3P085

組換えヒト・ヘモグロビンのCD

○長井 雅子、長井 幸史（法政大・工）

ヘモグロビンの任意のアミノ酸部位に変異を導入して構造と機能
相関を研究する目的で、ヒト・ヘモグロビン（Hb A）の遺伝子を組み
込んだプラスミッドを用いて大腸菌による組換えヒト・ヘモグロ
ビン（rHb A）の合成を試みた。今回は得られたrHb Aには、CDが
血液からのHb Aと同様のものと、CDスペクトルの異なるものが含
まれていることを報告する。rHb Aを菌体から抽出後、2種類のイオン
交換 Sepharose により精製した。精製の最終段階の SP-Sepharose
column で rHb A は 2 つのピークと 1 つの肩からなる溶出パターンを
示した。260nm の正の CD の大きさにより、溶出順に SP-1、SP-2、
SP-3 の 3 画分にわけた。SP-Sepharose column でわけた rHb A の 3 画
分は 260nm の CD のみならず、Soret 帯の CD も異なっていた。SP-1
では 260nm、Soret 帯の CD スペクトルともにほぼ血液からの Hb A
と同様であったが、SP-2 では 260nm の正の CD は SP-1 の約 1/2 と
小さく、Soret 帯では正の CD に加えて短波長側に負の CD が現れた。
SP-3 では 260nm の CD は SP-1 の約 1/4 と更に小さくなり、Soret
帯では顕著な負の CD を示した。この傾向は CO 型で最も顕著であつた
が、oxy、deoxy 型でも同様であった。特に異常な CD スペクトルを
示した SP-3 では Soret 帯、可視部ともに吸収のピークが SP-1 や血液
からの Hb A に比べて 1-2nm blue-shift していた。CD スペクトルの
違いはグロビン蛋白にとりこまれたヘムの配向が異なることが原因で
はないかと考えられる。260nm の CD の低い画分は、CO 及び deoxy
型のままでは変化しないが、酸化後低温に一日置き再還元するとその
CD は変化し、SP-1 と同様のスペクトルを示した。

M. Nagai and Y. Nagai : Circular dichroism of recombinant human
hemoglobin

3P087

最尤法により推測した祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列

○石田 学^{1,2}、安田 温³、山崎 伊織⁴、太田 元規⁵、磯貝 泰弘²、
今井 清博^{1,3,4}（¹法政大・マイクロナノテクノロジー研究センター、²理研・生体金属科学、³法政大院・工・物質化、⁴法政大・工・物質化、⁵東工大・学術国際情報センター）

現存生物のタンパク質は、数十億年にわたる生物進化の結果として
存在し、それぞれが生命活動を支える機能を持つ。これらのタンパク
質のアミノ酸配列には、遺伝子が祖先の記録を保存しているように、
タンパク質の分子進化の歴史が刻み込まれていると考えることができ
る。このことから、アミノ酸配列を比較することにより分子進化を表す
分子系統樹を描くことができる。この分子系統樹に基づいて、経験的
置換確率に従うと祖先型のアミノ酸配列を推測することができる。

本研究では、可逆的な分子状酸素結合能を有し、哺乳類、鳥類、爬
虫類などの陸生動物のみならず、両生類、魚類、植物、さらには、バ
クテリアなどの下等生物に至るまで幅広く分布している様々な生物種
のグロビンのアミノ酸配列をデータベースから集めた。得られたアミ
ノ酸配列データセットから、アラインメント後、最尤法によって分子
進化系統樹の推定と配列解析を統合的に行うことができるプログラ
ム PAML を用いて分子系統樹及び祖先型ミオグロビンのアミノ酸配
列の推測を行った。この方法によって求めたアミノ酸配列は、現存し
ていない生物あるいは祖先生物のタンパク質のアミノ酸配列を反映し
ているとは必ずしも断言できない。しかし、現状では天然様の立体構
造や機能を有するタンパク質の全配列設計は難しいのに対し、このよ
うな手法を駆使することで、グロビンフォールドに折りたたまれる可
能性が高く、酸素結合能を持つことが期待されるアミノ酸配列を比較
的簡単に得られるものと考えられる。そこで、計算によって得られた
祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列のうち、どの生物種からも適度に
相同性が低い配列を用い、大腸菌タンパク質発現系を利用してタンパ
ク質を合成し、それらの構造と機能を解析して行く予定である。

M. Ishida, A. Yasuda, I. Yamasaki, M. Ota, Y. Isogai and K. Imai :
Amino acid sequences of ancestral myoglobin inferred by the maxi-
mum likelihood method

3P086

組換えヒト・ヘモグロビンのヘムの配向：逆配向ヘムを含むヘモグロビンの酸素結合特性

○安藝 神 弥生¹、長友 重紀²、山本 泰彦²、長井 雅子^{1,3}、今
井 清博^{1,3}（¹法政大・マイクロ・ナノテクノロジー研究セン
ター、²筑波大・化、³法政大・工）

