

# 振動分光学に惹かれて: 塞翁が馬の研究者人生

北川禎三 (兵庫県立大学)

1963 阪大・工・応用化学・卒 燃焼熱測定 → bond energy

大河原研究室

1965 阪大理学大学院へ 宮澤辰雄 先生



# 振動分光学に惹かれて: 塞翁が馬の研究者人生

北川禎三 (兵庫県立大学)

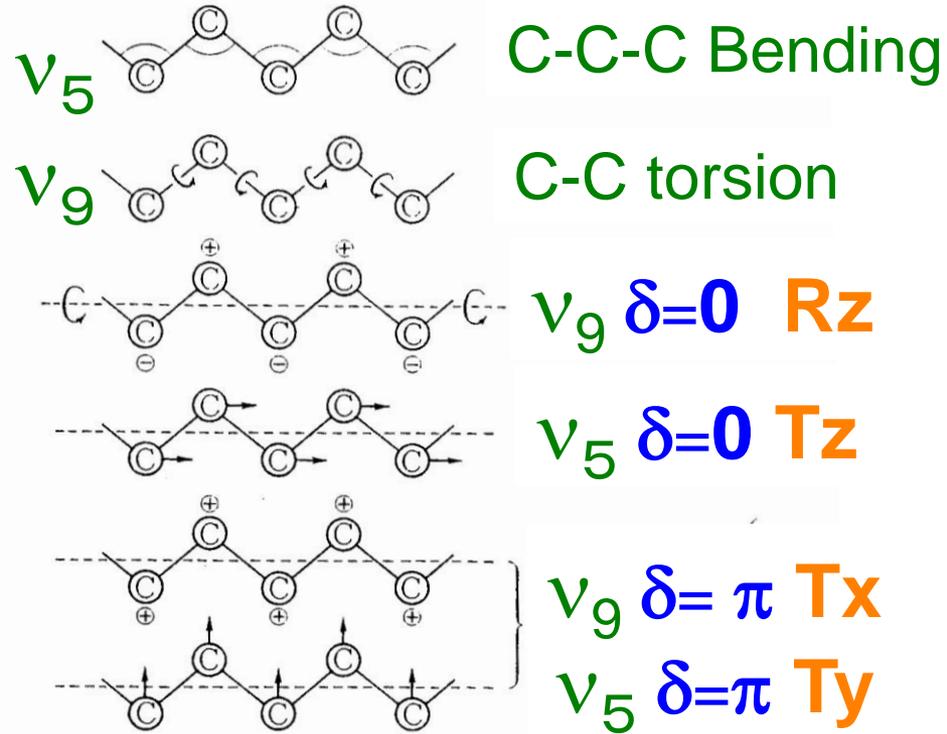
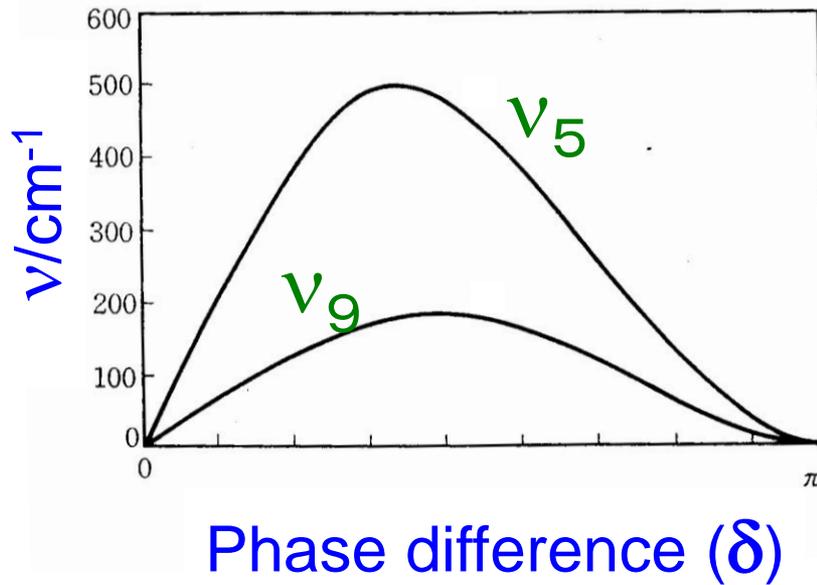
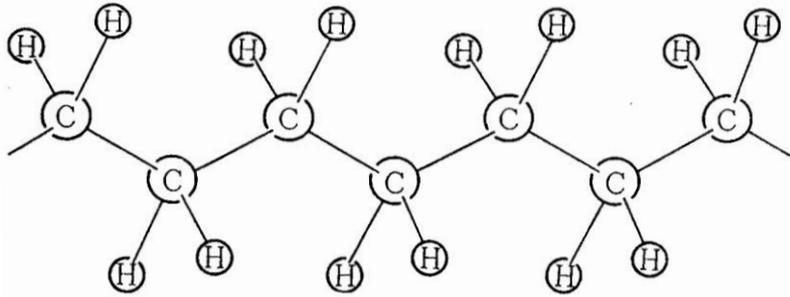
1963 阪大●工●応用化学●卒 燃焼熱測定 → bond energy

宮澤辰雄 先生

1965 阪大●理●無機物理化学●修士  $\text{CH}_3\text{OC}_2\text{H}_5$ の内部回転異性体  
遠赤外分光の実験

1966 阪大蛋白研●助手 ポリエチレン結晶の格子振動と物性

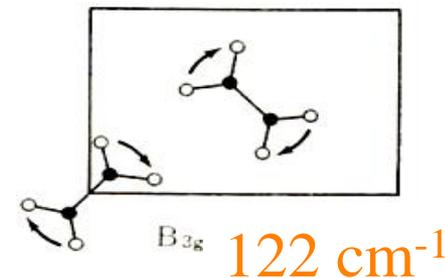
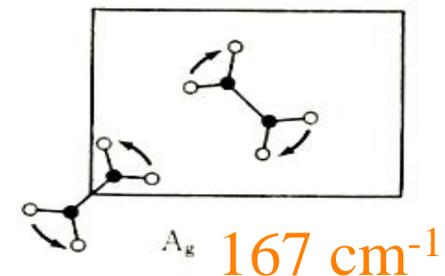
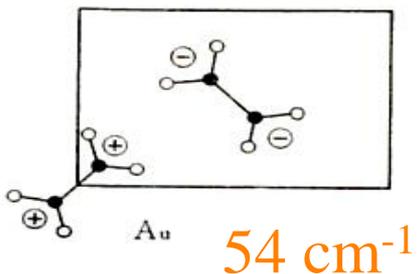
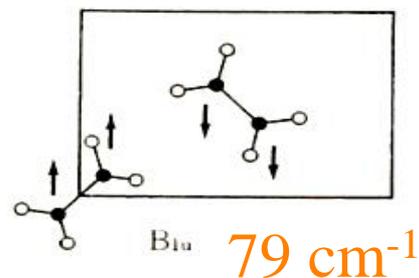
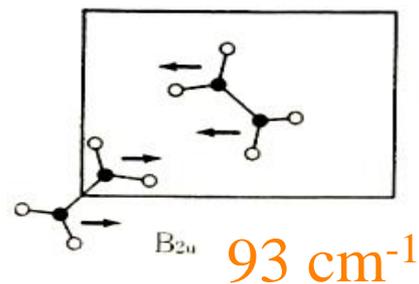
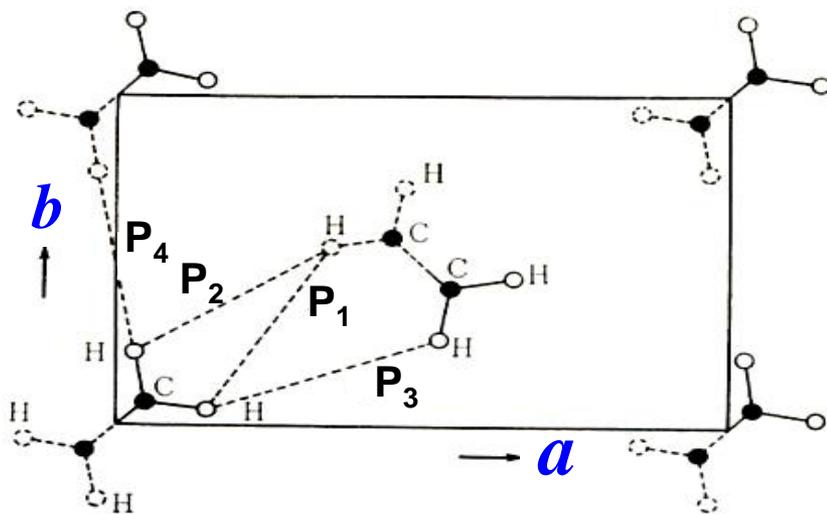
# ポリエチレン分子の振動



# ポリエチレン結晶の格子振動

斜方晶:  $D_{2h}$  対称の結晶

4種の分子間力の導入

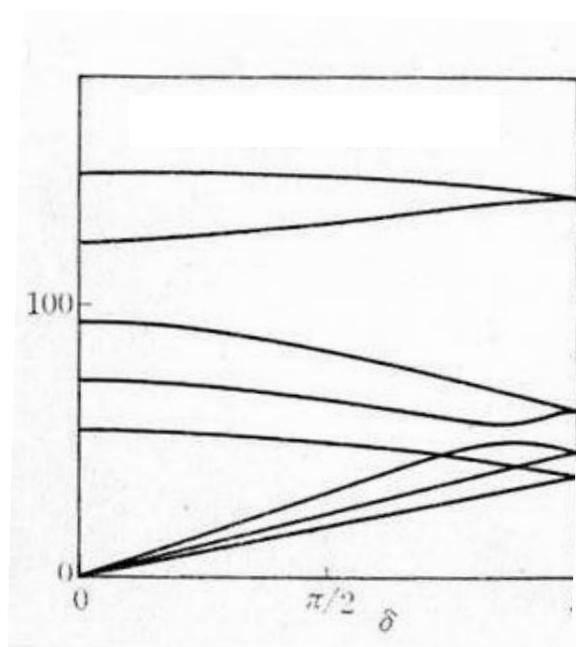


$\Gamma$ 点 ( $\delta a=0, \delta b=0, \delta c=0$ )での振動

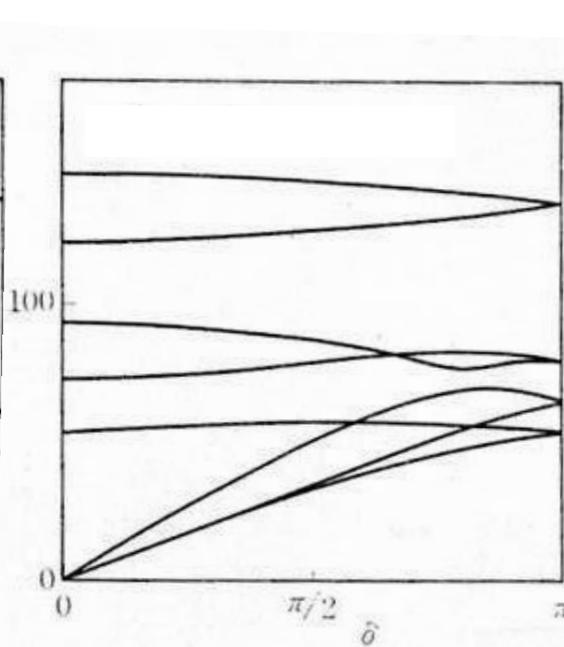
# 振動数 vs 位相差曲線

## 格子振動の分散曲線

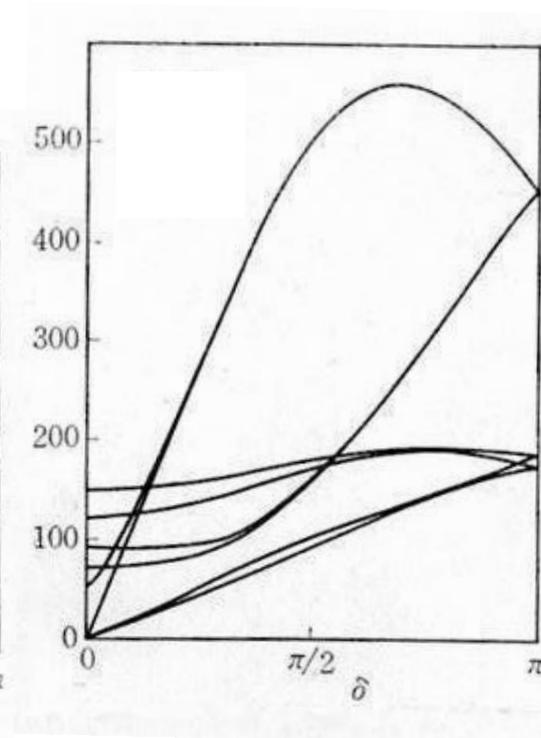
Frequency ( $\nu/\text{cm}^{-1}$ )



$\delta_a = \delta$ ,  $\delta_b = 0$ ,  $\delta_c = 0$

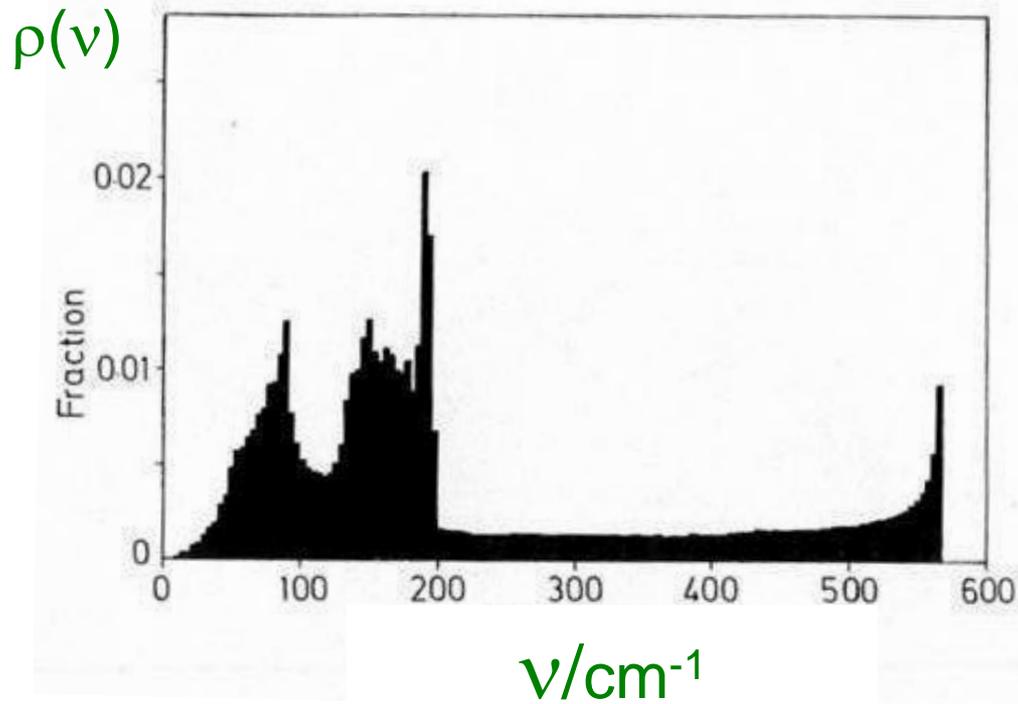


$\delta_a = 0$ ,  $\delta_b = \delta$ ,  $\delta_c = 0$

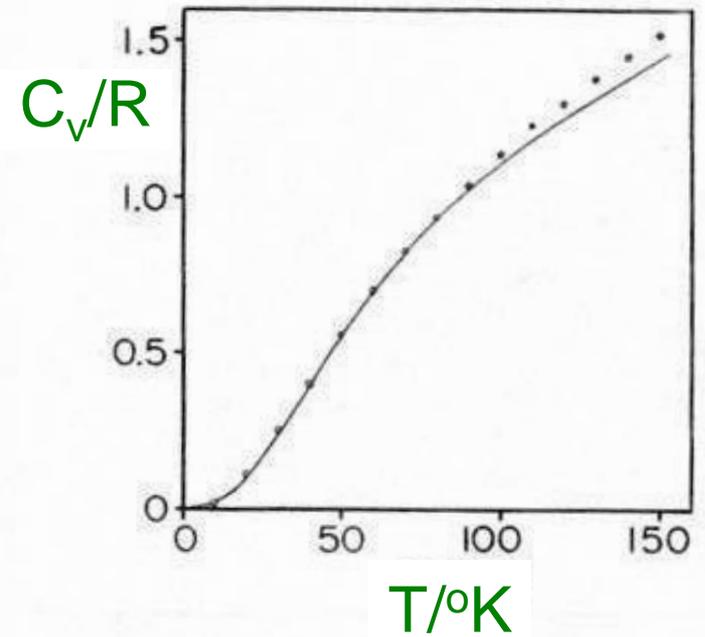


$\delta_a = 0$ ,  $\delta_b = 0$ ,  $\delta_c = \delta$

## ポリエチレン結晶の振動数分布

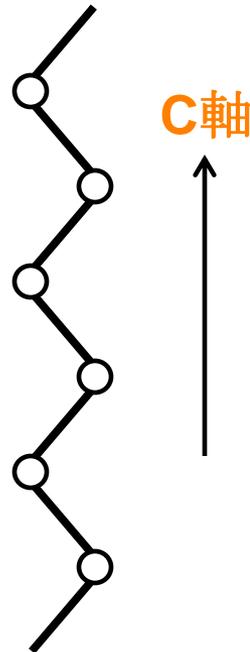
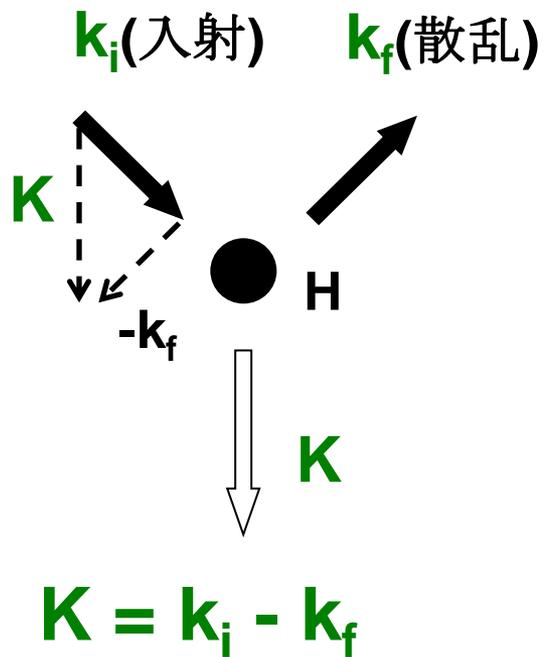


