— 論 文 —

(日本化学会誌, 1990, (2), p.185~191)

© 1990 The Chemical Society of Japan

動的光散乱法を用いたオボトランスフェリンの
ランタノイドイオンの結合にともなう形態変化

(1989年6月26日受理)

佐々木範之・本田 恒・矢島博文・百海浩行
市村 薫・佐竹一夫**・遠藤隆一*

ニワトリ卵白由来のオボトランスフェリン (OTf) は、分子のアミノ末端側 (N), カルボキシル末端側 (C) にそれぞれ金属結合部位を一つずつもつ。これら金属結合サイトの金属錯体の性質として、一連のランタノイド ($\text{Ln}(\text{III})$) イオンを用いた研究によって、結合する金属のイオン半径に錯体の安定性が大きく依存し、イオン半径の減少により錯体の安定性が増加することが示され、しかも、 $\text{Ln}(\text{III})$ イオンはN結合サイトよりもC結合サイトに結合しやすいことも山村らにより示された。本研究では、OTf が $\text{Ln}(\text{III})$ イオンの結合にともなう分子の形態変化を、拡散係数を指標にして、系統的に比較検討した。一連の OTf· $\text{Ln}(\text{III})$ 錯体の拡散係数の変化は原子番号の増加とともに増加し、その傾向は、 $\text{Ln}(\text{III})$ のイオン半径の減少によい相関関係を示した。分子の形態変化 (おそらく収縮) は、 $\text{Ln}(\text{III})$ のイオン半径の減少に依存することが示唆された。OTf· $\text{Ln}(\text{III})$ 錯体の安定性は、 $\text{Ln}(\text{III})$ イオンの結合にともなう OTf· $\text{Ln}(\text{III})$ 錯体の分子の形態変化と関係があることが推測される。また、OTf に対して金属イオンを徐々に添加していった時の拡散係数の変化は、実験を行ったすべての $\text{Ln}(\text{III})$ 錯体で、金属イオンの添加量そのものよりも、金属添加時に生成したC結合サイト錯体量に、より密接に関係した挙動を示した。また、 $\text{Ln}(\text{III})$ 結合にともなう拡散係数の変化をより明確にするために、N結合サイトに比較的結合しやすい $\text{Cu}(\text{II})$ イオンを用いて、それを比較したところ、拡散係数の変化は、C結合サイト金属錯体の生成量とよい相関関係が認められた。このことから、金属イオンの結合にともなう形態変化が、N結合サイトよりC結合サイトの方がより大きいと示唆された。

1 緒 言

鳥類卵白中に存在するオボトランスフェリン (以下 OTf と略記する) は、脊椎動物血清中に存在する血清トランスフェリン (以下 STf と略記する) や乳汁由来のラクトフェリンとともに一群の金属結合性タンパク質トランスフェリンの superfamily を形成する¹⁾²⁾。特にニワトリ卵白由来の OTf は一群のトランスフェリン (以下 Tf と略記する) のモデル物質として研究されてきた。Tf 分子は、分子量約 80000 のグリコシル化された1本のポリペプチド鎖から構成され、ポリペプチドのほぼ中央部分から、アミノ末端側 (N) 半分とカルボキシル末端側 (C) 半分がそれぞれコンパクトに折りたたまれた、二つの独立した領域 (ドメイン) を形成している。また、N, C 両ドメインは一次構造上非常に高い相同性を示し、X線結晶解析の結果によると、高次構造上で互

いに類似した半球状を示す³⁾⁴⁾。この N, C ドメインには、それぞれ一つずつ金属結合部位 (NサイトおよびCサイト) をもち、金属イオンを結合する配位子は両サイトとも等しいことが一次構造上の相同性やX線結晶解析などの研究から明らかにされた¹⁾⁴⁾。このように、Tf の両ドメインは構造上非常に類似した性質をもつが、必ずしも等価でなく、両ドメイン間の機能の相違を解明しようとする試みが数多く報告されている^{5)~10)}。既に山村ら

東京理科大学理学部応用化学科, 162 東京都新宿区神楽坂
** 東京理科大学理学部化学科, 162 東京都新宿区神楽坂

- 1) M.-H. Metz-Boutigue, J. Jolles, J. Mazurier, F. Schoentgen, D. Legrand, G. Spik, J. Montreuil, P. Jolles, *Eur. J. Biochem.*, **145**, 659(1984).
- 2) J.H. Brock, "Topics in Molecular and Structural Biology", Ed. by P. Harrison, Verlag Chemie, Weinheim, Basel, Vol. 7, p.187(1985).

