2J1645

ヘモグロビンのR→T構造転移に伴う紫外CDの変化

○神 弥生、櫻井 博、長井 幸史、長井 雅子（金沢大・医・保健）

ヘモグロビン（HbA）がoxy（R）型からdeoxy（T）型に変化するのに伴い、287nmに負のCD帯が現れることを1974年にPerutzらがみつけ、T型マーカーバンドと呼んだ。そして、これはサブユニット間で水素結合に関与している α 42Trpまたは β 37Trpの状態変化によると推定した。しかし、この推定を確証した報告はない。そこで、 α 132サブユニット接触面に存在する α 42Tyr、 α 140Tyr、 β 37Trpまたは β 145Tyrに変異を有するHbを用いて、この負のCD帯の由来を検討した。【材料・方法】変異Hbとして、rHb（ α Y42S）、Hb Rouen（ α Y140H）、Hb Hirose（ β W37S）および、 β 鎖C末端2残基を除去したDes（ β 145Y、 β 146H）Hbを用い、紫外領域のCDをJasco J-725 旋光分散計で測定した。【結果・考察】HbAのR→T変化で現れる287nmの負のCD帯に、上記4つのアミノ酸残基がどの位寄与しているかを、deoxy－oxyの差スペクトルから調べた結果、 α 42Tyrはほとんど関与していなかったが、 α 140Tyr、 β 37Trp、 β 145Tyrは寄与していることが判明した（その寄与はそれぞれ約30％）。また、我々は新たに220-230nmのブロードな負のCD帯がR→T変化に伴って強度増強することを見出した。TyrやTrpは200-250nm域にもCDを示すことが知られているので、この変化にも上記4つのアミノ酸残基が関与している可能性がある。HbAと変異Hb間の差スペクトルの解析から、Trp残基は230nmに、Tyr残基は220nmにそれぞれピークをもつCD帯を示すことがわかった。R→T変化により増加する220-230nmの負のCD帯には、 α 42Tyr、 α 140Tyr、 β 37Trp、 β 145Tyrのすべてが関与していた（それぞれ15、30、40、20％）。以上の結果から、HbのR→T変化に伴う287nmの負のCD帯の出現は、 α 140Tyr、 β 37Trpおよび β 145Tyrの変化に由来し、220-230nmの負のCD帯の変化は、 α 42Tyr、 α 140Tyr、 β 37Trpおよび β 145Tyrによることが判明した。

Y. Jin, H. Sakurai, Y. Nagai and M. Nagai : Changes of UVCD spectra upon the R to T transition of hemoglobin

2J1715

極限溶液条件下のヘモグロビン四次構造状態を探る

○藤本 久貴¹、常重 アントニオ²、長井 幸史³、長井 雅子³、今井 清博¹（¹阪大院・生命機能、²ペンシルバニア大医学センター、³金沢大・医・保健）

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2つの状態の間の平衡定数 L_0 (= $[T_0]/[R_0]$) およびそれらの酸素親和性（それぞれ K_T 、 K_R と表す）が溶液条件（H⁺、Cl⁻、DPG、IHP、BZF 等のエフェクターの濃度、すなわちヘモグロビン分子への束縛の強さ）に従って変化することで、ヘモグロビンのアロステリック作用が現れる。従来はこれらのうち L_0 と K_T のみが変化すると考えられてきた。しかし近年、非常に広い溶液条件を探索することにより、これらのみならず L_1 (= $[T_1]/[R_1]$) や K_R も著明に変化することが明らかとなった（“Universal allosteric model”；Yonetani et al., 2002）。これらの現象は、古典的な Monod-Wyman-Changeux モデル（Monod et al., 1965）において、代表としてのエフェクターが二つまでT状態とR状態の両方に結合するという拡張を導入すると首尾良く記述されることがわかった（Imai et al., 2002）。今回、我々は、これらのパラメーター値の変化に伴う四次構造の変化を、ヘモグロビンの α_1 - β_2 界面の状態を反映する紫外域微分スペクトルの微細構造をプローブとして観測し、更に Universal allosteric model を用いて解析した。その結果、

- 束縛が強まって K_R 値が減少するとともに、R 状態の微細構造が T 状態の微細構造に近づく。
- $K_T = K_R$ となる極端な条件下であっても T 状態と R 状態の微細構造は一致しない。すなわち、機能的に同一であっても立体構造の異なる状態が存在する。