## ポリエチレン結晶の比熱

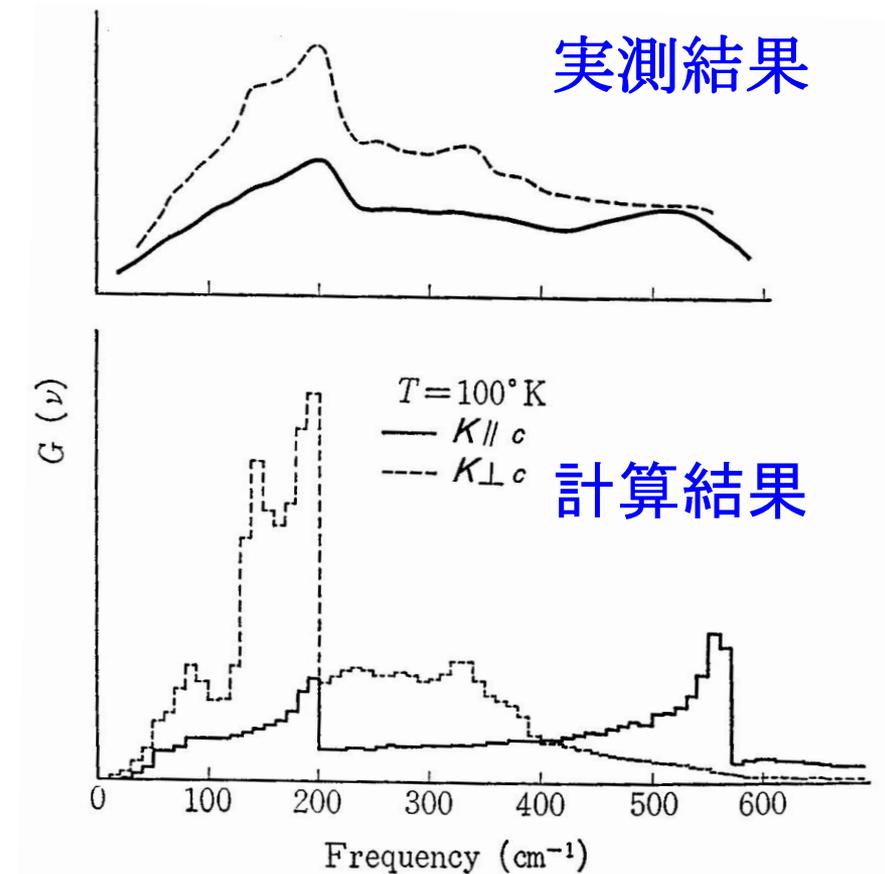


# 振動状態密度の計算結果の実験的検証

中性子非弾性散乱



——  $K \parallel c$   
- - -  $K \perp c$

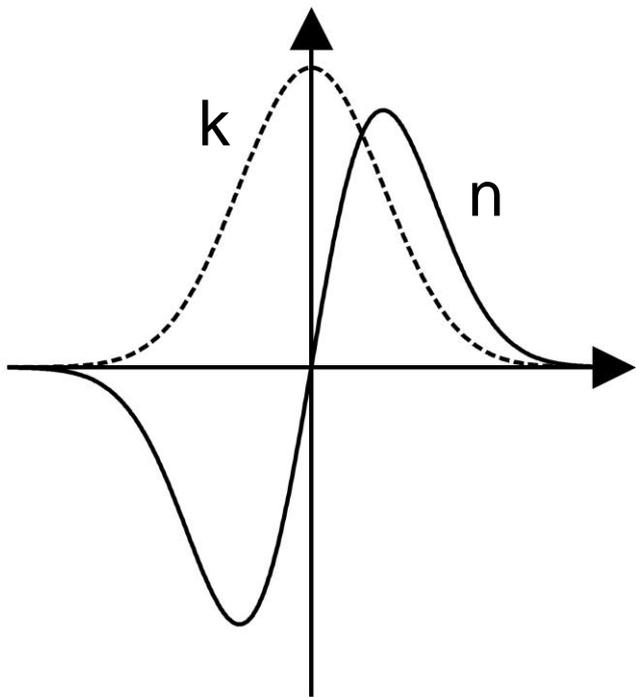


# 振動分光学に惹かれて: 塞翁が馬の研究者人生

## 北川禎三 (兵庫県立大学)

- 1963 阪大●工●応用化学●卒 燃焼熱測定 → bond energy
- 1965 阪大●理●無機物理化学●修士  $\text{CH}_3\text{OC}_2\text{H}_5$ の内部回転異性体  
遠赤外分光の実験
- 1966 阪大蛋白質研●助手 ポリエチレン結晶の格子振動と物性  
宮澤辰雄 先生
- 1971-73 ミネソタ大学 Bryce L. Crawford 教授 液体の分子運動

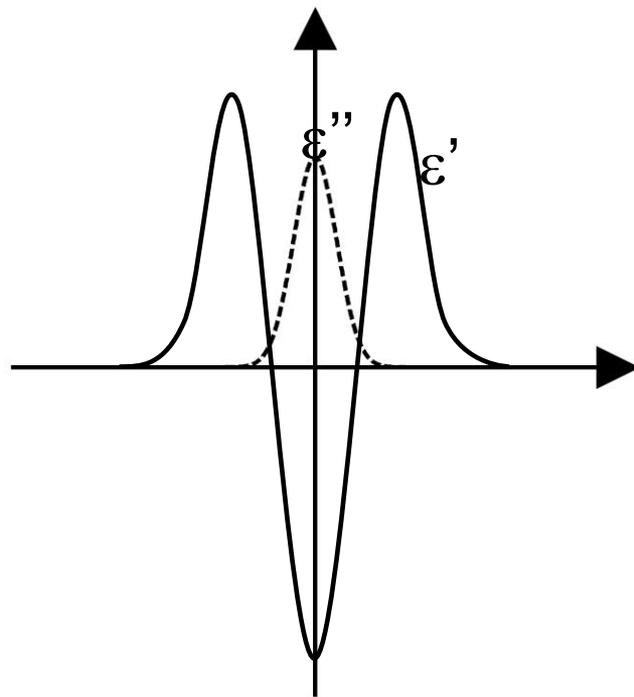
複素屈折率： $n + ik$



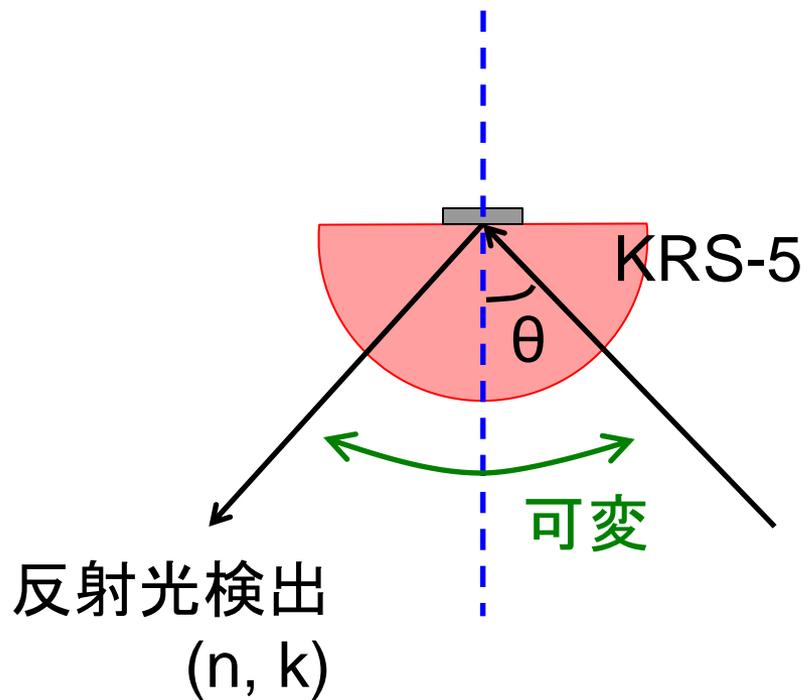
誘電率： $\epsilon' + i\epsilon''$

$$\epsilon' = n^2 - k^2$$

$$\epsilon'' = n k$$

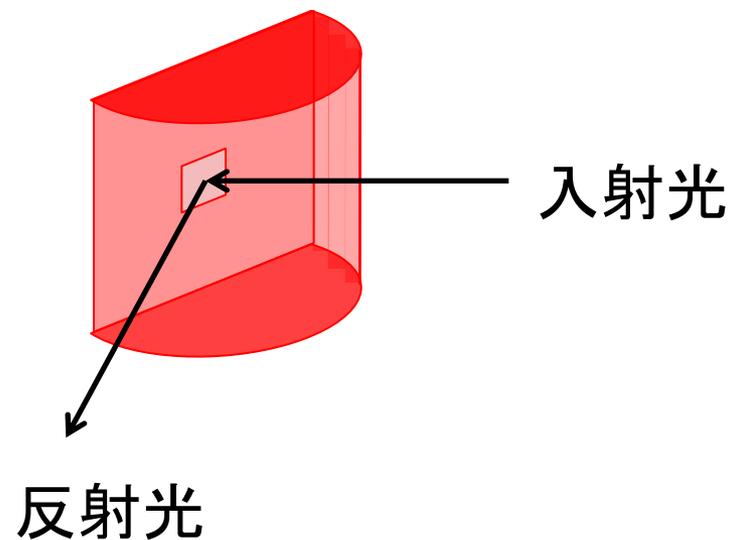


# 内部反射法を利用した液体の $n, k$ の決定



光源  
(分光器)

KRS-5 半円柱



# 振動分光学に惹かれて: 塞翁が馬の研究者人生

## 北川禎三 (兵庫県立大学)

- 1963 阪大・工・応用化学・卒 燃焼熱測定 → bond energy
- 1965 阪大・理・無機物理化学・修士  $\text{CH}_3\text{OC}_2\text{H}_5$ の内部回転異性体  
遠赤外分光の実験
- 1966 阪大蛋白質研・助手 ポリエチレン結晶の格子振動と物性  
宮澤辰雄 先生
- 1971-73 ミネソタ大学 Bryce L. Crawford 教授 液体の分子運動
- 1973 帰国 (京極好正教授) 転職か分野転換

# 帰国後の仕事

Bence-Jonesのラマン

浜口浩三 先生

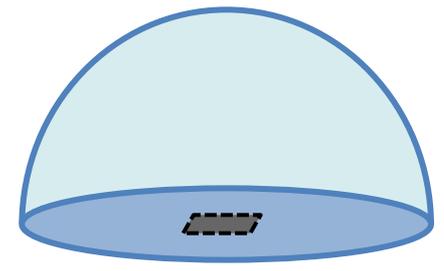
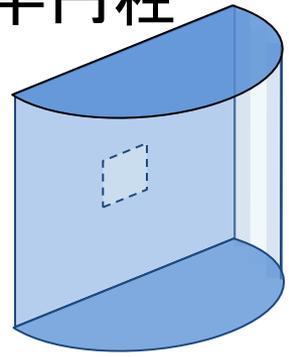
Poly(dA)-Poly(dT)2重ラセンのラマン

G. J. Thomas

内部反射法を利用した  
ミオグロビン単結晶の共鳴ラマン測定

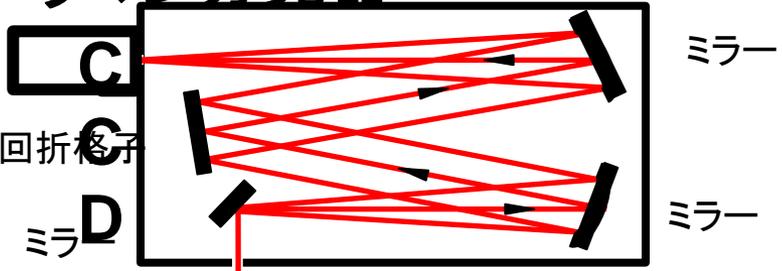
飯塚哲太郎先生

ガラス半円柱



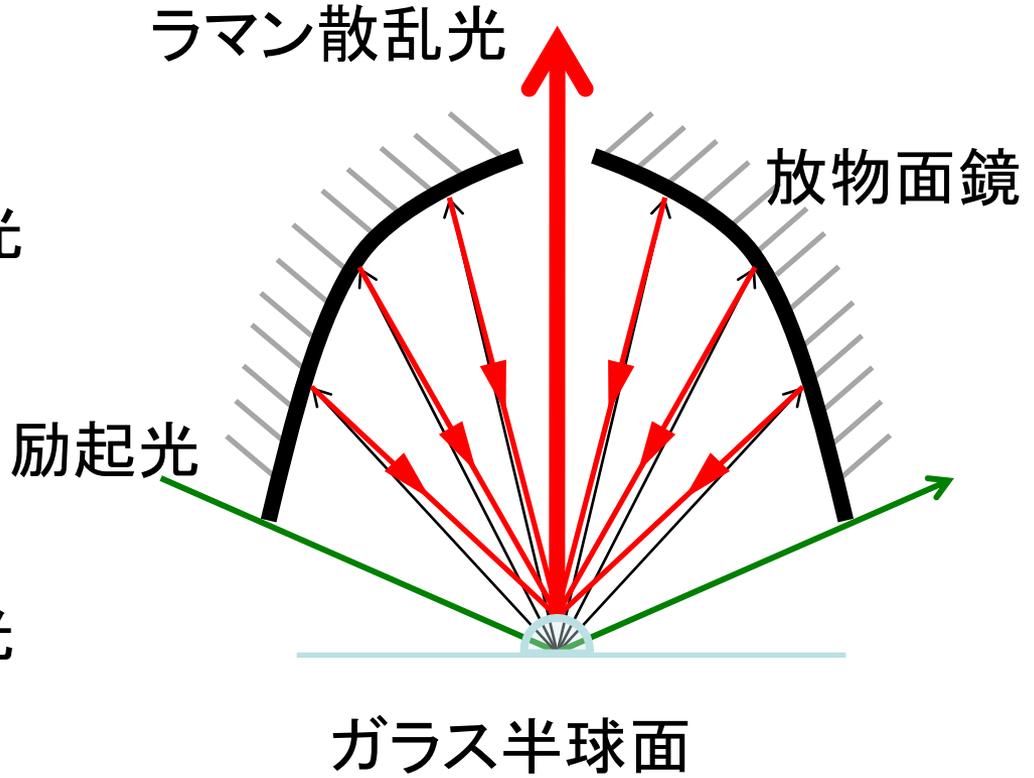
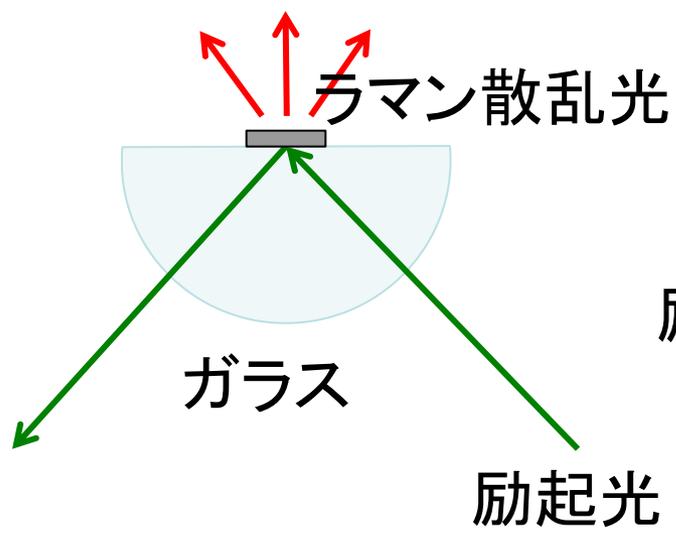
ガラス半球面

ラマン分光器



ラマン散乱光

ラマン散乱光



# 帰国後の仕事

Bence-Jonesのラマン

浜口浩三 先生

Poly(dA)-Poly(dT)2重ラセンのラマン

G. J. Thomas

内部反射法を利用した  
ミオグロビン単結晶の共鳴ラマン測定

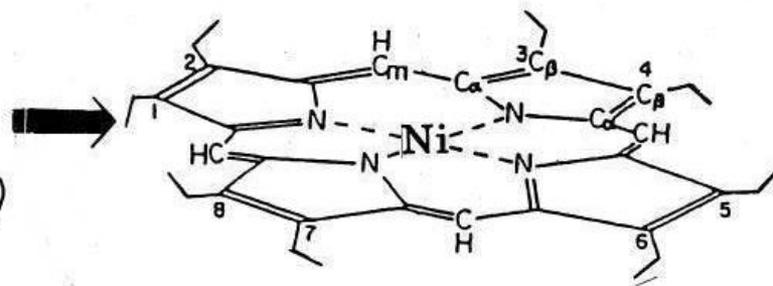
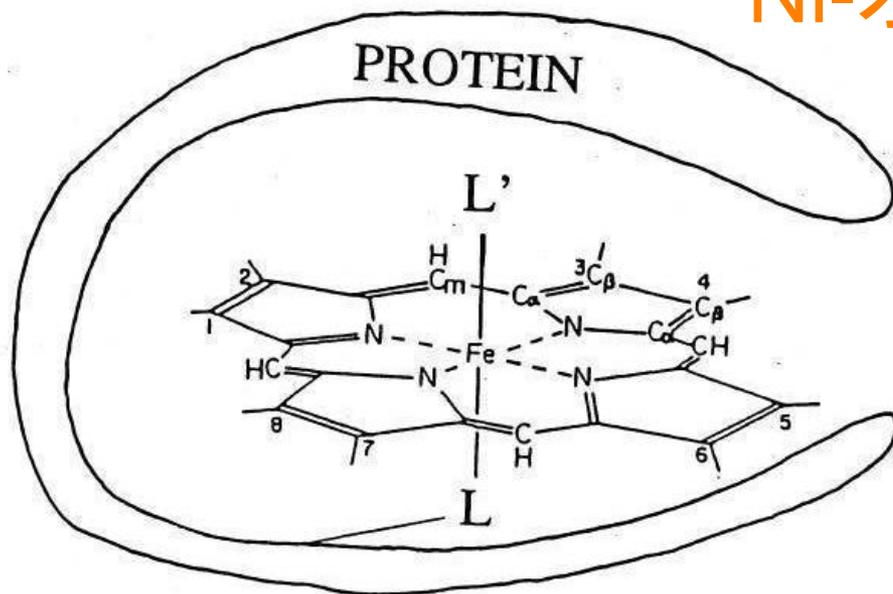
飯塚哲太郎先生

Ni-ポルフィリンの共鳴ラマン

生越久靖 先生

# ヘム蛋白質中の 鉄ポルフィリン

# モデル化合物としての Ni-オクタエチルポルフィリン

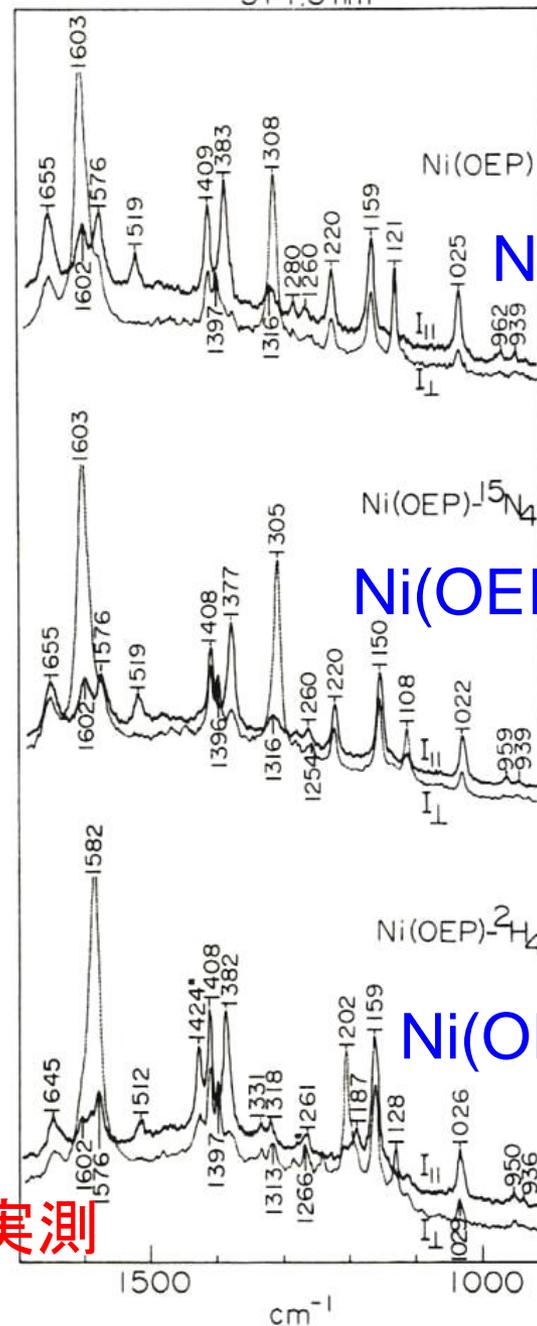
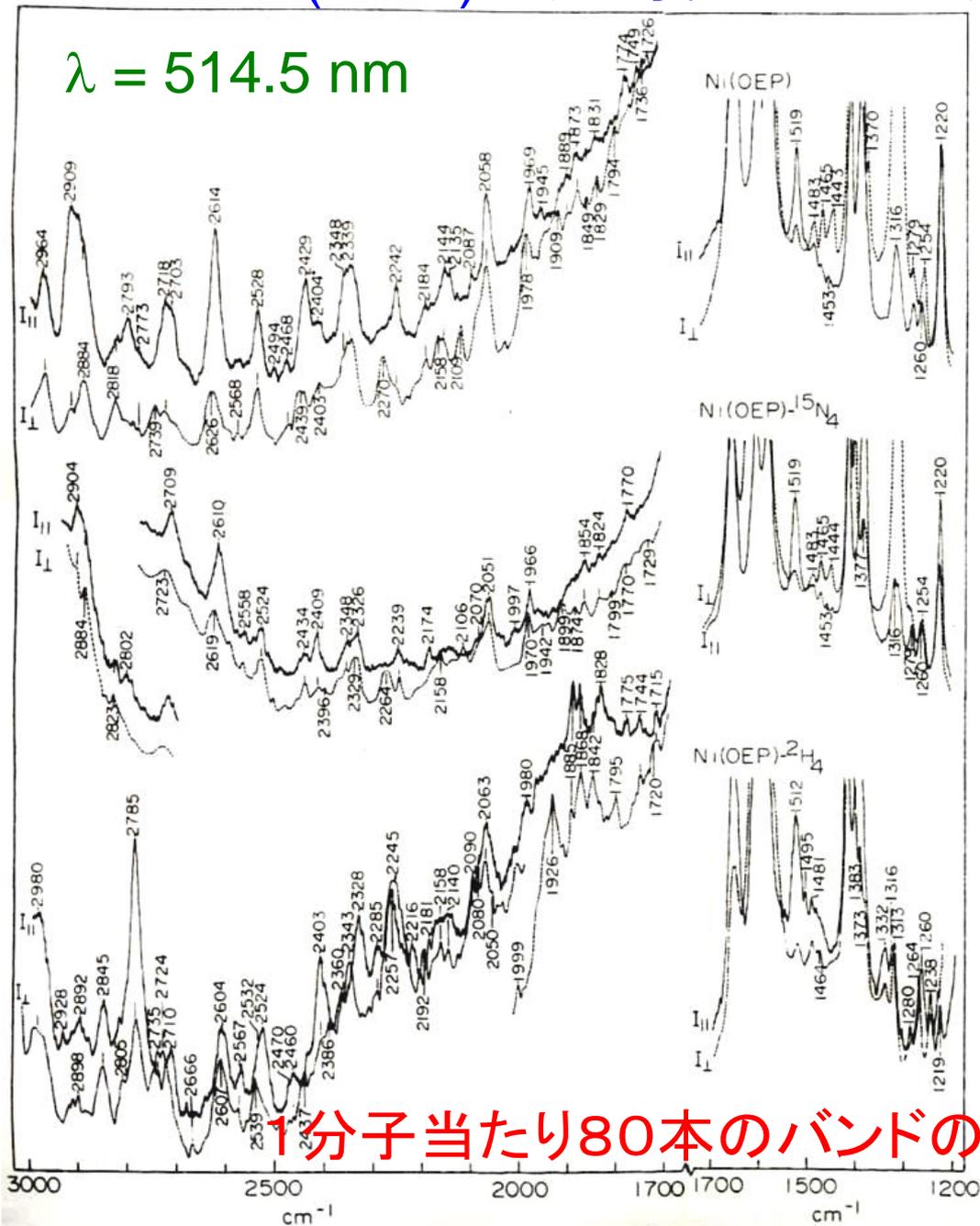


