2P061

鉄 (III) コルフィセンをもつミオグロビンのアジド化合物

○根矢 三郎¹、舟崎 紀昭¹、鐸木 基成²、堀 洋³、Takashi Yonetani⁴ (¹京都薬大、²姫路工大・理、³阪大院・基礎工、⁴ペンシルバニア大・医)

ミオグロビン Mbは鉄ポルフィリンを含むヘムたんぱく質である。コルフィセンはポルフィリンの異性体でテトラピロールが台形に配列した分子構造をもつ。この変形したポルフィリン異性体が鉄原子に与える影響には興味をもたれる。そこで、私たちは鉄 (III) コルフィセン再構成 Mb のアジド錯体のスピン平衡を解析した。再構成 Mb にはアジドイオンが強く結合した。アジド錯体の可視吸収スペクトルは大きな温度依存性をしめし、高スピン ($S = 5/2$) と低スピン ($S = 1/2$) 状態の熱的平衡系であるとわかった。可視吸収解析から室温での高スピン含量は 80 % となり、表題 Mb が高スピン状態にあると判明した。これは低スピン状態が優勢な天然 Mb とは対照的な性質である。可視吸収による結果を検証するため、鉄に配位したアジドの赤外吸収を室温で調べた。赤外の高スピン帯は低スピン帯の 4 倍の積分強度をもち、コルフィセン Mb が 6 配位型の高スピン状態が支持された。可視および赤外吸収の結果より、コルフィセン Mb の鉄—ヒスチジン結合が固有の性質をもつと考えられる。このことを電子スピン共鳴スペクトル (EPR) をヘリウム温度で測定して調べた。驚いたことに、15K で 5 配位型のアジド錯体由来する高スピン型信号が観測された。つまり、鉄—ヒスチジン結合が切れて、試料凍結により配位構造が変化したことを示唆している。これも天然 Mb では見られない特異な性質である。コルフィセンの金属配位座は台形である。そのために鉄原子はコルフィセン平面に納まりにくく、高スピン状態をもちやすと考えられる。アジド錯体では、配位力の大きいアジドイオンに鉄原子は引き寄せられ鉄—ヒスチジン結合は弱まり、試料凍結により鉄—ヒスチジン結合が切断される。鉄原子の配位座変形は Mb の磁気的性質を大きく変える。

S. Neya, N. Funasaki, M. Tsubaki, H. Hori, and T. Yonetani : Azide metmyoglobin reconstituted with ferric corrphycene

2P063

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 (東海大学総合科学技術研)

AcHTMLAeAcHEADaAcMETA HTTP-EQUIV="Content-Type" CONTENT="text/html; charset=x-sjis" AeAcTITLEAe 蛋白質 Ac/TITLEAeAc/HEADaAcBODYAeAcFONT FACE="MS 明朝" LANG="JA" SIZE=3AeAcP ALIGN="JUSTIFY" Ae 蛋白質分子の構造解析はめざましく進んでいるが、蛋白質の機能発現の分子機構が多くの人達が満足する形で解明された例は未だ殆ど無いと言ってよい。本研究は一つの蛋白質ヘモグロビンに集中して、協同的酸素吸着のメカニズムを物理学的に (分子内のエネルギー、力、動きから) 説明するのを目的として続けている。継続研究として、詳しい方法は省略する。Ac/P AeAcP ALIGN="JUSTIFY" Ae 昨年は T 型と R 型での β 鎖の酸素親和性のちがいを説明するために、既存の T 型 (R 型) のエネルギー極小構造から出発し、距離拘束をエネルギー極小化過程に取り入れて、重要な分子間距離を指向的に変えた新しいエネルギー極小構造を作ることと報告した。その中には T 型と R 型の中間の酸素親和性を示すものもある。Ac/P AeAcP ALIGN="JUSTIFY" Ae 本年度はこれをさらに進めて、合計 14 個の異なるエネルギー極小構造を求め、構造と酸素親和性の関係について比較検討を行っている。なかには β 鎖の H C 領域近くの構造が崩れ、超 R 型ともいえる酸素親和性の低い構造もある。方法としては、多くの構造から、酸素親和性 (酸素吸着によるエネルギー変化) の変化と選択した分子間距離の変化との相関係数が計算され、また逆に、おおくの原子対の距離を基準にして、異なるエネルギー極小構造の間の相関係数を求めて、構造の類似性を調べることが出来る。種々の構造と酸素親和性をもつ構造の比較検討のこの様な方法は試みの段階であるが報告したい。Ac/P AeAc/ FONTAeAc/ BODYAeAc/ HTMLAe

