



| | |
|--------------|---|
| Title | 常磁性共鳴吸収によるヘム蛋白質の研究 |
| Author(s) | 堀, 洋 |
| Citation | 大阪大学, 1978, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/1758 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

常磁性共鳴吸収による人山蛋白質の研究

1978年 1月

大阪大学 基礎工学部 生物工学科

堀 洋

目 次

八〇-三"

要旨 及び 参考論文リスト

i ~ iv

第一章 ヘムとアホ・蛋白との相互作用

| | |
|--|----|
| 1-1 緒 言 | 1 |
| 1-2 試 料 | |
| 1-2-1 プロトヘム及びその誘導体 | 3 |
| 1-2-2 ミオグロビンの結晶化 | 4 |
| 1-3 測定装置 | 5 |
| 1-4 単結晶中のヘム方位の解析法 | |
| 1-4-1 Fe^{3+} 高スピノンの場合 | 7 |
| 1-4-2 Fe^{3+} 低スピノンの場合 | 10 |
| 1-5 実験結果 | |
| 1-5-1 ミオグロビン(Fe^{3+})のヘム方位—配位子の影響— | 15 |
| 1-5-2 ミオグロビン(Fe^{3+})のヘム方位—ヘム側鎖の影響— | |
| A) 2,4位のヴィニル基の影響 | 19 |
| B) 6,7位のジヒドロピリオニン酸基の影響 | 24 |
| 1-6 考 察 | |
| 1-6-1 配位子のヘム面に対する影響 | 27 |
| 1-6-2 ヘム側鎖の影響 | |
| A) ポルフィリン環の2,4側鎖のヴィニル基の影響 | 30 |
| B) ポルフィリン環の6,7側鎖のジヒドロピリオニン酸基の影響 | 32 |

第二章 ヘモグロビン(Hb)の四次構造とヘムの電子状態 (一酸化窒素-Hb の場合)

| | |
|---------|----|
| 2-1 緒 言 | 36 |
| 2-2 試 料 | |

| | | |
|-------|--|----|
| 2-2-1 | 種々の一酸化窒素-Hb (NO-Hb) | 38 |
| 2-2-2 | -酸化窒素ヘム (NO-ヘム) 化合物 | 39 |
| 2-3 | 測定装置 | 40 |
| 2-4 | 結果 及び 考察 | |
| 2-4-1 | 単離鎖 (α^{NO} , β^{NO}) の EPR | 41 |
| 2-4-2 | 種々の一酸化窒素ヘムリッド-Hb の EPR | 42 |
| 2-4-3 | 種々の一酸化窒素ヘムリッド-Hb の 光解離 | 44 |
| 2-4-4 | 5 配位一酸化窒素ヘムモデリル物質の 光解離 | 47 |

第三章 ヘモグロビン (Hb) の四次構造とヘムの電子状態 (酸化型-Hb の場合)

| | | |
|-------|--|----|
| 3-1 | 緒言 | 50 |
| 3-2 | バレンシーアヘムリッド-Hb の EPR | |
| 3-2-1 | 酸素平衡曲線の結果 | 51 |
| 3-2-2 | T状態の Fe^{3+} ・高スピノの EPR スペクトル | 52 |
| 3-3 | 異常 Hb M の EPR | 55 |
| 3-3-1 | Hb M _{Milwaukee-1} (11E ($\beta 67$) Val. \rightarrow Glu.) | 57 |
| 3-3-2 | Hb M _{Boston} (7E ($\alpha 58$) His. \rightarrow Tyr.) | 61 |
| 3-4 | 結語 | |

第四章 還元型・デオキシ・ヘモグロビン (Fe^{2+} 高スピノ) のヘムの電子状態

| | | |
|-------|---------------------------|----|
| 4-1 | 緒言 | 65 |
| 4-2 | ヒト・デオキシHb 単結晶 のトルク測定 | |
| 4-2-1 | ヒト・デオキシHb 単結晶 | 67 |
| 4-2-2 | トルク測定 の一般原理 | 68 |
| 4-2-3 | ヒト・デオキシ-Hb 単結晶 のトルク測定の解析法 | 69 |
| A) | 高温 近似 | 70 |
| B) | 極低温 の解析 | 72 |

| | |
|--|----|
| 4-3 ヒトデオキシHb 単結晶 のトルク測定結果 及び考察 | 74 |
| 4-4 ヒト・デオキシHb(Fe^{2+} : 高スピン) の EPR 測定 | |
| 4-4-1 高温部での測定 | 79 |
| 4-4-2 極低温での測定 | 80 |
| 4-5 ヒトデオキシHb による Fe^{2+} -高スピンヘムモデル化合物の遠赤外測定 | |
| 4-5-1 ヒト・デオキシHb の遠赤外測定 | 82 |
| 4-5-2 ピケット・フェンス・ヘムの合成 | 83 |
| 4-6 結 語 | |
| 言 著 | 87 |
| 参考文献 | 88 |

