2J1545

NO 運搬タンパク質 NP4 のヘム周辺構造

宇野 公之、○浜辺 由紀、富杉 佳計、石川 吉伸 (熊本大・薬)

【目的】NP4 (Nitrophorin4) は、吸血性サシガメ *Rhodnius Prolixus* の唾液腺に存在するヘムタンパク質である。サシガメが吸血する際、NO と結合した NP4 は唾液腺から吸血対象の血管内に入る。そこで NO を遊離することで血管拡張を引き起こし、さらに、ヒスタミンと結合して炎症を抑制する。このように NP4 は、サシガメの吸血にとって合理的な機能を有している。今回 NP4 のヘム周辺構造を明らかにするために、NP4 遺伝子のクローニング、大腸菌株 BL21(DE3) を用いたタンパク質の大量発現を行った。そして、野生型、ヒスタミン結合型、NO 結合型 NP4 の共鳴ラマンスペクトルを測定した。さらに、ヒスタミンと同じイミダゾール環をもつ種々の化合物や KCN による滴定を、唾液腺内と血管内の pH にそれぞれ近い pH 5.0、pH 8.0 の条件下で行い、解離定数 Kd を算出した。【結果・考察】酸化型 NP4 の紫外可視吸収スペクトル及び共鳴ラマンスペクトルから、野生型は 6 配位高スピンヘムを、ヒスタミン結合型、NO 結合型は 6 配位低スピンヘムをふくむことが分かった。また、NO 結合型においては、 ν (Fe-NO) が 590 cm^{-1} に観測された。これらの配位構造は、結晶構造解析や、NP1 の共鳴ラマンスペクトルの結果と一致した。滴定の結果より、Kd は配位子の pKa とよく相関し、塩基性の強い配位子ほどヘム鉄に対する親和性が低いことがわかった。一方、ヒスチジンはこの相関から外れ、このことはヒスチジンのカルボキシル基と遠位側アミノ酸残基との静電的相互作用によるものだと考えられた。塩基性の配位子が配位しにくいのは、近位軸配位子のヒスチジンからの強い電子供与を示唆している。このことは、NP4 の電位が約 -270 mV と低く、鉄 3 価の状態が安定であることに対応すると考えられた。

T.Uno, Y.Hamabe, Y.Tomisugi and Y.Ishikawa : The heme proximate structure of NO carrier protein NP4

2J1615

カルボキシミオグロビンのリガンド放出過程

○西原 泰孝¹、坂倉 政明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)

蛋白質の構造ダイナミクスと機能との観点で広く研究されているのが、酸素の脱着を生理機能としているミオグロビン (Mb) である。ヘムに配位しているリガンドがどのような経路をたどって外に出るかという問題について、光による一酸化炭素 (CO) の解離反応をモデルとして、解離や会合速度の測定より、エネルギーバリアの存在などが明らかにされてきた。また、我々は過渡回折格子 (TG) 法を用いて、エネルギーや体積の観点から CO が蛋白質から出る過程を直接観測することに成功し、いくつかの CO トラップサイトの存在を示した。一方、CO 放出の経路については、X 線結晶解析による研究より、Mb の内部の Xe トラップサイトのうちの 2ヶ所が CO トラップに関わるらしいことが示唆されたが、溶液中の CO が放出される条件下でこの Xe トラップサイトが本当に関与しているかどうかの直接的な証拠はまだ得られていない。今回は、Xe 存在下で CO 放出過程と戻り過程がどのように変化するかを調べることで、CO の放出ルートと Xe トラップサイトとの関連を検討した。馬 Mb を還元後に CO を結合させ、Xe を封入して、パルスレーザ (532nm) による CO 光解離後のエネルギーや構造ダイナミクスを、赤外プローブ光を用いて検出した。TG 信号には、CO が蛋白質内のヘムトラップサイトから溶媒に放出される過程が、体積変化として観測され、1 気圧 CO 雰囲気下での脱出速度は約 700ns である。ところがサンプルに Xe を 10 気圧封入することで、この CO 脱出速度が 350ns にまで加速されることがわかった。更に、CO が元に戻る速度も約 2 倍加速された。また体積変化などを表す指標である屈折率変化にも、Xe を共存させることで変化が現れた。これらの変化を解析することで、CO 放出経路に Xe サイトがどのように関与しているかの知見が得られる。

Y.Nishihara,M.Sakakura,Y.Kimura,M.Terazima : Ligand releasing process of carboxymyoglobin

