

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

富永 圭介

(神戸大学分子フォトサイエンス研究センター 教授)

「ナノスケールにおける反応制御の基本原理の構築」

1. 研究実施の概要

本研究では、先端的な分子分光法を開発・製作し、自己組織化された系における反応の高効率性、方向性等を多点における分子間相互作用と動的な揺らぎという観点から解明することを目的とする。研究対象としては、1) 分子会合体や集合体、また水素結合性液体などの会合性液体、及び2) 膜貫通型タンパク質を含むタンパク質を選び、分子間相互作用や揺らぎなどの観点から種々の緩和過程、反応ダイナミクスを調べる。これらの系は距離としては、サブナノから数ナノメートルであり、その意味で、我々は「サブナノから数ナノメートルにおけるサイエンス」の構築を目指すといえることができる。チーム全体としては、本年度、装置開発をほぼ終了し、予備的な実験結果を得ることができたといえる。

2. 研究実施内容

富永グループ

本研究では、自己組織化された系における反応の高効率性、方向性等を、超高速レーザーを用いた先端的な分子分光法を開発し、多点における分子間相互作用と動的な揺らぎという観点から解明することを目的とする。扱う系としては、自己組織化の基礎となる分子集合体、分子会合体であり、具体的には水素結合性液体、電荷移動錯体、ホスト-ゲスト分子（超分子）、逆ミセル内のウォーターループ等である。また、反応の方向性に関する研究として、バクテリオロドプシンにおける光駆動プロトンポンプの初期過程の解明を行う。

本年度の研究成果は以下の通りである。

1. 可視ポンプ-赤外プローブ分光法の開発とバクテリオロドプシン光反応初期過程の解明

名工大神取グループとの共同研究として、バクテリオロドプシンにおける光駆動プロトンポンプの初期過程を調べることを目的として、フェムト秒可視ポンプ-赤外プローブ分光装置の開発を行った。本装置の特徴は、2台の光パラメトリック発振/増幅を行い、波長可変のポンプ光（700-550 nm, 400 nm, 266 nm）と、同じく波長可変のプローブ光

(1500-4000 cm^{-1}) を備えていることである。水和フィルム試料を用いて560 nm励起により過渡赤外信号の観測を行ったところ、レチナールの骨格振動 (1600 cm^{-1} 付近)では、既報のデータを再現することができた。一方、今回の研究で測定を目指しているレチナールシッフ塩基のN-D伸縮振動およびタンパク質内部に取り込まれた水分子の伸縮振動については非常に弱いながらも信号を観測することができた。しかし、フィルム状の試料がポンプ光による光反応により退色し、正確な測定が困難であった。本装置では、赤外パルスのショットごとの安定性が0.3% rms以下で、0.1 mODの変化を捉えることができ、これは可視ポンプ-赤外プローブ分光装置としては世界のトップレベルにある。

2. 赤外非線形分光による水素結合性液体における溶質分子の揺らぎ

赤外短パルスを用いた3-パルスフォトエコー法などにより水素結合性液体における溶質分子の振動状態の揺らぎの機構の検討を行っており、振動揺らぎの時定数は溶質にはよらず溶媒のみに依存するという一般的な結果を得ている。本年度は、装置の性能向上をはかるために、光パラメトリック発振/増幅によるシグナル光・アイトラー光の発生とその差周波発生による赤外パルスの発生を行った。その結果、ショットごとの安定性を従来に比べて各段に向上させることができ、微弱信号の観測が可能になった。赤外ポンプ-赤外プローブ実験を行い、吸光度変化0.1 mODの変化の観測が可能であることがわかった。これを用いて水、アルコール以外の水素結合性液体における三原子イオンの配向緩和や励起振動状態の寿命を求めた。

