

Photophysical Properties of Cytochromes c-553 and c \square and Their Iron-free Forms

メタデータ	言語: en 出版者: 静岡大学大学院電子科学研究科 公開日: 2008-04-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Abe, Miriam メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/1520

氏名・(本籍)	阿 部 ミ リ ア ン (ブラジル)		
学位の種類	博 士 (工 学)		
学位記番号	工博甲第 178 号		
学位授与の日付	平成 10 年 9 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻の名称	電子科学研究科 電子材料科学		
学位論文題目	Photophysical Properties of Cytochromes c-553 and c₃ and Their Iron-free Forms (シトクロムc-553、c ₃ および鉄フリー体の分光学的特性評価)		
論文審査委員	(委員長)		
	教授	岡 田 巖太郎	教授 長 村 利 彦
	教授	畑 中 義 式	助教授 板 垣 秀 幸
	教授	中 西 洋一郎	

論 文 内 容 の 要 旨

Recently, the photophysical processes of iron-free cytochromes have attracted much interest, because they can be used as one of promising materials to develop an opto-electronic protein device for novel optical memory by means of photochemical hole burning.

Cytochromes c₃ and c-553 are electron carrier proteins extracted from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgairs*, Miyazaki. Cytochrome c₃ has four hemes and contains 107 amino acid residues, with a molecular weight of 14,000. Its axial ligands of the iron heme are histidines. Cytochrome c-553 is a monohemic protein and it has a polypeptide chain of 79 amino acids, with a molecular weight of 9,000. Its axial ligands are a histidine and a methionine.

Fluorescence and UV/visible absorption properties of the cytochromes c₃ and c-553, as well as their iron-free forms were studied over wide pH and temperature ranges in comparison with cytochrome c and microperoxidase-9(MP-9) and their iron-free forms also.

It was found that the axial ligands of the iron heme influence the iron spin state, and therefore it greatly influence the UV/visible absorption characteristics of the cytochromes in the free base form. Coordination of the iron heme of the cytochrome c by strong-field ligands as methionine or histidine produces a low-spin com-

plex having a Soret maximum above 400 nm. The replacement of these two ligands such as oxygen or halogens supplied by the solvent, produces a high-spin complex showing a Soret maximum between 390 and 395 nm. The high-spin complex is also characterized by the band at around 620 nm.

All cytochromes in the oxidized form at neutral pH showed similar wavelengths at maximum absorbance of the Soret band, 406-409 nm. At acidic conditions, the Soret band of the cytochromes blue-shifted. However the Soret band of the cytochrome c_3 is more similar to the heme at $\text{pH} < 2.0$ than the other cytochromes, with a Soret band at 370 nm. The large blue-shift of the cytochrome c_3 is explained by the polarity of the amino acid residues around the iron heme. It was found out that the microenvironment of the iron heme of the cytochrome c_3 is more polar than the other cytochromes and therefore it has higher tendency to protonate. Cytochrome c-553 and cytochrome c showed very similar UV/visible absorption properties as the axial ligands of the iron hemes are the same.

The Soret band of the Fe-free cytochromes at neutral pH in the UV/visible absorption spectra showed a blue-shift as compared to the native ones at pH 7.2. Since it can not be considered the low-spin complex of the iron heme at pH 7.2, this shift is attributed to the unfolding of the protein which was confirmed by their earlier elution from the Sephadex G-50 column than native cytochromes. Also all four imidazoles of the iron-free cytochrome c_3 are expected to become protonated at pH 2.0, which caused the red-shift of the Soret band compared to the one at neutral pH.

All the iron-free cytochromes and iron-free MP-9 showed fluorescence properties in all pHs. The protonated form (pH 2.0) and the deprotonated form (neutral and basic pH) of the iron-free cytochromes c_3 and c-553 showed distinct fluorescence emission spectra. The protonated form showed peaks at 600 and 650 nm in the emission spectra and the deprotonated at 620 and 680 nm. Therefore, the protonation tendency of porphyrins was best monitored by the fluorescence spectrum.

