3P109

Diverse Effects of Amphipathic-Amphoteric Kosmotropes on the Oxygenation Properties of Human Hemoglobin A

○Haga Takehiko, Tsuneshige Antonio (Dept. of Materials Chemistry, Hosei University)

We have used several kosmotropes and studied their effects on the oxygenation properties of human hemoglobin A. In the absence of any allosteric effector, including chloride, at pH 7.4 and 25 °C, the P50 value (partial pressure of oxygen at half saturation) in the presence of 1 M glycine betaine (amphoteric kosmotrope) was 1.8 torr, similar to that in the absence of this co-solute. However, the P50 values increased to 3.6 torr and 8 torr in the presence of 2 M and 4 M glycine betaine, respectively.

Different effects were observed in the presence of amphipathic-amphoteric kosmotropes. We selected two betaine-derivatives which differed one from the other by the nature of the hydrophobic moiety. In the presence of 1 M of the pyridyl derivative co-solute, we noticed an increase in the affinity for the binding of the first oxygen, increase of P50 value, and a decrease in cooperativity. The effects were more dramatic in the presence of 1 M of the phenyl derivative co-solute. The shape of the oxygenation curve resembled that of a dimer (two binding sites) rather than that of a tetramer (four binding sites); however, cooperativity was definitively present. The current results suggest that the effects of amphipathic-amphoteric kosmotropes on the ligation function of hemoglobin are rather different from those exerted by amphoteric kosmotropes, presumably by affecting more than just the hydration shell of the protein. Moreover, the strength of these effects seemed to be related to the strength of hydrophobicity of the betaine-derivatives.

T. Haga and A. Tsuneshige : Diverse Effects of Amphipathic-Amphoteric Kosmotropes on the Oxygenation Properties of Human Hemoglobin A

3P111

チトクロム酸化酵素の一酸化炭素結合型構造の解析

○神田 勝正¹、村本 和優¹、伊藤・新澤 恭子¹、山下 栄樹²、青山 浩³、月原 富武²、吉川 信也¹ (¹兵庫県立大・院生命理、²阪大・蛋白研、³理研・播磨)

一酸化炭素 (CO) は還元型ヘム a_3 -Cu_B サイトに結合し酸素還元反応を阻害する。本研究では、CO の結合様式を調べるため X 線構造解析を行った。常温 (277 K) と低温 (100 K) で X 線回折実験を行い、構造を比較した結果、CO は 277 K ではヘム鉄に配位しているが、100 K ではヘム鉄から離れて Cu_B に配位していることが判明した。以前の研究から、一酸化炭素は可視光の照射によりヘム鉄から解離することが知られている。そこで、暗い条件下で 100 K に保った後、吸収スペクトル測定を開始し、その直後の様子を調べた。すると、最初 277 K の場合とよく似ていたスペクトルが時間経過とともに変化することが見いだされた。この結果は、低温では分光測定用の光照射でも CO が光解離し、Cu_B に結合することを示唆している。光解離した CO の再結合の半減期を計算したところ、277 K では msec のオーダーであるが 100 K では非常に長い時間であることが分かった。つまり、低温では光解離した CO の再結合が起こりにくく、Cu_B 付近で安定化されていると考えられる。

そこで、光解離を起こさないように、暗い条件下で急速凍結させた CO 結合還元型結晶を用いて X 線回折実験を行った。しかし、構造解析の結果、この場合にも CO は Cu_B 付近に見出された。そこで、CO の解離が X 線照射でも起こる可能性を調べるため、暗い条件下で急速凍結した結晶に X 線を照射し、それによる吸収スペクトル変化の測定を現在行っている。

K.Kanda, K.Muramoto, K.Shinzawa-Itoh, E.Yamashita, H.Aoyama, T.Tsukihara and S.Yoshikawa : Analysis of the CO-bound structure of cytochrome c oxidase

3P110

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の精密構造決定の戦略

○青山 浩¹、山下 栄樹²、伊藤・新澤 恭子³、吉川 信也³、月原 富武² (¹理研・播磨、²阪大・蛋白研、³兵庫県立大院生命理)