- 3) B. Gorinsky, C. Harsburgh, P. F. Lindley, D. S. Moss, M. Markerand, J. L. Watson, *Nature*, **287**, 157(1979).
- 4) H. M. Baker, E. J. Dodson, G. E. Norris, S. V. Rumball, J. M. Wates, E. N. Baker, *Proc. Natul. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 1769(1987).
- 5) J. Williams, R. W. Evans, K. Moreton, *Biochem. J.*, **173**, 535(1987).
- 6) D. C. Harris, *Biochemistry*, **16**, 560(1977).
- 7) E. H. Morgan, *Biochim. Biophys. Acta*, **580**, 312(1979).
- 8) T. Yamamura, H. Ikeda, K. Nakazato, M. Takimura, K. Satake, "Proteins of Iron Storage and Transport", Eds. by G. Spik, J. Montreuil, R. R. Chichon, J. Mazurier, Elsevier Science Pub., Amsterdam (1985) p. 53.
- 9) T. Yamamura, S. Hagiwara, K. Nakazato, K. Satake, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 298(1984).

は、ニワトリ由来の OTf とヒト由来の STf の N, C 両サイトの錯形成能と安定性の相違を明確にするために、化学的に性質の類似した一連のランタノイド金属イオン (以下 Ln(III) と略記する) をプローブとして、おもに Tf・Ln(III) 錯体の EDTA による錯体崩壊の速度定数を測定し、Tf・Ln(III) 錯体に関して Ln(III)・C サイト錯体の方が Ln(III)・N サイト錯体よりも安定性が高いこと、それぞれのサイトでの Ln(III) 錯体の安定性は Ln(III) のイオン半径が小さくなるほど、相対的に錯体の安定性が高くなることを示した¹⁰⁾。さらに OTf においては、ある一定量の金属イオンを添加すると両サイトに等しく結合せず、ほとんどの金属イオン種がどちらか一方のサイトに、より優先的に結合することが知られている^{10,11)}。N サイト占有性をもつものとしては Fe(III), Cu(II), Al(III) など¹¹⁾、C サイト占有性をもつものとしては Y(III) をはじめ、Pr(III), Nd(III), Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Dy(III), Ho(III), Er(III), Yb(III) が報告されている¹⁰⁾。

一方、X線小角散乱の研究から、Tf は Fe(III) イオンを結合すると金属を結合しない状態にくらべ、分子の回転半径が小さくなることが示されている^{12,13)}。

本研究では、金属イオンが結合することで分子の形態が変化する挙動を、形態変化の一つの指標として拡散係数 (以下 D とする) を測定することにより検討した。そして金属イオンとして Cu(II) および化学的性質が類似しイオン半径のみが異なる Ln(III) を用いて、形態変化のもたらす主要因を明確にする。

2 実験

2.1 試料

ニワトリ OTf は、新鮮なニワトリ卵白から、山村らの方法⁹⁾にしたがって精製したものを使用した。

Ln(III) 金属塩は、Nd(III), Sm(III), Eu(III), Gd(III), Tb(III), Dy(III), Ho(III), Er(III), Yb(III) 塩化物塩で Aldrich 社のものを使用した。そのほか使用したすべての試薬は、試薬特級のもをそのまま使用した。

2.2 試料溶液の調製

apoOTf を $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaHCO_3 を含む $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris(hydroxymethyl)aminomethane (以下 Tris と略記する)-HCl 緩衝液, pH 8.0 に溶解し、その濃度は $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 11.3^{14)}$ および分子量 $77770^{15)}$ を用いて決定した。