成人の血液に含まれるヘモグロビン（Hb A）の 90 %以上はヘム
が正しい配向でグロビン内に挿入されているが、10 %未満は α 、 γ -メ
ソ位に対して 180° 逆配向であると報告されている¹⁾。ヒトの α 、 β グ
ロビン遺伝子を組込んだプラスミッドを用いて大腸菌により組換え Hb
A を合成したところ、SP-Sepharose カラムクロマトグラフィーで 2 つ
のピークと 1 つの肩の 3 つの成分に分離された。溶出順に SP-1、2、3
とし、¹H NMR により解析すると、SP-1 のヘムは約 90 %が正常配向
であるが、SP-2 には α と β 鎖で若干差はあるものの正常配向と逆配
向のヘムが約 50 %ずつ含まれ（逆配向ヘムの割合は α 鎖 40 %； β 鎖
60%）、SP-3 のヘムは 80 %以上が逆配向であることが判明した。今
回、これらの酸素結合特性を今井式酸素平衡曲線自動記録装置により
測定した〔ヘム濃度 60 μ M、50 mM bis-Tris（pH 6.9 と pH 7.4）
または Tris buffer（pH 7.9）、0.1 M Cl⁻ およびメト Hb 還元酵素系存
在下、25 ℃〕。pH 7.4 で SP-1 は、協同性の指標である Hill 係数 n =
3.18 の値を示し、Hb A（ n = 3.18）と協同性に関しては同一であつた。
SP-2 は n = 2.95 と若干低い Hb A とほぼ同じ協同性を示した。一方、
SP-3 は n = 2.64 と低い有意の協同性の存在が確かめられた。また、
酸素親和性は SP-1、2 では Hb A とほぼ等しく、SP-3 では 1.1
～1.2 倍高くなっていた。当初、ヘムが逆配向であると Hb の協同性
は著しく損なわれると予想されたが、それに反してヘムの配向は協同
性にそれほど大きな影響は与えなかった。これらの結果は、Hb の協
同性の発現のために重要とされている 2、4 位のビニル基と周辺アミ
ノ酸残基との相互作用は必ずしも Site-specific ではないことを示唆し
ている。

1) La Mar, G. N. *et al.*: *Biochemistry* 24, 3826-3831 (1985).

Y. Aki-Jin, S. Nagatomo, Y. Yamamoto, M. Nagai and K. Imai :
Oxygen binding properties of recombinant human hemoglobin with
heme rotational disorder

3P088

硬骨魚類マグロのヘモグロビンのアロステリック特性

○見城 友崇¹、常重 アントニオ^{1,2}、宮崎 源太郎³、今井 清
博^{1,2}（¹法政大院・工・物質化学、²法政大・工・物質化学、³阪大・基礎工）

多くの動物の血液中には、酸素担体が存在する。脊椎動物において
は、赤血球中に含まれるヘモグロビン(Hb)がその役割を担っている。
そのHbは α 鎖、 β 鎖がそれぞれ2個ずつ会合してできる四量体ヘム
タンパク質である。Hbの酸素飽和度 Y と溶存酸素分圧 pO_2 の関係
を示す酸素平衡曲線（Oxygen Equilibrium Curve: OEC）は、アロス
テリック相互作用によりS字型を示す。また、Hbは血中のpHの低下
や二酸化炭素濃度の上昇により、酸素親和性が低下し、OECの形状
が変化する（Bohr効果）。Hbの立体構造は、異なる生物種間で極め
て類似しているが、その機能は各生物種の生息環境に適応して変化する。
硬骨魚類のHbの多くは、他の脊椎動物のHbに比べてpHや二
酸化炭素に対する効果が著しく、酸性条件下では高酸素分圧下でなけ
ればHbを完全に酸素で飽和することができない。この現象をRoot
効果と呼び、硬骨魚類において中立浮力を獲得するための浮き袋への
酸素放出に重要な役割を果たしていると考えられている。

本研究では、Tunaの四量体Hbおよび単離 α 鎖と単離 β 鎖のOEC
をpH 6.4、7.4、8.4の3条件下で測定し、酸素親和性と協同性につい
て検討した。Tuna Hbは四量体では協同的に酸素を結合し、Root効
果を示した。単離サブユニットでは、 α 鎖が非協同的でpH依存性を
示さなかったのに対し、 β 鎖は非協同的であるが著しいpH依存性を
示した。これらのことより、Tuna HbのRoot効果には α 鎖よりも β
鎖の方がより大きく寄与していることが示唆された。さらに、電子
常磁性共鳴(Electron Paramagnetic Resonance: EPR)の測定を行い、
ヒトHbの結果と比較することによって、Root効果発現の分子機構
を明らかにしていきたい。

T. Kenjo, A. Tsunesige, G. Miyazaki and K. Imai : Allosteric prop-
erties of the hemoglobin from a bony fish, the bluefin tuna (*Thunnus
orientalis*)