<要旨>

脊椎動物の赤血球中にあって、酸素分子を肺から諸組織に運搬するヘモグロビンや、筋肉中にあって、酸素分子の貯蔵におけるミオグロビン等のヘム蛋白質の活性中心の鉄の電子状態の変化が、ヘム蛋白質の機能にはたして何の役割を知るために、ポルフィリン環の側鎖や、蛋白質の構造あるいは配位子等の変化が、活性中心の鉄の電子状態にどのように影響しているのかを、常磁性共鳴吸収という磁気的測定法を使って研究した。

第一章では、ミオグロビンの様な単量体(モノマー)の蛋白質の中で、ヘムがどうかアポ蛋白と相互作用をしているかを論じた。ミオグロビンのヘムに種々の配位子を配位させた単結晶を作り、各々について、ヘム面方位及び β -テンソルの主値の方位を決定した。この結果、ミオグロビンのヘムは蛋白質の中で、必ず一定の向きにしか入れない様に立体構造的に制限されている事、即ち、ポルフィリン環の側鎖と周囲のアミノ酸残基との間の種々の化学結合により、ヘムが一定の方向性でアポ蛋白と結合している事、又、配位子の配位している方向等の複雑な要因が重要な事で、ヘム面の異方性(β -テンソル主値の方向)が決められているのであり、単純に、第5配位子のヒスチジンの向きによって支配されているのではない事を示した。

更に、ヘムの側鎖がヘム方位、ヘムの電子状態などとの様に影響しているかを調べる為に、ポルフィリン環の2,4側鎖のヴィニル基を化学修飾したヘム、あるいは、6,7側鎖のプロピオン酸基を化学修飾した場合のミオグロビン単結晶中のヘム面の動きを調べた。この結果、2,4側鎖のヴィニル基を化学修飾しても、ヘム面の変動がみられないが、6,7側鎖のプロピオン酸基を化学修飾した場合、ヘム面の変動が生じ、ヘムの電子状態の変動がみられた。このことは、6,7側鎖のプロピオン酸基のカルボキシル基はアポ蛋白中でヘムの安定化に極めて重要な役目をはたして

いふことを示すものである。

第二、三章では、ヘモグロビン分子の様に、サブユニット間の相互作用で分子全体のコンホーメーションが変化する場合、配位子の結合により、1つのサブユニットはおいた変化が、どのようにして他のサブユニットのヘムの電子状態の変化としてとらえられるかを常磁性共鳴測定を中心的に論じた。

先づ、第二章では、一酸化窒素(NO)ヘモグロビンの $\lambda=2^{\circ}\text{K}$ における常磁性共鳴及び、近赤外領域におけるNOの光解離実験より、NOヘモグロビンへのヘムの電子状態と、ヘモグロビンの四次構造との関係を論じた。

種々のNO-ヘモグロビンの常磁性共鳴の測定より、デオキシ型の四次構造(T状態)をとるNO-ヘモグロビンの大鎖のNO-ヘムは5配位構造をとり、NOのNの核スピルによると、3本の特徴的な超微細構造を示した。オキシ型の四次構造(R状態)をとるNO-ヘモグロビンでは、6配位構造をとり、3本の超微細構造は示さず、 $g=1.981$ に谷のあるスペクトルを示すことが判った。又、 $\lambda=2^{\circ}\text{K}$ において、NO-ヘモグロビンの配位子のNOが光照射によってヘムから解離し、 $\lambda=2^{\circ}\text{K}$ に保つ限り、いつまでも再結合をしない事が知られてるので、常磁性共鳴及び近赤外の低温スペクトルがNOの光解離に伴って、どの様な変化をするか、それが又、R \rightleftharpoons Tの四次構造の平衡と、どの様な関係があるかを調べた。この結果、ヘモグロビンの四次構造がT状態をとると、近赤外領域での吸収スペクトルに、光照射により、774, 790, 820 nmに特徴的なピークがあらわれ、常磁性共鳴での3本のすどい超微細構造をもつNO-ヘモグロビンとの対応関係が明らかとなった。

同様の光解離実験をNO-ヘムモデル物質で行った。3% SDS中のNO-ヘムの常磁性共鳴では、光照射した時のみNOが解離し、光照射を止めると再結合が起り、元のスペクトルに戻る=と見えた。この事は、蛋白部分が、ヘムから解離したNOをトラップする重要な役割をしていふ事を示唆するものである。

