2P073

整数スピン系(S=2)を持つヘムタンパク質のEPRによる解析: Mn³⁺一置換ミオグロビンの場合

○堀谷 正樹、村田 知弥、堀 洋 (阪大院・基礎工・生体工学)

はじめに 電子スピン共鳴(EPR)によるヘムタンパク質の電子状態の研究では半整数スピンを持つFe³⁺ヘム鉄で著しい成果を収めているが、生理的にも重要であるFe²⁺ヘム鉄のような整数スピン系(Sピン量子数S=2)での電子状態の研究はあまり進んでいない。本研究では、Fe²⁺ヘム鉄と同じS=2を持つMn³⁺-ポルフィリン置換ミオグロビン(Mn³⁺Mb)を作製し、単結晶EPR測定よりMn³⁺Mbの電子状態の解析を行ったので報告する。

方法 Mn³⁺高スピン状態(S=2)はスピンハミルトニアン $H = D[S_z^2 - S(S+1)/3] + E(S_x^2 - S_y^2) + \beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{B}$ としてゼーマンエネルギー準位を求める。ここで、Dはヘム面垂直(z軸)方向の異方性、Eはヘム面内の異方性、Bは外部磁場、gはg因子である。S=2の場合、外部磁場をヘム面に垂直(z軸)方向、かつz軸に平行にマイクロ波磁界をかけると、 $\Delta S=2$ のEPR遷移が可能になる。この条件を満たす二重モードEPR空洞共振器を作製し、Mn³⁺Mb単結晶EPR測定、信号強度の温度依存性の解析を行った。**結果** Mn³⁺Mb溶液のXバンドEPRは75mT付近に特異な信号を示した。平行モードでの信号強度は通常モードの空洞共振器でのそれと比べ、2桁強い事から $S_z = \pm 2$ 近接準位間の遷移である。一方、単結晶中でヘム面に垂直な方向に外部磁場をかけると信号強度が最大になった。10K~4Kで信号強度が温度の逆数に比例して増大する事から遷移は基底近接準位間で、 $D < 0$ である事が示された。z軸方向のEPR信号解析の結果から、 $g_z = 1.93$ 、 $E^2/D = -0.032 \text{ cm}^{-1}$ が得られた。D、Eの絶対値を求めるには、高磁場・高周波EPRを用いた $S_z = \pm 2$ 準位間以外の遷移を測定する必要があり、検討中である。

M.Horitani, T.Murata and H.Hori : EPR analysis of hemoprotein with integar spin system (S=2): Mn³⁺-myoglobin

2P075

ビスヒスチジン配位型ミオグロビン変異体のX線結晶構造解析

宇野 公之、○清田 浩平、坂本 力治、富杉 佳計、石川 吉伸、池水 信二 (熊本大院・薬)

【序】ミオグロビンは初めてX線結晶構造解析により立体構造が解明されたタンパク質のひとつである。近年種々のヘムタンパク質モデルとして多くのミオグロビン変異体が作成され、構造と機能との関係を探るツールとして広く利用されている。ミオグロビンの遠位側に存在するHis64とVal68を入れ替えた変異体H64V/V68H(VH)では近位軸配位子であるHis93とHis68が配位した6配位構造を取ることが報告されている(Dou et al, J. Biol. Chem. 270, 15993 (1995))。我々はこの変異体に注目し、近位側にヘムポケットを構築すべくHis93を非配位性のAlaに置換した3重変異体H64V/V68H/H93A(VHA)を作成したところ、VHと類似の6配位型構造を取ることが示した(Uno et al, Biochemistry 42, 10191 (2003))。今回VHA変異体の軸配位構造を詳細に調べるため、X線結晶構造解析法を用いて検討した。【結果・考察】2.2 Åの分解能で結晶構造解析を行った結果、VHAはHis68とHis97を軸配位子に持つことがわかった。この配位構造は、共鳴ラマン法によって示唆されたVHAの溶液構造を支持した。また、驚くべきことに、野生型やVHと比べてVHAではヘムが約40度も傾いた構造を取っているにもかかわらず、グロビンフォールドは依然として保持されていることが明らかとなった。このことから、グロビンフォールドはきわめて安定であるとともに、タンパク質内部でのヘムの配置に大きな自由度を与えることがわかった。以上から、グロビンフォールドを利用することでヘムポケットやヘム鉄軸配位子の自由な設計が可能であることが示唆された。