3. 赤外非線形分光のホスト-ゲスト分子の動的相互作用

赤外非線形分光法の応用として水素結合性錯体における振動ダイナミクスの測定を行った。四塩化炭素中におけるフェノール・ベンズニトリルの錯体におけるフェノールのOH伸縮振動とベンズニトリルのCN伸縮振動の両方のモードの振動数及び励起状態ダイナミクスの錯体形成による変化を観測した。さらに、来年度、光パラメトリック発振/増幅及び差周波発生装置を製作し、二色のポンプ-プローブ分光を行う。これにより、溶質のある振動モードを励起し、他の低振動のモードをプローブする。それにより励起エネルギーがどのように分子内を流れていくかを追跡することができる。

4. テラヘルツ電磁波分光による分子間相互作用と動的揺らぎ

テラヘルツ電磁波は空気中の水により吸収されるため、測定系を乾燥空気で置換する装置を作成し、スペクトルの精度の向上をさせることに成功した。テラヘルツスペクトルの解析から無極性溶媒中における極性溶質分子の配向揺らぎに関する新しい情報を得ることができた。また、電荷移動錯体の分子軌道計算を行い、分子間振動を見積もることができた。実験結果との比較から分子間振動を同定した。

5. 逆ミセル内ウォータープール中における反応と緩和

ナノメートルサイズにおける制限空間効果や界面からの影響が溶質分子の緩和や反応にどのような影響を及ぼすかということを時間分解蛍光スペクトルにより調べている。特に励起波長依存性からウォータープール中における不均一性について調べた。本年度はマイクロチャンネルプレートを導入し、時間分解能を最短35 psまで向上させた。ウォーター

プール内における励起状態プロトン移動の研究を行い、ウォータープール内でバルクと異なる反応ダイナミクスを観測し、逆ミセル中における特異的な微視的環境(誘電率の違いなど)によるとしてそれを解釈した。

6. 大環状化合物の合成と分子認識

自己組織化をキーワードとする本研究領域では特に生体関連物質の関与する分子認識について基礎的知見を蓄積するとともにその応用の可能性を提示する事が重要なテーマである。アミノ酸や糖をターゲットとした分子認識の解析手段としてキラリティーを利用した新手法を開拓することを目的として研究を進めている。鍵となる新物質は我々がここ数年の間に開拓してきた環拡大ポルフィリンである。本年度は8個のピロールからなる大環状化合物であるオクタフィリンの不斉ループ構造の安定性について検討を行った。この不斉ループ構造の反転メカニズムの解明はアミノ酸や糖との相互作用を研究する上で極めて重要である。ピロールの β 位に種々のアルキル置換基を有するオクタフィリンを合成し、そのX線結晶構造解析を行ったところ、8の字ループの交差部位においてアルキル置換基が対面するピロール環との間でCH- π 相互作用を受けている事が明らかになった。一方、溶液中でのオクタフィリンの不斉ループ構造の反転は温度可変NMRを用いた実験によって明らかにすることができた。非常に興味深いことにメチル置換基やイソブチル置換基を有するオクタフィリンの場合には不斉ループ構造の反転が40度付近で遅くなったが、エチル置換基の場合には-60度でも反転がNMRタイムスケールに比べて速く起こっていることを見いだした。非平面の環状 π 共役系からなる8の字ループ構造の安定化に寄与する項として、1) π 共役系の共鳴エネルギー、2) 交差部位での π - π 相互作用、3) 交差部位でのCH- π 相互作用、4) 周辺置換基同士の立体反発が考えられる。

富宅グループ

本研究では、生命現象と深く関係したアミノ酸分子やペプチドの自己集積化過程で基本となる分子間相互作用と溶媒和相互作用を、系がより簡単で詳しい研究が可能な気相において、種々の分光学的手段を用いて検討する。またこれらの凝集体の中で起こる化学反応(電子移動やエネルギー移動)を詳細に調べ、その指向性の発現と構造との関係が生体内での機能発現に如何に結びつくかを分子レベルで明らかにする。ここでは、気相での凝集過程の検討を端緒として、タンパク質分子の固体表面での二次元相互作用による集積化の検討を視野に入れた研究を遂行していく。また、金属イオンを含むクラスターについての詳細な分光実験を実施する。すなわち、溶媒分子数が数個から数十個に限定されたクラスター内で、溶媒分子の数と共に金属(錯体)イオンの電子構造がどのように変化するかを調べる。また電子構造の変化に伴って、電子移動過程や酸化還元過程がどのように影響を受けるかを分子論的に明らかにする。

