性部位近傍構造の部位選択的ダイナミクス観測法の開発」

基盤研究 (B) 平成 23-25 年度 15,600 千円 「タンパク質内エネルギー散逸の時空間分解観測による機構解明」

挑戦的萌芽研究 平成 23-24 年度 3,100 千円 「紫外共鳴ラマン分光法を用いた生細胞中タンパク質の選択的観測法の開発」

内田 毅：

基盤研究 (C) 平成 20-22 年度 4,810 千円 「転写制御因子 NPAS2 が酸化還元または一酸化炭素を利用し転写制御を行う機構の解明」

基盤研究 (C) 平成 24-26 年度 5,590 千円 「病原性細菌の鉄取り込みに関与するタンパク質の構造・機能に関する研究と創薬への応用」

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

北川禎三：

蛋白質の高次構造と機能の構造化学をヘモグロビンとガスセンサー蛋白質に焦点を合わせて研究を展開してきた。ヘモグロビンについては、サブユニット間相互作用を 1 残基レベルの紫外共鳴ラマン分光法できっちり評価し、その相互作用とヘム鉄にかかる張力の関係を構造化学的に調べた。これに基づき、教科書に記載されているヘモグロビン協同的酸素結合の KNF モデルと MWC モデルの何処が実態に合わないかを明らかにする原著論文を *J. Am. Chem. Soc.* 誌に発表すると共に、'Hemoglobin: Recent Developments and Topics' と云う本の 1 チャプターを書いて、世に知らせた。ガスセンサー蛋白質としては、 O_2 に対して細菌の HemAT と大腸菌の DOS, CO に対してはヒト脳の夜昼を識別する NPAS2, NO に対しては血管内皮細胞にある sGC を取り上げ、ヘムに 2 原子分子が結合した時のヘムの構造変化を蛋白質に伝えるメカニズムが、ヘモグロビンとは異なって Fe-His 結合を使わず、ヘム置換基と蛋白質との水素結合ネットワークを使っているらしい事がわかってきた。蛋白質が、大きさのよく似た 2 原子分子を識別するメカニズムには、2 原子分子の化学的特性によるヘムとの相互作用の違いを利用している事が示唆された。これらは、特別推進研究で蓄積された技術と知識を、新しい蛋白質に適用して初めて推論できるようになった。

水谷泰久：

特別推進研究の期間中に開発した、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置は期間終了後も稼働しており、蛋白質の構造ダイナミクスの研究に現在も活用されている。ピコ秒の時間分解能でタンパク質の紫外共鳴ラマンスペクトルを報告した研究グループは、カリフォルニア大学バークレー校のグループと水谷らだけであるが、前者はこれまでに 1 報だけであるのに対し、後者は 8 報をすでに報告しており、この分野でトップを走っている。また、この装置の高性能化によって、蛋白質中に含まれるアミノ酸残基のアンチストークススペクトルをピコ秒の時間分解能で観測することが可能になった。アンチストークス散乱は、一般にラマンスペクトルの測定で対象となるストークス散乱に比べ 2-3 桁弱いため観測が難しい。この困難を克服し、蛋白質中の反応余剰エネルギーの流れをピコ秒の時間分解能と残基単位の空間分解能で調べることができるようになった。この観測ができる研究グループは国際的にみても今のところ水谷らのみである。現在、蛋白質中のさまざまなアミノ酸残基の時間分解アンチストークススペクトルを観測することによって、蛋白質中のエネルギーフローの時空間マッピングを進めている。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

本特別推進研究では、蛋白質の微細な構造変化を振動分光学を用いて検出する新しい手法を開発してきた。その対象は、定常的に存在する蛋白質の静的測定以外に、短寿命の反応中間体や、室温で不安定な化合物も測定できる装置にしているため、色々な金属蛋白質やそのモデル錯体を取り扱う研究者の感心を集め、多くの人がそれを利用してデータを得た。その結果として、生物無機化学という新しい学問分野の一つの核を形成し、Asian Conference on Biological Inorganic Chemistry と云うアジア中心の国際学会を分子科学研究所で創始するに到った。2年に一度のこの会議は平成24年が第6回になり香港で開催されるが、毎回200人近い参加者が集まっている。

分子科学研究所は物理化学の研究所として設立され、生体分子は研究の対象外であった。生体分子について生化学者が知りたいと思っているタイプの情報が、分子科学の手法で得られ、新しい研究展開が出来ることを本研究を通して実際に示したことは、多くの分子科学者の基本的考え方を徐々に変えていった。その結果、分子科学会に生体分子のセクションが設置されるようになり、理論計算の対象としても生体分子が大きく取り上げられるようになった。これは時代の流れであるが、その発端を作ることに本特別推進の研究成果が寄与したことは間違いない。その意味でインパクトは大きかったと考える。