$^{15}\text{N}$  置換体  
 $\text{C}_m\text{D}$  置換体

# Ni(OEP)の共鳴ラマンスペクトル

514.5 nm

$\lambda = 514.5 \text{ nm}$



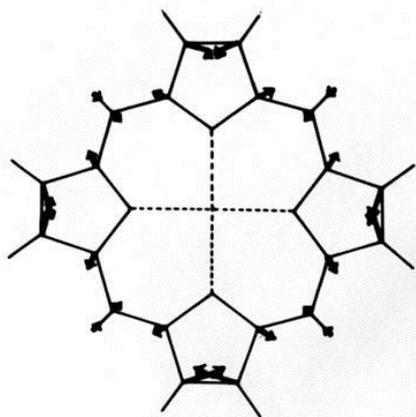
1分子当たり80本のバンドの実測

Ni(OEP)

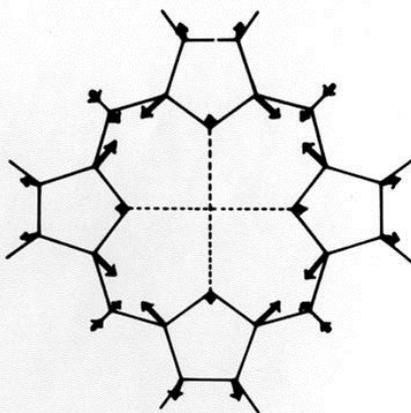
Ni(OEP)-<sup>15</sup>N<sub>4</sub>

Ni(OEP)-D<sub>4</sub>

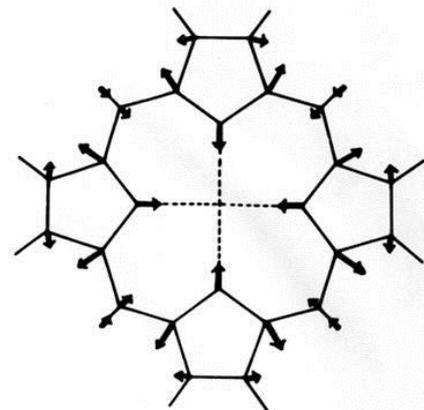
# ヘム蛋白マーカークバンドの振動モード



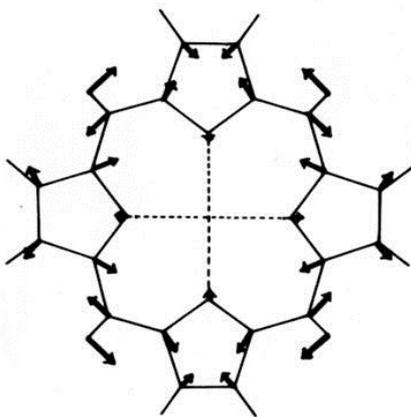
$\nu_2$  1602  
Core Size



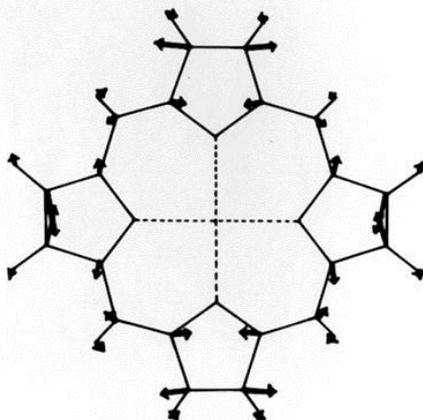
$\nu_3$  1519  
Coordination Number



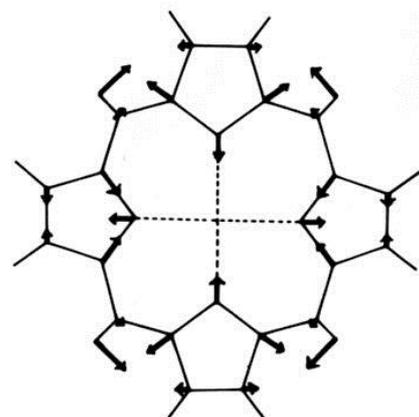
$\nu_4$  1383  
Oxidation State



$\nu_{10}$  1655



$\nu_{11}$  1576



$\nu_{12}$  —

# 1988年以前の研究

- 金属ポルフィリンの共鳴ラマンバンドの帰属およびスペクトルと物性との相関
- ヘム蛋白質の共鳴ラマンバンドの帰属およびスペクトルの特徴の構造との相関
- ヘモグロビンの鉄-ヒスチジン伸縮振動バンドの帰属とその4次構造依存性
- ペルオキシダーゼ反応中間体におけるFe(IV)=O伸縮振動バンドの検出と反応機構の解明

Spiroらによる引用

*J. Phys. Chem.* **94**, 47 (1990)

## Introduction

Nickel octaethylporphyrin (NiOEP) has played a key role in the characterization of heme proteins by resonance Raman (RR) spectroscopy.<sup>1,2</sup> Like all physiological porphyrins, OEP has carbon substituents at the eight pyrrole positions, and it retains the 4-fold symmetry of the porphyrin skeleton (neglecting questions of ethyl orientation), so that symmetry considerations can be brought fully to bear on the vibrational analysis. Kitagawa and co-workers<sup>3</sup> carried out an important base-line study of NiOEP using <sup>15</sup>N and meso-d<sub>4</sub> isotope shift data to assign most of the in-plane skeletal modes of the porphyrin ring in a consistent fashion, and they carried out a normal-coordinate calculation with a modified Urey-Bradley force field. They assumed that the ethyl substituents were isolated from the porphyrin electronic system and did not contribute directly to the RR spectra; the substituents were in fact treated as point masses. While this was a reasonable starting approximation, there have since been indications that it

# 帰国後の仕事

Bence-Jonesのラマン

浜口浩三 先生

Poly(dA)-Poly(dT)2重ラセンのラマン

G. J. Thomas

内部反射法を利用した  
ミオグロビン単結晶の共鳴ラマン測定

飯塚哲太郎先生

Ni-ポルフィリンの共鳴ラマン

生越久靖 先生

ヘモグロビンの4次構造変化の検出

森本英樹研究室

# ヘム蛋白の生物物理

ヘム蛋白のEPRスペクトル 飯塚 哲太郎(阪大・基礎工)

ヘム蛋白のNMR 森島 績 (京大・工)

ペルオキシダーゼ 山崎勇夫 (北大・応電研)

田村 守

ヘモグロビン 米谷 隆(ペンシルバニア大)

チトクロムP450 石村 巽 (慶大・医)

チトクロム酸化酵素 折井 豊 (阪大・理)

共鳴ラマンの共同研究者:

ミオグロビン

Fe-His伸縮バンド

Fe-Im伸縮バンドの帰属

ヘモグロビン四次構造

チトクロムP450の異常性

Fe(I)ポルフィリンのラマン

チトクロム酸化酵素のラマン

齋藤正男

鰐木基成

堀 洋

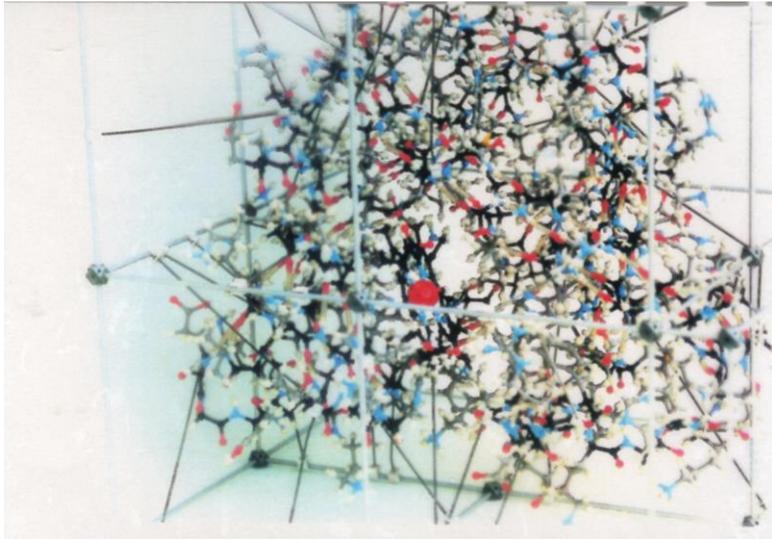
長井 潔

尾崎幸洋

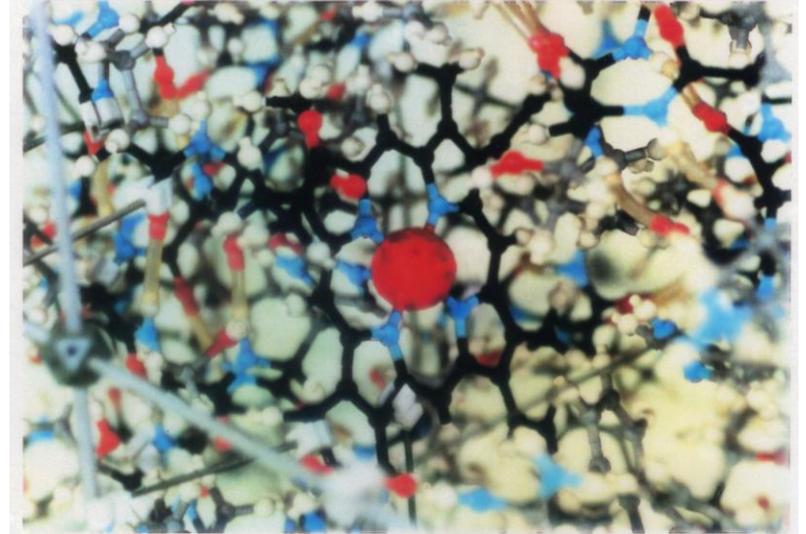
寺岡淳二

小倉尚志

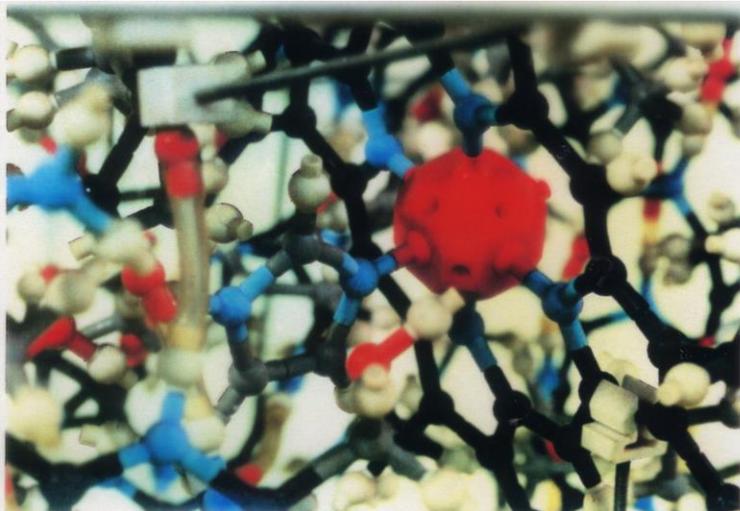
## ミオグロビン分子の全体像



## ヘムのみを拡大して見る



## Fe-His結合に注目



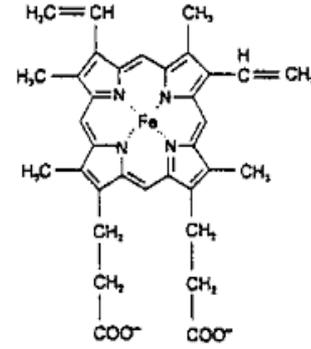
NMR、ラマン

EPR、ラマン、 $\gamma$ 線分光

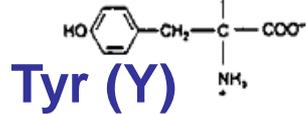
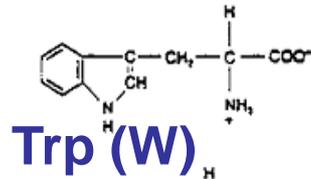
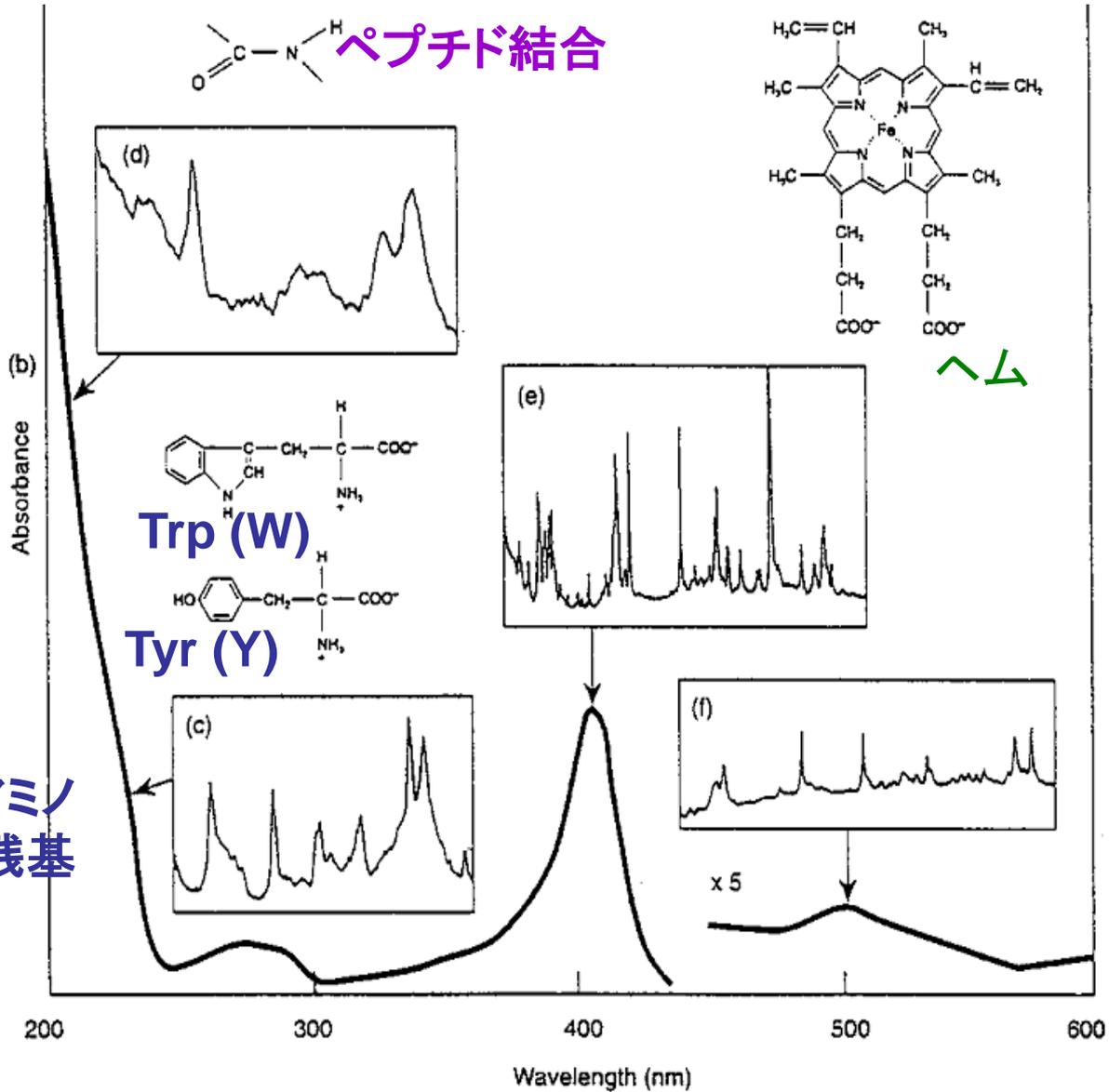
# ヘム蛋白質の共鳴ラマンスペクトル



ミオグロビン



ヘム

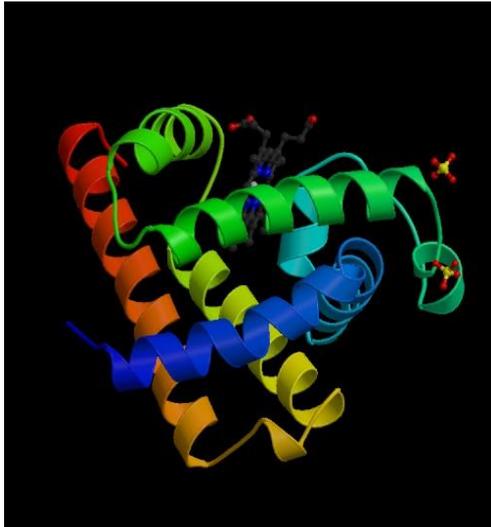


芳香族アミノ酸残基

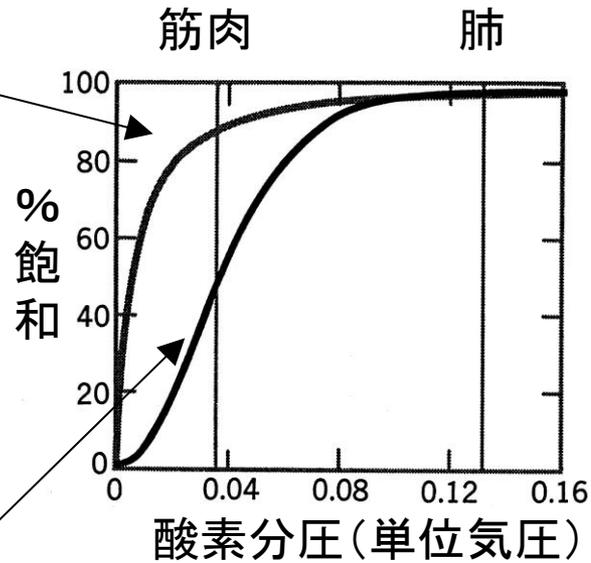
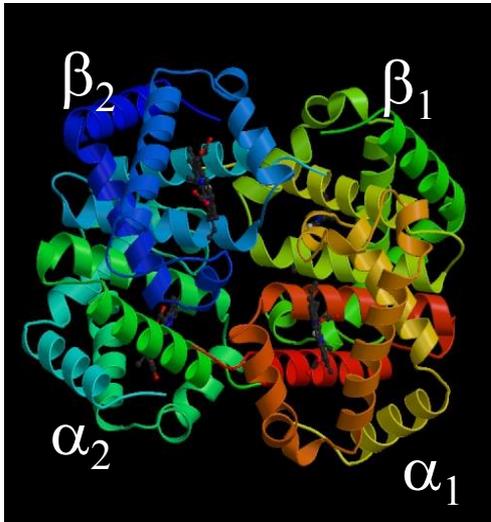
共鳴効果による分子振動の選択的観測.