第三章では、ヘム間相互作用のメカニズムを電子状態のレベル

て”理解する為に、酸化型(Fe^{3+})高スピノの常磁性共鳴に着目して、酸化型ヘモグロビン及びバレンシーハイドロキドヘモグロビンの常磁性共鳴スペクトルが、アロステリックエフェクターであるIHP(イノシトール6リン酸)の存在下で、酸素化に伴い、どの様な変化をするのかを調べた。

その結果、バレンシーハイドロキドヘモグロビンの常磁性共鳴には、IHP存在下で、Hillのn値が大きいものは、還元鎖をオキシ化あるいはデオキシ化する事により $R \rightleftharpoons T$ の四次構造の変化がひまわりされ、酸化鎖(Fe^{3+})の常磁性共鳴が変化した。即ち、ヘモグロビンの構造がT状態をとるとき、常磁性共鳴スペクトルは $\gamma=6$ 附近に、通常の Fe^{3+} の $\gamma=6$ の常磁性共鳴スペクトルの他に、ブロードをシグナルを示した。又、R構造であるヘモグロビン($\alpha_2^{3+} \beta_2^{3+}$)にIHPを加えると $\gamma=6$ 附近に、T状態に特有な肩のあるシグナルを示した。これは、「酸化型ヘモグロビンにIHPを加えるとT状態の四次構造をとる」とするPerutzの説を常磁性共鳴から支持したものである。

天然のバレンシーハイドロキドヘモグロビンである異常ヘモグロビンMについては、バレンシーハイドロキドヘモグロビンの様にHillのn値との関係をつける事は出来なかった。

しかし、今までM_{Hyde park}以外は、正常鎖の変化が異常鎖の常磁性共鳴に変化を与えないと考えられていたが、その他の異常ヘモグロビンMについて、種々の条件下で精密な常磁性共鳴の測定を行った結果、意味のある変化を見出した。

このスペクトル変化の原因については、推測の域を出ていないが、直接ヘムに配位している配位子の動きと、蛋白の構造変化とを結びつけて議論した。

最後の第四章では、デオキシヘモグロビン(Fe^{2+} 、高スピノ)の常磁性共鳴の可能性を追究した。この為に、デオキシヘモグロビン単結晶のトルク精密測定をやり直し、 $\eta_s = 2.0$ という仮定をあかなくても零磁場分離Dが求まる事を示した。この結果、Dは5cm⁻¹前後である事を確認した。そこで、超伝導磁石を使用した高磁場での常磁性共鳴あるいはサブミリ波の遠赤外の吸収等の測定を行ったが、共鳴吸収の観測には成功しなかった。

参考論文リスト

第一章

- Haem-plane orientation in single crystal of Bonito cytochrome C
H.Hori and H.Morimoto
Biochimica et Biophysica Acta, Vol.200, 581-583 (1970)
- Analysis of the principal g-tensors in single crystals of ferrimyoglobin complexes
H.Hori
Biochimica et Biophysica Acta, Vol.251, 227-235 (1971)
- The haem-plane orientation in single crystals of the meso- and deutero-myoglobins
H.Hori
Biochimica et Biophysica Acta, Vol.278, 399-403 (1972)
- Optical and magnetic measurements of horseradish peroxidase III. Electron paramagnetic resonance studies at liquid-hydrogen and -helium temperatures
M.Tamura and H.Hori
Biochimica et Biophysica Acta, Vol.284, 20-29 (1972)

第二章

- The Effect of Quaternary Structure on the State of the α and β Subunits within Nitrosil Haemoglobin:
Low Temperature Photodissociation and ESR Spectra
K.Nagai, H.Hori, S.Yoshida, H.Sakamoto and H.Morimoto
Biochimica et Biophysica Acta, (受理、印刷中)

第三章

- The Effect of the Quaternary Structure on the Electron Paramagnetic Resonance Spectrum of Ferric Haemoglobin
K.Nagai and H.Hori (投稿準備中)

第四章

- Picket fence モデル
堀 洋 生物物理, Vol.17 No.3, 55-59 (1977)
ヒト・デオキシ・ヘモグロビン単結晶のトルク解析結果は未発表

第一章 ヘムとアポ蛋白との相互作用

1-1 緒言

脊椎動物の赤血球中にあって、酸素分子を肺から諸組織に運搬するヘモグロビン(Hbと略記)、筋肉中にあって、酸素分子の貯蔵にあたるミオグロビン(Mbと略記)等のヘム蛋白質の活性中心は、補欠分子族によばれるヘムである。