特に本研究で開発した手法は、酸素分子の活性化の研究に非常に有効に使われ、哺乳類の酸素呼吸で酸素分子が水に変えられる全中間体の構造を解明した代表者らの研究結果は、アメリカの生化学の教科書（H. Lodish 著、Molecular Cell Biology, 第4版、日本語訳、野田春彦ら、分子細胞生物学第4版（下）、p.568、図16.26、東京化学同人）に記載されるに到っている。

特別推進研究最終年度に分子科学研究所の外国人評価を受けたが、北川グループは生物無機化学の国際的 COE として高く評価され、その評価結果が兵庫県庁と兵庫県立大学に認められ、「兵庫県科学技術支援センターにこの全装置を受け入れて、この活動を継続する」という判断の基礎になった。特別推進研究より前に北川グループで活躍した小倉尚志博士が、最終年には兵庫県立大学の教授であったので、彼の力で全装置が有効に稼働させられた事が幸運であった。兵庫県立大学生命理学研究科が、文部科学省の GCOE(平成19～23年度)に採択され、この装置の設置されていたところに「ピコバイオロジー研究所」が設立されると共に、大学院リーディングプログラム（平成24～28年度）採択の一つの因子として寄与した。そして、日本の色々な大学だけでなく、韓国の Ehwa Women University の Wonwoo Nam 教授のグループは現在も年に数回、一度に数人が測定に来ている。