# 高次構造変化と生理機能

## ミオグロビン



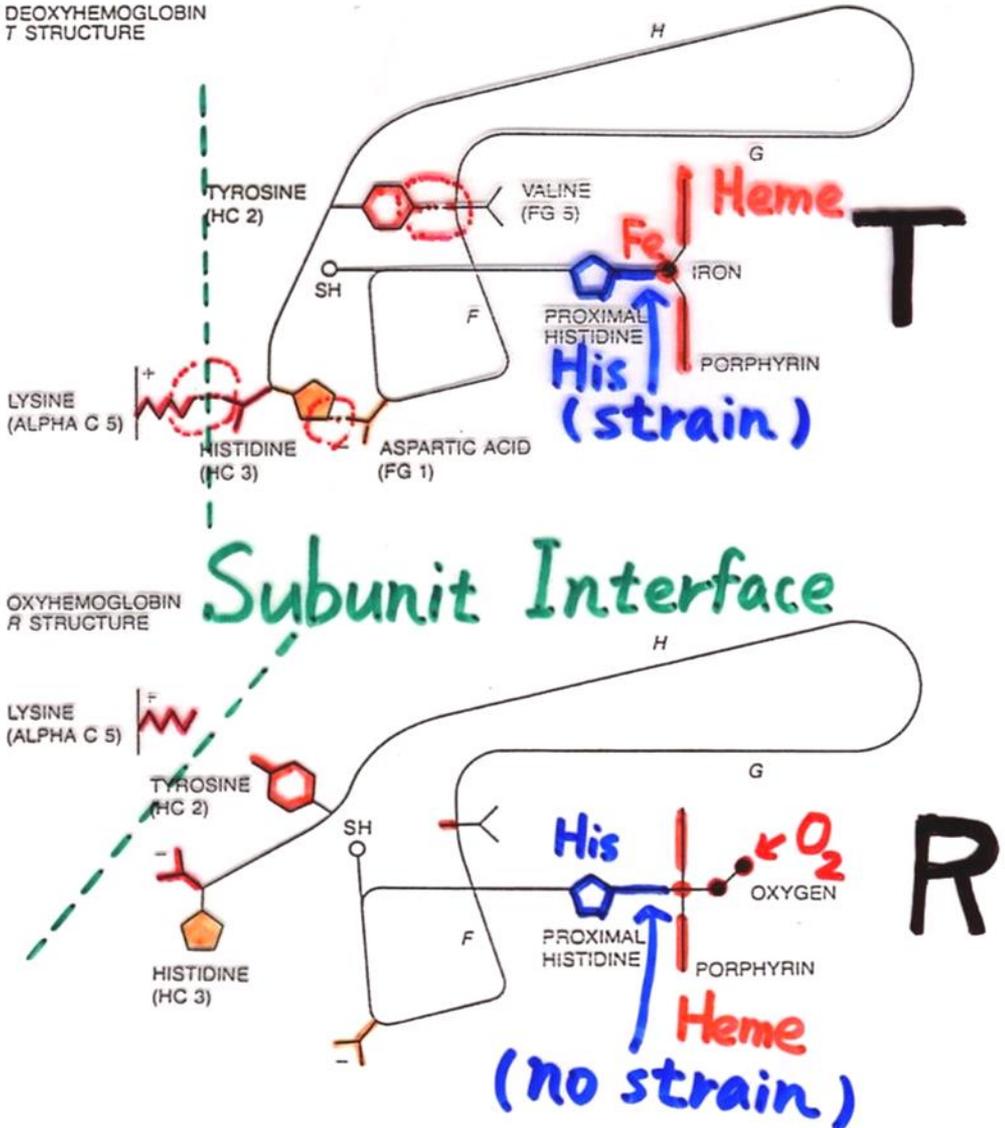
## ヘモグロビン



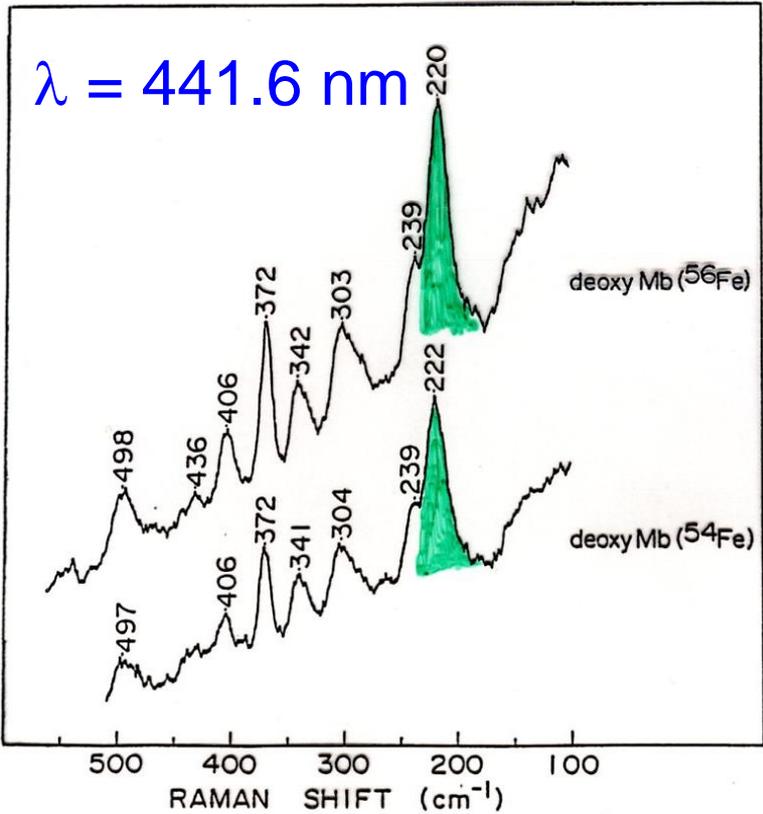
$$\text{Hb} = (\text{Mb}) \times 4 + ?$$

蛋白質の高次構造により新たな機能が付加

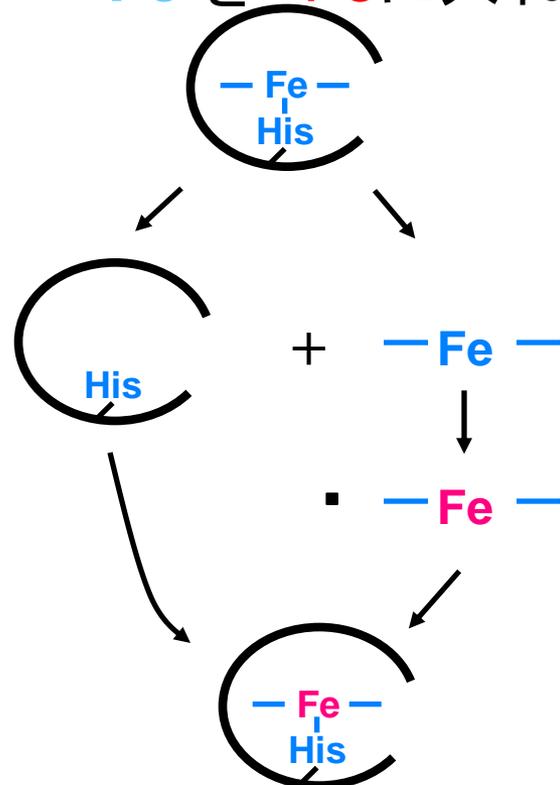
# Perutz's Model



# deoxyMbの共鳴ラマンスペクトル



<sup>56</sup>Fe を <sup>54</sup>Fe に入れ替え



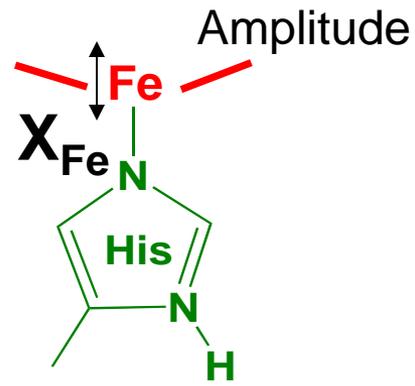
$$\langle X_{Fe}^2 \rangle_T = \frac{h(\nu_0 + \nu) \Delta \nu m [1 + \exp(-h\nu_0/kT)]}{8\pi^2 \nu_0^3 c \Delta m m_0 [1 - \exp(-h\nu_0/kT)]}$$

(T. Miyazawa, J. Mol. Spectrsc. 13, 321 (1964))

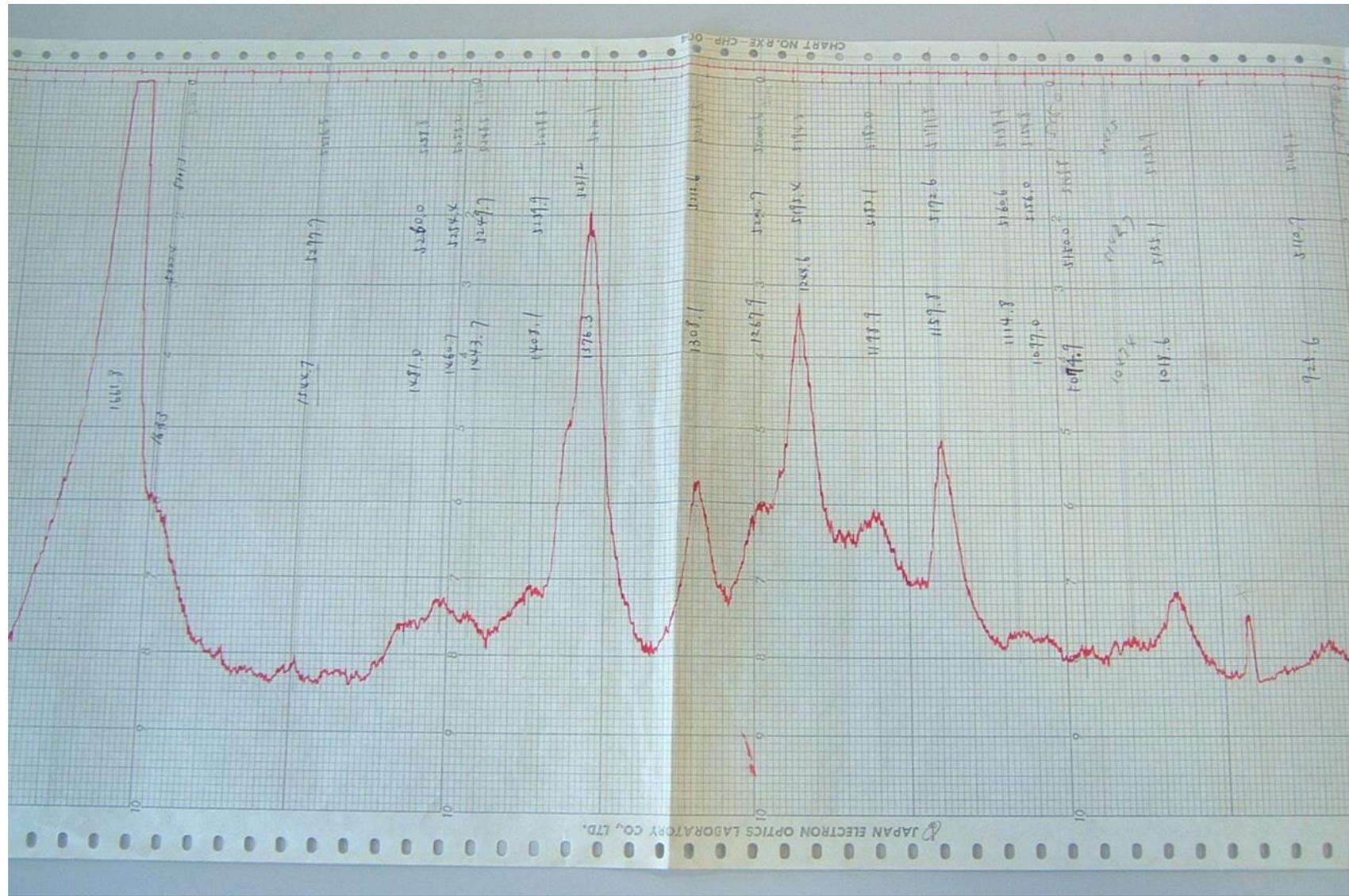
$$\left. \begin{array}{l} \nu_0 = 220 \text{ cm}^{-1} \text{ for } ^{56}\text{Fe} \\ \nu = 222 \text{ cm}^{-1} \text{ for } ^{54}\text{Fe} \end{array} \right\} \longrightarrow X_{Fe} = 0.037 \text{ \AA} \text{ at } 288 \text{ K}$$