ヘムは 図-1 に示す様に、ポルフィリン環の中央に Fe 原子がはまり込んだ構造をしている。(図-1 は プロトヘムを示す)

ヘムの鉄は、その 3d 電子の示す磁性、その他の性質の為に、物理化学的方法で詳しい研究を進める事が出来る。

Hbを中心とするヘム蛋白質の研究は、Hbが酸素分子といかなる機構によつて結合、解離するかを知る事を目的としてきたが、その

研究の為に、「鉄の電子状態の研究」が、いか

なる役割をはたしてゐるのである。それは、鉄の電子状態を知る為には、磁気的手段が最も有効な手段である。それは、この鉄が、ポルフィリンと光吸收のつよい π電子系にはまってゐるために、d電子の光吸收スペクトルをみる事ができないことも大きな理由のひとつになつてゐる。磁気的方法としては、常磁性共鳴吸収、メスバウア効果、磁化率 χ_m 、その異方性の測定等である。

この様な磁気測定から、活性中心にある鉄イオンの基底状態付近のエネルギー準位の微細構造を詳細に決定できる。単純エネルギー準位を詳細に決定するだけでは、それは、錯体化学、物性物理の域を出ない。我々の知りたいのは、エネルギー準位はもろんのことではあるが、活性中心の電子状態の変化がヘム蛋白質の機能にはたしてどの役割は何かという事である。これを知るためには、ポルフィリンの側鎖や蛋白質の構造、あるいは、配位子等が活性中心の鉄の電子状態に、どのように結び

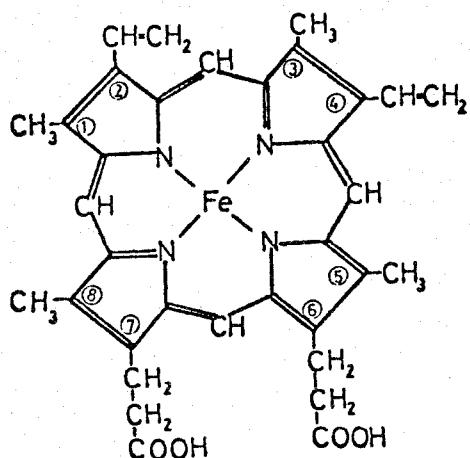


図-1 プロトヘム

つて いるのかを明らかにしなければ"ならぬ。

本論文では、磁気測定、特に、常磁性共鳴吸収(EPRと略記する)という手段によって得られたある種の情報と、他の物理化学的測定結果とを対比させることによって、ヘム蛋白質の構造及び機能と、活性中心の鉄の電子状態の関連を推論しようとするものである。

ヘム蛋白質のヘムは還元型(Fe^{2+})にも、酸化型(Fe^{3+})にもなり得る。HbやMbは生理的条件下では、還元型であるが、それらを体外に取り出して、容易に酸化型にする事が出来る。

さて、 Fe^{3+} は3d軌道に5個の電子を持つ $3d^5$ の配置をとり、この全スピン量子数Sは $\frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \frac{5}{2}$ の3種類が可能である。酸化型Mb(鉄は3価の状態で水分子が配位している)や、酸化型Hbのように、 Fe^{3+} と配位子がイオン的に結合してある場合は、 $S=\frac{5}{2}$ のもの(これを高スピン型といふ)が基底状態になる。配位子がアザイド N_3^- のような場合、 N_3^- と Fe^{3+} が共有結合的になり、フントの規則が破れて、 $S=\frac{1}{2}$ のもの(これを低スピン型といふ)が基底状態になる。

一方、MbやHbが酸素分子を吸着したり、解離したりする活性は Fe^{2+} の状態のときにのみみられるものである。 Fe^{2+} では3d軌道に6個の電子を持つ $3d^6$ の配置をとり、この全スピン量子数Sは0, 1, 2の3種類が可能である。酸素分子の結合してある状態は $S=0$ となり、酸素分子の結合していない状態(これをデオキシMb、デオキシHbといふ)では $S=2$ が安定になる。 Fe^{3+} の場合と同様に、 $S=0$ の場合を低スピン型、 $S=2$ の場合を高スピン型といふ。 $S=0$ 以外の鉄は磁気モーメントを持ち、ほぼキューリーの法則に従う常磁性を示す。

さて、Mbの分子構造はKendrew⁽¹⁾の1.4Å高分解能X線結晶解析によて、明らかにされており、それはよくMb分子は1本のポリペプチド鎖より成り、そのペプチド鎖は153個のアミノ酸残基から成っている。ペプチド鎖の約3/4程度は、 α -ヘリックスを作っている。ヘリックス部分は連続しているのではなく、一つのヘリックス部分が終るとランダムコイルで曲り、次に又、ヘリックス部分が続くという事が繰り返されて、全体としてはよく螺旋構造を作っている。ヘリックス部分には、ポリペプチド鎖の