本年度の研究成果は以下の通りである。

1. 生体分子分光解析装置の開発

ポリアミド、アミノ酸クラスターの構造形成における水和分子の役割を調べるために生

体分子分光解析装置の試作、開発を進めている。

(1) 新たに温度制御がイオントラップと生体分子分光解析装置の設計、製作を行った。ここでは、ポリペプチドの水和構造とその温度依存性を研究するために、室温から10 Kまで温度可変な22極型のイオントラップを試作した。またこのトラップに捕捉したイオンの構造を分光学的に調べる目的で、ナノ秒赤外レーザーの試作と分光解析部の設計、製作を行った。

(2) プロトン化したジペプチドの水和クラスターの光解離過程およびその安定性について検討し、水和による環化反応の促進と溶媒へのプロトン移動反応を新たに見出した。

2. 溶媒和金属イオンクラスターの構造と反応性

生体分子の構造と関連深いMgやCa原子とそのイオンの溶媒和過程について、ナノ秒、フェムト秒レーザーを駆使して構造と反応性の検討を行った。

(1) $Mg^+(NH_3)_4$ の励起状態の動的緩和過程および酸化反応の詳細な情報を得るために、 $Mg^+(NH_3)_4$ についてフェムト秒レーザーの基本波 (800 nm)を用いたポンプ-プローブ実験を行った。励起状態の寿命は800 fsと得られ、溶媒和に伴う励起状態の非常に大きく安定化で、基底状態への無輻射過程の速度が非常に速くなっていることを明らかにした。また $Mg^+(NH_3)_4$ の励起後の内部転換と溶媒和構造の動的変化を含む吸収回復の信号変化を初めて観測し、時定数を決定した(1.2 ps)。

(2) $Mg(H_2O)_n$ 、 $Ca(H_2O)_n$ の幾何構造と電子構造

$Mg(H_2O)_n$ 、 $Ca(H_2O)_n$ の光イオン化過程を検討し、アルカリ金属原子の系と同様に、8個以上の水分子の配位によりイオン化ポテンシャルが3.1 eVに収束することを新たに見出した。この結果は、金属原子のクラスター内で自発的イオン化により説明した。

鏝木グループ

高等動物の神経内分泌に携わる神経線維の末端部には、神経伝達物質の合成・貯蔵・放出に携わる小胞が存在する。この小胞膜には膜貫通型チトクロムb561を中心とする脳神経系内分泌組織特異的な電子伝達系が存在し、細胞質のアスコルビン酸から電子を受け取り、小胞内腔に存在する銅含有酸素添加酵素への電子伝達反応を媒介する。本研究ではチトクロムb561に代表されるような、生体膜を貫通する電子伝達反応の詳細なメカニズムを明らかにすることを目的としている。

本年度の研究成果は以下の通りである。

(1) プラナリアにおける神経ペプチドのアミド化反応を行う、PHM酵素のクローニングとその神経系における発現を解析し、チトクロムb561と同一の部位に発現していることを明らかにした。

(2) 大腸菌での可溶性チトクロムb5発現系を利用して得られたチトクロムb5をモデルとして利用することにより、DEPCによるチトクロムb561のへム配位性His残基の特異的修飾と電子伝達の阻害機構を調べた。この解析により、アスコルビン酸から細胞質側へへの電子伝達反応の機構モデル「協調的プロトン・電子伝達メカニズム」を提唱した。

(3) Blue Native PAGEの手法を利用した二次元電気泳動とMALDI-TOF-MSを中心としたタンパク質化学解析により、クロマフィン小胞におけるタンパク質間相互作用の解析を行った。チトクロムb561が小胞中のタンパク質との相互作用をしていることを明らかにした。