分担者の水谷は、現在は阪大理学研究科化学専攻の教授として、研究と教育に携わっているが、その研究に関しては、特別推進研究の時代に手がけた時間分解共鳴ラマン分光の実験手法を発展させている。すなわち、時間分解能を上げピコ秒刻みで測定できるようにし、感度を非常に高めた結果シグナル/雑音比の高いスペクトルを得られるようにした事が、測定結果から推論できることを質的に変えている。更に、プローブ波長を紫外光領域に拡張したことによって、蛋白質中の1アミノ酸残基のスペクトルを観測し、その構造変化やダイナミクスを論じることを可能にしてきた。これは、蛋白質の構造ダイナミクスだけでなく、蛋白質中のエネルギー拡散に関する時空間分解マップというこれまでにない新しい実験データをもたらした。これら他の手法では得難い実験データは、蛋白質の理論研究者にも刺激を与え、水谷らの実験データと照合する理論研究が生まれている。以上のように、質的に新しい実験データを発表してきたことによって、蛋白質の高速ダイナミクスの分野を先導するに至った功績は大きい。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Aono, S.; Kato, T.; Matsuki, M.; Nakajima, H.; Ohta, T.; Uchida, T.; Kitagawa, T., Resonance Raman and ligand binding studies of the oxygen-sensing signal transducer protein HemAT from <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2002 , 277 (16), 13528-13538.	バシラス菌の酸素に向かう走光性を決めるセンサー蛋白質の HemAT を大腸菌で作製し、その共鳴ラマンで Fe-O ₂ , Fe-CO, Fe-His 伸縮振動を決めた。酸素親和性や分光学的性質はミオグロビンに近かった。	53
2	Igarashi, J.; Sato, A.; Kitagawa, T.; Yoshimura, T.; Yamauchi, S.; Sagami, I.; Shimizu, T., Activation of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase 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. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2004 , 279 (16), 15752-15762.	赤血球にあってヘモグロビン合成を制御する蛋白質である HRI は、N 末端側にヘムを持つ。全長の HRI に NO を結合させた状態を、ラマンと EPR で調べた。それは 5 配位の NO-ヘムを持ち、活性は高くなった。ヘム含有部分のみでは、6 配位であった。	45
3	Hiramatsu, H.; Kitagawa, T., FT-IR approaches on amyloid fibril structure. <i>Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics</i> 2005 , 1753 (1), 100-107.	β2 ミクログロブリンのアミロイドフィブリルを顕微フーリエ変換赤外分光法で調べた。アミド I 吸収帯はフィブリル繊維軸方向の偏光特性を示し、アミド II はそれに垂直な偏光特性を示した。	44
4	Uchida, T.; Kitagawa, T., Mechanism for transduction of the ligand-binding signal in heme-based gas sensory proteins revealed by resonance Raman spectroscopy. <i>Accounts of Chemical Research</i> 2005 , 38 (8), 662-670.	遺伝子解析により、バクテリアから哺乳類まで全において 2 原子分子を検出して生理作用を生み出すヘム蛋白質の存在する事がわかった。それらの共鳴ラマンの研究をまとめ、シグナル伝達機構を論じた。	38
5	Aki, M.; Ogura, T.; Naruta, Y.; Le, T. H.; Sato, T.; Kitagawa, T., UV resonance Raman characterization of model compounds of Tyr(244) of bovine cytochrome c oxidase in its neutral, deprotonated anionic, and deprotonated neutral radical forms: Effects of covalent binding between tyrosine and histidine. <i>Journal of Physical Chemistry A</i> 2002 , 106 (14), 3436-3444.	ウシのシトクロム酸化酵素の Tyr ²⁴⁴ -His ²⁴⁰ 部分のモデル化合物として、クレゾールのイミダゾール付加体を合成し、その紫外共鳴ラマンスペクトルや吸収スペクトル、pKa を調べた。	35
6	Uchida, T.; Stevens, J. M.; Daltrop, O.; Harvat, E. M.; Hong, L.; Ferguson, S. J.; Kitagawa, T., The interaction of covalently bound heme with the cytochrome c maturation protein CcmE. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2004 , 279 (50), 51981-51988.	シトクロム c 生合成に関わるヘムシャペロン、CcmE とヘムとの相互作用を共鳴ラマンで調べた。ヘム鉄にヒスチジンとチロシン 134 の配位する構造が中間体として示唆された。	35
7	Sawai, H.; Makino, M.; Mizutani, Y.; Ohta, T.; Sugimoto, H.; Uno, T.; Kawada, N.; Yoshizato, K.; Kitagawa, T.; Shiro, Y., Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin. <i>Biochemistry</i> 2005 , 44 (40), 13257-13265.	サイトグロビンおよびニューログロビンは、グロビンフォールドのヘム蛋白質として 6 配位ヘムをもつことが見出された初めてのタンパク質である。これらのヘム周辺構造を、共鳴ラマン分光法を用いてキャラクタライズした。	33
8	Uchida, T.; Sato, E.; Sato, A.; Sagami, I.; Shimizu, T.; Kitagawa, T., CO-dependent activity-controlling mechanism of heme-containing CO-sensor protein, neuronal PAS domain protein. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2005 , 280 (22), 21358-21368.	ヒト脳にある CO 依存性転写因子の NPAS2 蛋白質 N 末側 PAS-A ドメインを大腸菌で作製し、そのラマンスペクトルを調べた。酸化型でヒスチジンとシステインがヘムに配位する構造が示唆された。	33
9	Okuno, D.; Iwase, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T., FTIR detection of protonation/deprotonation of key carboxyl side chains caused by redox change of the Cu-A-heme a moiety and ligand dissociation from the heme a(3)-Cu-B center of bovine heart cytochrome c oxidase. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2003 , 125 (24), 7209-7218.	ウシのシトクロム酸化酵素のプロトンポンプのゲートとなる Asp ⁵¹ 側鎖の COO ⁻ ⇌ COOH を FTIR で検出、Cu _A -heme-a 部分の酸化還元による変化、Cu _B -heme-a ₃ へのリガンド結合による変化を追跡した。	31
10	Mo, Y. J.; Jiang, D. L.; Uyemura, M.; Aida, T.; Kitagawa, T., 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. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2005 , 127 (28), 10020-10027.	Fe(TPP)Cl を核に持つ 3-5 層のポリアラルエーテル dendrodimer を合成し、赤外線照射によるポルフィリンの温度上昇を Stokes/anti Stokes Raman 強度比で検出した。Fe-Cl 伸縮振動の温度上昇が検出された。	29