N末端から順に、AからHまでの記号がつけてある。そして、蛋白中のアミノ酸残基の位置の表わし方として、例えば、8F(93) His. とは、ホリペプチド鎖のN末端より数えて、93番目のアミノ酸残基を表わし、Fヘルリックスの第8番目に位置している His. (ヒスチジン) であることを示している。これらのペプチド鎖に囲まれたところにおいて、プロトヘムがある。

F-ヘルリックス部分の第8番目の残基：8F(93) はヒスチジン(His.)である。このヒスチジンのイミダゾール基がヘムの鉄と配位結合している。

ヘムは主として、非極性基によって囲まれており、ヘムの側鎖はまわりのアミノ酸残基とファンデルワールス接触をしている。したがって、Mb中のヘムは必ず一定の方向性を持っていてしか安定に入れないようだ。立体構造的に制限されていると推定される。

それでは、ヘムとアポ蛋白(MbやHb等のヘム蛋白質からヘムを除いたものという)との結合はどうのように安定化されているのであろうか。

ヘムの鉄に配位している配位子、ヘム側鎖とアミノ酸残基との間のファンデルワールス接触、ヘム側鎖のコロピオン酸基のつくる塩結合等の役割は何であるか。本章では、常磁性共鳴吸収(EPR)を測定手段として、Mb単結晶中のヘム面方位、ヘム面の異方性の方向が配位子の種類や、ヘムの側鎖を変える事によって、どうに影響されるか調べ、上記観点よりヘムとMbのアポ蛋白との相互作用について論ずる。

1-2 試料

1-2-1 プロトヘム及びその誘導体

Mbのヘムはプロトヘムと呼ばれる。ヘム蛋白質にも、よくみられるヘムである。後述するHbのヘムもプロトヘムである。ヘムは化学的処理によって、蛋白質の本体から取り外すことも、又、ヘムの抜けたHbやMbに再びヘムを入れることもできる。

ヘム面に垂直な方向は、片側に蛋白質を構成しているアミノ酸の一つであるヒスチジン(His.：これをproximal Hisあるいは近位ヒスチジンといふ)

のイミダゾールの窒素(N)が配位している。

反対側は、生体内ではO₂が配位する。

図-2のXで示した箇所である。

Fe³⁺の状態では、XはH₂O, F⁻, OCN⁻, N₃⁻, CN⁻等の低分子やイオンである。Xの更に上方に、アミノ酸のもう1つのヒスチジン(distal His.あるいは遠位ヒスチジンといふ)のイミダゾールがあり。

プロトヘムは複雑におりたたまれたアミノ酸鎖の中に組み込まれている。

プロトヘムの特徴は、図-1に示したように2,4側鎖にヴィニル基(-CH=CH₂)を持っていふことであるが、このヴィニル基の2重結合を各々2個の水素原子で飽和させて-CH₂-CH₃としたヘムをメツヘムと云う。

Mbのプロトヘムをニのメツヘムで置き換えたものを再構成メツMb(R-メツ-Mbと略記する。特に断わらぬ限り、R-Mbとは再構成Mbを示し、N-Mbは天然のMbであることを示す)と云う。

更に、2,4側鎖の-CH=CH₂全体を水素原子で置き換えたものをデュテロヘムと称し、Mbのプロトヘムをニのヘムで置き換えたものを再構成デュテロMb(R-デュテロ-Mbと略記)と云う。

又、6,7側鎖のフロピオニ酸基(-CH₂-CH₂-COOH)をエステル化した(-CH₂-CH₂-COOCH₃)ヘムをプロトヘム・ジメチルエステルと称し、Mbのプロトヘムをニのヘムで置き換えたものを再構成プロト・ジメチルエステルMb(R-ジエステル-Mbと略記)と云う。

1-2-2 ミオグロビンの結晶化

本研究で扱うMbはマウスの赤肉からKendrew⁽²⁾の方法を基礎にして抽出、精製されたものである。精製された酸化型Mb(Fe³⁺)は約80%飽和硫安(pH~6.1調製)中で容易に結晶化される。