(4) 大腸菌での膜結合形チトクロムb5の発現系構築に成功した。膜結合型を高純度に大量精製する方法を確立した。

(5) 小麦胚芽由来の無細胞タンパク質発現系を利用して、膜結合型チトクロムb5及び可溶性チトクロムb5の発現とヘムの効率的再構成の手法を確立した。

松下グループ

タンパク質の構造揺らぎを明らかにし、機能との関わりを理解することはソフトナノマシンの設計指針を検討する上で重要である。しかし、タンパク質の揺らぎを直接観察することは通常のアンサンブル測定では困難である。本研究では、個々のタンパク質を分光測定することで揺らぎを直接捉えることを目的としている。光合成の反応に必要なエネルギーを得るために、一個の反応中心の周りには100個以上の色素分子がタンパク質との複合体として配置されており、光捕集のためのアンテナとして働いている。タンパク質の安定構造は無数にあり、常温ではタンパク質はこれら無数の構造の間を絶えず移り変わっている。この揺らぎと機能の関係を理解するために、低温で個々の色素・タンパク複合体を分光測定し、個々の安定状態における光励起状態を解明することを本研究では目的としている。

本年度の研究成果は以下の通りである。

1. 脂質膜中のアンテナ複合体

紅色光合成細菌と呼ばれる一群の細菌の色素・タンパク複合体にはLH1複合体とLH2複合体の二種類があり、ともに環状構造を持っている。構造に関してはLH2についての研究が先行しており、X線結晶構造は円であるが、ミセル中のLH2の単一分子分光の結果は楕円であった。LH2の構造が環境に敏感であることを示しているため、できるだけ天然に近い状態で個々の複合体の分光を行うために、透析によってミセル中のLH2を脂質膜中に導入した。脂質にはdimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)を用い、DMPC:LH2=50,000:1のモル比でLH2を脂質膜中に孤立させることができた。

天然の状態に近い脂質二重膜の中でLH2が取る構造を調べるために、B850バンドの $k = \pm 1$ の2本のピークのエネルギー差 ΔE_1 のヒストグラムを作り、ミセルの場合と比較した。データ数がまだ少ないが、脂質中とミセルとでは分布のパターンが異なることが示唆された。

2. 単一複合体のスペクトルにみえる異常な線形

LH2の発光励起スペクトルにはB850バンドの低エネルギー端にしばしば左右非対称な異常な線形が見られる。この領域には1 ns程度の輻射寿命で基底状態に輻射失活する $k = 0$ 状態と、0.1 ps程度の時定数で $k = 0$ に緩和する $k = \pm 1$ 状態の三つの状態が存在する。しかし、スペクトルはそれぞれの寿命を反映した三つのLorentz曲線の和にはなっていない

い。これは、 $k = \pm 1$ が $k = 0$ に緩和するために、両者が干渉しあってスペクトルの位相がずれ、吸収曲線に分散成分が混ざって非対称な線形を生み出しているためである。いわば、緩和が引き起こしたFano効果のようなものであるが、緩和による励起子のコヒーレンスの乱れがスペクトルに現れたと見ることもできる。

3. 単一複合体のスペクトルの温度変化

タンパク質の安定構造は無数にある。室温ではそれらの間を絶えず移り変わっているが、測定を行っている1.5 Kでは熱エネルギーが小さくポテンシャル障壁を越えられないため、一つの構造に固定されている。1.5 Kから徐々に温度を上げていくとスペクトルが変化し始めるだろう。9個の独立したBChl *a*分子の吸収線の集まりであるLH2のB800バンドについて、5 ~ 40 Kの範囲で同一の複合体のスペクトルを測定した。典型的には温度とともに各分子の吸収線の動きが活発になる。一種類の構造変化に別の種類の構造変化が重なって同時に起こっているのがしばしば見受けられ、ポテンシャルの多次元性や階層性を反映している。さらに温度を上げていくと、やがてスペクトルが大きく変化する。このとき複数の色素分子の吸収波長が同時に変わっているので、この構造変化は一個の色素だけに影響を及ぼす局所的な変化ではなく、タンパク質の大きな範囲で起こる共同的な構造変化である。別の複合体では、大きなスペクトル変化が5 Kでも起こっており、そのポテンシャル障壁は必ずしも高くはない。

