

氏 名 高 影

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1013 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 先導科学研究科 光科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Resonance Raman Investigation of Protein Dynamics  
Studies on Myoglobin: Information Transmission and  
Energy Funneling Mechanisms

論文審査委員 主 査 教授 松本 吉泰  
特任教授 猿倉 信彦  
教授 渡辺 正勝  
特任教授 北川 禎三  
教授 寺嶋 正秀（京都大学）

## 論文内容の要旨

The iron protoporphyrin IX (*b* type heme) exists as a reaction center in most of the heme proteins as a prosthetic group which bound with the protein matrix. It carries out various functions including the diatomic gaseous ligand storage and transport, electron transfer, oxidization, peroxidization, catalysis and signaling process and so on. For investigating the active center, heme-iron-ligand complex, IR and visible RR spectroscopy have revealed the heme environment structure and the ligand discrimination mechanism for many heme proteins. Furthermore, electron paramagnetic resonance spectroscopy and quantum mechanism study have been used to revealing the reaction mechanism of heme enzyme. However, in any cases the accompanying conformational changes in protein moiety always occur for regulating protein function as revealed by x-ray crystallography. It appears quite important to establish a correlation between the active center, heme, and the protein matrix for understanding the essential mechanism for heme proteins. Also, this issue has attracted a lot of concerns from many fields. The nature utilizes *b* type heme as the most common structure among the four kinds of hemes that contain same framework but altered substitutions. Therefore, it is easy to propose that the side chains of heme could play important role in regulation of protein structure and function, and this propose is consistent with the discoveries from more and more experimental data that side chains are involved in many reactions related with protein functions. In this study, the interactions between heme and protein matrix as well as solvent leading to intramolecular transduction of structural information and intermolecular energy transfer were systematically investigated by using Mb. Those interactions include the covalent bond and the hydrogen bonds between heme and globin and spatial collision between heme side chains and water molecules.

In order to investigate the transmission of a binding signal of a gaseous ligand from the ligand binding site—heme, to protein moiety in gas sensory heme proteins, we applied UVRR spectroscopy to myoglobin as a model. UVRR spectroscopy is known as an excellent tool for monitoring protein conformational changes. First of all, we determined the changes of conformation in globin that occur upon binding of CO, NO, or O<sub>2</sub> to heme. Specifically, NO induces spectral changes in Trp residues of A-helix that are significantly different from those induced by O<sub>2</sub> or CO binding. On the other hand, binding of O<sub>2</sub> to heme produces spectral changes in the Tyr residues of H-helix that are different from those induced by CO or NO binding. The UVRR results demonstrate

that the heme discriminates among different ligands by driving corresponding conformational changes in the globin matrix. In order to explore the signaling pathway through His93 covalent bond, and 6- or 7-propionate hydrogen bonding network, we extended measurements to mutant- and heme-modified Mbs in a similar way to native Mb, and investigated how they are responsible for transmitting structural changes from ligand binding site--heme to globin for different ligands. The experimental results demonstrate that the cleavage of Fe-His93 covalent bond eliminates communication to the C-terminal of the H-helix and that 7-propionate hydrogen-bonding network is essential for transmitting the CO or NO binding signal to the N- and C-termini. Finally, 6-propionate is important only for NO binding. Thus, the hydrogen-bonding network in the protein appears to be critical for intramolecular signal transduction in gas sensory heme proteins.

Furthermore, pathway of vibrational energy dissipation from the heme to surrounding protein matrix and solvent following CO photolysis in the fast time component ( $\leq 10$  ps) was investigated by using picosecond time-resolved anti-Stokes Raman spectroscopy. The modified and mutant Mbs, in which the 6- or 7-propionate is selectively replaced by a methyl group or related hydrogen bonds is eliminated by mutagenesis was used as model systems. The time constants of population decay of vibrationally excited states for two modified Mbs became significantly larger compared with those of native Mb. However the corresponding values of mutants are not different from those of the native Mb. This work indicates that the two heme-propionate side chains are highly involved in the energy transfer from the heme to solvent through the collision with surrounding water molecules and contribute equally. But the hydrogen bonding interactions with protein matrix seem to contribute scarcely to this fast energy transfer process. This is the first experimental data estimating the contribution of individual heme-propionate side chains to the vibrational energy transfer from the heme to the surroundings.