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の酸素還元と水素イオン能動輸送機構を明らかにするためには、タンパク質内部の原子の空間配置を正確に決定し、それらを經由した水素イオンの輸送過程を追跡して初めて理解できる。また酸素還元部位であるヘム a_3 -Cu_B サイトの酸化型構造は長年の議論があり、正確な構造決定が待たれている。このために本研究では、精密な構造決定を行うための X 線回折データ測定法について検討したので報告する。

1) 波長の検討

これまでは SPring-8 の阪大蛋白研ビームライン (BL44XU) において、0.9 Å の波長で実験を行ってきた。しかし波長を 0.75 Å にすれば、フォトンフラックスは約 25% 低下するが、吸収は低下し X 線によるダメージが軽減される可能性がある。そこで波長 0.9 Å、露光時間 20 秒の測定と、波長 0.75 Å、露光時間 30 秒の測定を同じ結晶を用いて行い、分解能、1/σ, 反射数等を比較したが、0.9 Å の波長の方が良質のデータ収集に適していた。これは検出器感度の波長依存性が原因と思われる。

2) 温度の検討

我々は酸化型酵素のヘム a_3 と Cu_B の間には過酸化物が存在することを明らかにしたが、100 K の測定では、X 線の露光時間が 400 秒と 200 秒の間に X 線損傷による過酸化物の電子密度の消失が認められた。そこで窒素気流から He 気流に切り替え 47 K で測定を行ったところ、400 秒の露光時間までは、X 線による還元の影響が軽減され、過酸化物の消失は認められなかった。このことから、酸化型酵素のヘム a_3 と Cu_B の間には過酸化物が存在することが確認できた。He 気流中で X 線による還元を軽減して今後より高分解能の構造解析を行いたい。

H.Aoyama, E.Yamashita, K.Shinzawa-Itoh, S.Yoshikawa, T.Tsukihara : Strategies for collecting high resolution data of bovine heart cytochrome c oxidase

3P112

還元型チトクロム酸化酵素のシアン化物イオン結合構造の解析

○太田 和宏¹、村本 和優²、伊藤・新澤 恭子²、山下 栄樹¹、青山 浩³、月原 富武¹、吉川 信也² (¹阪大・蛋白研、²兵庫県立大・院生命理、³理研・播磨)

シアン化物イオン (CN⁻) は陰イオンであるため一般的に酸化型のヘムに結合するが、チトクロム酸化酵素では還元型のヘム a_3 -Cu_B サイトにも結合する。本研究では、CN⁻ が結合した還元型のヘム a_3 -Cu_B サイトの構造について、分解能 2.2 Å までの複数の独立した X 線回折データセットを用いて解析した。その結果、CN⁻ はヘム軸から傾いて Fe_{a3} に配位していることが分かった。更に、CN⁻ の結合による構造変化に関して調べたところ、ヘム a_3 、Cu_B、及びヘム a_3 付近のアミノ酸残基の局所的な構造変化が見いだされた。また、ヘム a_3 付近で Tyr244 と水素結合距離の位置に電子密度が見いだされた。この電子密度は還元型構造では観測されず、電子密度レベルは CN⁻ のものよりも低かった。

以上の結果から、還元型ヘム a_3 -Cu_B サイトへの CN⁻ の結合に関する考察を行った。CN⁻ は HCN の形で、酵素中の基質透過経路を通じて還元型ヘム a_3 -Cu_B サイトに到達すると考えられる。また、H₂O も同様に透過し Tyr244 に水素結合することが推測される。ヘム a_3 -Cu_B サイトへの CN⁻ の結合により、解離した H⁺ は Tyr244 にヒドロニウムイオン (H₃O⁺) として水素結合する可能性が考えられる。この正電荷の存在により、ヘム a_3 -Cu_B サイト付近の電気的中性が保たれ、還元型のヘム a_3 にも CN⁻ が結合するのではないかと考えられる。また、CN⁻ と H₃O⁺ 間の静電相互作用が、CN⁻ の結合に伴うヘム a_3 -Cu_B サイト付近の構造変化に関与しているのではないかと考えられる。

K.Ohta, K.Muramoto, K.Shinzawa-Itoh, E.Yamashita, H.Aoyama, T.Tsukihara and S.Yoshikawa : Analysis of the cyanide-bound structure of cytochrome c oxidase in the reduced state.