神取グループ

本研究では、バクテリオロドプシンを対象として、水素結合ネットワークを介した光駆動プロトンポンプ機構を、赤外分光を用いて解明し、将来的には、水溶液中における情報伝達を活用した機能性材料などのナノソフトマシンの創製の設計指針を与えることを目指している。

本年度の研究成果は以下の通りであり。

前年度までに、低温偏光赤外分光をバクテリオロドプシンの光反応中間体に適用し、蛋白質内部でのプロトン移動にとって中心的な役割を演じる水分子の水素結合変化を明らかにしている。本年度は、さらに蛋白質のアミノ酸側鎖として水素結合ネットワークに重要な寄与をするアルギニンに対して同位体標識を導入し、プロトンポンプ過程における水素結合変化を明らかにした。一方、室温での時間分解赤外分光装置を用いた計測の試みも、2つの方法で開始した。フェムト秒からピコ秒までの超高速時間領域の実験（レチナールの異性化による水素結合ネットワークの摂動を測定する）は富永との共同研究として行った。本年度、測定系の構築までが完了し、現在は水和フィルム試料を用いた実験条件の最適化を試みている。一方、ナノ秒以降の時間領域の実験（プロトン移動過程における水素結合ネットワークの摂動を測定する）は神取研究室で行っている。本年度は、時間分解フーリエ変換赤外分光器を用いた測定系の構築を行い、天然のバクテリオロドプシンに対して十分な精度のデータを得ることができた。

さらにバクテリオロドプシンの類縁蛋白質として塩素イオンをポンプするハロロドプシ

ンのポンプ機構を低温赤外分光により解析し、プロトンポンプとは異なった内部結合水の水和構造を見出した。

水谷グループ

酵素で起きる反応においては、活性部位が反応の触媒として働いていると同時に、その残りの部分は媒質として反応が生理的に期待される方向へ起こるよう助けている。さらにタンパク質の立体構造は溶媒である水から静的・動的両面において大きな影響を受けている。タンパク質と水とが動的にどのように結びついているかという問題は、生命活動における水の役割を考えるうえで大変重要である。本研究では、ヘムタンパク質のひとつであり基礎的データが揃っているミオグロビンを対象として、高次構造変化と水和構造の変化の動的相関を調べる。その活性部位であるヘムでのリガンド脱離に伴い、高次構造と水和構造がどのように変化するかについて、スペクトル変化をピコ秒の時間刻みで追跡する。リガンド脱離に伴ってタンパク質が異方的に構造変化することに着目して、水和殻にある水分子のラマンスペクトルを選択的に抽出する。水和構造のダイナミクスと、紫外共鳴ラマン分光法から得られたタンパク質の構造ダイナミクスとを比較して、活性部位を取り巻く2つの媒質であるタンパク質と水とが、機能発現において動的にどのような相関関係を持っているかを明らかにする。

本年度の研究成果は以下の通りである。

1. タンパク質高次構造ダイナミクスの検出にむけたピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置の製作

