1F1315

計算機シミュレーションによるヘモグロビンの構造と機能の研究

○妹尾 康喜 (東海大・総科研)

何故 T 型の酸素親和性が R 型より低いかを説明する目的で、まず X 線構造から出発して T 型と R 型のエネルギー極小構造を求め、次にそれらに酸素吸着の摂動を加えて (ヘム面に近位 His を近づける力を加える) で 2 段階目のエネルギー極小化を行ったときの構造変化と立体構造エネルギー変化 (δE) を α 鎖 2 つに酸素が着く場合 (α -oxy) と β 鎖 2 つに酸素が着く場合 (β -oxy) で解析した。一般に T 型では R 型に比べて α 鎖 β 鎖共に δE が高い (親和性が低い) 意味でアロステリックモデルに一致する。 α -oxy の場合は、 α 鎖の酸 R 型構造で His89 α 、ALA88 α 、LYS139 α の 3 残基の側鎖が動きやすく、酸素化により互いに近づき引力エネルギーを大きく得るが、T 型はこれらの側鎖が接近しすぎて動き難くなっていることが分かった。他方 β -oxy では、T 型構造で、Leu96 β と Val98 β が強い反発力のためヘムに近づき難いこと (R 型では引力)、 β 鎖の FG 領域と C 末端との距離が R 型で長く、T 型で短いのが特徴であるが、酸素化に際してサブユニット間相互作用の影響が T 型で強い。 β -oxy の問題は広範囲に亘り複雑で、近接する原子或いは残基の間の相互作用の解析のみでは親和性の違いを理解するのが難しく思われる。本年度は (1) 既存のエネルギー極小構造に重要と思われる水素結合、塩橋を切る或いは原子間距離を変える等の人為的な変化を加えてエネルギー極小化、(2) 4 量体としてのエネルギー極小構造から β 鎖一つを取り出して (サブユニット間相互作用が無い) エネルギー極小化し、得られた構造で酸素親和性を調べた。結果を報告する。

Y.Seno : Study of structure-function relationship of hemoglobin by computer simulation

1F1345

ヘモグロビン β 鎖における Leu28 の酸素親和性制御メカニズムの解明

○小西 一誠、石川 春人、高橋 聡、石森 浩一郎、森島 績 (京大・院工・分子工)

酸素結合能を持つヘモグロビン (Hb) とミオグロビン (Mb) は、ともにヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体を有し、よく似たヘム近傍構造を有している。近年、Mb を用いた研究から、ヘムポケットの疎水性アミノ酸残基をより親水性のアミノ酸残基で置換することにより、その酸素親和性も低下することが報告され、ヘム蛋白質の酸素親和性を制御する因子としてヘムポケットの疎水性が提唱されている。このような酸素親和性の低下は、他のアミノ酸残基ではあまり例がなく、精製された Hb を人工血液として用いる際に問題となる高すぎる酸素親和性を検討する上で興味深い。そこで、Hb においてもヘムポケットの疎水性度が酸素親和性に重要ではないかと考え、Hb β 鎖のヘムポケットを構成する Leu28 に着目した。この Leu28 の代わりに疎水性度の小さな 5 種のアミノ酸残基 (Val、Ala、Ser、Glu、Thr) を導入して変異体を作成し、その酸素結合速度を測定した。その結果、疎水性度の減少した変異体 L28S において、酸素結合速度は約 1/15 にまで低下した。この原因を明らかにするため、変異体の CO 体の C=O 伸縮振動を検討したが野生型とは大きな相違はなくアミノ酸置換によるヘム近傍の構造変化は小さいことが明らかとなった。したがって、Thr や Ser のような親水性のアミノ酸残基に置換することで大きく酸素結合速度が低下することは、Mb 同様、Hb β 鎖野生型のヘムポケットには存在しない水分子がその疎水性の低下によりヘムポケット内に進入し、ヘム鉄に酸素が結合する際のエネルギー障壁となったと考えられる。つまり、Hb β 鎖の Leu28 は Mb の場合と同様に、ヘムポケット内への水分子の進入を制御することで酸素親和性を調節していることが示唆された。

K.Konishi,H.Ishikawa,S.Takahashi,K.Ishimori and I.Morishima : Study on control mechanism of the oxygen affinity in the isolated beta-chain of hemoglobin by using Leucine 28 mutants

1F1330

圧力効果を利用した蛋白質間電子移動反応における Conformational Gating 機構の解明

○古川 良明、石森 浩一郎、森島 績 (京大院・工)