$$K_{Fe-His} = 0.87 \text{ mdyne/\AA}$$

Vibrational

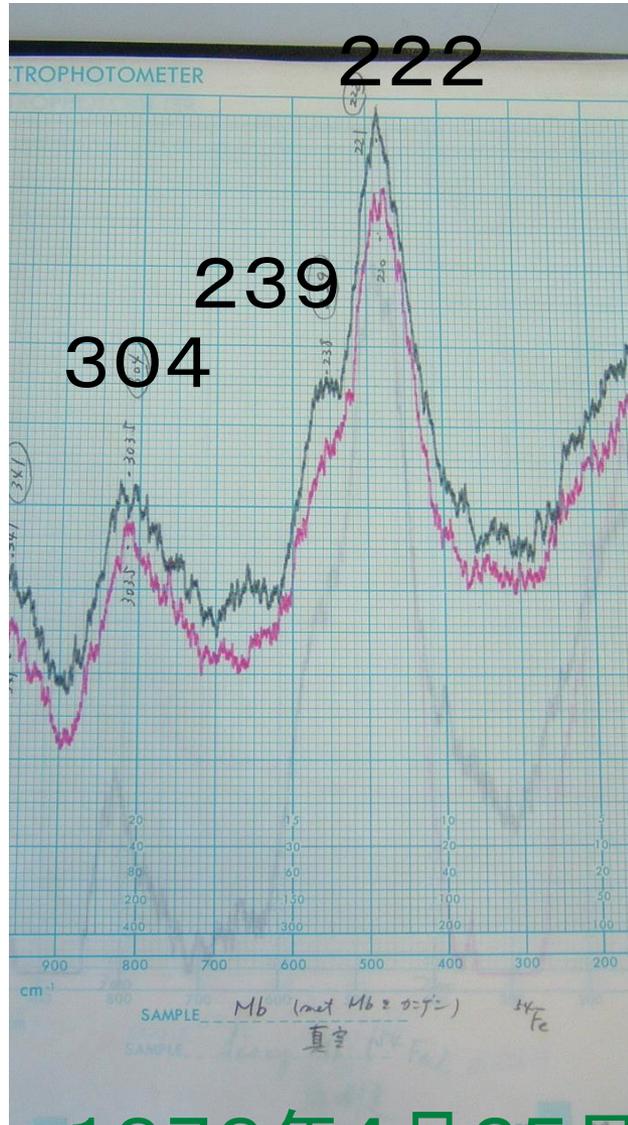


# 日本電子U1ラマン分光器による測定データ



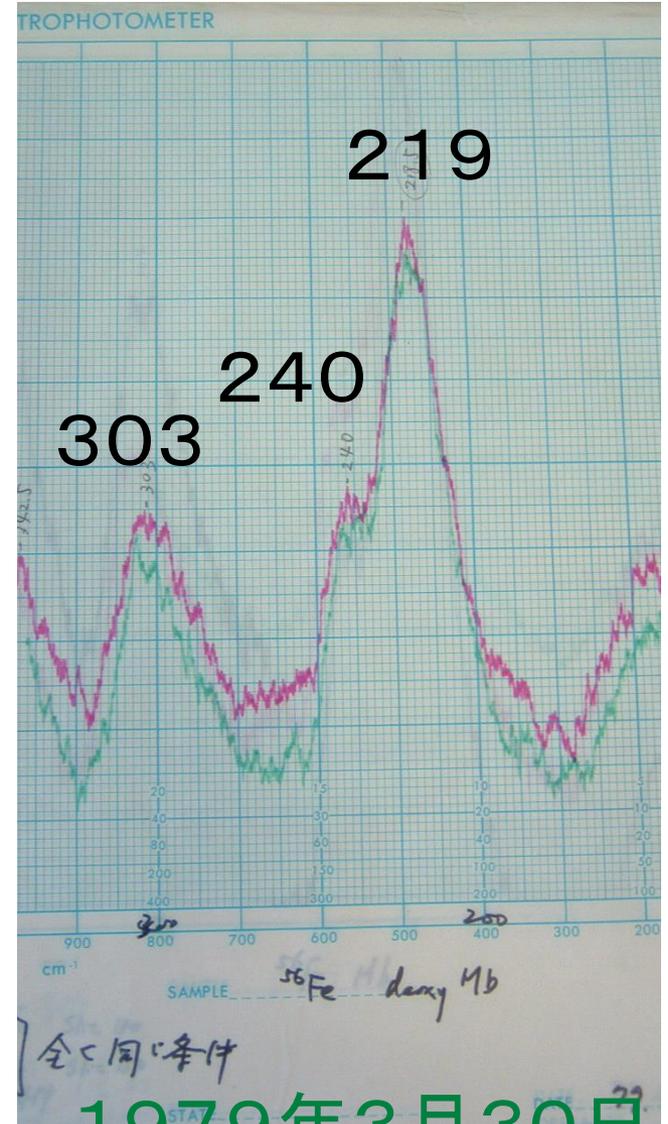
# deoxyMbのFe-His 伸縮振動ラマン線の帰属

**$^{54}\text{Fe}$**



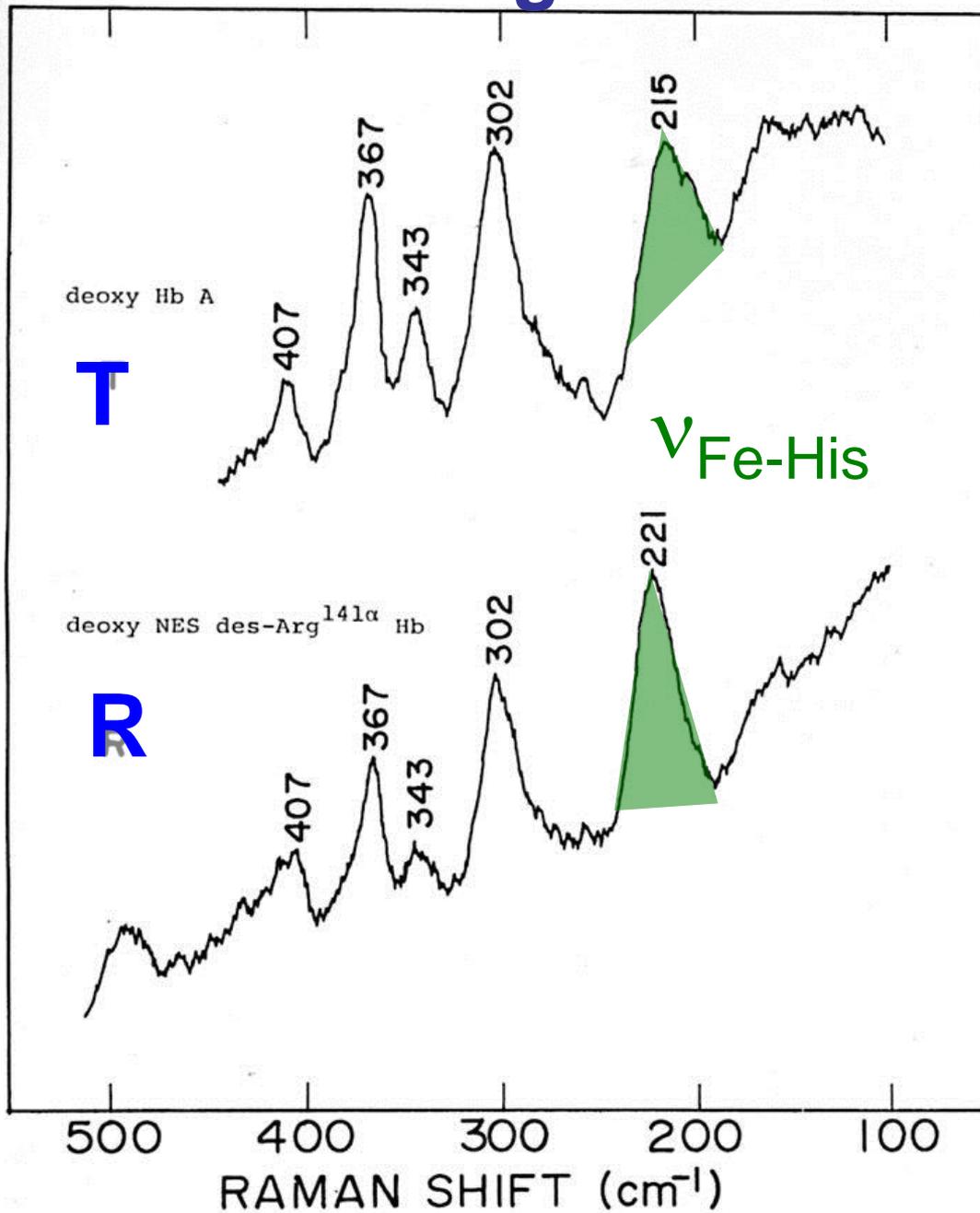
1979年4月25日

**$^{56}\text{Fe}$**



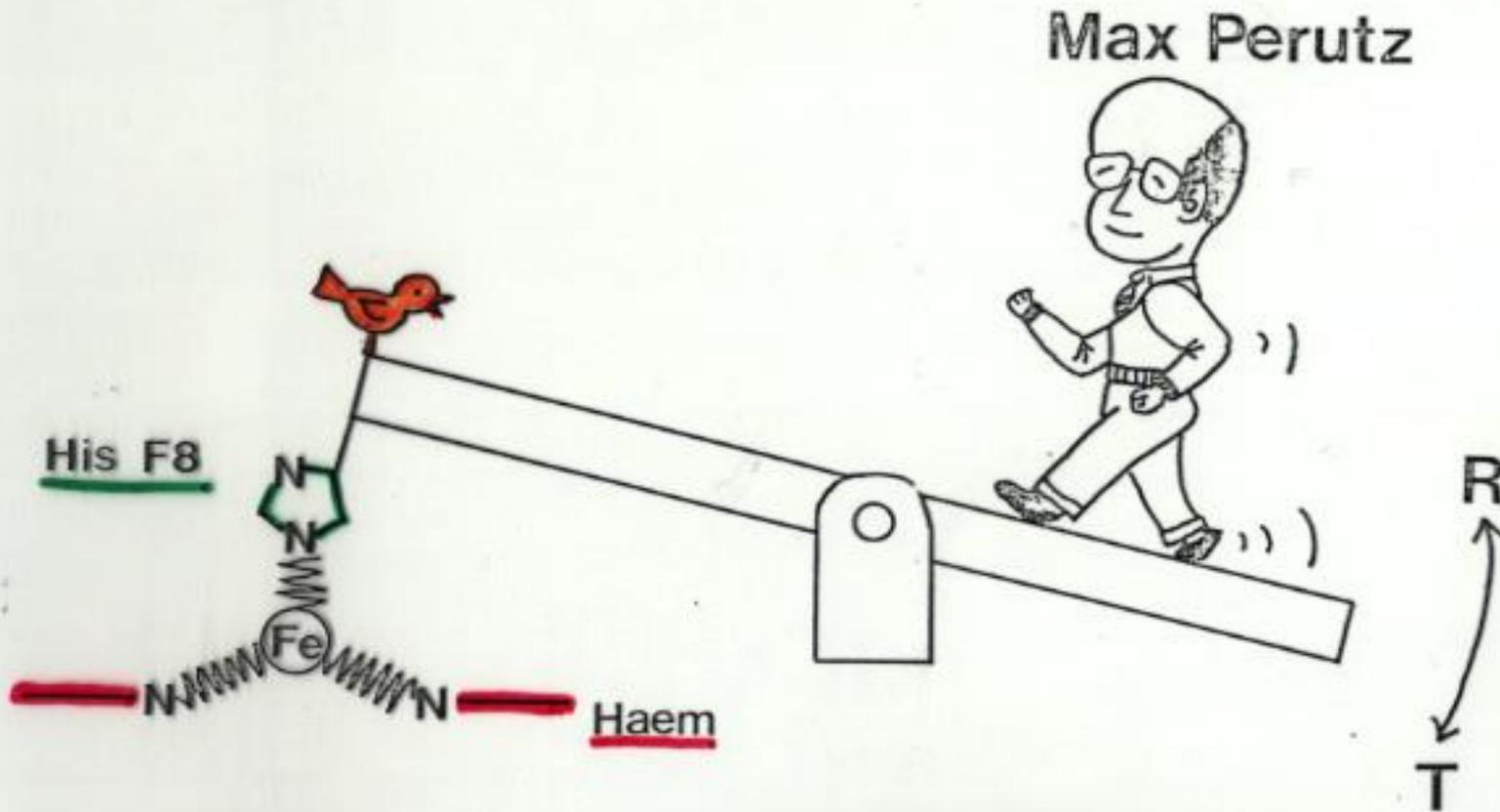
1979年3月30日

# Hemoglobin



TとRはFe-His伸縮  
振動数のみが違い、  
他は変わらない

# へム間相互作用のPerutzモデル



四次構造シーソー

$\nu_{\text{Fe-His}}$  and  $K_1$  of various hemoglobins

Name/Conditions	$\nu_{\text{Fe-His}}$ a)	$K_1$ b)
Hb A/pH 7.0, +IHP	214.5	138
Hb J Capetown/pH 7.0, +IHP	214.5	58
Hb Chesapeake/pH 7.0, +IHP	214	37.1
Hb Yakima/pH 7.0, +IHP	216	26.9
Hb Kempsey/pH 7.0, +IHP	217	17.1
Hb Hirose/pH 7.0, +IHP	218	11.5
Hb A/pH 8.5, $-\text{Cl}^-$	218	5.0
Hb Chesapeake/pH 8.5, $+\text{Cl}^-$	220	1.21
Hb J Capetown/pH 8.5, $-\text{Cl}^-$	220	1.0
Hb Chesapeake/pH 8.5, $-\text{Cl}^-$	222	0.60
$\alpha$ chain	223	0.6
$\beta$ chain	224	0.34

a)  $\text{cm}^{-1}$

b) mmHg

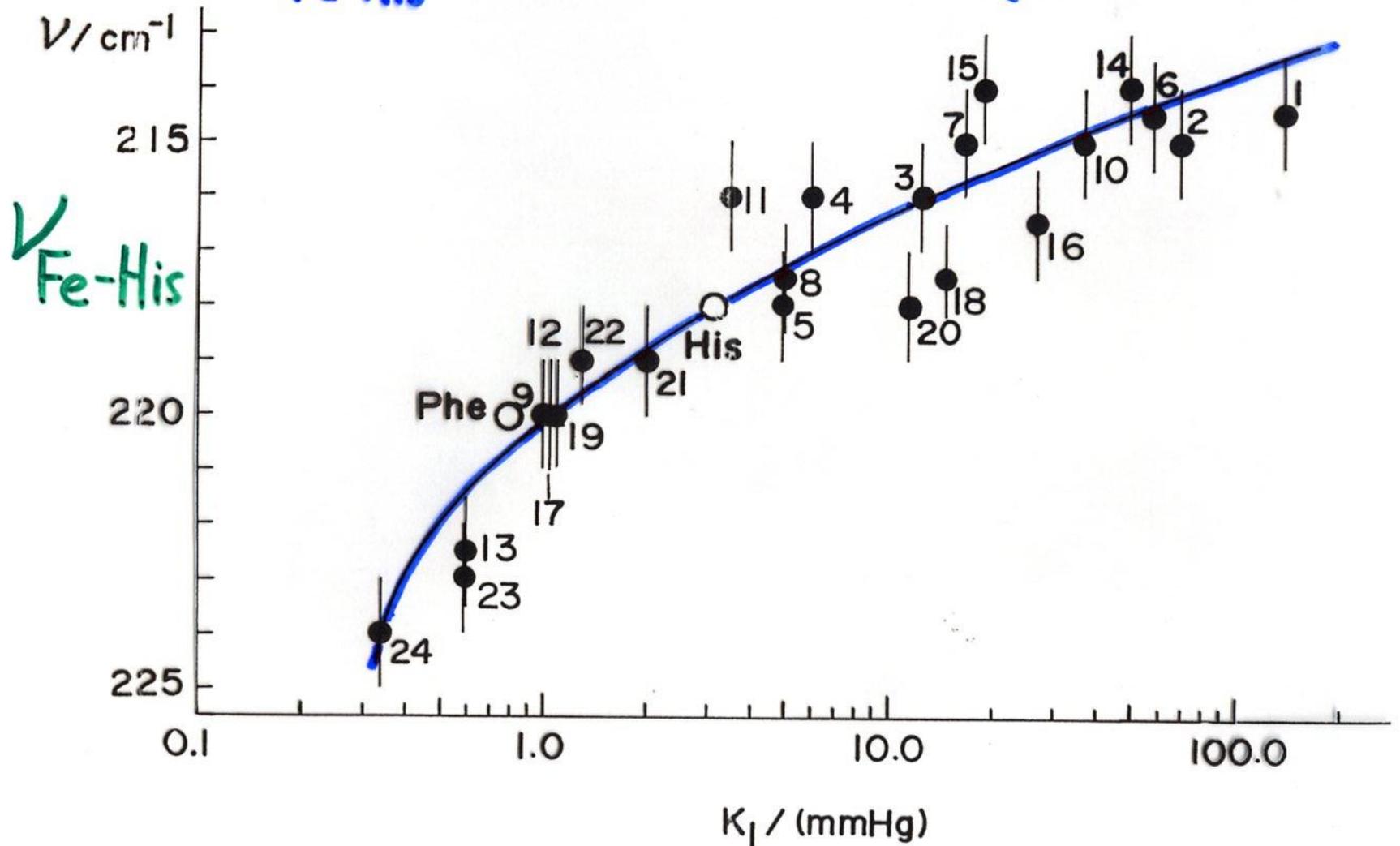
+IHP, 1 mM IHP,  $+\text{Cl}^-$ , 0.1 M NaCl

↑  
 $\text{cm}^{-1}$

↑  
mmHg

# Relation Between $\nu_{\text{Fe-His}}$ and $O_2$ Affinity

$$\nu_{\text{Fe-His}} = 225.2 - 7.10 \sqrt{\log K_1 - 0.488}$$



1979 阪大医学部修士課程 助教授  
山野俊雄医学部長の基礎医学の考え方

医学部に異端者が一人入り込んだ。  
ラマン分光器は無く、「ラマン」と云う言葉は周りに  
全く理解されない。

Duty : 医学部1年生への講義と学生実習

学生実習 : ラット肝臓の機能の理解 : 肝臓を取り出す。  
酵母のミトコンドリアの単離、呼吸機能の測定

実際の研究 : 薬品倉庫にペンキを塗り、穴蔵ラマン測定室にする。  
ラマン分光器は付属病院から2ヶ月単位で借り、  
リヤカーで運ぶ。

試料調整は、生化学研究室と共同実験室を使用。

セミナー : 第1生化学教室の昼食セミナーに毎日出席。

# 阪大医学部で実施した研究と共同研究者

フラビン蛋白の共鳴ラマン(世界最初のデータ)

Old Yellow Enzyme

$^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  リボフラビン

アドレノドキシン還元酵素

仁科安三

八木国夫

山野俊夫

ブレオマイシンの共鳴ラマン

杉浦幸雄

非ヘム鉄酸素添加酵素のラマン

龍野睦宣

(Fe-Tyr蛋白の世界最初の共鳴ラマン)

# 1992 分子科学研究所教授の昇進

(先代教授のスタッフの元、遠慮しながら)

## 研究方針

- 小分子の伝統的分子科学はやらない。
- 振動分光法の長所をシャープに活かす事を第一に。
- 生体分子の構造と機能に関する問題を中心に据える。
- 出来るだけ基本的化学現象を対象にし、基本的蛋白質を取り扱う。

酸素の活性化機構、生体エネルギー変換機構、  
アロステリック効果、蛋白ダイナミクス  
ミオグロビン、ヘモグロビン、ペルオキシダーゼ、  
シトクロム酸化酵素

# 分子研に於ける共鳴ラマンの研究

呼吸酵素による酸素活性化機構:

全反応中間体の酸素関連振動の観測

小倉尚志

蛋白の超高速ダイナミクス:

MbCOのピコ秒時間分解ラマンの観測

水谷泰久

差ラマン分光法による溶液構造

加茂川恵司

金属中心に於ける酸素活性化:

Fe(IV)=O伸縮振動の観測

長友重紀

蛋白の高次構造と機能

Hbの紫外共鳴ラマン

長井雅子

センサー蛋白による情報検出・伝達機構

内田 毅

アミロイドの構造化学: 顕微IR分光

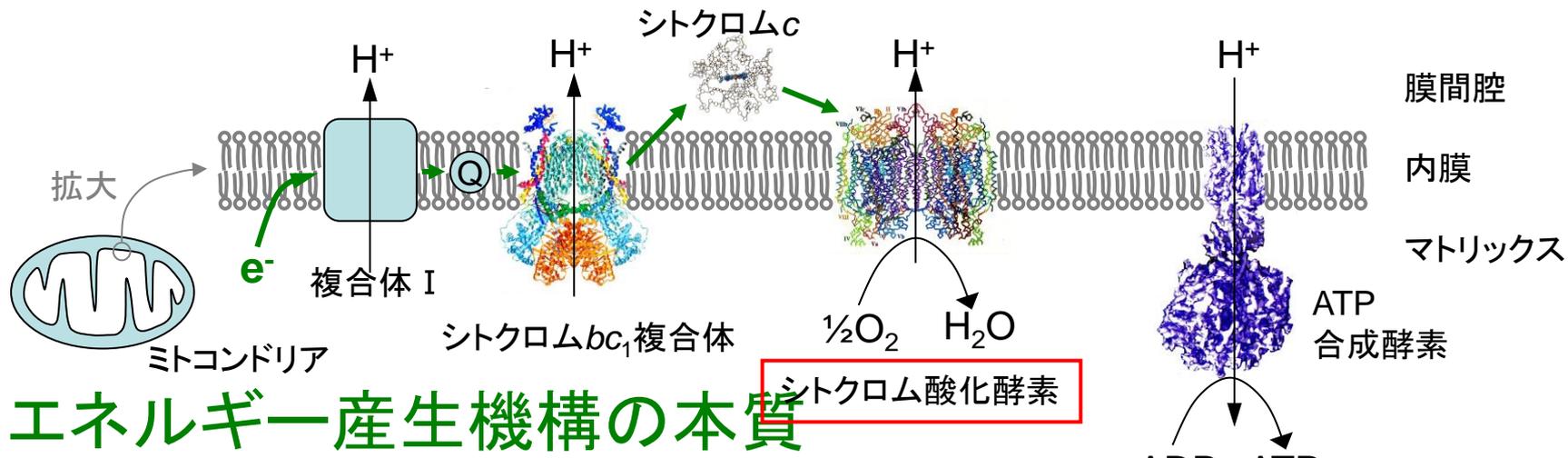
平松弘嗣

# シトクロム酸化酵素の全反応中間体の鉄一酸素振動の同定および反応サイクルの確立

- シトクロム酸化酵素による $O_2$ 還元機構

- 分子状酸素を水にまで還元する

- 呼吸により取り込まれた酸素の90%以上がこの反応に使われる



- エネルギー産生機構の本質

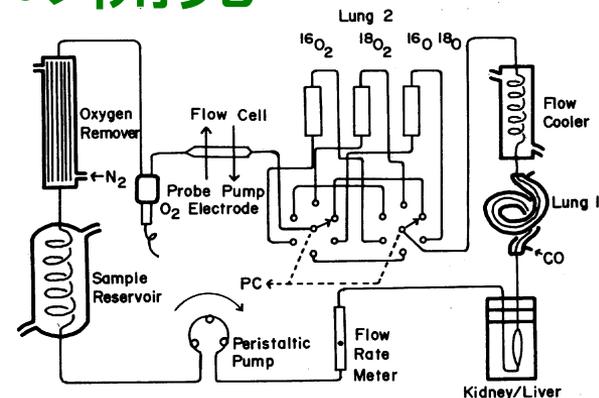
- 電子移動(酸化還元反応)とプロトン移動のカップリング

- 機構の解明には酵素反応中間体の構造を知ることが重要

# 酵素反応中間体の構造決定

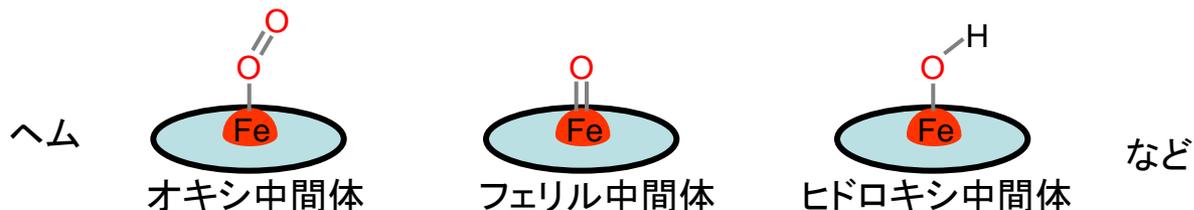
## • どこにもない独創的な実験装置の開発

- 酵素反応追跡用人工心肺装置
- ラマン／吸収同時測定装置
- 競合する研究グループのある中でトップランナーの位置を保った

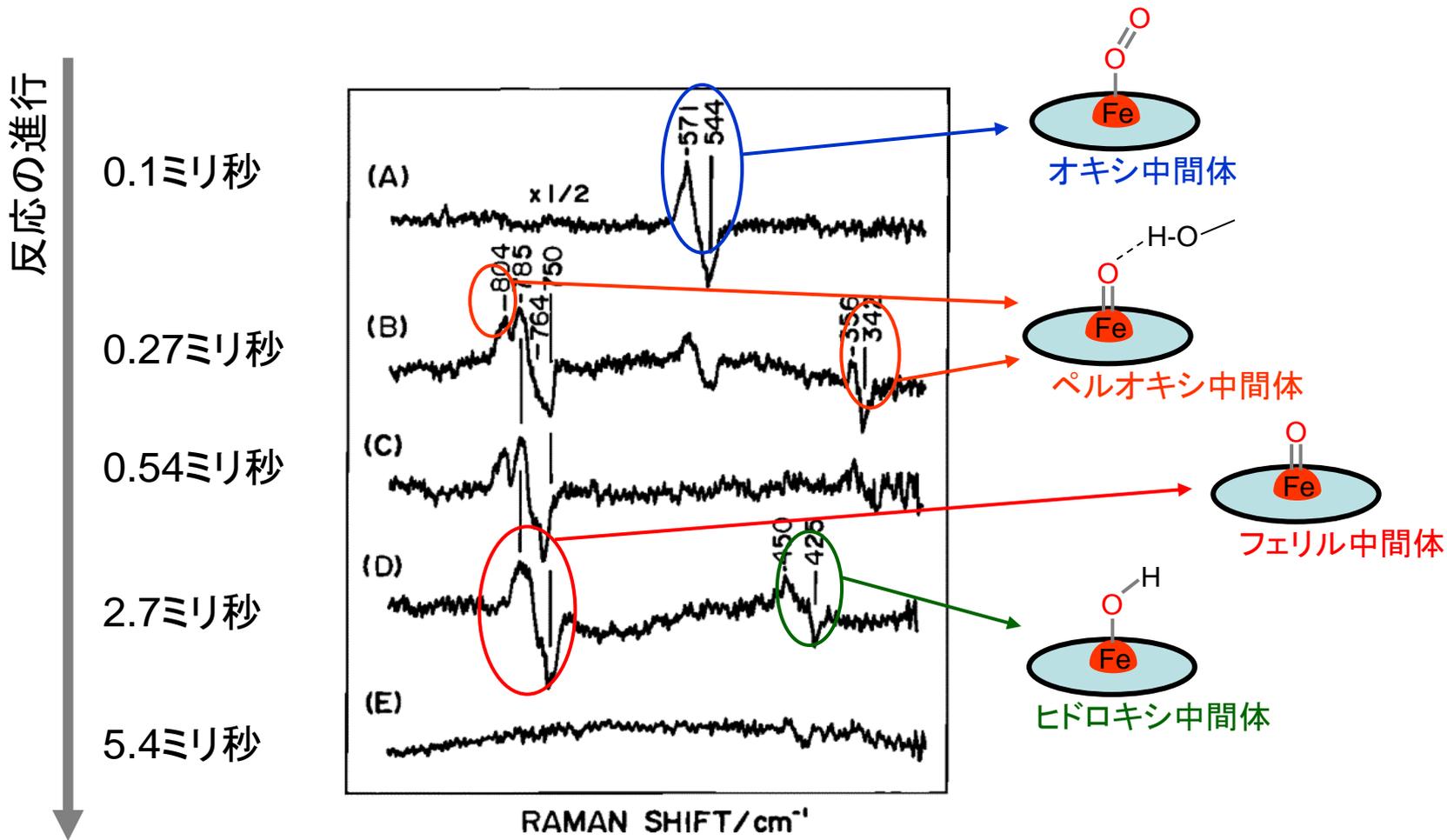


酵素反応追跡用人工心肺装置  
JACS, 115, 8527 (1993)

## • シトクロム酸化酵素の全反応中間体の鉄一酸素振動を同定し、反応サイクルを確立した



# 時間分解共鳴ラマンスペクトル



# 研究成果の与えたインパクト

- **ペルオキシ中間体**はO-Oによる架橋構造を持っていると過去30年間信じられていたが、この反応段階では**O-O結合はすでに切れている**ことを明らかにした
- 従来のプロトンポンプ機構に対して見直しを迫る研究成果

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
Vol. 95, pp. 12819–12824, October 1998  
Biochemistry

## The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase

HARTMUT MICHEL

Max-Planck-Institut für Biophysik, Heinrich-Hoffmann Strasse 7, D-60528 Frankfurt am Main, Germany

Surprisingly, Kitagawa and coworkers (12, 13) demonstrated that in the P-states (see Fig. 1) the O—O-bond is already broken and have suggested the P-states to be a hydrogen-bonded oxoferryl form. This suggestion raises the question whether water has been already formed during the transition to the P-state. If yes, all proton pump mechanisms, which use incoming protons needed for water formation to electrostatically repel protons taken up during reduction of the binuclear site, are in jeopardy because proton pumping is expected to occur only beyond the P-state.