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、ミオグロビンというヘム蛋白質の共鳴ラマン分光に関するもので、英文で書かれており、4章から成るものである。第2章は、リガンド結合による蛋白構造変化を紫外共鳴ラマンで調べた結果、第3章はCO光解離によるエネルギー緩和を時間分解アンチストークス共鳴ラマンで調べたもので、これらが業績としての主要部分である。第2、第3章の内容は既に外国の雑誌に掲載されており、わかりやすい英語で書かれている。

第1章はヘム蛋白質という一群の蛋白質の背景説明で、本研究の位置づけをしている。即ちヘム蛋白質の中で最近遺伝子解析によって見つけれられたガスセンサーヘム蛋白質が、 $O_2$ 、 $NO$ 、 $CO$ 等の2原子分子を見分け、その検出の情報を作用部位に伝達して生理作用を生み出すメカニズムを解明する事が、現在ヘム蛋白質に関する共鳴ラマン研究分野の主要テーマの1つであり、そのモデル分子としてミオグロビンを選ぶ事の説明が述べられている。

第2章はリガンド結合による蛋白の構造変化を紫外共鳴ラマンで検出するもので、蛋白の部位特異的アミノ酸置換や化学修飾したヘムによるミオグロビンの再構成をとり込んでいる。その結果はJ. Biol. Chem.に発表済みである。ヘム鉄に $O_2$ 、 $NO$ 、或いは $CO$ が結合した事をタンパクに伝達する道筋として、1)ヘム結合ヒスチジン(His93)、2)ヘムの6位プロピオン酸基(6-Prop)、3)ヘムの7位プロピオン酸基(7-Prop)の3通りを仮定し、(1)、(2)、(3)のどれかが働かない蛋白を各々用意して、リガンド結合による構造変化を紫外共鳴ラマンスペクトルで調べた。ネイティブ分子のリガンド結合によって変化したのはTrp7、Trp14、Tyr151の3残基で、その変化の仕方は $O_2$ 、 $NO$ 、 $CO$ で違っていた。 $CO$ 結合の場合、Trp7が7-PropとSer82との水素結合を通して変化し、Tyr151はHis93を通して変化する事、6-Propは寄与しない事、 $O_2$ と $CO$ ではTyr151の変化が異なり、 $NO$ ではTrp14とTrp7の両方が変化し、 $CO$ の場合とは逆方向に動く事等が明らかになった。

第3章は $CO$ を光解離させた時に一瞬高温になったヘムの冷却、即ちヘムの振動緩和を時間分解アンチストークス共鳴ラマン分光で解明したもので、強度の強い $\nu_4$ と $\nu_7$ の2つのラマンバンドに注目し、第2章で用いた試料を調べた。本章の内容はChem. Phys. Lett.に掲載可になっている。 $\nu_7$ の緩和時間は6-Prop、7-Propのいずれを取り除いてもネイティブのものより同じように遅くなった。これはヘムの熱エネルギーがプロピオン酸基を通して直接溶媒に流れるという最近のシミュレーション計算結果を支持する実験結果であった。一方 $\nu_4$ の緩和時間は1.3~1.5 psでプロピオン酸基除去の効果を示さなかった。この緩和時間はヘム内の振動エネルギー再分配の時定数を表わしていると説明され、ヘム環の振動がプロピオン酸基の除去で変らない事とつじつまが合っていた。プロピオン酸基と蛋白との水素結合の除去(相手アミノ酸残基のミュートーション)は6-Prop、7-Propいずれもエネルギー緩和に影響を与えなかった。

第4章は、全体のまとめが記されている。

この様に、本論文はミオグロビンの分子振動の測定から分子科学の基礎的情報を引き出したレベルの高い研究成果を述べており、学位論文として合格であることに全員の意見が一致した。