各種 Ln(III) 錯体は、一定量の金属イオン溶液を、濃度の決定した apoOTf にできるだけ均一になるように添加し、調製した。調製した各種 OTf 金属錯体溶液は、光散乱測定を行う前に、

セルロースアセテート メンブランフィルター ($0.22 \mu\text{m}$, Millipore LTD. 製) を 2~3 回通した後、測定に使用した。

2.3 Cu(II) 錯体の調製

山村らによれば Cu(II) イオンは、pH 8 付近では N サイトに選択的に結合する^{9,10)}。OTf・Cu(II) のうちで N サイトに優先的に配向させた錯体 (以下 OTf(N)・Cu(II) 錯体と示す) は、この方法にしたがって調製した。

Cu(II) を強制的に C サイトに多く結合させた錯体 (以下 OTf(C)・Cu(II) 錯体と示し、N サイトにより多く結合した錯体、OTf(N)・Cu(II) と区別する) を Baldwin と deSousa の方法¹⁶⁾を参考にして調製した。すなわち、OTf 溶液を酸性下 (約 pH 5.5) で Cu イオンを添加し、その後 pH を徐々に 8 にして調製した。OTf の N および C サイトに結合している量は山村らの報告⁹⁾にしたがって、EDTA による Cu の引き抜き反応速度と吸光度から求めた。本実験では、まず約 1% の OTf(C)・Cu(II) を調製し、その一部から N および C サイト錯体の形成量を EDTA 引き抜き法^{9,10)}により調べ、残りの溶液は Tris 緩衝液で希釈して、光散乱測定に使用する溶液を調製した。

2.4 N および C サイト錯体の生成量について

OTf の N, C サイト選択性は、Ln(III) では、より優先的に C サイトに、Cu(II) では、より優先的に N サイトに結合することが示された^{9,10)}。そして、金属イオンを OTf に添加したとき、OTf の N, C 二つの結合サイトに結合した分配比は、EDTA による金属の引き抜き反応から決定した^{10,11)}。

一方、OTf の金属錯体の生成の仕方は、下の図式の様になる (詳細は引用文献 8), 17) を参照)。

EDTA による N, C 金属錯体の崩壊速度が異なる (二相性) こと、 $t=0$ における各相の吸光度比が N および C サイト錯体生成量の比に比例することから、各サイトの錯体生成量を計算することができる^{10,11)}。モデル解析に用いた飽和度 (θ) と、N, C サイト結合比 (y) の関係式は、 $\theta = [N] + [C]$, $y = [C]/[N]$ で示される。これから、N および C サイト錯体の相対的な生成量は次式で表すことができる。

$$[N] = \frac{\theta}{y+1} \quad (1)$$

- 10) 山村堯樹, 市村 薫, 津田 透, 林 敦子, 谷口高広, 戸井利香子, 前田芳人, 木原 裕, 佐竹一夫, 日化, 1988, 452.
- 11) T. Yamamura, S. Shimo, T. Tsuda, K. Satake, *Rep. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, 28, 633(1985).
- 12) T. Yamamura, K. Ichimura, K. Satake, Y. Tachi-iri, H. Kihara, Y. Amemiya, *Photon Factory Activity Report*, 4, 308(1986).
- 13) L. Kilar, I. Simon, *Biophys. J.*, 48, 799(1985).
- 14) A. N. Glazer, H. A. McKenzie, *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 109(1963).
- 15) J. Williams, T. C. Elleman, B. Kingston, A. G. Wilkins, K. A. Kuhn, *Eur. J. Biochem.*, 122, 297(1982).