• H. Michel(タンパク質結晶のX線構造解析の権威、1988年ノーベル化学賞受賞)の総説にも引用されている



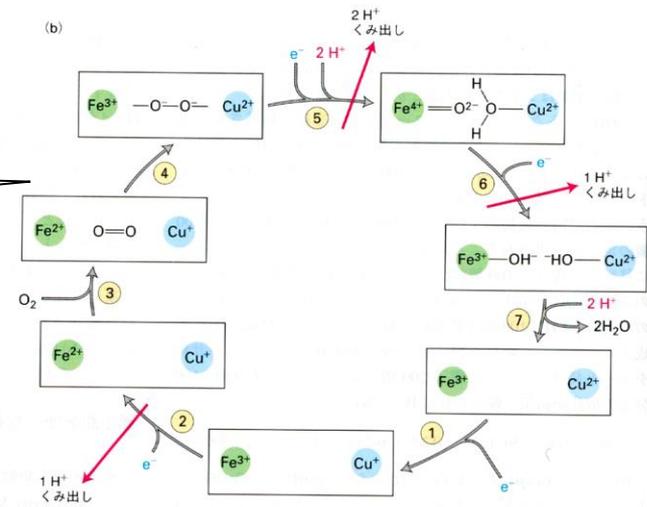
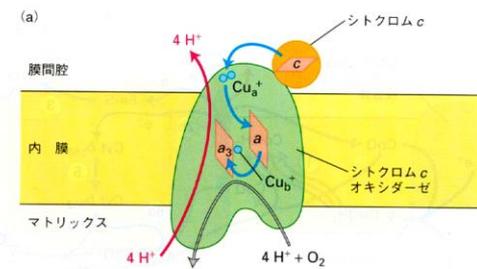
# 研究成果の与えたインパクト

- 生化学の教科書に取り上げられる重要なトピックス

568

図 16・26 シトクロムcオキシダーゼ複合体  
 中の電子伝達と共役するH<sup>+</sup>輸送。(a)オ  
 キシダーゼ複合体内での電子伝達体の配置  
 と、還元型シトクロムcからO<sub>2</sub>への電子の  
 流れ、ヘムは赤で示してある。還元型シト  
 クロムcのヘムから1個の電子がCu<sub>a</sub>(青丸)と  
 ヘムaを経由し、ヘムa<sub>3</sub>とCu<sub>b</sub>からなる酸  
 素還元中心へと運ばれる。4分子の還元型シ  
 トクロムcからの4個の電子とマトリックス  
 内の4個のH<sup>+</sup>が1分子のO<sub>2</sub>と一緒に2  
 分子のH<sub>2</sub>Oができる。それに加えて、シトク  
 ロムcから酸素へ移動する電子1個当たり  
 1個のH<sup>+</sup>がマトリックスから膜間腔へ移動す  
 る。すなわち、酸素1分子が水2分子に還元  
 されるたびに4個のH<sup>+</sup>が移動する。(b)酸  
 素が水に還元される中間状態についての假  
 説。還元型シトクロムc 4分子から順次放出  
 される電子4個は酸素還元中心のFe-Cu<sub>2</sub>に  
 順を追って移される。反応①と②で、電子  
 2個が加わりヘムのFe<sup>3+</sup>をFe<sup>2+</sup>に還元し、  
 Cu<sup>2+</sup>をCu<sup>+</sup>に還元する。次に酸素分子が酸  
 素還元中心に結合する(反応③)。するとた  
 だちに電子2個(1個はFe<sup>2+</sup>から、他の1個  
 はCu<sup>+</sup>から)が移動し過酸化物陰イオンO<sub>2</sub><sup>2-</sup>  
 が生成される。反応④でFe<sup>3+</sup>とCu<sup>2+</sup>が再生する(反応

### III. 細胞の構築とエネルギー供給

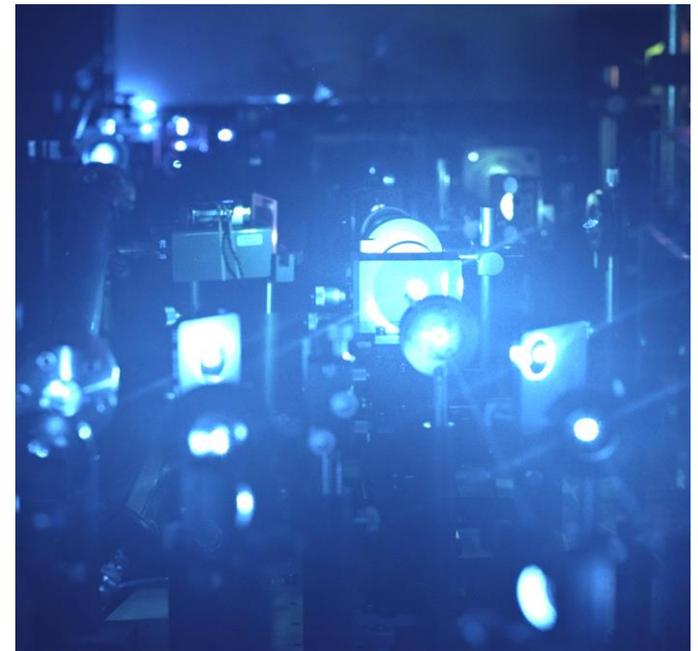
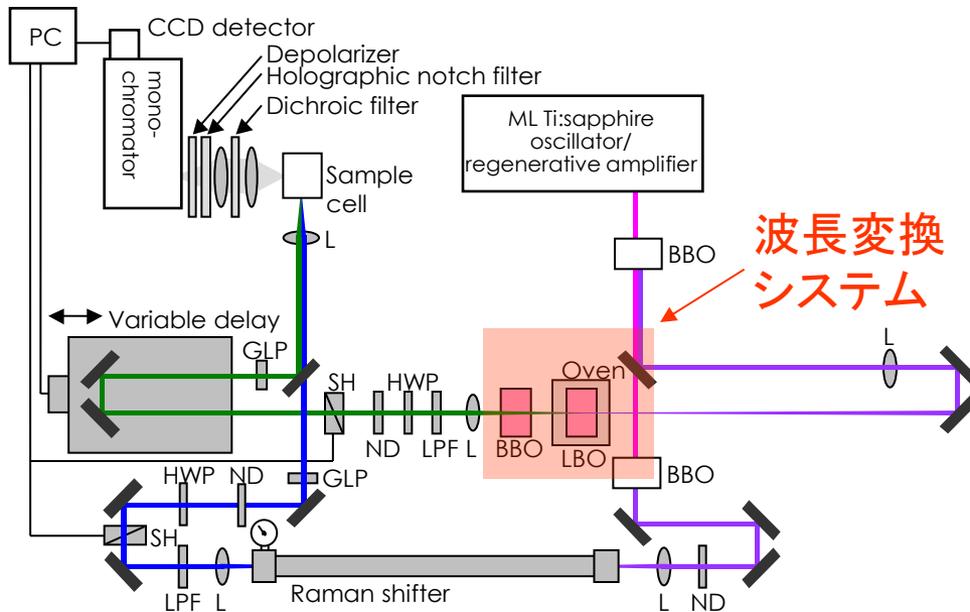


共鳴ラマン分光のデー  
 タが、これらの酵素反  
 応中間体の活性部位  
 構造を決定した

「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

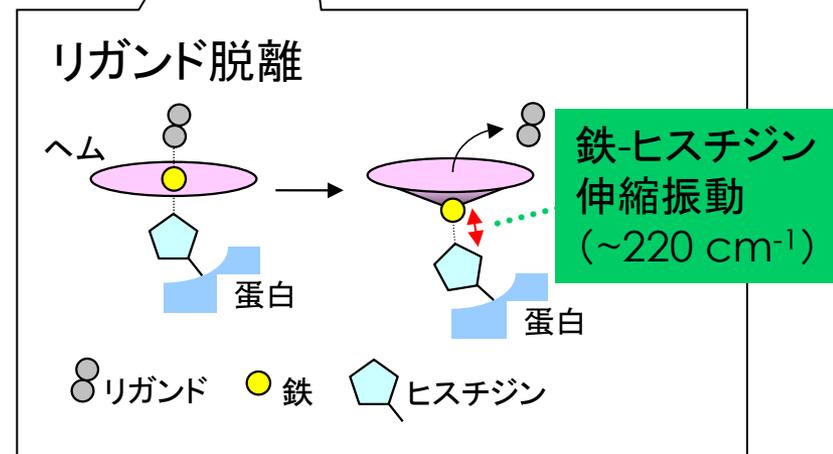
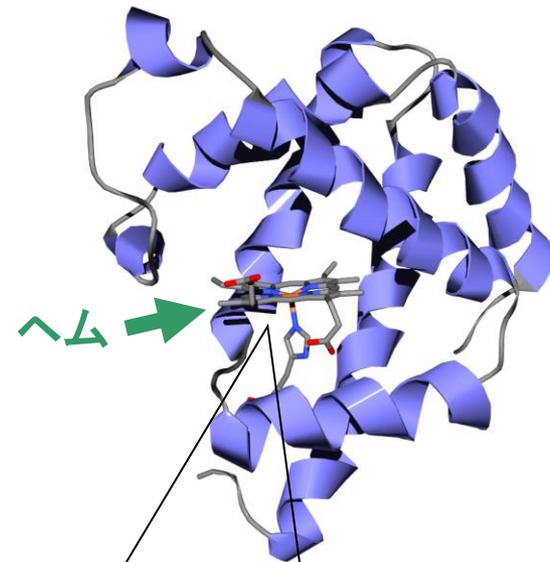
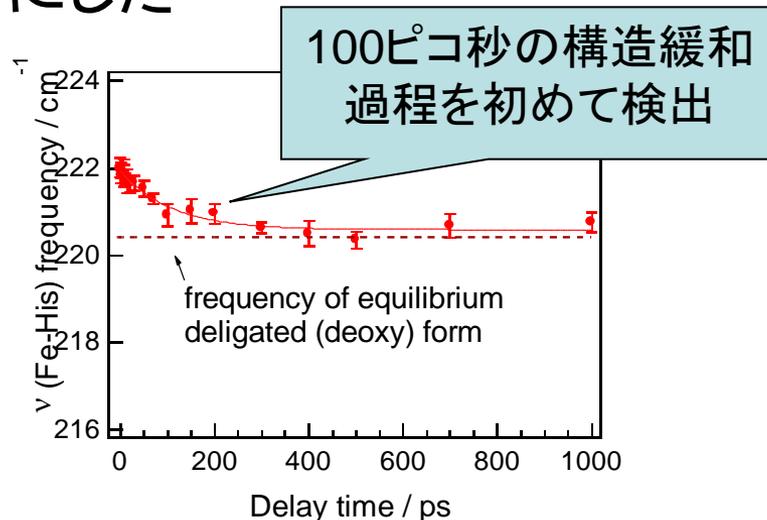
# ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光によるミオグロビン、金属ポルフィリンの超高速ダイナミクスの研究

- 2波長独立な波長可変パルス光源の開発
- チタンサファイアレーザーをベースにした**世界初**のピコ秒時間分解共鳴ラマン分光装置
  - *Rev. Sci. Instrum.*, **68**, 4001 (1997)



# ミオグロビンの構造ダイナミクス

- 鉄-ヒスチジン伸縮振動
  - 1979年、北川らによって帰属
  - 蛋白構造を反映する優れたマーカーバンドであることが確立
- リガンド脱離に伴って起こる蛋白構造緩和のダイナミクスを明らかにした



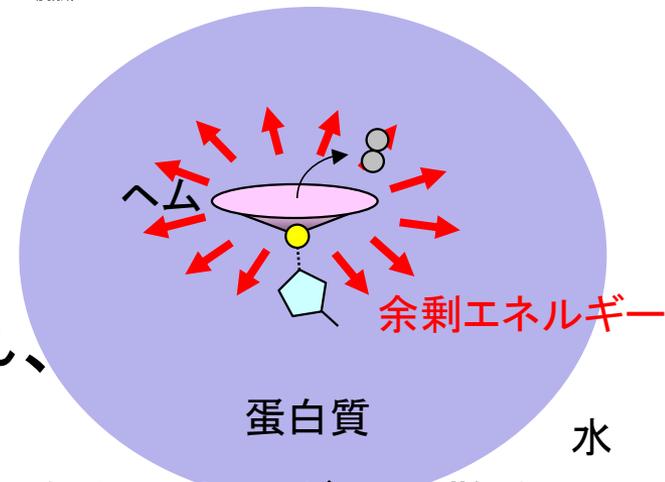
# ミオグロビンでのエネルギー散逸

- 蛋白質中のエネルギー散逸過程を実時間で初めて検出
  - アンチストークススペクトルのピコ秒時間分解測定
  - *Science*, **278**, 443 (1997)
- 国内外のいくつかの理論グループがこの研究に触発され、理論計算を行っている
  - 木寺(横浜市大)
  - 長岡(名大)
  - Straub (Boston University)
  - Austin (Princeton University)

## Direct Observation of Cooling of Heme Upon Photodissociation of Carbonmonoxy Myoglobin

Yasuhiro Mizutani and Teizo Kitagawa\*

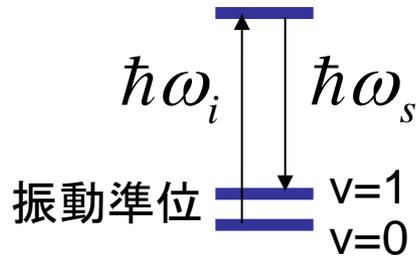
The formation of vibrationally excited heme upon photodissociation of carbonmonoxy myoglobin and its subsequent vibrational energy relaxation was monitored by picosecond anti-Stokes resonance Raman spectroscopy. The anti-Stokes intensity of the  $\nu_4$  band showed immediate generation of vibrationally excited hemes and biphasic decay of the excited populations. The best fit to double exponentials gave time constants of  $1.9 \pm 0.6$  and  $16 \pm 9$  picoseconds for vibrational population decay and  $3.0 \pm 1.0$  and  $25 \pm 14$  picoseconds for temperature relaxation of the photolyzed heme when a Boltzmann distribution was assumed. The decay of the  $\nu_4$  anti-Stokes intensity was accompanied by narrowing and frequency upshift of the Stokes counterpart. This direct monitoring of the cooling dynamics of the heme cofactor within the globin matrix allows the characterization of the vibrational energy flow through the protein moiety and to the water bath.



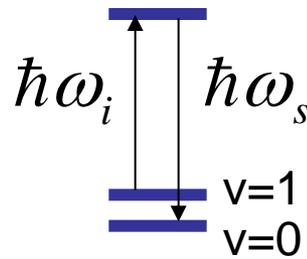
## 余剰エネルギーの散逸

リガンドの光解離直後、反応余剰エネルギーによってヘムは振動励起されている。余剰エネルギーは周囲の蛋白質を経て水へと散逸する。

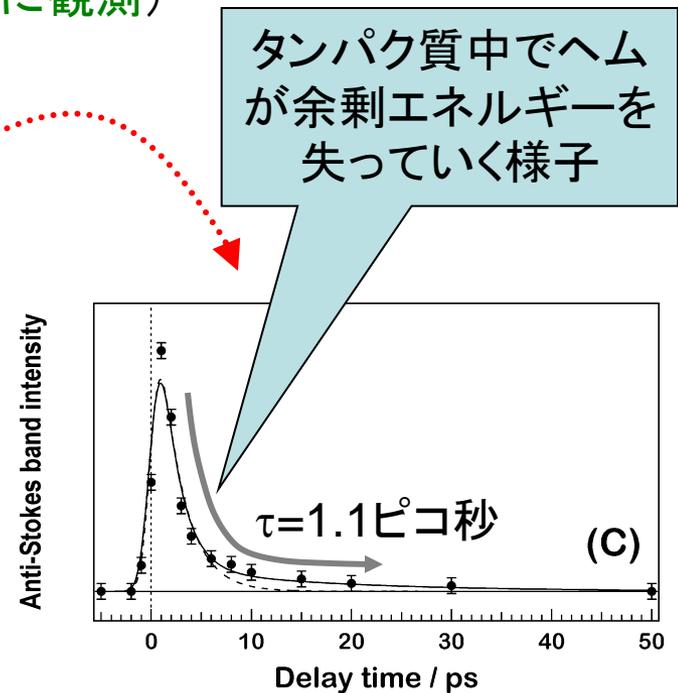
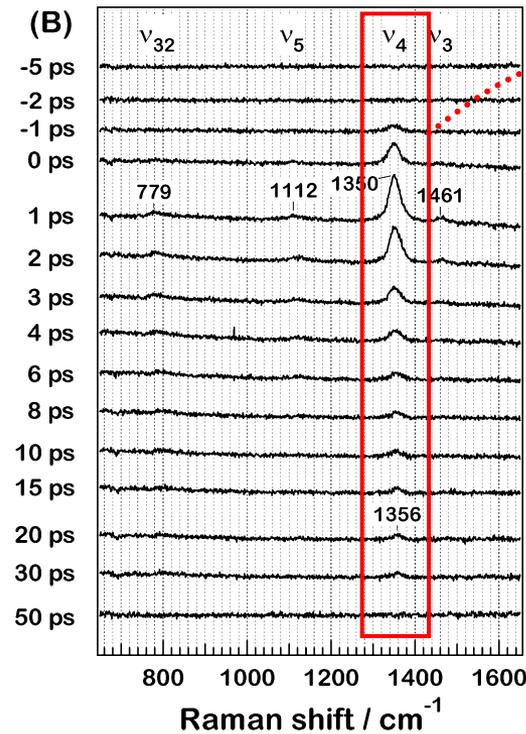
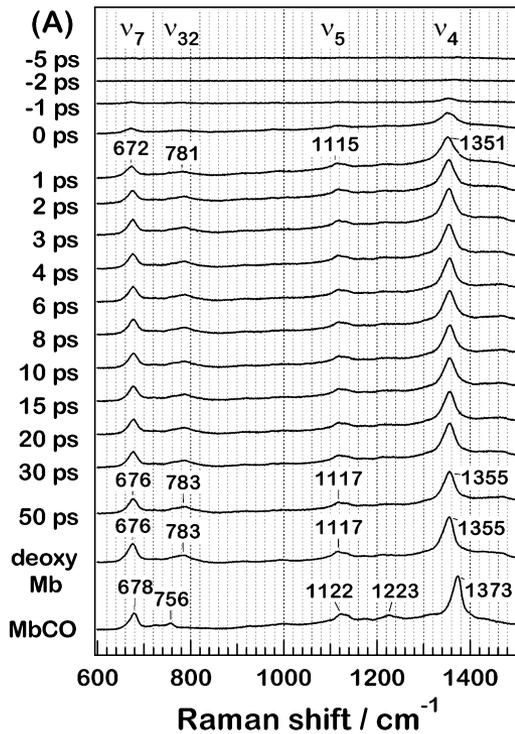
# ヘムが余剰エネルギーを失う過程を直接観測



