

氏 名 岩 瀬 正

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第426号

学位授与の日付 平成11年9月30日

学位授与の要件 数物科学研究科 機能分子科学専攻
学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Investigation of Ligation-Induced Structural Changes of
Hemeproteins by Mid-Infrared Spectroscopy

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 渡辺 芳人
教 授 北川 禎三
助 教 授 田原 太平
助 教 授 岡本 祐幸
助 教 授 加藤 立久
助 教 授 鏑木 基成（姫路工業大学）

In this study the author aimed to explore structure-function relationships of hemeproteins, whose reactions are initiated by ligation/deligation of a small molecule to the heme, by observing mid-IR difference absorbance spectra in water suspensions. Allosteric conformational changes of hemoglobin triggered by the ligand binding, and protonation/deprotonation states of a carboxyl side chain in cytochrome c oxidase which would be involved in proton translocation activity of the enzyme, were in particular studied.

It is well known that mid-IR spectroscopy of aqueous solutions is seriously by strong absorption of a water itself. To overcome it, the author constructed sensitive apparatus for time-resolved IR (TRIR) measurements based on a tunable diode laser light source. For static measurements, commercially available Fourier-transform infrared spectrophotometer were used with modifications. In addition, a simple but new scheme for reliable static ligation-induced IR difference spectra measurement was established.

Part I surveys infrared spectroscopy of proteins in aqueous solutions, including sensitivity and precision required wherein. The importance of the noble strategy for measurements of ligation induced difference spectra is addressed.

Part II is devoted to measurements of static ligation-induced mid-IR difference spectra of myoglobins in H₂O and D₂O. Although transient difference spectra of Mb after photolysis of hemeCO were already examined in D₂O, static difference spectra measured in comparison to transient spectra in those previous reports were distorted because of technical difficulties of static measurements. In this study a reliable static measurement scheme was established based on a sample-replacement technique in a single fixed cell, and CO-difference mid-IR spectra in H₂O as well as in D₂O at ambient temperature were successfully measured for the first time. The technique was also applicable to other ligands e.g. NO and O₂, which were so far only measured by photolysis at low temperatures. Fully ligated minus deligated difference at ambient condition were examined for the first time. Structural changes of protein backbone, porphyrin associated with ligation were revealed. Those band assignments for Mb were also useful to interpret similar hemeproteins e.g. hemoglobins.

In part III, allosteric conformational progress of hemoglobin R→T transition after photolysis of fully CO-ligated tetramer was observed by TRIR. Sensitive apparatus for the measurements was constructed with tunable IR diode laser as a probe light source. Relatively slow progress corresponding R → T structural rearrangements in temporal range of ten-microseconds were clearly observed at several IR absorption bands, which can be ascribed to residues in a/b interfaces. Behaviors of those bands at different pH/pD conditions consistently explained Hb functions known as ligand affinity. Moreover, remaining difference absorption species

later than a few millisecond after photolysis was found to be due to T-state Hb, as identified by the coincidence of the spectra to those of static complete CO-minus deoxy difference spectra.

In Part IV, Photodissociation induced difference IR spectra of CO-ligated bovine cytochrome c oxidase was examined by static, photo-steady state and TR measurements. Deprotonation of carboxyl side chain, presumably Asp 242, was observed after photolysis of CO. This finding is important for the understanding of proton translocation of the enzyme. Transient ligation of CO to CuB site was also examined.

論文の審査結果の要旨

本論文は、タンパク質水溶液の赤外吸収を静的及び時間分解的に測定し、タンパク質の構造化学を調べる研究で、装置づくりに関する部分と、ミオグロビン、ヘモグロビン、チトクロム酸化酵素の測定結果に関する部分から成る英文のものである。

第一章ではタンパク水溶液の赤外吸収に関する研究状況を概括している。溶媒である水の赤外吸収が強いため、非常に明るい分光器で精度高く測定しないと微妙なスペクトル変化がノイズに隠れ、大事な構造変化を赤外分光的に見逃す恐れが多いこと、及びそれを克服し検出することの意義について、具体的な数字をあげて説明している。市販のフーリエ変換赤外分光法を使うときの問題点と、新しく制作する赤外ダイオードレーザー法の利点、不利点をあげ、前者に関してサンプルの入替えに光路長が不変のセルを自作したこと、後者に関しては、波長スキャン測定に不向きだが時間分解分光に有効であったことを本研究の成果として述べている。

第二章では、新しく自作したセルを用い、ミオグロビンの一酸化炭素結合形と非結合形の静的差スペクトルを決めたこと、一酸化炭素を光解離した後のスペクトル変化を時間分解的に測定することに成功したことを説明し、それが非常に速い光解離とゆっくりの再結合で統一的に説明できる単純変化であることを示した。納得できる成果と思われた。

第三章ではヘモグロビンに関する同様の測定結果を説明している。ヘモグロビンは $\alpha_2\beta_2$ のテトラマー構造で、単離した α サブユニットと β サブユニットの測定結果の単純性と、テトラマーに対する測定結果が非常に違うことを指摘した。それはヘモグロビンでは、4次構造変化が3次構造変化に重なるためである。 β 鎖末端2残基を酵素処理で切ることにより4次構造がRに固定されるヘモグロビンを自分で用意し、それに同様の測定をしたところ、一酸化炭素の結合しているものとしてないものとの差スペクトルも、その時間変化もnativeのものから大きく変化した。その解釈やそれより学んだ構造情報に関して、必ずしも満足な説明が与えられてない面があった点は残念なところであるが、実験結果は国際的にトップレベルの新しいスペクトルデータであることを考え、学位論文としてはこのレベルでも許容範囲であることに委員の意見が一致した。

第四章はチトクロム酸化酵素に関するもので、一酸化炭素をへム鉄から光解離したときに一酸化炭素がCuBに結合してからタンパク外に出るが、CuBに結合しているCOのCO伸縮振動を光照射定常状態で観測し、そのときにタンパク質のカルボン酸側鎖がプロトン脱離していることを初めて見つけたもので、これはJ. Am. Chem. Soc.の速報として既に印刷され、その分野の注目を浴びている研究成果である。このタンパク質がプロトンポンプとして機能するものであるので、カルボン酸がプロトン担体として働き、鉄からリガンドが脱離することと同期してタンパク部分のプロトンが脱着するという説明は合理的で納得し得るものであった。

以上の各項目を総合的に判断し、本論文は学位論文として合格の範囲にあることに全委員の意見が一致した。

学位論文の内容について、申請者の発表と委員の質疑応答を含め約3時間の口述試験を実施した。実験装置の詳細に関する質問には満足に答え、申請者が装置づくりに専門的な

知識と技術をもっていることがよくわかった。申請者はヘムタンパク質の時間分解赤外吸収の測定結果を示し、ヘモグロビンについてこのような実験データが得られるようになったことの意義を強調した。その解釈については今後の研究を待たねばならない面のあることをよく認識していた。チトクロム酸化酵素の時間分解赤外吸収の研究成果は既に海外の論文誌に印刷されており、解釈も納得できるもので、質問にも満足に答えた。論文は英語で書かれており、語学力や研究の周辺の知識も含めて口述試験に合格と結論した。公開発表会では研究内容をわかりやすく説明し、質疑応答も満足なものであった。