- 16) D. A. Baldwin, D. M. R. deSousa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99, 1101(1987).
- 17) K. Ichimura, H. Kihara, T. Yamamura, K. Satake, *J. Biochem.*, 106, 50(1989).

$$[C] = \frac{\theta y}{y+1} \quad (2)$$

一方, 上の図式中で,

$$Q = 1 + K_N m + K_O m + K_N K_O K_{st} m^2 \quad (3)$$

$$\theta = (K_N m + K_O m + 2 K_N K_O K_{st} m^2) / (2 Q) \quad (4)$$

$$y = (K_O m + K_N K_O K_{st} m^2) / (K_N m + K_N K_O K_{st} m^2) \quad (5)$$

式(3)から(5)を整理し, $K_{st}=1$ (協同効果がない場合)を代入すると

$$y - 2\theta + 1 = \lambda(1/y - 2\theta + 1)$$

が得られる。なお, $\lambda = K_O/K_N$ とおく。この式を分配比 y について解くと,

$$y = (\lambda - 1)(1 - 2\theta) + \sqrt{((\lambda - 1)(1 - 2\theta))^2 + 4\lambda} \quad (6)$$

となる。分配比 y は, λ が与えられれば, θ のみの関数となる。この y を用いて, 式(1), (2) から, 各飽和度における N 結合サイト, C 結合サイト錯体の生成量の割合をシミュレートした。なお, Tb(III) および Cu(II) が OTf に結合する時には, N, C サイト間には協同性がない⁸⁾¹⁷⁾ということが佐竹らによって報告されている。また, Tb(III), Cu(II) の OTf の N 結合サイトに対する C 結合サイトの平衡定数比 λ は, $\lambda (=K_O/K_N) = 2.2 \pm 0.2$ (Tb(III) の場合)¹⁷⁾ および 0.25 ± 0.2 (Cu(II) の場合)⁸⁾ を用いた。各飽和度における金属イオンの N, C サイトの錯体生成量の計算値と, 実験で得られた錯体の生成量の割合を比較した。実験に使用した OTf の濃度範囲では, θ, λ の濃度依存性は認められなかった。

2.5 OTf 金属錯体の拡散係数の測定

各 OTf 金属錯体溶液に対する動的光散乱測定は大塚電子社製の DLS-700 (光源 Ar⁺ レーザー, 488 nm) を用いて行った。この測定において各錯体の D 値は, ホモダイナ法¹⁸⁾により得られた散乱光の自己相関関数曲線をキュムラント法¹⁹⁾に基づき解析し決定した。測定散乱角度は 35°, 温度は 25±0.2°C で行った。なお, 測定した D 値の誤差はおおむね ±0.06% であった。

3 結果および考察

3.1 各種 OTf・Ln(III) 錯体の形成と拡散係数

Tf・Ln(III) 錯体は可視部に吸収をもたない無色錯体である。しかしながら, 金属結合部位の配位子群の中にチロシン残基が存在するため, この残基のフェノール性のヒドロキシル基のプロトンが金属結合時に金属イオンに置換されることにより, 芳香族環の吸収スペクトルに変化が生ずるので金属が結合したことがわかる。OTf・Ln(III) 錯体 vs. apoOTf の差吸収スペクトルでは特徴的なピーク (245, 290 nm 近辺) が出現し, この吸光度の変化をモニターすることで OTf・Ln(III) 錯体の生成量を知ることができる¹⁰⁾¹¹⁾²⁰⁾。図 1 (A) に OTf の Ln(III) イオンによる滴定の一例として Tb(III) イオンの場合を示す。Tb(III) イオンは [Tb(III)]/

[OTf]~2.1 で完全に飽和した。これは OTf に存在する二つの金属結合部位に Tb(III) イオンが完全に結合したことを示す。なお, 今回使用したすべての他の Ln(III) イオンについても同様な滴定曲線が得られた (Data not shown)。一方, Tb(III) イオンを徐々に飽和させた時の D 値の変化を図 1 (B) に示す。[Tb(III)]/[OTf]~2.2 まで, 添加した Tb(III) イオンの増加とともに, D 値も増加した。またこの比以上, Tb(III) イオンを添加しても D 値のいちじるしい変化は認められなかった。遊離の Ln(III) イオンの影響はあまりないと推測できた。また, 金属添加した時の各 OTf-Tb 溶液の D 値の角度依存性は実験誤差内 (±2%) でほとんど認められなかった。Ln(III) の添加量を変化させたときの D 値は, 今回実験を行った他のすべての Ln(III) 錯体についても同様な変化を示し, さらに金属滴定曲線の吸光度変化と D 値の変化がほぼ対応していることが認められた。金属滴定による D 値の変化を他の Ln(III) 金属イオンについて, 図 2 (A)~(D) に示した。