【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Sato, A.; Gao, Y.; Kitagawa, T.; Mizutani, Y., Primary protein response after ligand photodissociation in carbonmonoxy myoglobin. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> 2007 , 104 (23), 9627-9632.	ミオグロビン-酸化炭素化合物の CO 光解離後の蛋白質の構造変化を、ピコ秒の時間分解共鳴ラマン分光法で調べた。	29
2	El-Mashtoly, S. F.; Takahashi, H.; Shimizu, T.; Kitagawa, T., Ultraviolet resonance Raman evidence for utilization of the heme 6-propionate hydrogen-bond network in signal transmission from heme to protein in Ec DOS protein. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2007 , 129 (12), 3556-3563.	酸素センサーである、大腸菌の DOS 蛋白質の紫外共鳴ラマンスペクトルを観測した。ヘム第6位のプロピオン酸基に繋がる水素結合ネットワークが、ヘムから蛋白質への情報伝達をしている事がわかった。	11
3	El-Mashtoly, S. F.; Nakashima, S.; Tanaka, A.; Shimizu, T.; Kitagawa, T., Roles of Arg-97 and Phe-113 in regulation of distal ligand binding to heme in the sensor domain of Ec DOS protein - Resonance Raman and mutation study. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2008 , 283 (27), 19000-19010.	大腸菌 DOS 蛋白質におけるヘムへの、リガンド結合の制御にアルギニン-97とチロシン-113が重要な役割を果している事が、部位特異的のアミノ酸置換と共鳴ラマン分光の実験で明らかになった。	11
4	Fujiwara, A.; Mizutani, Y., Photoinduced electron transfer in glucose oxidase: a picosecond time-resolved ultraviolet resonance Raman study. <i>Journal of Raman Spectroscopy</i> 2008 , 39 (11), 1600-1605.	グルコース酸化酵素の光誘起電子移動を調べ、トリプトファン残基が電子供与体であること、電子移動が 1.5 ピコ秒で起きることを明らかにした。	10
5	El-Mashtoly, S. F.; Gu, Y.; Yoshimura, H.; Yoshioka, S.; Aono, S.; Kitagawa, T., Protein conformation changes of HemAT-Bs upon ligand binding probed by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. <i>Journal of Biological Chemistry</i> 2008 , 283 (11), 6942-6949.	酸素センサー蛋白質である HemAT-Bs の、リガンド結合による蛋白質の構造変化を、紫外共鳴ラマン分光法で解明した。	9
6	Mizuno, M.; Shibata, M.; Yamada, J.; Kandori, H.; Mizutani, Y., Picosecond Time-Resolved Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin: Primary Protein Response to the Photoisomerization of Retinal. <i>Journal of Physical Chemistry B</i> 2009 , 113 (35), 12121-12128.	光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシンの光異性化に伴うタンパク質ダイナミクスを調べ、発色団近傍のトリプトファン残基が約 30 ピコ秒の時定数で構造変化することを明らかにした。	9
7	Mizuno, M.; Hamada, N.; Tokunaga, F.; Mizutani, Y., Picosecond protein response to the chromophore isomerization of photoactive yellow protein: Selective observation of tyrosine and tryptophan residues by time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy. <i>Journal of Physical Chemistry B</i> 2007 , 111 (23), 6293-6296.	光センサー蛋白質であるイエロープロテインの光異性化に伴うタンパク質ダイナミクスを調べ、発色団近傍のチロシン残基の水素結合強度が 8 ピコ秒の時定数で変化することを明らかにした。	8
8	Hiruma, Y.; Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., Resonance Raman observation of the structural dynamics of FixL on signal transduction and ligand discrimination. <i>Biochemistry</i> 2007 , 46 (20), 6086-6096.	酸素センサー蛋白質である FixL のリガンド脱離に伴うタンパク質の構造ダイナミクスを調べ、酸素脱離に特異的にみられる構造変化を明らかにした。	7
9	El-Mashtoly, S. F.; Takahashi, H.; Kurokawa, H.; Sato, A.; Shimizu, T.; Kitagawa, T., Resonance Raman investigation of redox-induced structural changes of protein and heme in the sensor domain of Ec DOS protein. <i>Journal of Raman Spectroscopy</i> 2008 , 39 (11), 1614-1626.	大腸菌の酸素センサー蛋白質、Ec-DOS の酸化還元による構造変化を、229 及び 244nm 励起の紫外共鳴ラマンと部位特異的のアミノ酸置換法で調べた。ヘム置換基の構造変化が Trp53, Tyr126, Tyr80 を通じて表面に伝達される事がわかった。	5
10	Pal, B.; Kitagawa, T., Binding of YC-1/BAY 41-2272 to soluble guanylate cyclase: A new perspective to the mechanism of activation. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> 2010 , 397 (3), 375-379.	ウシ肺の可溶性グアニレートシクラーゼのエフェクターによる活性化機構を、現時点での全実験データを見直し、docking simulation 法で計算したところ、エフェクターはαのキャビティに結合してβの Fe-His 結合を切断する事を示唆した。	5