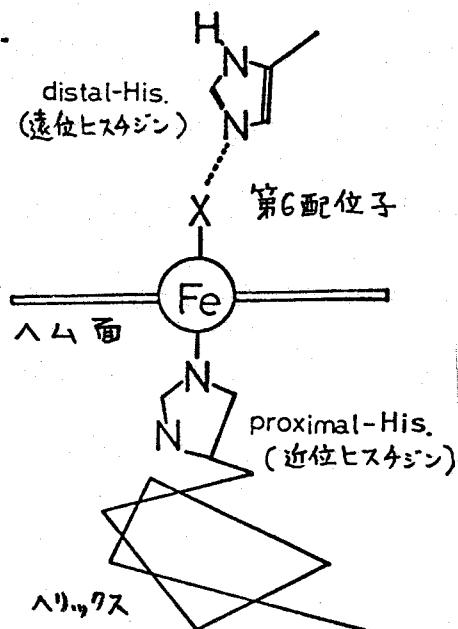


図-2 ヘムの上下の配位子

これらの結晶はタブ^o-A と呼ばれる。Kendrew さんが X 線結晶解析で使用したものと同じタブ^oの結晶である。

この結晶は、单斜晶系に属し、 $a = 64.6 \text{ \AA}$, $b = 31.1 \text{ \AA}$, $c = 38.8 \text{ \AA}$, $\beta = 105.5^\circ$ である⁽³⁾。単位胞中には 2 個の分子が含まれる。その空間群は P_{2_1} と表わされる。

硫安溶液から析出した結晶は、ab 面がよく成長するから、 a , b , c^* 軸 (ab 面に垂直な軸を c^* 軸にとる) は容易に肉眼で決定できる。

メト-Mb は单結晶のままで、種々の誘導体を作成することが出来る。結晶母液に結晶を入れ、各 KCN , NaN_3 , イミダゾール (Im. と略記), $NaOCN$ 及び NaF を、Mb がこれらのイオンで充分飽和する程度に入れて、約 1 日放置すると、各々 $Mb(Fe^{3+})CN^-$, $Mb(Fe^{3+})\cdot N_3^-$, $Mb(Fe^{3+}) \cdot Im$, $Mb(Fe^{3+})OCN^-$ 及び $Mb(Fe^{3+})F^-$ の单結晶が出来る。

次に、再構成 Mb であるが、プロトヘンは化学的処理によって蛋白質本体 (アホ^o蛋白) から容易に取り外したり、再び化学的に結合させることが出来る。

本研究で扱うアホ^o-Mb は Teale⁽⁴⁾ のいわゆる酸性条件下におけるメチル・エチル・ケトン法 (MEK 法) で精製したものである。アホ^o-Mb は、プロトヘン、メソ^oヘン、テ^o-プロトヘン、プロトヘン-ジメチルエチルと各々、化学量論的に結合し、各々、再構成 Mb となる。これらの再構成 Mb は再構成しない、N-プロト-Mb の結晶化と全く同じ条件で結晶化せら事が出来た。R-プロト-Mb, R-メソ^o-Mb 及び R-テ^o-プロト-Mb の单結晶は面角の測定より全てタブ^o-A の单結晶であった。

しかし、R-ジエステル-Mb の单結晶はタブ^o-A とは異なる結晶系を示した。X 線の解析によると、斜方晶系に属し、 $a = 60.46 \text{ \AA}$, $b = 77.09 \text{ \AA}$, $c = 33.64 \text{ \AA}$ であった。⁽⁵⁾

1-3 測定装置

測定は日本電子製 JES-3BX 型及び ME-2X 型 ESR 分光器を使用した。使用周波数は X バンド ($\sim 9 \text{ GHz}$) で、磁場変調は 100 kHz 変調を用いた。

磁場の精密測定には水のプロトンの核磁気共鳴(NMR)を使用した。

NMR の測定周波数を ν^H MHz とすれば、磁場 H(ガウス)は

$$H \text{ (ガウス)} = 234.87 \times \nu^H \text{ (MHz)}$$

で与えられる。

測定温度は主として液体水素温度(20°K)で行った。

単結晶は石英製の試料ホルダーにのせて、液体水素の入ったデューワービンに挿入する。

デューワービンは更にEPRの試料空洞共振器に挿入される。

単結晶をとりつけた試料ホルダーは、図-3に示す。試料ホルター軸のまわりに手でまわして、 γ 値の角度変化を測定する。

測定は 10° 間隔で行った。

試料ホルター上の結晶の軸方向は、肉眼で決定した。特に、 $\Delta\mu$ 面内の異方性等の測定の場合は、図中のⅢに示した様な、テフロン製の2軸回転軸のある試料ホルターを使用した。