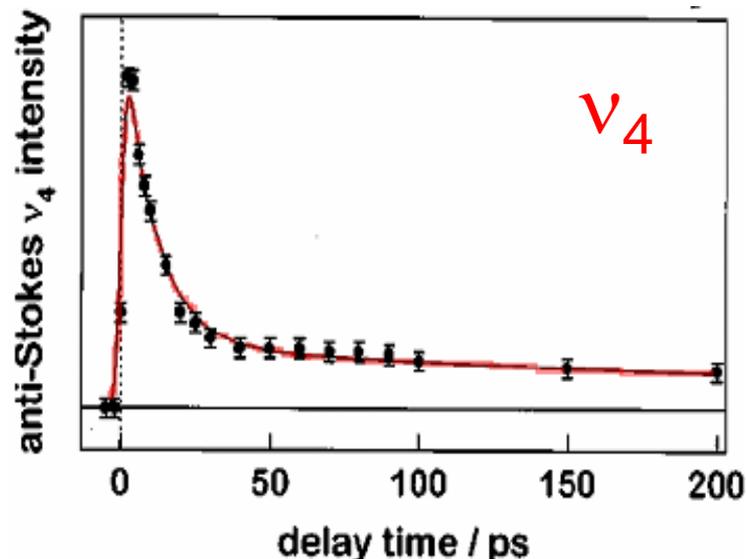
(A) ストークス散乱



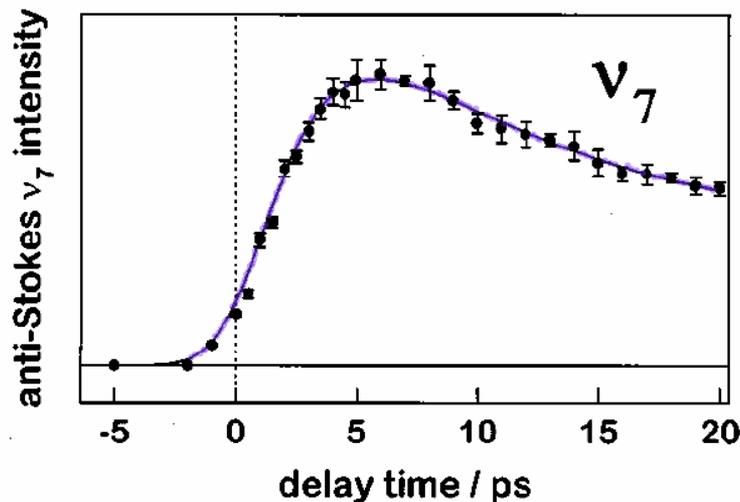
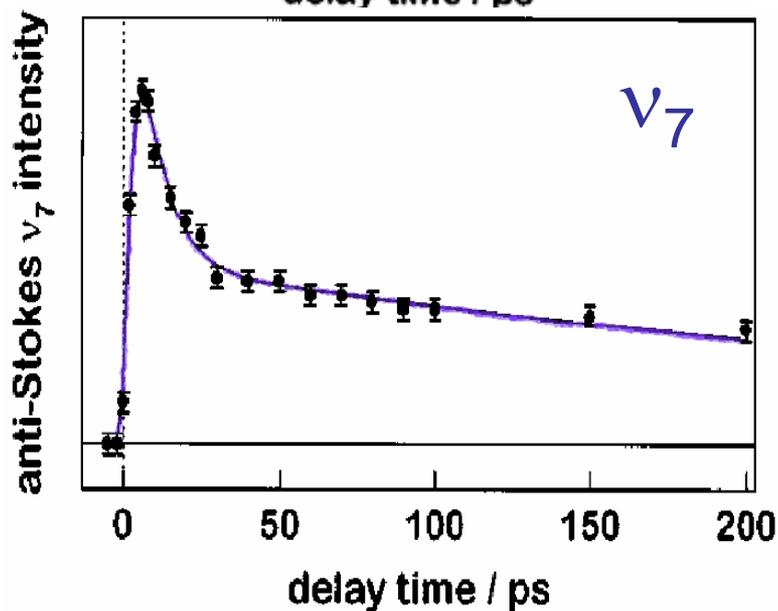
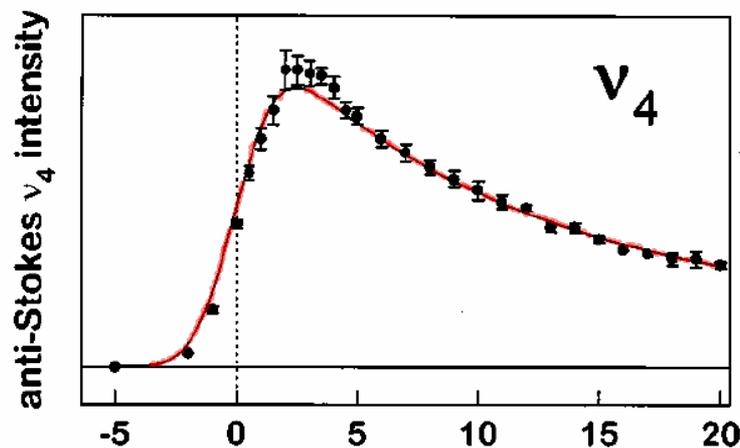
(B) アンチストークス散乱  
(振動励起状態を選択的に観測)



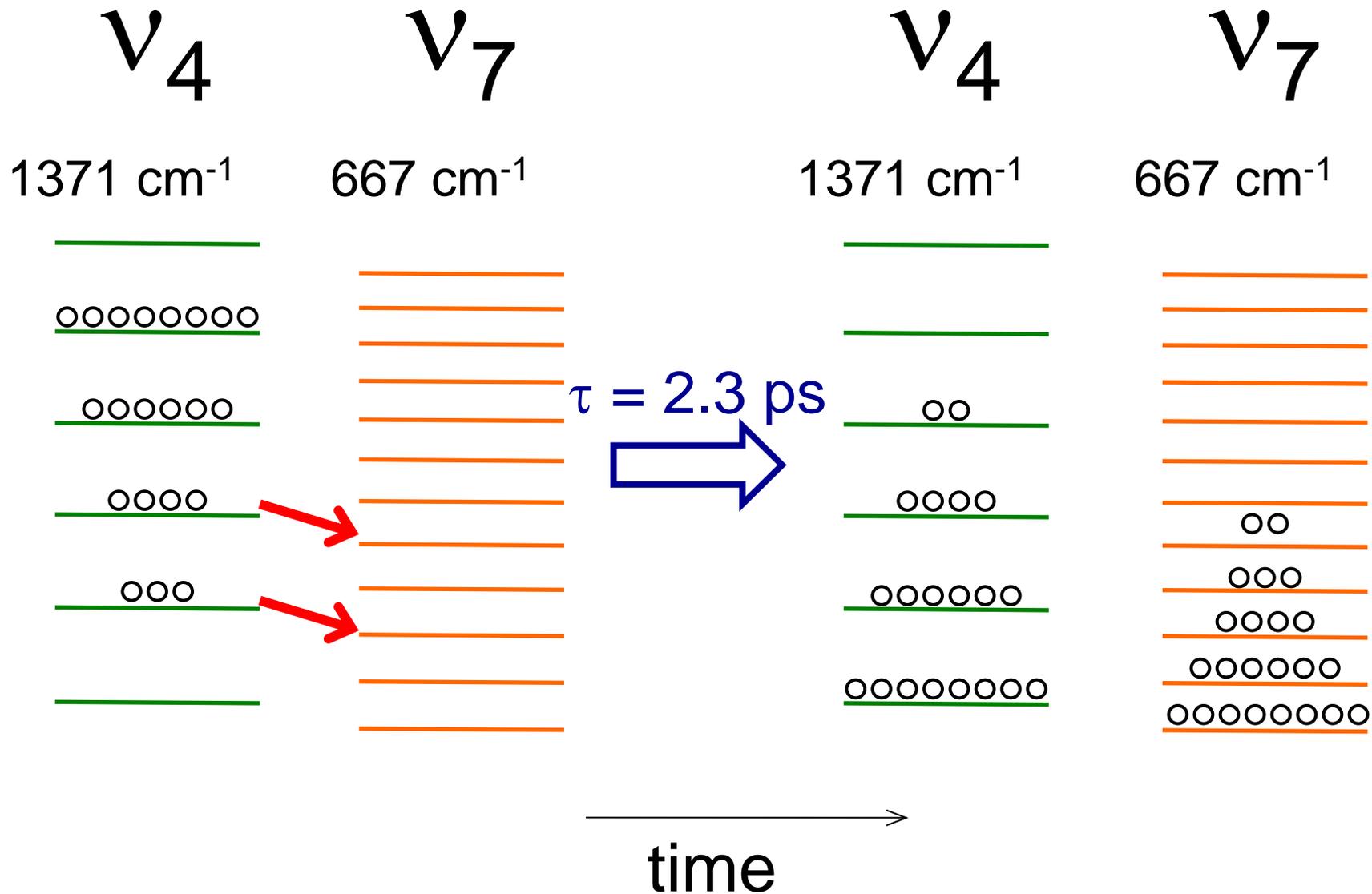
# Rise Time Difference between Anti-Stokes $\nu_4$ and $\nu_7$ Raman Bands of Ni(OEP)



Expansion between -5 and 20 ps



# Vibrational Energy Redistribution



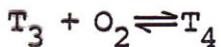
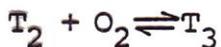
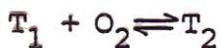
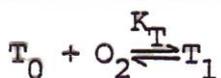
# Two State Model (MWC Model)

## Two State Model

Monod, Wyman, Changeux; J. Mol. Biol. 12, 88 (1965)

$$X = \frac{K_1 [O_2] + 3K_1 K_2 [O_2]^2 + 3K_1 K_2 K_3 [O_2]^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 [O_2]^4}{1 + 3K_1 [O_2] + 3K_1 K_2 [O_2]^2 + K_1 K_2 K_3 [O_2]^3}$$

T state (tensed)



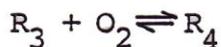
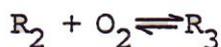
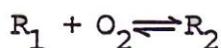
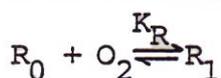
$$[T_i] = \frac{4!}{(4-i)! i!} [O_2]^i K_T^i$$

$$\frac{[T_i]}{[R_i]} = \frac{R_0}{T_0} \left(\frac{K_T}{K_R}\right)^i = L \cdot c^i$$

$$X = \frac{K_T [O_2] \cdot L \cdot (1 + K_T [O_2])^3 + K_R [O_2] (1 + K_R [O_2])^3}{L \cdot (1 + K_T [O_2])^3 + (1 + K_R [O_2])^3}$$

$K_T, K_R, L$  と合わせ

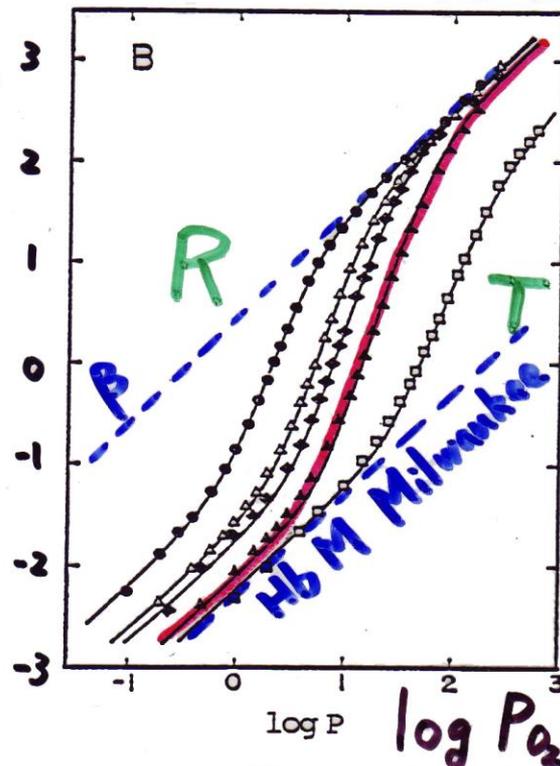
R State (relaxed)



saturation

Hb A

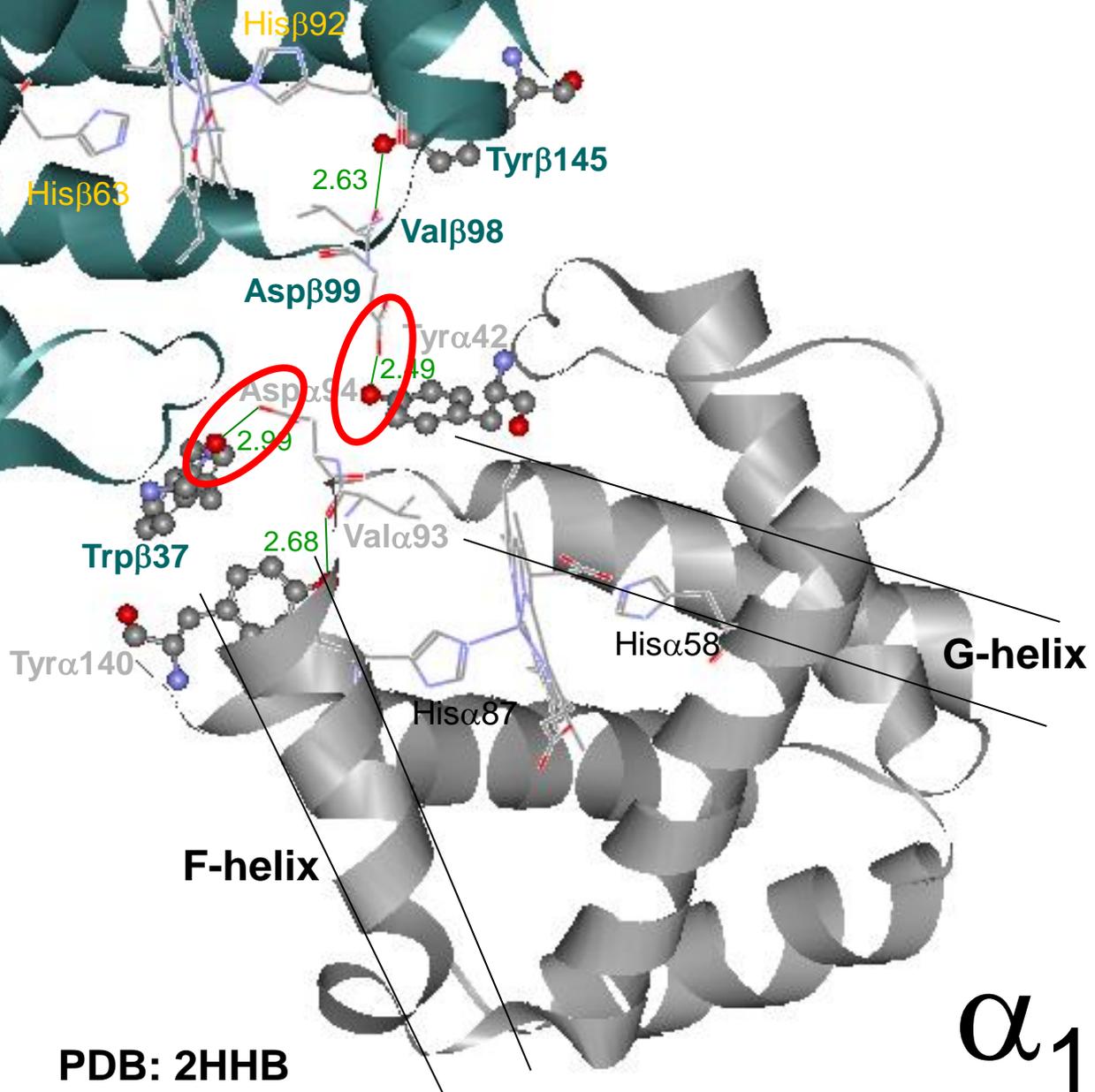
log Y



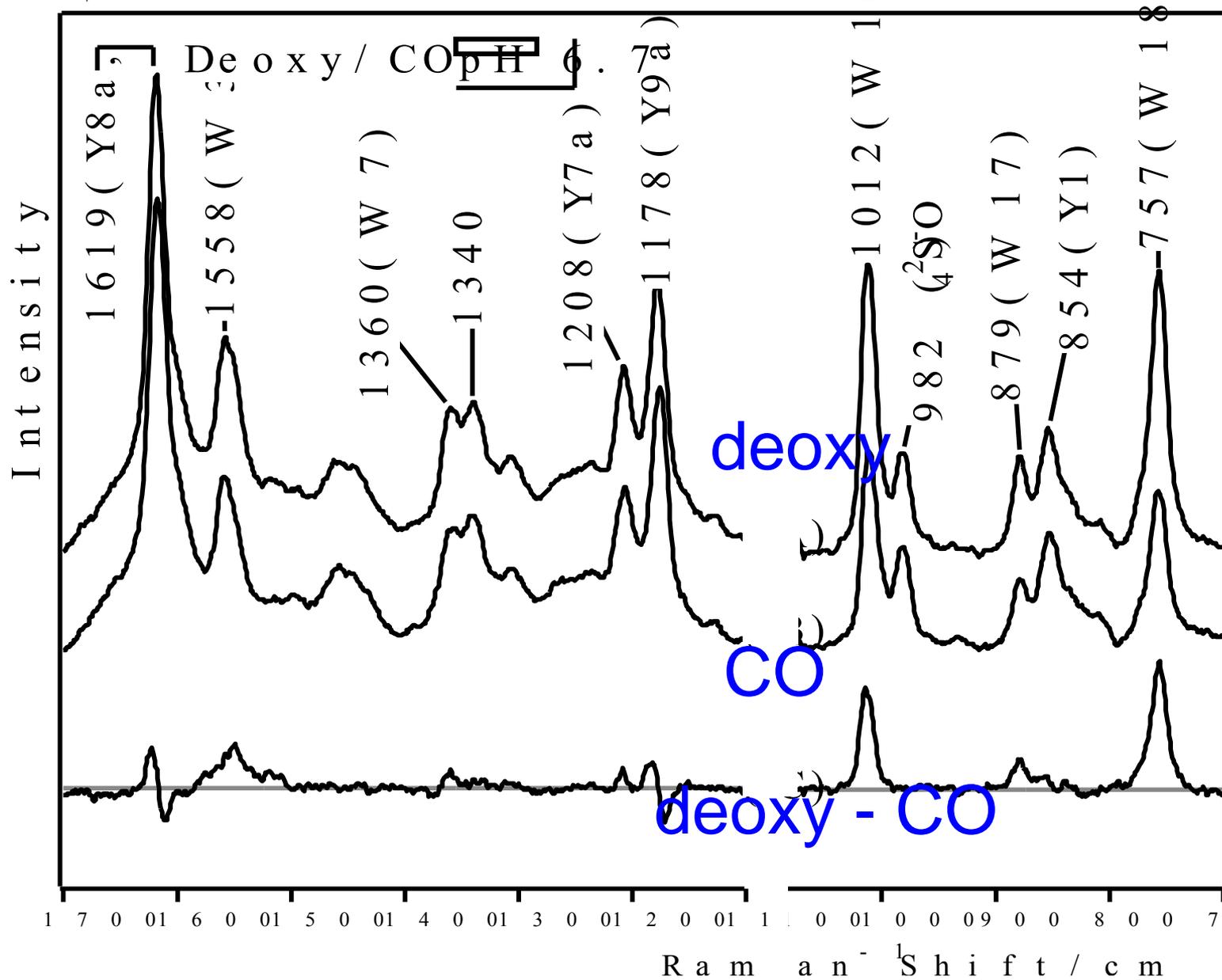
K. Imai, "Allosteric Effects in Hemoglobin" (1982)