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

本特別推進研究は理学的な基礎研究であり、その研究成果が直接社会に繋がる面は少ない。基礎科学の成果を文化と考えて、社会への還元と考えたい。

酸素分子を水に変換するには 4 当量の電子とプロトンが必要とする。すなわち、中性の酸素分子を 1 当量還元するごとに $O_2 \rightarrow O_2\cdot (HO_2\cdot) \rightarrow O_2^{2-} (HO_2^-, H_2O_2) \rightarrow O\cdot (HO\cdot) \rightarrow H_2O$ (プロトン付加体) と変化していくが、中間体は全部活性酸素と呼ばれる反応性に富んだ分子種で、身体の中に放出されると細胞をこわしてしまう毒物である。生物では、シトクロム c 酸化酵素がそのような分子種を作ることなく、酸素を水に変換する一方で生体エネルギーを生み出している。酵素内でどのような中間体を作りながら酸素を水に変化しているか、全部の中間体(5 種)の酸素の構造を共鳴ラマン分光の研究で解明した。酸素分子は、還元型のシトクロム c 酸化酵素のヘム a₃ の Fe(II) イオンに結合し、Fe(III)-O₂ を作り、そこにシトクロム c から 1 電子が与えられて O-O 結合がヘテロに切断され、Fe(V)=O (P 中間体) が出来、さらに 1 電子が与えられると、Fe(IV)=O (F 中間体)、さらに 1 電子与えられると Fe(III)-OH 中間体、最後にプロトンと電子が与えられて、Fe(II) と H₂O とができる。この事を論文で発表したときは、これまで生化学者が長年信じてきた描像と異なっていたため、すぐには受け入れられなかった。何度も国際学会で討論し、10 年かかってようやく受け入れられたが、それには植物の光合成反応中心の X 線結晶解析でノーベル賞を受賞し後に呼吸酵素の研究に移ってきたミッチェル博士が、総説で我々のラマン分光の結果を紹介し、高く評価してくれたことが大きな力となった。2. でも述べたが、代表者らの解明した中間体の構造の図は、アメリカの生化学の教科書 (H. Lodish ら著、Molecular Cell Biology, 第 4 版、日本語訳、野田春彦ら、分子細胞生物学第 4 版 (下)、p.568、図 16.26、東京化学同人) に記載されるに到っている。世界中で広く用いられている学部レベルの教科書の内容を変えた意義は大きく、社会への還元といえる。

また、代表者は金属蛋白質の働くメカニズムについて、振動分光学を用いて広く調べてきた。「どんな金属イオンが身体の中にあり、どのような働きをしているか？」について、一般市民にわかるように、岡崎市教育委員会が主催した市民講座で講演し、啓発活動に寄与した。2011 年が International Year of Chemistry となり、世界中で化学啓発活動をしたが、その行事の一環としてインドの Tata Institute for Fundamental Research が主催した一般人向けの特別講演会に代表者が招待され、上記の「重金属イオンと身体」の英語版の講演をした。

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）

(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）

分担者：

水谷泰久： 期間中は神戸大学分子フォトサイエンス研究センター助教授として参画し、期間最終年度に大阪大学理学研究科化学専攻の教授に昇進した。

内田 毅： 終了後すぐに北海道大学 大学院理学研究科化学専攻の助教となり、現在に至る。

以下には、特別新研究報告書の論文リストに含まれる著者のうち、北川グループに属していた人達のその後の動向について記す。

助手及び技術補佐員

小倉尚志： 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 教授

長友重紀： 筑波大学 大学院数理物質系 講師

ポスドク

太田雄大： 九州大学 大学院理学研究科 化学専攻助教

平松弘嗣： 東北大学 大学院薬学研究科 助教

中島 聡： 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 准教授

久保 稔： 兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 助教

當舎武彦： 理化学研究所 播磨研究所研究員

Li, Zhengqiang: Professor at Jilin University, Key Laboratory for Molecular Enzymology, China

Varotsis, Constantinos: Professor at Cyprus University of Technology, Cyprus

Mo, Yu-Jun: Professor at Henan University, Physics Department, Kaifeng, China

Gu, Yuzong: Professor at Henan University, Kaifeng, China

Maiti, Nakul, C.: Primary Researcher at Indian Institute of Chemical Biology,

Pal, Biswajit: Research staff at Centre for Cellular and molecular Biology, India.

El-Mashtoly: Samir, F.; Posdoc at Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-universität Bochum, Germany.

学生：

広田 俊：名古屋大学助手、京都薬科大学助教授を経て、現在は奈良先端科学技術大学院大学教授

安藝理彦：富士通研究所ナノテクノロジー研究センター主任研究員

佐藤 亮：オリンパス研究所 研究員

春田奈美：東北大学 大学院理学研究科 生命科学専攻 博士研究員

山本晃司：福井大学 遠赤外領域開発研究センター 准教授

奥野大地：理化学研究所 生命システム研究センター 准教授

長野恭明：JNC 石油化学株式会社 主務

江川 毅：Posdoc at Albert Einstein College of Medicine, U.S.A.

Li, Jiang: Posdoc at Ohio State University, U.S.A

Gao, Ying: Posdoc at Cornell University, U.S.A

Lu, Ming: Assistant professor at Jilin University, Key Laboratory for Molecular Enzymology, China