3.2 飽和 OTf・Ln(III) 錯体の拡散係数と Ln(III) イオン半径の関係

図 3 に示したように一連の飽和 OTf・Ln(III) 錯体の D 値と Ln(III) イオンのイオン半径²¹⁾の間にはイオン半径の増大 (原子番号の減少) とともに D 値が減少するという明瞭な関係が認められた。OTf の金属結合にともなう形態変化は, 結合する金属イオンの大きさに依存することが示唆された。一方, 山村らは, イオン半径が小さいほど Ln(III) 錯体の安定性が高いということを示した¹⁰⁾。そして, EDTA による Ln(III) イオン引き抜きの反応速

Fig.1 Absorbance at 245 nm (A) and diffusion coefficient (B) of the Tb(III)-OTf complex as a function of the molar ratio of Tb(III) to OTf

Conditions: [OTf]_T = 1.2 × 10⁻⁵ mol·dm⁻³ (A), 4.5 × 10⁻⁵ mol·dm⁻³ (B) in 10 mmol·dm⁻³ Tris-HCl buffer containing 10 mmol·dm⁻³ NaHCO₃, pH 8; Temp. 25±0.2°C

- 18) T. A. King, M. F. Treadaway, *J. Chem. Soc., Faraday Trans 2*, 73, 1616(1977).
- 19) D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.*, 57, 4814(1972).
- 20) A. T. Tan, R. C. Woodworth, *Biochemistry*, 8, 3711 (1969).

- 21) 参考として, 結晶イオン半径を用いた; N. E. Topp, "Chemistry of The Rare-Earth Elements", 塩川二朗, 足立吟也訳, "希土類元素の化学", 化学同人 (1974)p.10.

Fig. 2 Diffusion coefficients of the Ln(III)-OTf complexes as a function of the molar ratio of the protein and metal ion

(A) Sm(III), (B) Gd(III), (C) Dy(III), (D) Er(III)

Conditions were the same as Fig. 1

度定数から、この安定性の原因が錯体形成部位の配位子と金属イオンの相互作用の強さ、すなわち、解離定数の大きさによるものと結論した。これらのことから、錯体の安定性の強さは、各種金属イオンの結合にともなう OTf 分子の形態変化と密接な相関関係を示すことが示唆された。一方、X線小角散乱の結果¹²⁾¹³⁾から類推すれば、 D 値の変化は金属イオンの結合により起こる形態変化に関連して、OTf·Ln(III)錯体分子の見かけの半径の減少に係するものと予想される²²⁾。

3.3 OTf·Ln(III) のNおよびC結合部位錯体の生成量と拡散係数の変化

C結合サイト選択性を示す Tb(III)イオンの添加により、生成する OTf·Tb(III)錯体の D 値の変化をより詳細にみると(図1参照)、[Tb(III)]/[OTf]~1.2までは、ほぼ直線的に増加し、これ以降は2.2までは緩やかな曲線を示す傾向が認められた。この二相的な変化の挙動は、添加した Ln(III) と OTf の比に多少の違いはあるが、今回測定したすべての Ln(III) について認められ

Fig. 3 Relationship between the diffusion coefficients of Ln(III) saturated OTf complexes and the ionic radii of Ln(III)

The values of ionic radii of Ln(III) were based on the data of Ref. 22

22) X線小角散乱の結果は、apoOTf; 約 3.2 Å, OTf·Fe₂; 約 3 Å (Ref. 12) と報告されている。Stokes-Einstein の関係式 $d = kT/6\pi\eta_0 D$ (D : 拡散係数, d : Stokes 半径, k : Boltzmann 定数, η_0 : 粘度) から、著者らの実験結果から得られた d は、およそ、apoOTf で (3.5±0.5) Å, OTf·Tb(III)₂ で (3.3±0.3) Å であった。