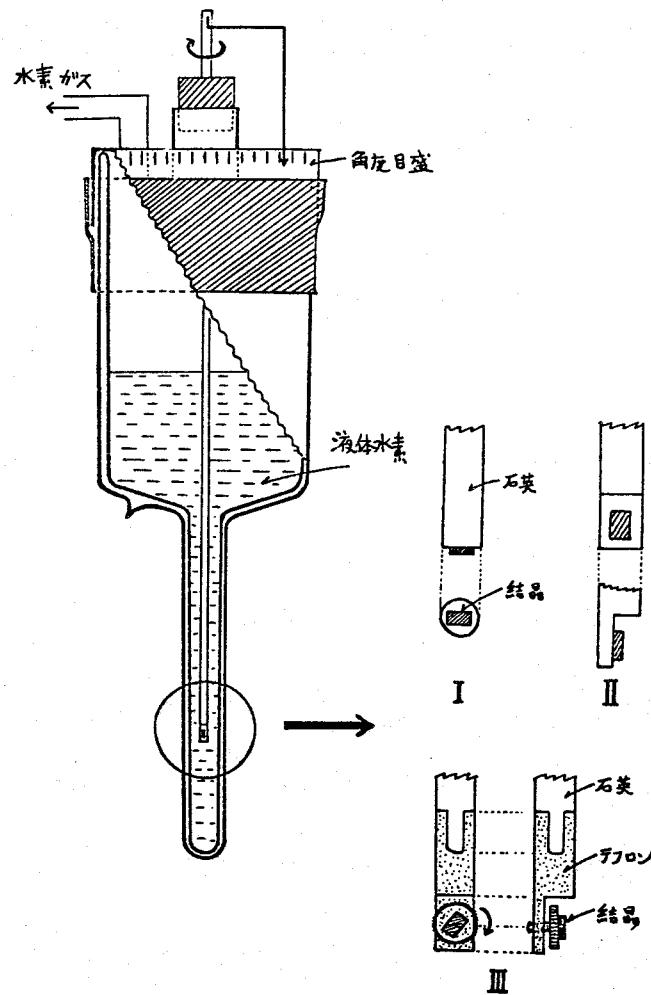


図-3 単結晶用 デューウー

及べ 単結晶支持台

1-4 単結晶中のへ4方位の解析法

1-4-1 Fe^{3+} ・高スピノンの場合

Fe^{3+} 高スピノンのEPRについて 言論する。

自由空間では Fe^{3+} の基底状態は 6S である ($S = 5/2$, $L = 0$)。

即ち、3Dの5個の軌道に1つずつ電子が入っており、軌道的には縮退がない。スピノンの向きによって、6重項状態になっている。鉄がポルフィリンに入ると、配位子場により、基底状態は D_4 の既約表現から。

6A_1 と表わされる。 6A_1 のスピノン6重項は、磁場を加えなくても、へ4の低い対称性の為に3個のクラマース2重項に分離している。

基底状態のエネルギー準位の分裂はスピノンハミルトニアン：

$$\mathcal{H} = D [S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1)] + E(S_x^2 - S_y^2) + \beta \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} \quad (1)$$

で書き表わされる。

ここで、 S_x , S_y , S_z は合成されたスピノンのx, y, z 成分を表わし、Dはへ4面に垂直な方向の異方性の強さ、Eはへ4面内の異方性の強さ(対称性の低さ)を示すパラメーターである。

ところで、6重項の基底状態 6A_1 は空間的な対称性が良いので、 6A_1 状態だけでは、スピノン・軌道相互作用を考えても、 6A_1 を分裂させる事が出来ない。しかし、4重項の励起状態(4T_1)は対称性が下ると、 4E , $^4A'_2$ に分裂し、スピノン・軌道相互作用によって、基底状態の 6A_1 は少し混ってきている。その混り方が、 $S_z = \pm \frac{1}{2}, \pm \frac{3}{2}, \pm \frac{5}{2}$ によって異なっていふ為、 6A_1 が3つのスピノン2重項(クラマース2重項)に分裂する事になる。

(図-4)

6A_1 から測った 4T_1 の3つの分裂

した準位(E_x , E_y , $^4A'_2$)への

励起エネルギーを ΔE_x , ΔE_y , ΔE_z

とする計算の結果

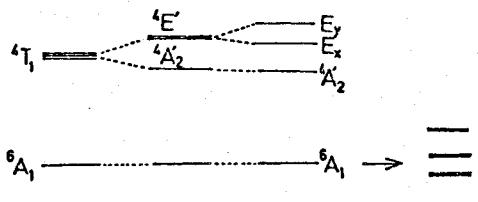


図-4 6A_1 の分裂

$$D = \frac{\alpha^2}{10} \left(\frac{2}{\Delta E_z} - \frac{1}{\Delta E_x} - \frac{1}{\Delta E_y} \right) \quad (2)$$

$$E = \frac{\alpha^2}{10} \left(\frac{1}{\Delta E_x} - \frac{1}{\Delta E_y} \right)$$