T.Uno, K.Kiyota, R.Sakamoto, Y.Tomisugi, Y.Ishikawa and S.Ikemizu : X-ray crystal structure of bis-histidine coordinated myoglobin mutants

2P074

UV Resonance Raman Studies on the Trigger of Structural Changes of Myoglobin upon Ligand Binding

○高影¹、Pal Biswajit²、林 高史³、原田 勝好³、中川 知之³、北川 禎三^{1,2} (1総研大、2岡崎統合バイオ、3九大院・工学部)

The structural changes of globin upon ligand binding to heme in myoglobin were investigated with ultraviolet resonance Raman (UVR) spectroscopy. It has been noted by our UVR study that Tyr151 and Trp7 exhibit some changes upon ligand binding, and it is the purpose of this study to explore a practical trigger of the conformational change of globin. It had been believed that the out-of-plane movement of iron upon dissociation of a ligand results in a structural change of globin, but this idea was denied by the finding that His93 → Gly mutation in the presence of exogenous imidazole exhibited the same structural change as that of WT. In the present study, we tried to clarify importance of the hydrogen bond networks between propionate side chains of heme and globin. Accordingly, Mb was reconstituted with a modified heme, 6-Me-7-Pro or 6-Pro-7-Me heme. The UVR spectrum of the 6-Me-7-Pro Mb was appreciably different from that of native Mb, while that of 6-Pro-7-Me Mb remained unchanged, indicating importance of the hydrogen bond between 6-propionate and Arg45.

Y. Gao, B. Pal, T. Hayashi, K. Harada, T. Nakagawa and T. Kitagawa : UV Resonance Raman Studies on the Trigger of Structural Changes of Myoglobin upon Ligand Binding

2P076

ファージディスプレイ法を用いた新規人工ヘム蛋白質の構造安定化

○野上 薫、高田 耕児、石森 浩一郎、森島 績 (京大院工)

生体内においてヘム蛋白質は、酸化反応、酸素貯蔵、電子移動など多種多様な機能を有しており、これらの機能を人工的に制御した新規ヘム蛋白質を構築することは生物工学の分野において非常に興味深い。本研究室ではこのような多機能を有する新規ヘム蛋白質分子の設計を目指し、酸素運搬ヘム蛋白質ヘモグロビン α 鎖のヘム結合部位を、電子伝達ヘム蛋白質シトクロム b_5 (以下 b_5)のヘム結合部位に置換した新規蛋白質(以下 $b_5 \alpha b_5$)を作製した。しかし、この $b_5 \alpha b_5$ は構造が不安定化し、ヘム親和性も b_5 に比べて1000分の1となり、可逆的な酸素結合や電子移動特性の検討にまでは至らなかった。我々はこのような人工蛋白質の構造を安定化するため、ヘムとの親和性を安定性の指針としたファージディスプレイ法を用いることにより、ランダムに変異を施した変異体集団から安定な変異体だけを選択することができるのではないかと考えた。まず目的の変異蛋白質を発現させた多数のファージをヘム固定化カラムに吸着させ、適度な変性剤を含む緩衝液で洗浄し、ヘムとの親和性の低い不安定な変異体を取り除き、その後カラムに残った変異体を回収した。このような一連の流れを8回繰り返した結果、得られた多数の変異体において、ヘムとの相互作用がない位置に存在し、疎水性相互作用により蛋白質構造の揺らぎを抑える役割を果たしている疎水性クラスター領域で、より分子体積の小さな残基への置換が観測された。このような疎水性クラスター領域におけるより小さな残基への置換は、クラスターを形成する残基の側鎖間の立体障害を減少させ、クラスター領域の構造を安定化すると考えられ、その結果蛋白質の全体構造も安定化し、ヘムへの親和性も向上したと推定できる。今後、得られた数種類の変異体を発現させ、単離した状態でのヘム親和性や熱力学的安定性を比較検討していく必要があると考えられる。

K.Nogami, K.Takata, K.Ishimori and I.Morishima : The Stabilization of Novel Heme Proteins Using Phage Display