1F1515

酵母の Flavohemoglobin : 結合酸素の安定性と FAD の有無

○小林 元、松岡 有樹、四釜 慶治（東北大・院理・生物、弘前大・教育・生物）

酵母菌の一種 *Candida norvegensis* から単離したヘモグロビン様タンパク質は、389 個のアミノ酸残基からなる単量体であるが、その分子構造は2つの異なるドメインからなっている。すなわち、N 末端側 155 残基まではヘム鉄を含む酸素結合ドメイン、残りの C 末端側 234 残基は FAD を含む還元酵素ドメインである (Iwaasa, H., Takagi, T. and Shikama, K., *J. Mol. Biol.* (1992) **227**, 948-954)。

ところで、*Candida* 酵母を大量に培養して、そこから抽出したフラボヘモグロビンの硫酸分画液を Butyl-Toyopearl カラムにかけ、さらに DEAE-cellulose カラム上で精製すると、酸素を結合したオキシ型では FAD を含む native な成分の他に、FAD のはずれた成分も溶出してくる。そこでこの両成分について、オキシ型からメト型への自動酸化速度を広い pH 領域に渡って詳細に測定し、結合酸素の安定性に及ぼす FAD の影響を検討した。

その結果、FAD のはずれた成分は、native なものに比べて約 10 倍も自動酸化しやすいことが分かった。一方、FPLC によるゲルろ過法により、酵母ヘモグロビン分子中の FAD 含有量を測定すると、アルカリ側では pH 8.6 に中点を持つような解離反応を示すことも明らかとなった。

G. Kobayashi, A. Matsuoka, K. Shikama :
Yeast flavohemoglobin: Stability property of the bound dioxygen with reference to its FAD contents.

1F1600

メクラウナギヘモグロビンの x 線結晶構造解析

○三戸 恵¹、宮崎 源太郎¹、森本 英樹¹、Chong Khoo Tee²、Park Sam Yong³ (¹ 阪大院・基・生物、² 阪大・蛋白研・構造物理、³ 理研・播磨)

軟骨魚類以降の脊椎動物のヘモグロビンは、 $\alpha 2 \beta 2$ 型の安定な 4 量体構造をとっている。しかし、おなじ脊椎動物に属しながら、軟骨魚類以前に分岐した円口類に属するヤツメウナギのヘモグロビンは、そのような安定な $\alpha 2 \beta 2$ 型 4 量体構造をとっていない。したがって、 $\alpha 2 \beta 2$ 型 4 量体構造は、ヒトにいたるまで脊椎動物が進化する過程で、円口類が分岐してから、軟骨魚類が分岐するその間に獲得したと考えられている。そこで、生物が $\alpha 2 \beta 2$ 型の 4 量体構造を獲得していく進化の過程を知る手がかりになると思い、ヤツメウナギと同じ円口類に属するメクラウナギのヘモグロビンの機能および構造を解析することが今回の研究の目的である。メクラウナギの血液中には、4 種類の Chain が存在する。そのうち、分子量カラムを通した結果、平均分子量が 4 量体に近い一つの Chain について、機能および構造の解析を行った。メクラウナギヘモグロビンの一次構造とヒトヘモグロビンの一次構造との類似性は約 20%、ヤツメウナギとの類似性は約 40% となっている。メクラウナギヘモグロビンの一次構造は、軟骨魚類以降の脊椎動物の α 鎖、 β 鎖の一次構造に比べて N 末端が 12 残基ほど長い。これはヤツメウナギでも同様であり、配列も保存されているので、円口類共通の性質である。酸素平衡曲線測定の結果、ヒトに比べて酸素親和性、共同性 ($n=1.1\sim 1.28$)、ボーア効果ともに小さかった。そして、X 線結晶構造解析の結果、CO 型ではホモ 4 量体 (1.6 Å の分解能)、Deoxy 型ではホモ 2 量体 (2.2 Å の分解能) が同定できた。会合の様式は、ヒト型の 4 量体ともヤツメウナギの 2 量体とも全く違っていた。

M.Mito, G.Miyazaki, H.Morimoto, C.K.Tee, S.Y.Park : The structure of Hagfish hemoglobin

1F1530

ゾル・ゲル法による環形動物巨大ヘモグロビン分子のコンホメーションの固定

○柴山 修哉¹、今井 清博²、後藤 寿夫³ (¹ 自治医大・物理、² 阪大・院医、³ 徳島大・総合科学・生命科学)

