Osaka University Knowledge Archive

Title	RESONANCE RAMAN INVESTIGATIONS OF THE OXYGEN BINDING SITES IN HEMOPROTEINS WITH CARBON MONOXIDE AS A PROBE
Author(s)	Tsubaki, Motonari
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27676
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【76】

氏名・（本籍）	鍔木基成（つばき もとなり）
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 7054 号
学位授与の日付	昭和60年12月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**一酸化炭素をプローブとしたヘムタンパク質酸素結合サイトの共鳴ラマン散乱法による研究**
論文審査委員	（主査） 教授 三井 利夫 （副査） 教授 大沢 文夫　教授 葛西 道生　教授 又賀 昇 教授 京極 好正　助教授 森本 英樹

論文内容の要旨

ラマン効果は物質による光の非弾性的散乱の結果生ずるものであるが，レーザー光源の導入以来とりわけ共鳴ラマン散乱の研究が盛んとなってきている。これは励起光の波長がその物質の持つ電子遷移に由来する吸収帯に接近するにつれその電子遷移に関係した振動のみが共鳴ラマン線としてラマンスペクトル中に強く現れて来ることによる。ヘムタンパク質は可視部に吸収帯があるヘムをその活性中心に持つことから共鳴ラマン散乱による研究対象として生化学的，生物物理的見地から非常に興味を持たれてきた。一酸化炭素（CO）は酸素（O_2）が結合するヘムタンパク質の競合的阻害物であるが，ヘム鉄に配位結合したCOの光解離性が非常に強いためCO結合型ヘムタンパク質の共鳴ラマン散乱による研究はこれまであまり行われてこなかった。本研究の目的はこのCO結合型ヘムタンパク質（ヘモグロビン，ミオグロビン，シトクロムP－450）の共鳴ラマン散乱スペクトルの測定によって，ヘム鉄に配位したCOをプローブとして活性中心であるヘムの電子状態およびその周辺の動的な立体構造を知ろうというものである。

本論文は四つのPartより構成されており，まずPart Aにおいてはラマン効果および共鳴ラマン効果の理論的背景について述べたあと，本研究を行うにあたっての実験的基礎となるヘムタンパク質およびヘムモデル複合体についての共鳴ラマン散乱法による研究結果についてまとめた。Part Bにおいては，CO結合型ヘモグロビン，ミオグロビンの共鳴ラマンスペクトルの測定より，COの安定同位体の使用によるν（Fe－CO），ν（C－O）伸縮振動およびδ（Fe－C－O）変角振動の同定と，それらの振動モードのラマン励起機構について記述した。さらにこれらの振動，特にν（Fe－CO）伸縮振動がヘモグロビンのR－Tの四次構造変化に際しても何の変化も見られなかったことは注目される。Part Cにお

いては，ＣＯ結合型シトクロムＰ－４５０scc　におけるν（Fe－CO），ν（C－O）伸縮振動の同定について述べたあと，ヘモグロビン，ミオグロビンに比較して極端に低いν（Fe－CO）伸縮振動数の原因としてのシトクロムＰ－４５０sccヘムの第五配位子（システイン残基のチオレートイオン）の重要性について記述した。Ｐａｒｔ Ｄにおいては，シトクロムＰ－450sccのν（Fe－CO）伸縮振動に対する基質コレステロールあるいは電子供与体であるアドレノドキシンの添加効果について述べた。特に基質コレステロールが活性中心であるヘムに配位したＣＯに対して立体化学的な作用を示すことがν（Fe－CO）伸縮振動数の変化より推測された。このことは，酸化型状態におけるヘム鉄のスピン状態に対するコレステロールの添加効果とあわせて，シトクロムＰ－４５０sccが他のヘムタンパク質と比較してはるかに柔軟なヘム周辺の立体構造を持つことを強く示すものである。

ＣＯ結合型ヘムタンパク質は，酸素（O_2）結合型ヘムタンパク質を研究するにあたっての良いモデルとみなすことができ，しかもはるかに安定性が高い。このため各種ＣＯ型ヘムタンパク質の共鳴ラマンスペクトルの測定により，酸素結合型ヘムタンパク質についての多くの情報を知ることが可能になってくるものと思われる。

論文の審査結果の要旨

ヘム蛋白質の活性中心はヘム（フェロポルフィリン）にあり，ヘムは可視部に光吸収帯を持つので，共鳴ラマン法がヘム蛋白質の研究に有力な手段となる。この論文は，ヘモグロビン，ミオグロビン，チトクロームＰ－４５０ の活性中心に一酸化炭素（CO)を結合させたものについて，ＣＯの関与する固有振動のレーザラマン法による研究と，その結果に関する考察を述べている。

ヘムに結合したＣＯは光解離をおこし易いので，従来レーザラマン法による研究は行われていなかった。この研究では，励起レーザーとして吸収帯ピークに近い波長のクリプトン・レーザーを用い，ＣＯの光解離を小さくして共鳴ラマン線を観測した。またＣＯの安定同位体$^{12}C^{16}O$, $^{13}C^{16}O$, $^{12}C^{18}O$, $^{13}C^{18}O$ を用い，ラマンスペクトルの同定を行った。

論文はＡ，Ｂ，Ｃ，Ｄの４章からなる。Ａ章ではラマン効果と共鳴ラマン法の理論的背景とそのヘム蛋白研究への応用を概観している。Ｂ章ではＣＯ結合型ヘモグロビンとミオグロビンの共鳴ラマンスペクトルの測定結果を述べている。ＣＯの同位体を用いて，伸縮振動ν（Fe－CO），ν(C－O)と変角振動δ(Fe－C－O)によるピークが同定された。またヘモグロビンにＲ－Ｔコンフォーメーション変化を起させ，その際のこれらの振動モードの振動数を測定したが，変化は見られなかった。これはＲ－Ｔ転移の機構についての知見として重要と思われる。Ｃ章ではＣＯ結合型チトクローム，Ｐ－450scc の共鳴ラマンスペクトルについての研究結果を述べている。伸縮振動ν（Fe－CO）とν(C－O）は同定できたが変角振動δ（Fe －C－O）にあたるピークは明確には観測できなかった。ν（Fe－CO）伸縮振動の周波数はヘモグロビン，ミオグロビンに比べて極めて低い。この原因としてはチトクローム Ｐ－450sccのヘムの第５配位子がシステイン残基のチオレートイオンであることが重要であると推測して

いる。D章では，ＣＯ結合型チトクロームＰ－450sccの光解離性と共鳴ラマンスペクトルに対する基質コレステロールおよび電子供与体であるアドレノドキシン添加の効果についてのべている。ν（Fe－ＣＯ）はコレステロール添加により477 cm^{-1}から483 cm^{-1} へと変化する。これはコレステロールのステリックな効果によるものとしている。

以上のように，この論文は，今まで測定の困難とされていたＣＯ結合型ヘム蛋白質の共鳴ラマンスペクトルの観測に成功し，ＣＯの関与した固有振動について新しい知見を報じており，ヘム蛋白の構造と機能についての基本的データを提供している。よって本論文は博士論文に値するものと認める。