$$Y = X / (1 - X) = [O_2\text{-結合型}] / [\text{非結合型}]$$

$\beta_2$



# UVRR Spectra of Native Hb A excited at 235 nm



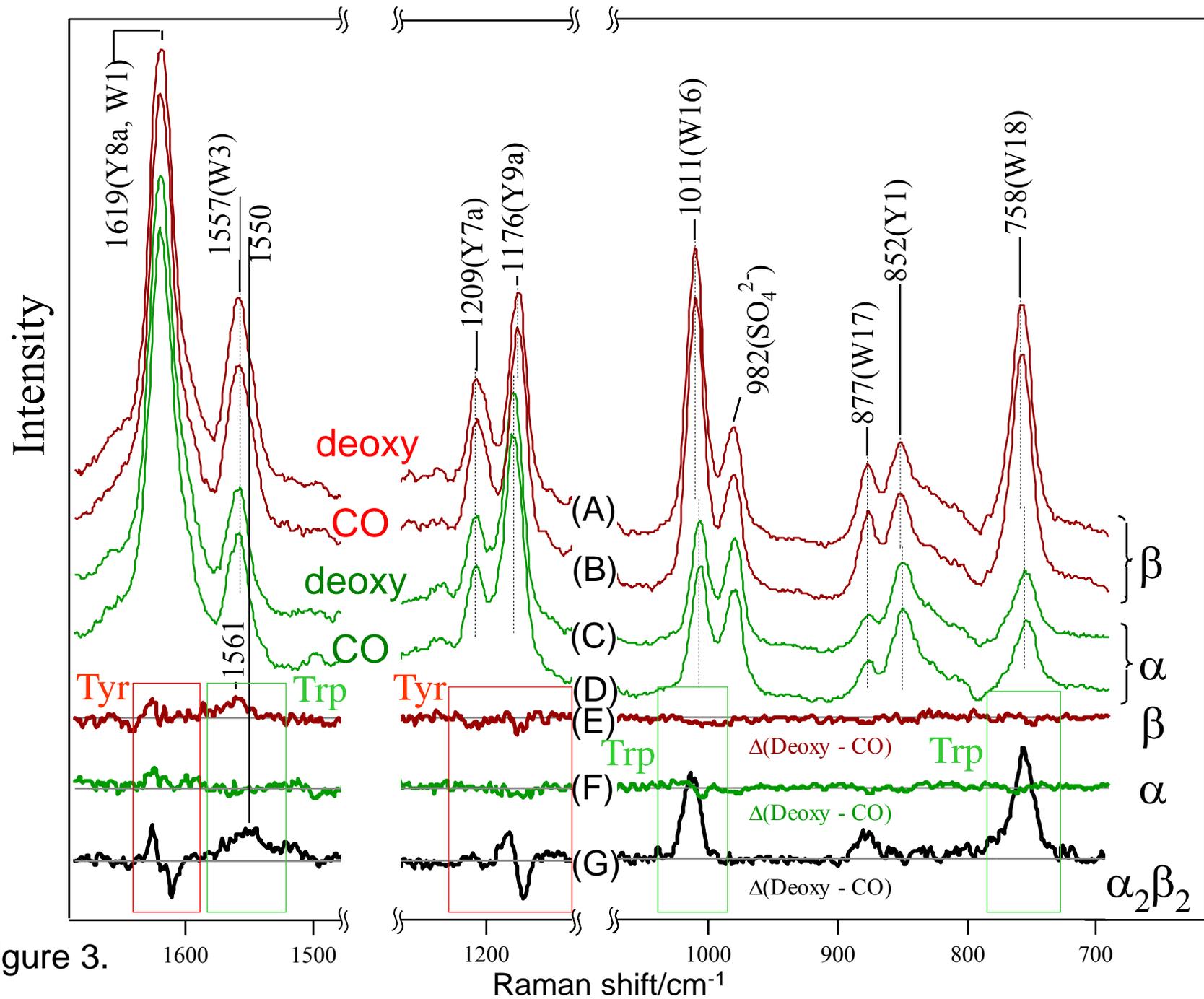
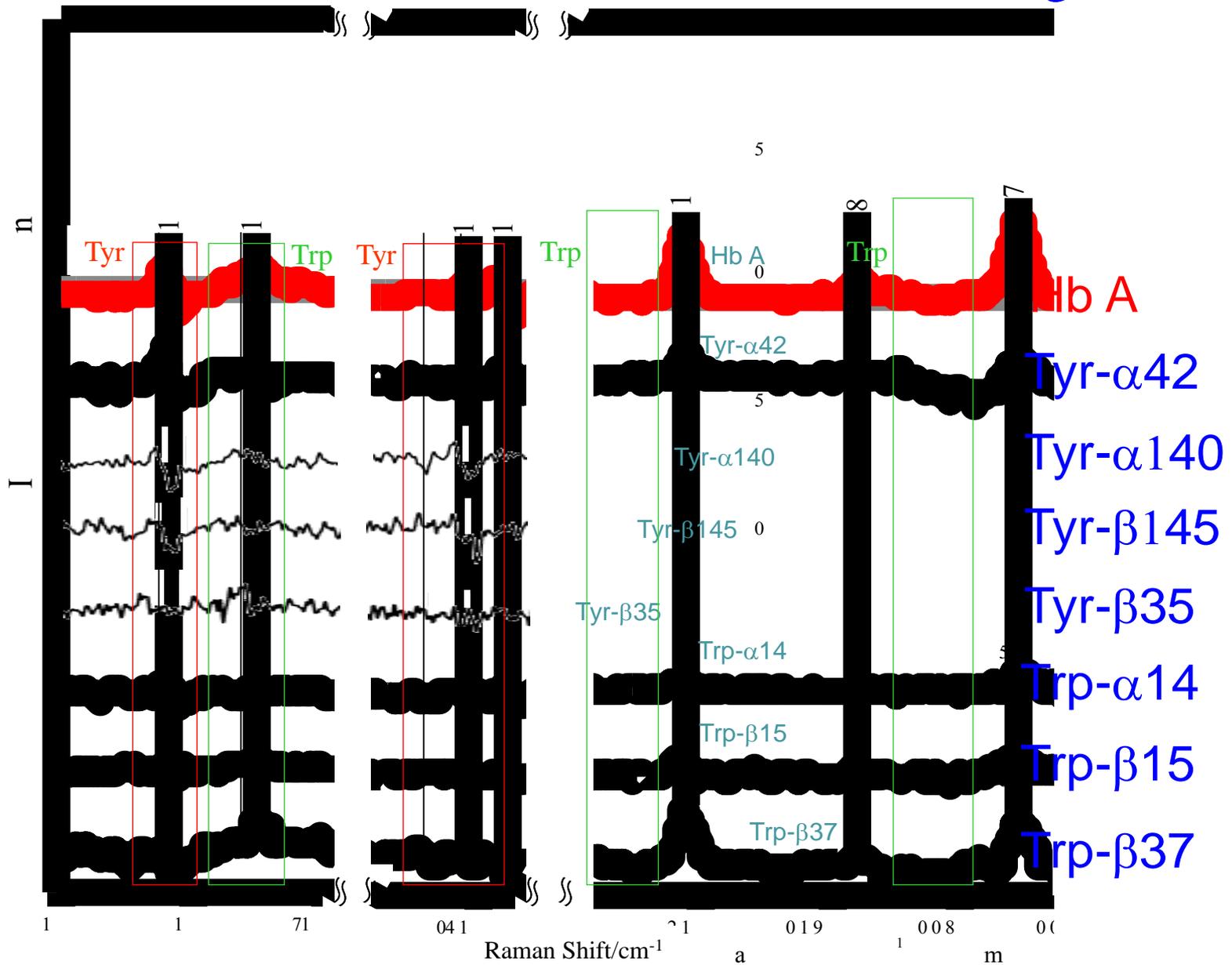
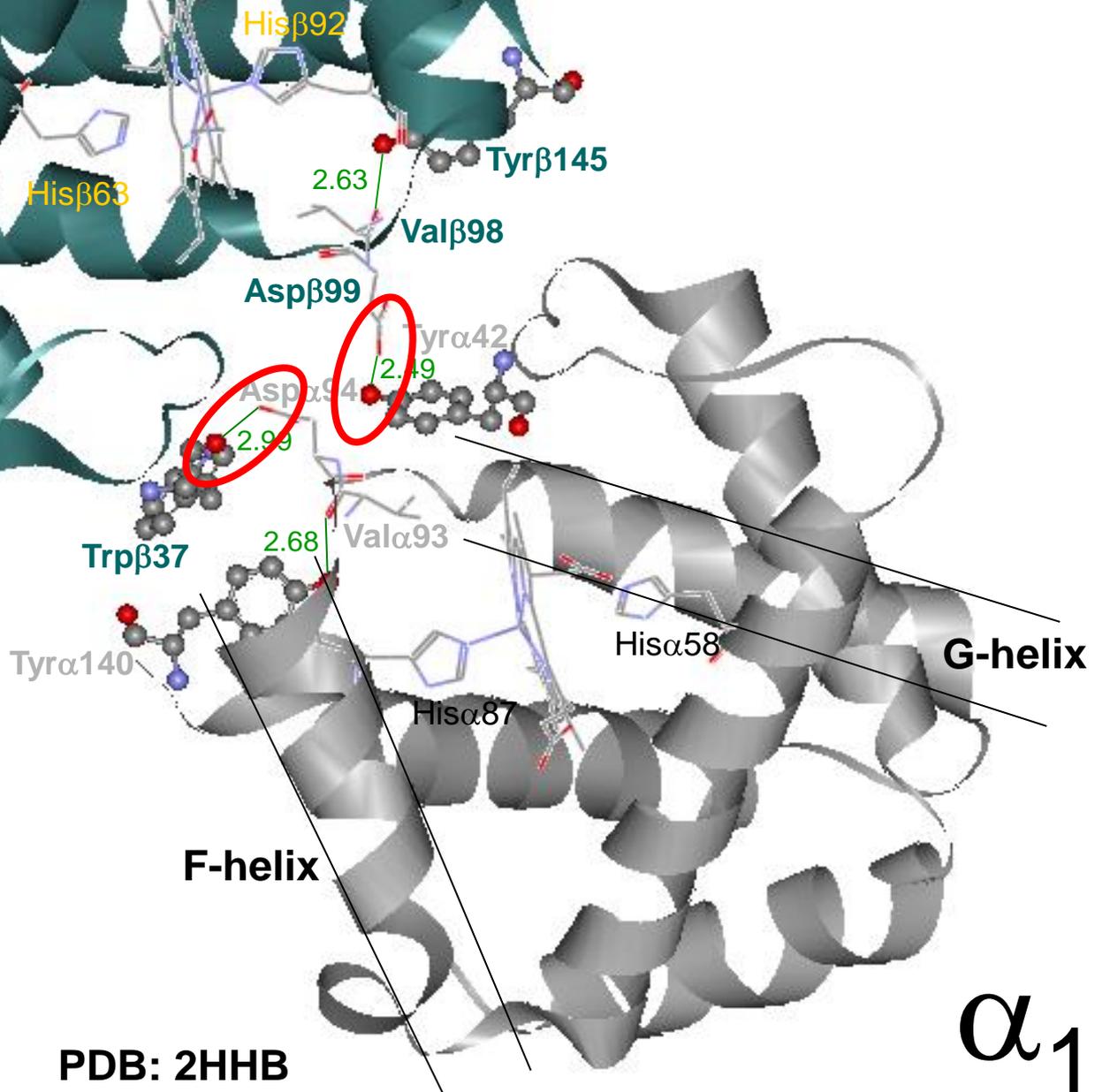


Figure 3.

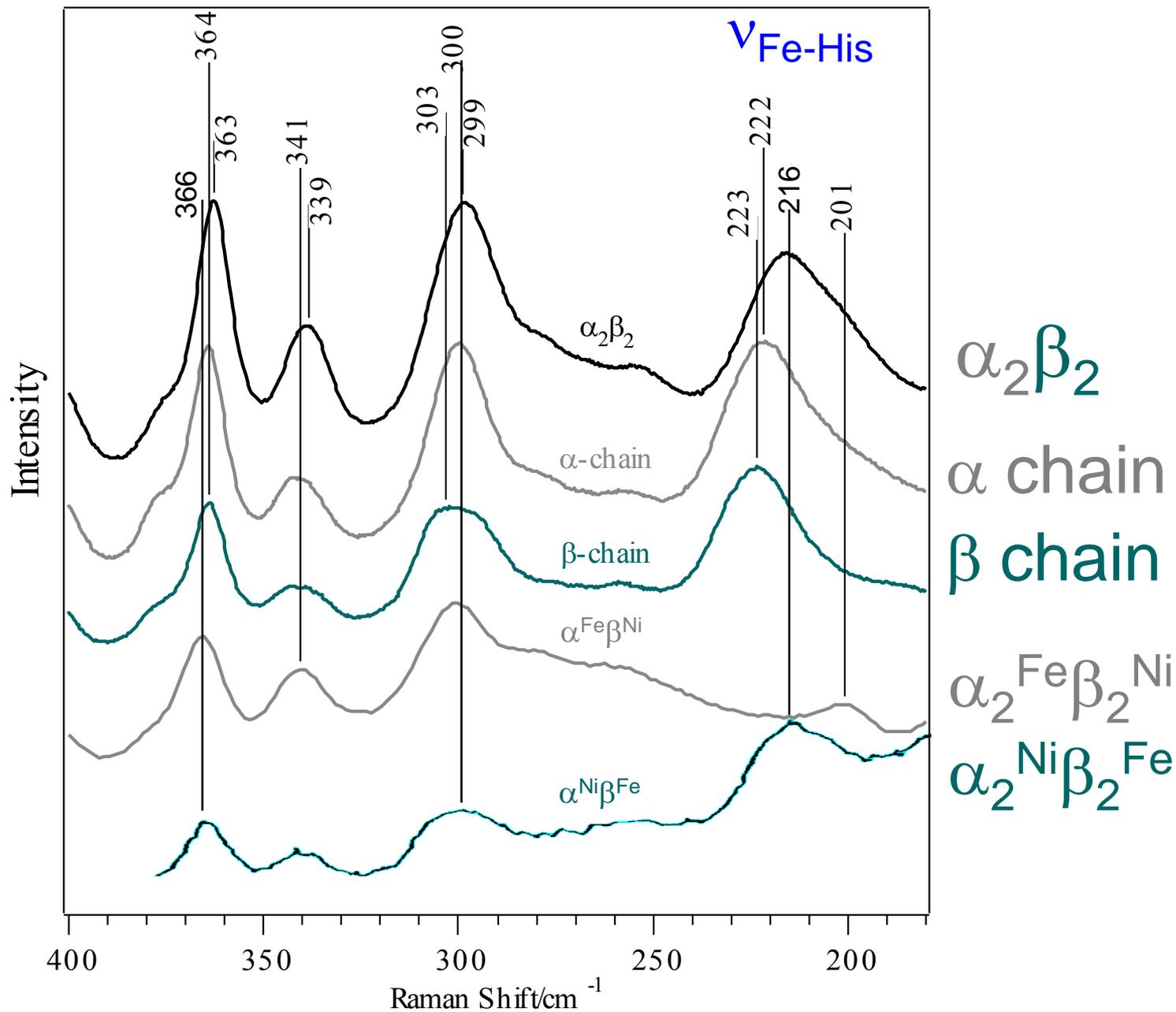
# UVRR Spectral Contribution from Selected Single Residues



$\beta_2$

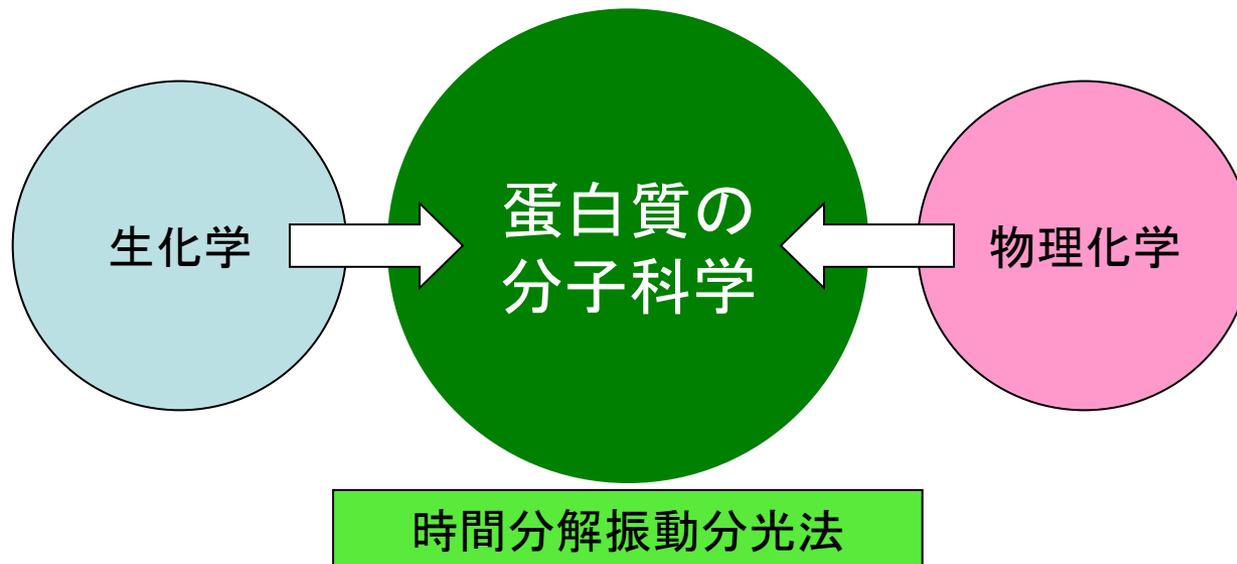


# Fe-His Stretching Band of the $\alpha$ and $\beta$ Subunits



# 研究成果のまとめ

- 新規な実験装置の開発
- 機能に重要な部位の構造変化を明らかにし、それに基づいて蛋白質の機能発現機構を解明
  - 重要な部位(ヘム、サブユニット界面等)を狙って観る分光
    - 共鳴ラマン効果を巧みに利用
- 新しい研究領域を開拓



# 生体分子系の振動分光の研究動向

pm オーダーの構造変化 → 機能発現

テクニカル ブレークスルー

光源                      レーザー（PCFによるSC光、IR白色光）

検出器                      高感度化、2次元化

コンピューター              駆動及びデータの高速処理

分光器駆動                      デジタル駆動

# I. 新規な装置によるフロンティア形成

顕微ラマン分光によるラベルフリー細胞測定

非線形ラマンを利用したイメージング  
(CARS, SRS)

Fsパルス光差モードによる新IR光源  
(強い白色光、H<sub>2</sub>Oバンド)

プラズモン共鳴の利用  
(SERSと免疫、TERSとAFMの組み合わせ)

## II. ユニークな発想による新たな分子情報

ラマン光学活性 (振動モード毎に異なる)

新規な生化学現象の発見 (domain swapping)

H<sup>+</sup>-pumping gateのメカニズムとH<sup>+</sup>の道筋の決定 (CcO)

in vitro と in tissueの比較 (CcO)

時間分解ラマンによる蛋白中のエネルギー移動ダイナミクス  
(Cyt c)

紫外共鳴ラマンによる蛋白高次構造変化のメカニズム解明  
(アロステリック効果の構造化学)

振動分光によるピコバイオロジーの  
更なる発展を願っています。

ご清聴ありがとうございました

# 感謝

## 研究室職員

小倉尚志 (兵庫県立大・生命科学)

水谷泰久 (阪大・理)

長友重紀 (筑波大・化学)

内田 毅 (北大・理)

加茂川恵司 (文部省)

藤井尚志 (スペクトラネット)

佐藤信一郎 (北大・工)

## 博士研究員

李 浩喜□ (金沢大・薬)

向井政博 (三菱生命研)

中島 聡 (阪大・基礎工)

浅野-染田素子 (首都大・理)

太田雄大 (スタンフォード-大学)

長野恭朋 (分子研)

平松弘嗣 (東北大・薬)

久保稔 (分子研)

當舎武彦 (カリフォルニア大)

Ying Hu (Cornell Univ.)

Nakul Maiti (Case Western Reserve U.)

Biswajit Pal (Center Cell & Mol. Biol.)

E. H. Appelman (Argonne Natl, Lab.)

Takashi Yonetani (Univ. Pennsylvania)

John S. Olson (Rice Univ.)

Mel Okamura (UC, San Diego)

Gilbert Walker (Pittsburg大)

Costas Varotsis (Univ. of Crete)

Sergei G. Kruglik (Pari VI<sup>th</sup> Univ.)

Younkyoo Kim (韓国外大・物理)

Zhengqiang Li (Jilin Univ.)

Yu-jun Mo (Henan Univ.)

Jiri Hudecek (Charles Univ.)

Josef Stepanek (Charles Univ.)

Myrna Mahinay (Mindao State Univ.)

Yuzong Gu (JSPSフェロー)

Samir El-Mashtoly (JSPSフェロー)

Costas Koutsoupakis (JSPSフェロー)

## 大学院生

橋本慎二 (山口東京理科大)

中川将司 (兵庫県立大・生命科学)

紙中庄司 (キアゲン)

江川 毅 (Albert Einstein大)

# 感謝

## 総研大生

高橋 聡 (阪大・蛋白研)  
目 喜直 (ターボ・オブ・チックス)  
広田 俊 (京都薬大)  
**D. A. Proshlyako (Michigan State Univ.)**  
**X. Zhao (Princeton Univ.)**  
富田 毅 (NIH)  
上杉有紀 (物質・材料研機構)  
岩瀬 正 (カナレ電気)  
山本晃司 (阪大・工)  
安藝理彦 (富士通)  
春田奈美 (阪大・微研)  
奥野大地 (阪大・産研)  
佐藤亮 (神戸大・分子フォト)  
Jinag Li (D3)  
Ming Lv (D3)  
Ying Gao (D3)

## 他大学の共同研究者

吉川信也 (兵庫県立大・理)  
長井雅子 (法政大・理工)  
渡辺芳人 (名大・理)  
森島 績 (京大・工・名誉)  
長井 潔 (MRC. UK)  
堀 洋 (阪大・基礎工)  
鏝木基成 (神戸大・理)  
鈴木正樹 (金沢大・理)  
伊東 忍 (大阪市大・工)  
茂木立志 (東工大・資源研)  
高妻孝光 (茨城大・理)  
青野重利 (分子研)  
清水 透 (東北大・多元研)  
石村 巽 (慶大・医・名誉)  
成田吉徳 (九大・先導物質科学研)

## 技術支援

水木寛子

## 事務補佐

彦坂潮里、野村恵美子、  
二宮朱美、磯貝美穂