The temperature dependence of fluorescence properties revealed the coexistence of two components at neutral and basic pHs. During cooling process new bands appeared at 590 and 650 nm and their intensities increased, while the bands at 620 and 680 nm decreased their intensities. This phenomenon suggested that new bands were due to the protonated form. This hypothesis was supported by the temperature dependent fluorescence measurements of Fe-free MP-9 in an aprotic solvent, *a*-picoline, which did not show such new bands during a cooling process. The pH dependences of fluorescence spectra for the Fe-free cytochromes at the same excitation wavelength gave the pK_a of the Fe-free cytochromes. The pK_a for the Fe-free cytochrome c_3 is higher than those of the cytochromes c and c-553, as the 590 and 650 "acidic" peaks are formed at higher pHs (around pH 3.4) than the other two cytochromes (around pH 2.3). Taking into account that the polarity of microenvironment around the porphyrin of Fe-free cytochrome c_3 is higher than the Fe-free cytochrome c-553 and MP-9, it leads to a higher protonation tendency than the other two ones.

The present study clarified that spectroscopic properties of cytochromes c_3 and c-553 together with their Fe-free forms were controlled by several factors such as the spin state, polarity of the microenvironment, conformation, and protonation mainly through ligands.

論文審査結果の要旨

高度な波長多重記録ができるフォトケミカルホールバーニング(PHB)は、超高密度光記録の有力候補の一つである。ポルフィリンは環内の二つの水素原子の互変異性により極低温でPHBを示す。本論文では鉄ポルフィリンをもつ生体系の電子伝達ヘム蛋白質を、新しい超高密度記録材料として応用するために、天然およびそれから中心金属の鉄イオンを除去したいくつかのシトクロムなどについて、種々の条件で分光学的検討を行っている。

第1章では、シトクロム c_3 、c-553に関するこれまでの研究およびPHBについてまとめ、さらに参照化合物として用いたシトクロムc、マイクロパーオキシダーゼ-9(MP-9)、ヘミン、ポルフィリンの構造と特長について述べ、本研究の背景と目的を示している。

第2章では、硫酸還元菌*Desulfovibrio vulgaris*からのシトクロム c_3 、c-553の抽出・精製、鉄イオンの除去法及び分光学的測定法を述べている。

第3章では、天然のシトクロム類について、紫外可視吸収及び蛍光スペクトルにより、水素イオン濃度(pH)や配位子などの効果を調べた。吸収スペクトルのpH依存性から、シトクロム c_3 、c-553の酸解離定数をそれぞれ2.8、2.2と評価した。また、配位子としてヒスチジン1個を含む9個のアミノ酸のみからなるMP-9を用いて、配位子の効果を明かにした。中性条件では、天然のシトクロム類、ヘミンおよびMP-9は蛍光を示さない。シトクロムで一度pH2以下にすると以後どのpHでも蛍光を示すことを明かにした。ヘミン及びMP-9では、pH2以下でも蛍光は観測されなかった。

第4章では、鉄イオンを除去した(Fe-free)シトクロム類について、吸収・蛍光スペクトルのpH依存性、蛍光スペクトルの温度依存性、過渡吸収および蛍光寿命測定の結果を述べている。フェムト秒レーザー励起による過渡吸収はFe-freeシトクロム類でのみ観測された。鉄イオンの除去により全pH領域でかなり強い蛍光が観測され、蛍光スペクトルは、シトクロム類の構造、pH、温度、溶媒の特性に依存して中性型及び酸性型を示した。

第5章では、測定結果を分子レベルで議論している。シトクロム類のヘムのまわりのアミノ酸配列から、微視的環境の極性を評価した。シトクロムc、c-553、MP-9では極性が低く、シトクロム c_3 では4個のヘムの内1個を除いて極性が高いことを明かにした。これがpH依存性に大きく影響し、蛍光挙動には蛋白のコンフォーメーション変化も寄与していると結論した。最後に本研究で得られた成果の意義と展望について述べている。

このように、本論文は電子伝達蛋白質及びそれから鉄イオンを除去したものについて、広範な条件下で分光学的特性を検討し、分子構造やマイクロ環境との関係を明かにしている。これは次世代の超高密度光記録材料の開発などに関し、工学上の寄与が大きい。よって、本論文は博士(工学)を授与するに充分値すると結論された。