た。このことは、金属結合にともなう形態の変化が、N, C 結合サイトに対し金属イオンが結合した時に生成する錯体生成量に何らかの関連があるものと予想される。そこで、金属イオンを OTf に添加したときに生成する、NおよびCサイト金属錯体生成量の

割合を, EDTA 引き抜き法⁹⁾¹¹⁾¹⁷⁾によって計算し, D 値の変化と比較した。図4に, 各飽和度における, Nサイト, Cサイト錯体の生成量の割合と D 値の変化の割合を示した。これらの変化を比較するために, それぞれの変化量を1に規格化した。また, 図中の実線と破線は2.4で述べたモデルにしたがって計算されたNサイト, Cサイト錯体の生成量の割合を示している。本実験で使用了試料のNサイト, Cサイト錯体の錯体生成量は, 文献値(2.4参照)とよく一致し, N, C結合サイト間に, 金属結合にともなう協同性は認められないことを確認した。したがって, N, C結合サイトは, 互いに独立に形態変化を起こしていると考えられる。本実験で得られた D 値の変化は, Nサイト錯体の生成量よりもCサイト錯体の生成量により近い挙動を示した。

そこで, Cサイト選択性であるLn(III)イオンの添加による錯体の D 値の変化をより明確にするために, 次節でNサイト選択性を示すCu(II)錯体の錯形成による D 値の変化について述べる。

3.4 Cu(II)・OTf 金属錯体の拡散係数

図5(A)にOTfのCu(II)イオンによる滴定曲線を示した。Ln(III)と同様にOTfの2倍の点で飽和していることが確認された。しかしながら, Cu(II)を結合させた場合の D 値の変化は, Ln(III)の場合と異なり, 図5(B)に示すようにS字様になった。OTf(N)・Cu(II)錯体の場合は逆に, $[Cu(II)]/[OTf] \sim 1.2$ まで緩やかな勾配をもつ上昇曲線を示し, この比以上飽和するまでは大きな値の変化を示した。そして, Cu(II)イオンが飽和した後は一定値を示した。この様にNサイト選択性を示す金属イオンの場合は, Cサイト選択性のものと異なる D 値の変化を示した。このことから, D 値の変化は, N, C結合サイトの金属結合にと

Fig. 5 Absorbance at 440 nm (A) and diffusion coefficient (B) of Cu(II)-OTf complex as a function of the molar ratio of Cu(II) ion to OTf

Conditions: $[OTf]_T = 1.1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (A), $4.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (B) in $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris-HCl buffer containing $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaHCO_3 , pH 8; Temp $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$

Fig. 4 (A) The increment of the D value (●) for the Tb(III)-OTf complex with reference to apoOTf ($\Delta D = (D_{\text{obs}} - D_{\text{apo}})/(D_{\text{sat}} - D_{\text{apo}})$) and (B) N- (ΔR_N) and C-site occupancies (ΔR_C) as a function of the saturation degree (θ) of bound Tb

The solid and dotted lines refer respectively to the calculated N- and C-site occupancies giving by Eq. 6, whereas + and ○ refer to those determined by measuring the time course for the metal release by EDTA; $\Delta R_N = [N]/[N]_{\text{sat}}$, and $\Delta R_C = [C]/[C]_{\text{sat}}$

Fig. 6 (A) The increment of the D value (●) for the OTf(N)-Cu(II) complex with reference to apoOTf ($\Delta D = (D_{\text{obs}} - D_{\text{apo}})/(D_{\text{sat}} - D_{\text{apo}})$) and (B) N- (ΔR_N) and C-site occupancies (ΔR_C) as a function of the saturation degree (θ) of bound Cu under the condition of pH 8

The solid and dotted lines refer to the calculated N- and C-site occupancies giving by Eq. 6, whereas + and ○ refer to those determined by measuring the time course for the metal release by EDTA; $\Delta R_N = [N]/[N]_{\text{sat}}$, and $\Delta R_C = [C]/[C]_{\text{sat}}$

Fig. 7. (A) The increment of the D value (■) for the OTf(C)-Cu(II) complex with reference to apoOTf ($\Delta D = (D_{\text{obs}} - D_{\text{apo}}) / (D_{\text{sat}} - D_{\text{apo}})$) and (B) N-site occupancies (ΔR_N) and C-site occupancies (ΔR_C) as a function of the saturation degree (θ) of bound Cu