蛋白質における電子移動反応 (ET 反応) では、蛋白質の会合の後に生じる構造変化が全体の ET 反応の律速段階になっている場合が数多く提案されており、Conformational Gating 機構 (CG 機構) と呼ばれている。CG 機構は蛋白質 ET 反応を制御する重要な役割を担っているが、どのような構造変化により ET 反応が起こるのか明らかではない。そこで我々は、圧力を用いて CG 機構における蛋白質構造の変化を「体積変化」として捉え、CG 機構が ET 反応に果たす役割の解明を試みた。本研究では、CG 機構の存在が示唆されている亜鉛置換シトクロム c (ZnCytc) とシトクロム b_5 (Cytb₅) 間での ET 反応をモデルとして用い、その圧力依存性を検討した。532nm のレーザー光により生じる ZnCytc の三重項励起状態から、Cytb₅ への ET 反応をフラッシュフォトリシス法により測定した結果、ZnCytc のほぼ全て (95% 以上) が Cytb₅ と複合体を形成している条件では、Cytb₅ 濃度に依存しない二つの速度 ($1.2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $2.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) が観測された。速い速度成分は ZnCytc/Cytb₅ 間の還元電位差と ET 距離を用いて得られる理論値 ($8.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$) とほぼ一致していた。しかし、遅い速度成分は理論値の 3% 程度と非常に遅いため、ET 速度ではなく CG 機構による反応速度であると考えられた。さらに、0.1MPa から 100MPa までの圧力依存性を検討したところ、速い速度成分は圧力により変化しないが、遅い速度成分は 100MPa で常圧下での速度 ($2.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$) の約 1.3 倍に加速され ($3.6 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$)、活性化体積は $-7 \pm 2 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と負の値を示した。これは、ZnCytc/Cytb₅ 複合体が形成される際の体積変化 (約 $122 \text{ cm}^3/\text{mol}$) や複合体の体積 (約 $30000 \text{ cm}^3/\text{mol}$) に比べると非常に小さいことを示しているが、本研究で得られた活性化体積の値が反映している構造変化の詳細については、現在検討中である。

Y.Furukawa, K.Ishimori and I.Morishima : Pressure effects on the conformational gating mechanism in protein electron transfer

1F1400

O₂ ジャンプ・ストップフロー法を用いた非対称 Zn 混成ヘモグロビン (Hb) の酸素平衡機能の研究

○尹 慶黙¹、宮崎 源太郎¹、高橋 聡²、森島 績²、柴山 修哉³、西郷 敏³、森本 英樹¹ (¹ 大阪大・院基、² 京都大・院工、³ 自治医大・物理)

[α (M) β (M)][α (Fe) β (Fe)] のような非対称な金属置換混成 Hb は (他に 5 種類ある) 溶液中には存在するが、単 1 の分子の溶液としては不安定で 4 量体-2 量体平衡を通して対称分子種との混合溶液になるため、酸素平衡機能は直接には調べられていない。Zn-protoporphyrin は deoxy Hb の構造を安定化する。したがって deoxy FeHb (4 個の Fe を持つ) と ZnHb (Fe のかわりに 4 個 Zn を持つ) を混合すると酸素のない状態では FeHb、非対称混成 Hb {[α (Zn) β (Zn)][α (Fe) β (Fe)]}, ZnHb は平衡に達するとはば 2 項分布になる。一方、酸素の結合した状態では非対称混成 Hb の比率が非常に小さくなる。そこで、酸素のない状態で非対称混成 Hb を溶液中に作り、ストップフロー法で 4 量体の再構成が起こる前に酸素飽和度を測定することを試みた。FeHb と ZnHb を混合し、12 時間以上まつと平衡に達する。その溶液と酸素の溶解した緩衝液を混合すると、ミリ秒で酸素が 2 項分布的に結合し、その後 T-R の構造変化が 0.1 秒領域でおき、4 量体の組み換え (非対称混成 Hb の減少) が秒領域でおきる。4 量体の組み換えの起こる前の酸素飽和度を測定し、FeHb の分を差し引けば非対称混成 Hb {[α (Zn) β (Zn)][α (Fe) β (Fe)]} の飽和度が得られる。低酸素飽和度の範囲では混合溶液の酸素平衡曲線が組み換えがあまり起こらず測定できて K₁ が決定できる。この K₁ とストップフロー法で得られた非対称混成 Hb の高い酸素濃度での酸素飽和度から K₂ が計算できる。実際の測定では FeHb と ZnHb を 1:10 の濃度比で混合し測定を行った。その結果 K₁=0.017Hg⁻¹, K₂=0.03mmHg⁻¹ となった。

K-M.Yun,G.Miyazaki,S.Takahashi,I.Morishima,N.Shibayama, S.Saigo,H.Morimoto : An O₂-jump stopped-flow method to determine oxygen equilibrium properties of asymmetric Zn-Fe hybrid hemoglobin