The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | クロロクルオリンの共鳴ラマンスペクトルによる研究：クロロクルオロヘムとアポ蛋白との相互作用 |
| Author(s) | 千原，壯介 |
| Citation | 大阪大学，1984，博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33971 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【16】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 千(ち) 原(はら) 壯(そう) 介(すけ) |
| 学位の種類 | 医 学 博 士 |
| 学位記番号 | 第 6396 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和59年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 医学研究科 生理系専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **クロロクルオリンの共鳴ラマンスペクトルによる研究**<br>**—クロロクルオロヘムとアポ蛋白との相互作用—** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教 授 萩原 文二<br>(副査)<br>教 授 中馬 一郎 教 授 山野 俊雄 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

(目　的)

クロロクルオリン(Chl)は泥ケヤリ(Potamilla leptochaeta)と呼ばれる，海岸に住む環形動物の体液中にあるヘム蛋白で，そのヘムはプロトヘムⅨの2位のビニル基をホルミル基に置換したクロロクルオロヘムを持つ。機能はプロトヘムⅨを持つヘモグロビン(Hb)と同じ酸素担体であるが，酸素化過程における共同性は小さい。

本研究では，蛋白に結合したヘム近傍の分子構造に関する情報を選択的に得られる共鳴ラマン(RR)分光法を用い，クロロクルオロヘムとアポ蛋白との相互作用を調べた。

(方法ならびに成績)

RRスペクトルは10℃で，441.6nmのレーザー光で励起して測定した。

deoxy ChlのRRスペクトルは，クロロクルオロヘムをアポミオグロビンに再構成したものとよく似ており，Fe－N(His)の伸縮振動に帰属される222$cm^{-1}$にラマン線がみとめられ，ヘム鉄の軸配位子としてHisのイミダゾールが配位していることが確かめられた。R型deoxy Hbでも220$cm^{-1}$にラマン線があり，Fe－Hisの結合の強さはホルミル基の影響を殆んど受けていない。しかし，deoxy Chlの酸化還元マーカーは1347$cm^{-1}$と，deoxy Hbの1357$cm^{-1}$より大きく低波数側にシフトしており，ホルミル基の電子吸引性により$\pi$電子密度が小さくなっていることを示唆している。

oxy Chl，met Chlは回転セルでRRスペクトルを測定しても，かなりの部分が光解離，光還元を受けるがoxy Chlでは低スピンとなり，met Chlでみられたfe－Hisの伸縮振動による222$cm^{-1}$のラマン線は272$cm^{-1}$にみられる。さらにこの時酸化還元マーカーは1378$cm^{-1}$に観察された。met Chlは液体窒

素温度でも光還元されたが，488 nm で励起した時は光還元されなかった。

deoxy Chl にシッフ塩基を分子内で造った時のラマン線の変化から 1636 $cm^{-1}$ と 1647 $cm^{-1}$ のラマン線はホルミル基の C＝O 伸縮振動に帰属されることが証明された。SDS を加えると met 型では 1646 $cm^{-1}$, oxy 型では 1649 $cm^{-1}$ のラマン線がホルミル基の本来の位置である 1672 $cm^{-1}$ にシフトした。したがって Chl ではホルミル基がアポ蛋白と強い水素結合をしていると考えられる。

oxy Chl の光解離は $Mg^{2+}$ によって抑制された。Tris－buffer 中，10 mM $Mg^{2+}$ 存在下では酸化還元マーカーは，deoxy 型を示す 1347 $cm^{-1}$ が消え oxy 型を示す 1378 $cm^{-1}$ のラマン線と共に 1356 $cm^{-1}$ が現われた。met 型に KCN を大過剰に加え RR スペクトルを測定すると酸化還元マーカーは met 型を示す 1374 $cm^{-1}$ と 1356 $cm^{-1}$ の 2 本になったが，光還元をおこさない 488 nm で励起すると 1356 $cm^{-1}$ は消えるので 1356 $cm^{-1}$ $Fe^{2+}$ によるものといえる。また 1356 $cm^{-1}$ のラマン線が現われる時は全て低スピンを示す 270 $cm^{-1}$ のラマン線が観察された。それ故 1356 $cm^{-1}$ のラマン線は $Fe^{2+}$ 低スピンのものと結論された。

met Chl の pH をあげていくと，吸収スペクトルでは，$Fe^{3+}(H_2O) \rightleftarrows Fe^{3+}(OH) \rightarrow$ 変性，の 2 段階の変化を示し，最初の変化の pK は 8.5 であった。RR スペクトルでは OH の配位したヘムは高スピンと低スピンの混合物であることを示した。oxy Chl は pH 10 以上で自動酸化を起こし吸収スペクトルは met 型と同じになり，変性への変化を示しており pK は 10.5 であった。

met Chl を Ar 下 80 ℃で加熱するとシッフ塩基の形成によりホルミル基の C＝O 伸縮振動によるラマン線がなくなり，酸化還元マーカーはプロトヘム Ⅸ の deoxy 型と同じ 1356 $cm^{-1}$ にシフトし，低スピンで光還元されていることが示された。これを空気にさらすと酸化還元マーカーは met 型の 1374 $cm^{-1}$ に現われ光還元されない。これらの結果から光還元にはアポ蛋白が関与し，その電子供与体はアミノ酸残基で，ある立体構造を取る時のみ電子供与体になると推測される。またヘムの性質は光還元には関与していないことがわかった。

（総　　括）

Chl ではホルミル基の C＝O 伸縮振動によるラマン線が大きく低波数側にシフトしていること及びヘムの酸化還元マーカーとなるラマン線もヘモグロビンと比べて低波数側にシフトしていることから，クロロクルオロヘムのホルミル基とアポ蛋白が水素結合をし，その結果ポルフィリンの $\pi$ 電子密度を下げているといえる。鉄軸配位子は His のイミダゾールであり，Fe と His の結合の強さはホルミル基の影響を殆んど受けていない。

$Mg^{2+}$，大過剰 KCN，あるいは $OH^-$ 存在化での met Chl の RR スペクトルに生ずる 1356 $cm^{-1}$ のラマン線は $Fe^{2+}$ 低スピンに属する。

光還元はヘムの性質に依存しない。また光還元の電子供与体はアミノ酸残基で，ある立体構造をとるとき電子供与体となり得る。

## 論文の審査結果の要旨

本論文はある種の環形動物の酸素運搬体であるクロロクルオリンの性質を共鳴レーザーラマン分光法を用いて調べたもので，この研究の結果このヘム蛋白質の相互作用，そのヘム近傍の電子状態および光還元の際のSH基の関与などについていくつかの新しい知見が得られた。これらの成果は酸素担体の構造と機能の関連を解明する上できわめて有意義なものであり，本論文は学位論文にふさわしい内容をもつものであると判断される。