環形動物の酸素運搬タンパク質は、約 200 個のポリペプチド鎖からなる分子量 300 万を越す巨大ヘムタンパク質である。これらの巨大ヘモグロビンは、酸素結合に強い協同性を示し、六角形の円盤が 2 層重なった特徴的な電子顕微鏡像を与える。今のところ、環形動物巨大ヘモグロビン分子の酸素結合に伴う構造変化に関する知見は何も得られていない状況である。

今回、我々は、溶液の酸素平衡機能のよく調べられているゴカイ (*Perinereis aibuhitensis*) の巨大ヘモグロビン分子を、ゾル・ゲル法で多孔性ゲル（水を細孔中に含む多孔性ケイ酸ガラス）に封じ込め、その脱酸素型及び一酸化炭素結合型の各コンホメーションをゲル・マトリックスの外力で固定することに成功した。ゲルでトラップされた pH7.0 の両コンホメーションの酸素平衡曲線を比較したところ、両者の酸素結合は非協同的で、酸素親和性には約 100 倍の差があった。また、これら二つのコンホメーションの脱酸素型の可視吸収スペクトルには顕著な差が観測された。更におもしろいことに、このヘモグロビンの pH6.0 の一酸化炭素結合型には、上述の二つのコンホメーションが共存することが分かった。即ち、リガンド結合型は酸素親和性の大幅に異なる二つのコンホメーションの構造平衡にあり、この平衡は pH で制御されているようである。一方、脱酸素型には pH によらず酸素親和性の低い方のコンホメーションのみが存在する。今回みつかったリガンド結合型に特有の構造平衡を考慮すると、環形動物巨大ヘモグロビンの溶液の酸素平衡曲線の主な特徴をうまく説明することができる。

N.Shibayama, K.Imai and T.Gotoh : Sol-gel trapping of the conformations of the annelid giant hemoglobin

1F1615

硫酸還元菌 Y43L チトクロム c_3 のキャラクタリゼーション

小澤 潔¹、○熊谷 次郎¹、安川 文美子¹、Cusanovich MA²、阿久津 秀雄^{1,3} (¹ 横浜国大・工、² アリゾナ大・生化学、³ 阪大・蛋白研)

硫酸還元菌は、最終電子受容体として硫酸塩を用い、電子伝達系と共役して、エネルギーを得ている絶対嫌気性細菌である。そのマーカー蛋白質であるチトクロム c_3 は、1 分子中に 4 つの c 型ヘムを含み、著しく低い酸化還元電位 (-300mV) を示すという特異な性質を持つことが知られている。これまでに、電気化学的解析を始め、酸化型の X 線結晶構造および、NMR による溶液構造等のさまざまな解析が行われてきたが、最近では、U (VI) を U (IV) に還元できることも報告され、バイオレメディエーションの分野でも注目されている。しかしながら、このチトクロム c_3 は、マルチヘムでかつ、ヘムがポリペプチドと共有結合している c 型のため、遺伝子工学的な手法による大量発現系の確立が困難であった。そこでわれわれは、長年、大腸菌、酵母、枯草菌、光合成細菌を宿主としたチトクロム c_3 の発現系を検討してきたが、最近、大腸菌と同じ、プロテオバクテリアのガンマ属に属する *Shewanella oneidensis* を宿主に用いた際、このチトクロム c_3 の培地あたりの収量が、野生株の 27 倍にも増加することがわかった。そこで、この大量発現系をもちいて、現在、さまざまなアミノ酸置換体を構築し、それぞれについて、キャラクタリゼーションを進めている。チロシン 43 は、ヘム 1 とヘム 2 の間に位置し、芳香族環を持つため、チトクロム c_3 分子の酸化還元電位および、電子移動速度に大きな役割を果たしていると考えられる。そこで、今回、この巨視的酸化還元電位を、電気化学的測定により求めたところ、ヘム 1、ヘム 2 だけでなく、ヘム 3 の電位にまで影響を与えていることがわかった。また、5-デアザリボフラビンからの電子移動速度をレーザーフラッシュフォトリシス法を用いて測定したので併せて報告する。

K. Ozawa, J. Kumagai, F. Yasukawa, M. A. Cusanovich, H. Akutsu : Characterization of the Y43L cytochrome c_3 from *D. vulgaris* Miyazaki F