2PA105

Hb M Iwate の紫外及び可視共鳴ラマン分光による研究

○長井雅子, Li Renqiang, 安藝理彦¹, 長友重紀²
北川禎三² (金沢大・医, ¹総研大・数物, ²分子研)

Hb M Iwate ($\alpha 87\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$)の異常鎖は酸化された状態で安定化している。その酸化型(メト)は正常Hb(Hb A)のメト型とは吸収、EPR、NMR、共鳴ラマンスペクトルで大きく異なり、それはヘム鉄と近位Tyr(F8Tyr)との結合によると考えられている。本研究では244nm励起紫外共鳴ラマン分光(UVRR)を用いて、そのF8Tyrの状態を調べ、イオン化したTyr(tyrosinate)で存在することを明らかにした。また、還元によりそのtyrosinateのラマンバンドは消失し、通常のTyrバンドに1個分のTyr(un ionized)が加算されることを確認した。これらのUVRRの結果と可視共鳴ラマンによる異常鎖ヘムのHb Aとの違いについて報告する。

Hb A及びHb M IwateはIEFまたはAmberlite CG50により精製した。UVRRの測定には244nm 疑似CWレーザーとsolar-blind マルチチャンネル検出器を組合せた新しい分光システムを用いて測定し、可視共鳴ラマンスペクトルは406.7nmと441.6 nmの励起光を用いて測定した。

Hb M IwateのUVRRでは1620(Y8a), 1177 cm^{-1} (Y9a)のTyr由来のラマンバンドに加えて、1605, 1166 cm^{-1} にHb Aでは見られない新たなラマンバンドを検出した。pH7と13のチロシン水溶液のUVRRとの比較から、これらのラマンバンドをtyrosinate由来と同定した。還元によりこれらのラマンバンドは消失した。可視共鳴ラマンによりメトHb M Iwateのヘムの状態をみると、5配位高スピン型をとること、ヘムのビニル基とプロピオン酸基に大きく変化を及ぼしていることが判明した。一方還元するとTyrとヘム鉄との結合は切れ、ヘム鉄は遠位Hisと結合することをHb M Iwateの単離 α 鎖にみられる $\nu\text{Fe-His}$ により確認した。遠位Hisとの結合によるヘムの変化についても報告する。

M. Nagai, R. Li, M. Aki, S. Nagatomo, T. Kitagawa: UV and visible resonance Raman studies of Hb M Iwate.

2PA107

ヒト正常Hbの部分配位構造: $\alpha(\text{Fe-NO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ を中心に

○長友重紀, ¹長井雅子, ²Antonio Tsuneshige, ²米谷 隆、
北川 禎三 (分子研, ¹金沢大・医, ²University of Pennsylvania)

Hb(ヘモグロビン)は酸素結合に伴い酸素親和性が增大するという協同性を持つ。これはDeoxyHb(T状態)とOxyHb(R状態)でHbの四次構造が異なり、酸素結合に伴ってHbが構造変化するためと考えられている。その四次構造変化がどのようにして起こっているかをみるには、 $\alpha(\text{Fe-NO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ のような配位子が部分的についた中間体構造の研究が重要である。このNO配位中間体ではFe(II)とNOの結合が他の配位子に比べて強いために他の配位子結合Hbとは違い $\alpha(\text{Fe-NO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ という部分配位子結合体が安定に存在することによる。2年前の本年会で、 $\alpha(\text{Fe-NO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ の紫外共鳴ラマン(UVRR)から四次構造を議論し、それがpHやIHPの有無にかかわらずDeoxyHbと同じT構造をとると結論づけた。今回はこの部分NO配位Hbの β ヘムに配位子を結合させた時の変化について検討した。低いpHでIHPのある場合と高いpHの場合とでは、UVRRでTyrとTrpの変化を通してみた四次構造変化が異なった。前者ではトリプトファンがT構造に近かったのに対し、後者ではほぼ完全にR型になった(図1)。このことは β ヘムに配位子がつく前の四次構造がpHによらず同じT構造を示しても、 β ヘムにNOが配位した時のT→R四次構造変化のしやすさがpHで異なることを示している。 $\alpha(\text{Fe-NO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ のEPRによる結果では、低いpHでIHPのある場合の α ヘムの配位数は5配位で、高いpHでIHPがある場合では6配位であり、このことは、 α ヘム近傍の構造の違いがこれら四次構造変化の仕方の違いに反映されているように思われる。以前の研究では、 $\alpha(\text{Fe-NO})$ の配位数が6配位でもUVRRでは四次構造変化が見られなかったことから、 α ヘムの近位His-Feのヘム方向への動きが四次構造変化の引き金ではないと結論付けたが、実は、NO配位の α ヘムは6配位ではあっても近位His-Feのヘム方向への動きがCOなどとは異なっている可能性も否定できない。そこで本研究では、上記のような $\alpha(\text{Fe-NO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ 部分配位状態の β ヘムへの配位に対する四次構造変化の仕方の違いを決めているのはどこで、またその時の四次構造変化の伝わり方はどのようなものか、これらのことをNOの配位したモデルポリフィリン化合物の結晶構造解析結果などからできる限り推測したいと考えている。