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

2P062

MbCO 光解離過程に対する Xe の影響と ligand pathway に関する研究

○坂倉 政明¹、西原 泰孝¹、木村 佳文²、寺嶋 正秀¹ (¹京大院・理・化学、²京大国際融合創造セ)

以前我々は過渡回折格子法 (TG 法) により MbCO 光解離過程を研究し、室温で 700 ナノ秒の時定数をもつ体積膨張を検出し、反応体積変化とエンタルピー変化を決定した [Sakakura et al.2001]。過渡吸収法と TG 法の結果から、光解離後、distal pocket に trap された CO が 180 ナノ秒でタンパク内の別の pocket に移動し、その後 700 ナノ秒で CO が Mb から放出されると解釈した。これは Mb の内部に CO が安定に存在する pocket が 2 ケ所存在することを示唆する。一方、7atmXe 下において、Xe が trap される空洞が Mb の内部に 4 ケ所存在することが確認されており (Xe sites) [Tilton et al.1984]、最近の X 線による研究では、このうち二ヶ所が MbCO 光解離過程での ligand pathway に関わることが示されている [Ostermann et al.2000]。この Xe site と MbCO 光解離過程における CO の pocket との関連を Dynamics の観点から調べるために、9atmXe 下での TG 測定を試みた。TG 法は体積変化、熱放出、分子拡散過程を検出できるため、光解離後の CO によって Xe が溶媒へ押し出される様子や、CO が放出される時の体積変化への影響が観測できると期待される。1atm CO 下と Xe(9atm)+CO(1atm) 下での horse MbCO 光解離後の TG 信号を比較すると、反応における体積変化に違いが見られた他、CO が溶媒へ放出される速度に違いがあった。この速度の違いは二倍もあり、単に圧力だけの効果と仮定すれば、このダイナミクスにおける活性化体積が 1000cc/mol という異常な量になるので、圧力よりも Xe による効果が dominant であると考えられる。今のところ、9atmXe 下で CO 放出速度が速くなるのは、Xe が Mb の空洞に入ることによる中間体での CO の不安定化に起因すると考えている。

M.Sakakura, Y.Nishihara, Y.Kimura, M. Terazima : The investigation of the xenon effect on the photodissociation process of MbCO and the ligand pathway

2P064

広範な溶液条件下でヘモグロビンはいかに振舞うか？

○藤本 久貴、今井 清博 (阪大院・医学系・情報生理)

ヘモグロビンの四次構造には、少なくとも T 状態および R 状態と呼ばれる 2 種類がある。これらの状態はサブユニット間の結合力および酸素親和性が異なる。この知見に合致する Monod-Wyman-Changeux モデル (Monod et al., 1965) では、2 状態間の平衡と転移、酸素結合定数が酸素化の段階に依存しないという仮定のもとに、3 つの独立なパラメーター ($L_0 (= [T_0]/[R_0])$ 、T 状態、R 状態の酸素結合定数 K_T 、 K_R) で酸素化を記述する。ヘモグロビン分子への束縛が極端に強くない溶液条件下での精密酸素平衡曲線の測定を通し、事実上独立なパラメーターは K_T の 1 つのみであることが示された (Imai, 1983)。これは、このような条件下においては、T 状態にのみ H^+ 、 Cl^- 、DPG、IHP 等のエフェクターが結合して K_T を変化させ、R 状態には結合しないことを意味している。今回我々は、酸性かつ多種のエフェクター (BZF を含む) が共存するような束縛の強い条件下で酸素平衡曲線を測定し、 K_T のみならず K_R も大きく変化することを見出した。更に、束縛の増強に伴い L_0 は増大するが、ある極大を持ち、その先は減少することも見出した。この結果は、従来結合しないとされてきた R 状態に対してもエフェクターが結合することを示唆している。そこで、我々は更に、これらの条件下での四次構造へのエフェクターの効果を調べるため、紫外域微分スペクトルの微細構造を測定した。その結果、従来知られていた、deoxy 型の微細構造が束縛条件の緩和に伴い oxy 型のそれに近づくことに加え、強い束縛条件下では oxy 型の微細構造が deoxy 型の方向へ変化することが見出された。これらの結果は、広範な溶液条件下における MWC モデルのパラメーターの挙動を説明するための構造上の知見を与える。

H. Fujimoto and K. Imai : How does hemoglobin behave under a wide range of solvent conditions?