タンパク質が機能するためには、それ自身の高次構造が変化することが必要不可欠である。本研究では、タンパク質高次構造変化の実体の解明にむけてピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置を製作し、性能の評価を行なった。モード同期チタンサファイアレーザーおよび再生増幅器で構成されるレーザーシステムの出力を基に、第二高調波(波長390-405 nm)を発生させ、これをポンプ光発生用および紫外プローブ光発生用とに分割した。後者の光を50気圧のメタンガスもしくは水素ガスを封入したラマンシフターに集光し、誘導ラマン散乱を発生させた。この後、(1) 1次ストークスラマン散乱光の第二高調波発生、(2) 1次のストークスラマン散乱光とレーザー光の第二高調波との和周波発生の二通りの方法により、204-244 nmの範囲で連続的に波長可変なピコ秒の紫外プローブ光を発生させた。この広範囲の波長可変性は、共鳴効果を活用した部位選択的な観測が可能となる点でタンパク質の測定にはきわめて有効である。得られた紫外プローブ光の線幅は 16 cm^{-1} であり、紫外プローブ光と可視ポンプ光との相互相関幅は2.3 psであった。タンパク質試料に紫外共鳴ラマン分光法を応用する場合、分子量が大きいことによる強いレーリー散乱光やトリプトファン蛍光が、測定上大きな問題となる。これら迷光を効率的に除去するフィルターとして働くプリズム型前置分光器を製作し、CCD検出器を装着した主分光器前段に設置した。前置分光器のフィルターとしての性能を評価するために、主分光器の入射スリット

幅を変えて、ヘモグロビンの紫外共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、レーリー散乱光や蛍光に起因する迷光が著しく低減されることがわかった。

2. ミオグロビンのリガンド脱離に伴うタンパク質構造変化：ピコ秒紫外共鳴ラマン分光法による観測

ヘモグロビン (Hb) はリガンドの脱着に伴い、大きな構造変化を起こし、それがリガンド親和性に協同性を生み出している。本研究では、Hbのサブユニットに構造が似たミオグロビン (Mb) を用い、新たに製作したピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置を使って、タンパク質の構造変化をとらえることを試みた。得られたピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルでは、COの光解離後、100 psの段階ですでに1618 cm^{-1} 付近のチロシンのY8aバンドに明瞭な強度変化が現れた。また、トリプトファンバンドの強度変化はチロシンの変化よりは遅い変化を示し、100 psにおいてはまだ変化がみられず、1000 psにおいて強度増大を示した。これらのバンドに強度変化がおこる原因は、リガンド脱離後の過渡状態において、トリプトファンやチロシン残基周囲の局所的なタンパク質環境変化を反映していると考えられる。以上のように、このような部位特異的なダイナミクスの観測により、ミオグロビンについて、ピコ秒の時間領域で起る二段階のタンパク構造の変化をとらえることに初めて成功した。ミオグロビンは物理化学的に最もよく調べられているタンパク質のひとつであるが、タンパク質のピコ秒に起きる構造変化を部位特異的に観測したのはこれが初めての例である。現在、スペクトルのS/N比を、各残基のバンド強度変化の時定数を求められるレベルまで向上させようとしている。