OTf(C)-Cu(II) complex was prepared according to Ref. 16

+ and □ refer to the calculated N- and C-site occupancies determined by measuring the time course for the metal release by EDTA; $\Delta R_N = [N] / [N]_{\text{sat}}$, and $\Delta R_C = [C] / [C]_{\text{sat}}$

飽和度における OTf(N)・Cu(II) 金属錯体の D 値の変化を比較すると、C サイト錯体生成量により近い変化をしていることが示された (図 6 参照)。OTf に Cu(II) が結合するときも N, C 金属結合サイト間に協同性が認められないこと⁸⁾を考え合わせると、金属イオンが N サイトに結合した時に起こる N ドメインの形態変化よりも、C サイトに結合した場合に起こる C ドメインの形態変化の方が、より大きいものと推察される。

さらに、この点を明確にするために OTf(C)・Cu(II) 錯体を調製し、その錯体の D 値を測定した (図 7 (A))。まず、調製した OTf(C)・Cu(II) 錯体の、N, C 結合サイト生成量を EDTA による Cu イオンの引き抜き法により決定した (図 7 (B))。明らかに C 結合サイトに、より多く結合していることを確認した。この時の OTf(C)・Cu(II) 錯体の D 値を測定すると、その変化の割合は C サイトの Cu 錯体生成量に、より近い変化をしていることが示された。OTf(C)・Cu(II) と OTf(N)・Ca(II) の D 値を比較してみると、たとえ飽和度 θ が同じでも (例えば図 6 および 7 の $\theta = 0.4$)、C サイト Cu 錯体の生成量が違えば D 値も異なることが示された。このようなことから、 D 値の変化は C サイト錯体の生成とより密接な関係があるということが示唆された。

4 結 語

1) OTf に Fe が結合すると、分子の回転半径が小さくなることが示されていたが¹²⁾¹³⁾、Ln(III)錯体の場合、分子の収縮は、結合する金属のイオン半径に関連すること、また、この分子の収縮と錯体の安定性の間により相関性が認められた。

2) 金属イオンの結合により起こる分子の収縮は、N 結合サイト錯体より C 結合サイト錯体の方が大きいこと、そして OTf の N, C サイト選択性に関係ないことがわかった。

もなり選択性の違いによるものと推測できた。図 4 と同様に、各

Dynamic Light Scattering Study of the Conformational Change of Ovotransferrin Induced by the Binding of Lanthanoid Ions

Noriyuki SASAKI, Hisashi HONDA, Hirofumi YAJIMA, Hiroyuki MOMOMI, Kaoru ICHIMURA, Kazuo SATAKE** and Ryuichi ENDO*

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Science University of Tokyo; Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan

** Department of Chemistry, Faculty of Science, Science University of Tokyo; Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162 Japan

In order to elucidate the predominant factors for the conformational change of chicken ovotransferrin (OTf), which has one metal-binding site in each of amino (N) and carboxyl (C) terminal domains, induced by metal binding, the effects of the coordinated metal ions on the diffusion coefficients (D) of the metal-OTf complexes were investigated by means of dynamic light scattering technique using various lanthanoid (Ln^{3+}) ions with a high affinity for C metal-binding site. The D values of the OTf complexes increased with increasing amounts of bound Ln^{3+} up to $(\text{Ln}^{3+})/(\text{OTf}) (=R) \approx 1.2$, and then gradually changed, leveling off above $R \approx 2$, regardless of the species of Ln^{3+} metals. The behavior of D values with increasing degree of saturation of bound metals was related to that of the C-site complexes compared to the N-site complexes. In addition, the D values of the saturated OTf complexes increased with decreasing ionic radii of Ln^{3+} . These results suggested that the stokes radii

of the OTf complexes appreciably depend on the ionic radii of bound Ln^{3+} and that the contraction of the OTf molecules originates from a predominant metal binding to the C-site compared to the N-site.

~~~~~