2J1600

ヒト脳由来ニューログロビンのヘム周辺構造

宇野 公之、○龍 大輔、清田 浩平、富杉 佳計、石川 吉伸 (熊本大・薬)

【目的】ニューログロビン (Ngb) は脊椎動物の脳において発見された分子量約 17000 のヘムを含むグロビンタンパク質である。アミノ酸配列上 Hb (約 21%) や Mb (約 25%) との相同性があり、その機能もまた Hb や Mb に似た、酸素の貯蔵や運搬に関わるものであると考えられている。しかし、マウス Ngb (mNgb) においては酸化型、還元型において 6 配位低スピンヘムを含む事が明らかになっており、そのヘム周辺環境が他のグロビンタンパク質とは異なることが示唆される。そこで今回、ヘム周辺構造を明らかにする目的でヒト Ngb (hNgb) のクローニングを行い、紫外可視吸収スペクトル、及び共鳴ラマンスペクトルを測定した。【結果考察】PCR 法を用いて遺伝子を全合成し、大腸菌株 BL21-Gold(DE3) を用いて hNgb の大量発現に成功した。野生型標品の紫外可視吸収スペクトル、及び共鳴ラマンスペクトルから、hNgb は mNgb 同様酸化型、還元型ともに 6 配位低スピンヘムを含む事が分かった。また、CO 結合型の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、野生型 mNgb の CO 結合型と同様のスペクトルを示し、 ν (Fe-CO) が 497 cm^{-1} と 522 cm^{-1} に観測された。以上のことから、hNgb は mNgb と同様のヘム周辺構造を持ち、近位軸配位子は 96 位の His であると考えられた。もう一方の遠位側軸配位子の性質を調べるため、シアン滴定を行った。hNgb は Mb と同程度のシアン解離定数を示したことから、外來性配位子は極めて結合しやすい事が分かった。したがって、遠位側軸配位子はヘム鉄を低スピン状態にするものの、非常に置換しやすい性質を持っていることが明らかとなった。

T.Uno, D.Ryu, K.Kiyota, Y.Tomisugi and Y.Ishikawa : The heme proximate structure of human neuroglobin expressed in the brain

2J1630

T 型および R 型ヘモグロビン-CO 光解離中間体の低温結晶構造解析

○足立 伸一¹、朴 三用²、Jeremy Tame²、城 宜嗣¹、柴山 修哉³ (¹ 理研・播磨研、² 横浜市大院・総合理学、³ 自治医大・生理学)

ヘモグロビンは酸素親和性の低い T 型と、親和性の高い R 型の 2 つの 4 次構造をとり、酸素をエフェクターとするホモトロピックなアロステリック効果により、酸素結合平衡における協同性を示す。これまでにヘモグロビンの構造転移における 2 つの安定構造については、主に X 線結晶構造解析法によりその詳細が明らかにされてきたが、配位子結合反応に伴う中間体構造に関しては、X 線解析法は必ずしも有効な方法ではなかった。一方、ヘモグロビンに結合した一酸化炭素 (CO) などの配位子が光解離した後に起こる 3 次および 4 次構造の経時変化については、時間分解分光法により活発な研究が行われてきた。ヘモグロビンに結合した CO 分子は、光解離により一旦蛋白質内にトラップされた「geminate 状態」と呼ばれる状態になり、その状態からの CO 再結合反応と CO 分子の蛋白質外部への拡散が平行して起こる。これら分光法による研究は、ヘム近傍の構造変化とその時定数を明らかにすることに成功したが、蛋白質部分の構造変化を含む、より広範な構造変化については十分に明らかではなかったと思われる。今回われわれは、R 型および T 型の一酸化炭素結合型ヒトヘモグロビン結晶を調製し、冷却ヘリウムガス吹き付け条件下 (2.5 K) で結晶に可視光を連続照射することにより、結晶中で CO が光解離した中間状態の X 線回折データを収集し、その結晶構造解析を行った。低温下でトラップされた構造は、光解離した CO がヘムポケット内にトラップされた geminate 状態の構造を示しており、CO 光解離に伴うヘム中心から最大 15 Å にわたる 3 次構造変化が観測されたので報告する。

S. Adachi, S.-Y. Park, J. R. H. Tame, Y. Shiro and N. Shibayama : Crystal structure of photolysed intermediates of T- and R-state human carbonmonooxy hemoglobin at 25 K