3. 研究実施体制

富永グループ

- ①研究分担グループ長：富永圭介（神戸大学分子フォトサイエンス研究センター、教授）
- ②研究項目：新規な時間分解赤外分光法による状態相関と反応の特異性

富宅グループ

- ①研究分担グループ長：富宅喜代一（神戸大学理学部化学科、教授）
- ②研究項目：金属イオンを含むクラスター・生体分子の電子状態及び構造の多様性

鏝木グループ

- ①研究分担グループ長：鏝木基成（神戸大学大学院自然科学研究科、教授）
- ②研究項目：膜貫通型タンパク質における電子伝達系の構造・機能解析と生理機構

松下グループ

- ①研究分担グループ長：松下道雄（東京工業大学理学部物理学科、助教授）
- ②研究項目：単一分子分光による酵素タンパク質の構造揺らぎと機能

神取グループ

- ①研究分担グループ長：神取秀樹（名古屋工業大学応用化学科、教授）
- ②研究項目：水素結合ネットワークを介した光駆動プロトンポンプの解明

水谷グループ

- ①研究分担グループ長：水谷泰久（神戸大学分子フォトサイエンス研究センター、助教授）
- ②研究項目：機能発現における水とタンパク質の動的相関

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- T. Satoh, H. Okuno, K. Tominaga, and K. Bhattacharyya, “Excitation Wavelength Dependence of Solvation Dynamics in a Water Pool of a Reverse Micelle”, *Chem. Lett.* **33** (No. 9), 1090-1091 (2004).
- H. Maekawa, K. Ohta, and K. Tominaga, “Spectral Diffusion of the Anti-Symmetric Stretching Mode of Azide Ion in a Reverse Micelle Studied by Infrared Three-Pulse Photon Echo Method”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6** (No. 16), 4074 - 4077 (2004).
- H. Maekawa, K. Ohta, and K. Tominaga, “Vibrational Population Relaxation of the $-N=C=N-$ Anti-Symmetric Stretching Mode of Carbodiimide Studied by Infrared Transient Grating Method”, *J. Phys. Chem. A* **108**, 9484-9491 (2004).
- T. Uemura, S. Saito, Y. Mizutani, and K. Tominaga, “Isotope Dilution Effect on the Hydroxyl Stretch Bands of Alcohols”, *Mol. Phys.* **103**, 37-44 (2005).
- H. Maekawa, K. Ohta, and K. Tominaga, “Vibrational Dephasing of the $-N=C=N-$ Anti-Symmetric Stretching Mode of Carbodiimide Studied by Infrared Photon Echo Method”, *J. Mol. Struct.* **735-736**, 135-143 (2005).
- N. Zhavoronkov, H. Maekawa, H. Okuno, and K. Tominaga, “All-Solid-State Femtosecond Laser System for Variable Multi-kHz Operation”, *J. Opt. Soc. Am. B* **22** (No. 3), 567-571 (2005).
- J. Setsune, and T. Yoshida, “Synthesis and Properties of Metal Complexes of Expanded Porphyrins”, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 8/4-6, 485, 2004.
- N. Okai, A. Takahata, and K. Fuke, “Electronic Structure, Stability, and Formation Dynamics of Hypervalent Molecular Clusters: $CH_3NH_3(CH_3NH_2)_n$ ”, *Chem. Phys. Lett.* **386**, 442-447, (2004).
- N. Okai, S. Yoshida, K. Aranishi, A. Takahata, and K. Fuke, “Multiphoton

Ionization and Oxidation Processes of Mg-Ammonia Clusters”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7**, 921–929 (2005).

- F. Takeuchi, H. Hori, E. Obayashi, Y. Shiro, and M. Tsubaki, “Properties of two distinct heme centers of cytochrome *b561* from bovine chromaffin vesicles: Redox titration, EPR, and resonance Raman studies”, *J. Biochemistry* **135**, 53–64 (2004).
- A. Asada, H. Orii, K. Watanabe, and M. Tsubaki, “Planarian peptidylglycine-hydroxylating monooxygenase, a neuropeptide processing enzyme, colocalizes with cytochrome *b561* along the central nervous system”, *FEBS Journal*, **272**, 942–955 (2005).
- D. Nozaki, T. Iwata, T. Ishikawa, T. Todo, S. Tokutomi and H. Kandori, “Role of Gln1029 in the photoactivation processes of the LOV2 domain in *Adiantum* phytochrome3”, *Biochemistry* **43**, 8373–8379 (2004).
- M. Shibata, N. Muneda, K. Ihara, T. Sasaki, M. Demura and H. Kandori, “Internal water molecules of light-driven chloride pump proteins”, *Chem. Phys. Lett.* **392**, 330–333 (2004).
- T. Tanimoto, M. Shibata, M. Belenky, J. Herzfeld and H. Kandori, “Altered hydrogen bonding of Arg82 during the proton pump cycle of bacteriorhodopsin: A low-temperature polarized FTIR spectroscopic study”, *Biochemistry* **43**, 9439–9447 (2004).
- S. Hayashi, E. Tajkhorshid, H. Kandori and K. Schulten, “Role of hydrogen-bond network in energy storage of bacteriorhodopsin’s light-driven proton pump revealed by ab initio normal-mode analysis”, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10516–10517 (2004).