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 型で最も顕著であったが、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 maximum 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 °C]。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った。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 properties of the hemoglobin from a bony fish, the bluefin tuna (*Thunnus orientalis*)