という新しい知見がえられた。

H.Fujimoto, A.Tsumeshige, Y.Nagai, M.Nagai, K.Imai : State of the quaternary structure of haemoglobin under limit solution conditions

2J1700

ヘモグロビンの四次構造変化における Trp 残基の動き： α 14 および β 15Trp 変異体の UV 共鳴ラマン

○長井 雅子¹、神 弥生¹、櫻井 博¹、長井 幸史¹、長友 重紀²、北川 禎三²（¹金沢大・医、²岡崎共同機構・統合バイオ）

ヘモグロビンの酸素結合解離による四次構造変化をUV共鳴ラマン(UVRR)でTyrやTrpの変化としてとらえることができる。酸素結合にともないTrpのラマンバンドには強度変化が顕著である。グロビン蛋白中には、 α 14、 β 15、および β 37と3つのTrpがある。本研究では α 14または β 15Trpの四次構造変化への寄与を調べる目的で、遺伝子組み換えにより2つの変異体、rHb(α W14L)とrHb(β W15L)を合成しアミノ酸置換の影響を調べた。【材料と方法】rHbはヒト α 、 β グロビン遺伝子を含むプラスミドに変異を導入し大腸菌に合成させた。UVRR測定には励起波長として235 nmを用いた。【結果と考察】 α 14および β 15変異体はともに酸素親和性が高く協同性の低下がみられたが、IHPを加えると親和性はHbAと同程度に下がり有意の協同性(n=2.2)がみられた。rHb(β W15L)+IHPのUVRRスペクトルは、HbAに比べdeoxy、CO型共すべてのTrpのラマンバンドに著しい強度減少と低波数シフトが見られた。特にW3バンドは1552 cm⁻¹とHbAに比べて5 cm⁻¹も低波数シフトしていた。このことは β 15TrpはHbA中で強いラマンバンドを与えるような環境にあり、また高波数側にラマンバンドを与えることを意味している。一方、rHb(α W14L)では強度減少がみられるのみで波数シフトはなかった。リガンド(CO)結合によるTrpのラマンバンドの強度変化は α 132接触面でサブユニット間の水素結合に関与する β 37Trpの変化によるとされていたが、Hb Hirose(β W37S)においても30%の強度変化は残っていて、 α 14または β 15Trpの寄与が予測されていた。rHb(α W14L)ではリガンド結合によるTrpのラマンバンドの強度変化はHbAと同程度で α 14Trpの寄与は小さかったが、rHb(β W15L)ではHbAの60%に減少した。したがって β 15Trpは β 37Trpと同様HbAの四次構造変化に関与していると考えられる。

M. Nagai, Y. Jin, H. Sakurai, Y. Nagai, S. Nagatomo and T. Kitagawa : Changes of Trp residues upon the T to R transition of hemoglobin: UV resonance Raman of mutants at α 14 and/or β 15Trp

2K1330

Thermus thermophilus 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼのS92残基のランダム化による低温適応化機構の解析

○梅澤 明夫、大栗 誉敏、大島 泰郎、山岸 明彦（東薬大・生命）

好熱菌の酵素は高い熱安定性を持ち高温で高い活性を発揮するが、低温での活性が低い事が多い。しかし高い熱安定性を持ち低温での活性の高い酵素を得る事は、工業的な利用に有用であるだけでなく、たんに質の構造と機能の理解につながると考えられる。これまでの実験で、好熱菌 *Thermus thermophilus* にランダムに変異を導入する事で低温での活性の上昇した変異体を得る事ができた。本実験はその中のS92F変異体についてアミノ酸のランダム化を行う事により、低温適応化機構の解析を行う事にした。方法として、部位特異的な変異導入法により変異を導入する事でアミノ酸のランダム化を行い、大腸菌で発現、精製した後に活性等の評価を行った。それによって、得られた変異体の内S92I、V、T変異体は野生型と比較して40℃でのkcat/Kmが1.5倍に上昇しており、70℃においては野生型と同様の値を示すこと、S92L変異体においては40℃、70℃どちらのkcat/Kmも野生型との違いはないことが分かった。Thrでの活性の上昇や、Leuで野生型との差異がみられない事から、S92残基における低温での活性の上昇は、疎水性相互作用によるものではない事が明らかになった。またS92残基においてPhe以外でも低温適応が可能である事が示唆された。

A.Umezawa, T.Ohkuri, T.Oshima and A.Yamagish : Low-temperature adaptation mechanism of S92 mutants of 3-isopropylmalate dehydrogenase from a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*