



Title	Resonance Raman Studies on the Structural Dynamics of Hemoglobins from Scapharca inaequalvis
Author(s)	高, 翔
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/98714">https://hdl.handle.net/11094/98714</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

## Abstract of Thesis

Name ( Gao Xiang )

## Title

Resonance Raman Studies on the Structural Dynamics of Hemoglobins from *Scapharca inaequivalvis*  
(共鳴ラマン分光法によるアカガイ由来ヘモグロビンの構造ダイナミクスに関する研究)

## Abstract of Thesis

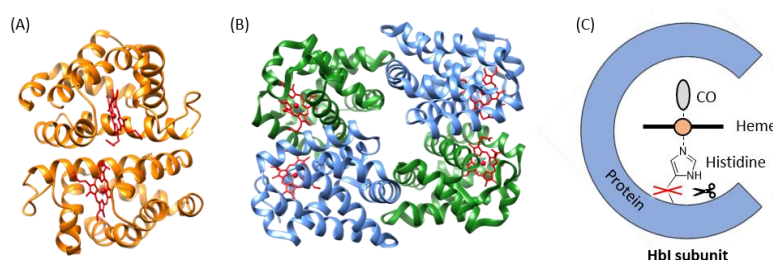
Cooperativity arising from the coupling between domains is essential for the protein functionality. Although the cooperativity in the oxygen affinity of hemoglobin has been extensively studied, the cooperativity in the structural dynamics of hemoglobins remains poorly understood. In this thesis, we study the structural dynamics of homodimeric hemoglobin (HbI, Figure 1A) and heterotetrameric hemoglobin (HbII, Figure 1B) from *Scapharca inaequivalvis* following carbon monoxide (CO) photodissociation using time-resolved resonance Raman spectroscopy.

HbI is a homodimeric protein that serves as a minimal cooperative system. Due to the absence of heterotropic effects, HbI is an ideal model for studying the cooperativity in structural dynamics involving the number of dissociated ligands. We investigated the structural changes in the Fe–proximal histidine bond, the position of the heme within the

pocket, and the hydrogen bonds between heme and interfacial water within the same time regime following ligand dissociation. The singly and doubly dissociated species exhibited similar structural changes, but at different rates. The rates of the observed structural changes indicated that they occurred synchronously with subunit rotation and are influenced by intersubunit coupling, which underlies the positive cooperativity of HbI. HbII consists of two AB-dimers, whose structure closely resembles that of HbI. Therefore, HbII is a more complicated system for studying cooperativity in a more advanced stage. The observed spectral changes showed that the heme structure of the transient dissociated form of HbII was similar to that of HbI; however, the transition from the transient dissociated form to the equilibrium unligated form was faster for HbII than that for HbI. Additionally, the transition rate of HbII increased as the number of dissociated ligands increasing from one to four. The positive correlation between the rate constants and number of dissociated ligands indicates that the structural transition of HbII following CO dissociation is cooperative.

The covalent linkage between heme and the proximal histidine residue is highly conserved among diverse hemoglobins. In our third study, we revealed the effects of this linkage on the structural dynamics of HbI. We designed a mutant with exogenous imidazole, disrupting the covalent connection between the heme proximal ligand and the peptide chain, to mimic the protein without the covalent linkage (Figure 1C). The structural dynamics following CO photodissociation suggested that the rearrangements of the intersubunit interactions of HbI were conserved in the mutant. In contrast to the one-phase relaxation of wild-type HbI, the mutant exhibited two-phase relaxation. Moreover, the cooperativity in dynamics observed in the HbI H101G mutant indicated that the coupling between the two binding sites involves both the interactions through the peptide chains and the direct communication between the two heme groups.

In summary, our studies revealed the intersubunit coupling in the structural dynamics of HbI and HbII. The cooperativity in the dynamics of HbI and HbII dimer involves various interactions, including intersubunit assemblies and heme–globin covalent linkage. These studies help further characterize the protein dynamics regulating the cooperativity mechanism of hemoglobins composed of globin-folded subunits.



**Figure 1.** (A) Structure of HbI. (B) Structure of HbII. (C) Scheme of the disruption of the heme–globin covalent linkage of HbI.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( Xiang Gao )		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	教授 水谷 泰久
	副 査	教授 舩橋 靖博
	副 査	教授 水口 賢司

論文審査の結果の要旨

複数のサブユニットから構成される、多量体タンパク質においては、サブユニットの性質が他のサブユニットの状態に依存することがしばしばある。この性質は協同性とよばれる。協同性は、運搬体タンパク質や酵素において重要な役割を果たす。ヘモグロ빈は協同性を示す代表的なタンパク質であり、協同性によって効率的な酸素運搬を実現している。ヘモグロ빈の協同性発現機構を解明することは、ヘモグロ빈の理解のみならず、サブユニット間相互作用および協同性に関して広くタンパク質の理解に寄与する。

ヘモグロ빈の研究においては、協同性を理解するために、リガンドの結合数に依存してタンパク質の性質がどのように変化するかが調べられてきた。しかし、それはリガンド結合平衡やリガンド結合部位の構造などの静的な性質であり、動的な性質を調べた研究はなかった。Xiang Gao 氏は、時間分解紫外共鳴ラマン分光法を用いて、アカガイ (*Scapharca inaequivalvis*) 由来ヘモグロ빈の動的性質についてリガンド結合数依存性を調べた。

本論文はその研究成果をまとめたものであり、7 章から構成されている。第 1 章は、協同性およびヘモグロ빈の解説をし、本論文にまとめた研究の目的について述べている。第 2 章は、ヘモグロ빈のリガンド結合部位であるヘムの共鳴ラマンスペクトルについて説明している。第 3 章は、本研究で用いた実験方法について述べている。特に、研究室オリジナルの装置である、時間分解共鳴ラマン分光装置およびデータ解析法について、詳しく解説している。

第 4 章では、アカガイ由来の二量体ヘモグロ빈について、リガンド結合形からリガンド非結合形への構造転移ダイナミクスを調べた成果について述べている。Gao 氏は、リガンド脱離を誘起するパルス光強度をさまざまに変えることにより、リガンド結合数の異なるヘモグロ빈の比率を変え、脱離したリガンドが 1 つの場合と 2 つの場合の構造転移ダイナミクスを分離して得ることに成功した。得られた結果から、二量体ヘモグロ빈では、構造転移速度は脱離したリガンド数に応じて正の協同性を示すことが明らかになった。

第 5 章では、アカガイ由来の四量体ヘモグロ빈について、リガンド結合形からリガンド非結合形への構造転移ダイナミクスを調べた成果について述べている。第 4 章で述べた手法をさらに四量体ヘモグロ빈に拡張した。その結果、四量体ヘモグロ빈においても、構造転移速度は脱離したリガンド数に応じて正の協同性を示すことを明らかにした。

第 6 章では、リガンド結合部位－ポリペプチド鎖間の共有結合の役割を調べた成果について述べている。Gao 氏は、リガンド結合部位とポリペプチド鎖間との共有結合を失ったヘモグロ빈変異体を作製し、野生型との比較を行った。共有結合の喪失は構造転移ダイナミクスに影響を与えたものの、協同性は完全には消失しないことわかり、水素結合や原子間接触などの弱い相互作用も協同性発現に寄与していることが明らかになった。

第 7 章では、第 4 章から第 6 章までの知見をまとめている。

本論文の研究成果は、ダイナミクス観測に基づき、ヘモグロ빈の協同性を動的な側面から明らかにしたものであり、タンパク質の物理化学研究として意義深い。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。