S. Nagatomo, M. Nagai, A. Tsuneshige, T. Yonetani, T. Kitagawa: The partially NO-ligated structure of Human Hemoglobin

2PA106

紫外共鳴ラマン分光法によるPI3-kinaseのSH3

ドメインと結合ペプチドとの相互作用の解析

○置塩信行¹, 長井雅子¹, 福田龍二¹,
長友重紀², 北川禎三² (¹金沢大・医, ²分子研)

我々はSH3ドメインのリガンド認識メカニズムを詳細に調べるため、紫外共鳴ラマン分光法を用いてSH3ドメインリガンド結合面を構成するTrp, Tyr残基の環境および構造変化の検出を試みた。材料としてphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)のSH3ドメインとその結合ペプチドRKLPKPSKを用いた。また、結合ペプチドとの親和性が約50倍低下するD21N変異体(Asp21→Asn)を比較に用いた。ペプチド添加前には野生型とD21N変異体のスペクトルに著明な違いは見られなかった。野生型ではペプチドとの結合によりTrp残基の水素結合が弱まり、Tyr残基の環境については疎水性が強まることが示唆された。D21N変異体では、スペクトル変化は著しく小さく野生型とは逆のスペクトル変化が見られた。これらの結果は、TrpやTyr残基がリガンド認識に関与することを示すと共に、D21N変異によりリガンド親和性が低下するのみならず結合パターンが変化することを示している。

N. Okishio, M. Nagai, R. Fukuda, S. Nagatomo, T. Kitagawa: Analysis of interactions of PI3-kinase SH3 domain with its ligand peptide by UV resonance Raman spectroscopy.

2PA108

NO結合型Mbの単結晶EPR

○堀 洋 (阪大・基礎工)、
斉藤 正男 (東北大・反応化学研)

はじめに: 一酸化窒素(NO)が還元型ヘムタンパク質に結合すると遠位残基と結合NO分子間の静電的、立体相互作用等を反映したヘム-NOのEPRスペクトルが観測される。第31回本大会(93年度)に於て、マッコウクジラミオグロビン(Mb)の遠位残基Val68をAlaに置換すると(V68A)、室温に於けるNOMbのEPRスペクトルが野生型のスペクトルと異なる(野生型では $g_{\perp} > g_{\parallel}$ の軸対称、V68Aでは逆の軸対称 $g_{\parallel} > g_{\perp}$ になる)事を報告した。そこで、野生型(WT)及びV68A変異体Mbの¹⁵N結合体の室温に於ける単結晶EPR測定より、 g -テンソル、¹⁵N超微細分裂(A-テンソル)の詳細な解析を試みた。結果: マッコウクジラMb変異体を遺伝子工学で作製する際、N末端にメチオニン(Met)が結合したままでは、P₆の空間群の結晶になるので、天然型Mb単結晶(P2₁)と直接比較が出来ない。本研究ではN末端のMetを除去した野生型(real WT)、変異体(real V68A)標品を用いた。単結晶は共に天然型Mbと同型(P2₁)の結晶である事を確認した。

WT, V68Aの g -及び¹⁵N-A-主値の解析結果:

WT	$g_1=2.059$, $g_2=2.030$, $g_3=2.000$, $A_{\max}=2.22$, $A_{\text{mid}}=1.34$, $A_{\min}=0.65$ (mT)
V68A	$g_1=2.077$, $g_2=2.011$, $g_3=1.994$, $A_{\max}=2.08$, $A_{\text{mid}}=1.10$, $A_{\min}=0.43$ (mT)

WTの $g_3(=2.000)$ 軸がヘム法線軸(Fe-N^{NO})に近い事は既に報告されているが、V68Aでは g_2 軸がヘム法線軸に近い事が判った。一方、A-テンソルから結合NOの向きが決定できる。過去に報告されたNOMb単結晶EPRのFe-N-Oの結合角は、近年報告された1.7Å分解能のNOMbのX線結晶構造解析の結果(Fe-N-O結合角は112°)と一致しない。今回のNOMb(WT)では、X線結晶構造解析から得られたN-O軸に最も近いA-主軸は $A_{\text{mid}}(1.34\text{mT})$ の方向になり、 g_3 軸と A_{mid} 軸のなす角度は122°となる。V68Aでは、 $A_{\min}$ 軸がN-O軸になると仮定すると、 g_2 軸と $A_{\min}$ 軸のなす角度は112°で、N-O軸は30°近くヘム面上を回転する事を示している。NOMb(V68A)のX線結晶構造解析を進めると共に、EPRのA-テンソルの精度を高める必要がある。

H.Hori, M.Saito: EPR crystallography of NOMb