と書ける事が知られている。ここで α は スピン・軌道相互作用定数である。

当然の事ながら、配位子場が“正方対称場ならば”、Z 軸（八面に垂直）を主軸方向にとるところにより、 $\Delta E_x = \Delta E_y$ となり、 $E = 0$ を得る。もちろん、配位子場が立方対称場ならば、 $4T_1$ の分裂はないので、 $\Delta E_x = \Delta E_y = \Delta E_z$ となり、 $D = 0$ 、 $E = 0$ で 6A_1 の分裂は生じない。八面の鉄において、 6A_1 の分裂が異常に大きい原因は $4T_1$ あるいはそれが分裂した低い成分の励起エネルギーが大変低いところに基づいていると考えられていく。

さて、D が大きいとき、磁場を加えると、これら 3 つの二重項の縮退が解けて、 $| \Delta S_z | = 1$ の遷移、即ち、一番最低の二重項 ($S_z = \pm \frac{1}{2}$) の分裂による EPR が観測される。

通常使用される電磁石による磁場を $\sim 10^4$ ガウスとすれば、ゼーマン分裂は $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ であり、 $\sim 30 \text{ mm}$ のミリ波（マイクロ波）を使って、EPR を観測する事が可能である。

Ingram らは⁽⁶⁾、 Fe^{3+} -高スピノンの八面蛋白質を使って、最低の二重項 $S_z = \pm \frac{1}{2}$ のゼーマン分裂による EPR を観測し、 $g_{\parallel} = 2$ （八面に垂直方向に磁場をかけた場合の g 値）、 $g_{\perp} = 6$ （八面内に磁場をかけた場合の g 値）を得た。EPR では、 g 値でモードミクナムの特徴を示す。 g 値とは $h\nu = g\beta H$ より定義される。ここで h は プランク定数、 β はボーア磁子、 ν は 使用マイクロ波周波数、 H は 共鳴磁場である。スピノンハミルトニアン (1) 式を使って

$$g_{\perp} \left\{ \begin{array}{l} g_x = 6 + 24 \frac{E}{D} + O(\frac{1}{D^2}) \\ g_y = 6 - 24 \frac{E}{D} + O(\frac{1}{D^2}) \end{array} \right. \quad (3)$$

$$g_{\parallel} = g_z = 2 + O(\frac{1}{D^2}) \quad \text{を得る。}$$

EPRの測定結果が、ある種のヘム蛋白質を例外として、
 $g_{\perp} \approx 6$, $g_{\parallel} = 2$ であるから、E/Dは非常に小さな値である
 事が予測される。

Dの値は、種々のヘム蛋白質、ヘムモデル物質について、磁化率
 遠赤外⁽⁹⁾、メスバウ-効果⁽¹⁰⁾等の測定によつて決定されてゐる。
 それによると、Dの値はほぼ 10 cm^{-1} 前後の範囲内にある。

さて、EPRでは、Dの値が大きいので、直接Dの値を決定
 する事は出来ない（決定できるのは、E/Dである）。

多くの場合、 $D \gg E$ であるので、外部磁場を加えない零磁場
 分離をみる限りでは、エネルギー分裂は DS_z^2 で表わされる。
 分裂の状態を図-5に示す。

ここで、スピンハミルト=アン(1)

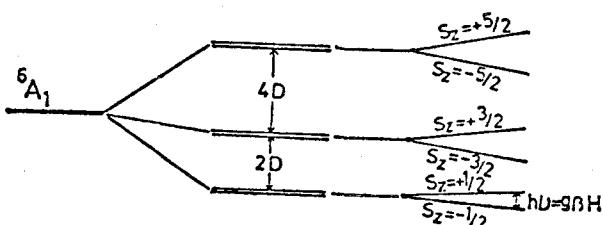
とおいて、 $E = 0$, $D \gg 2\beta S \cdot H$

とおいて、 $S = 5/2$, $S_z = \pm 1/2$ と

併せば、

$$\hbar\nu = 2\beta \sqrt{H_z^2 + 3^2(H_x^2 + H_y^2)}$$

高スピン状態 ($S = 5/2$)



の関係を得る。

図-5 零磁場分離

磁場をZ軸（ヘム面に垂直な

方向）に平行にかけると、 $g_{\parallel} = 2$ となり。X又はY軸（ヘム面
 内に平行）に平行にかけると、 $g_{\perp} = 6$ を得る。

$$g_{\parallel} = 2.0$$

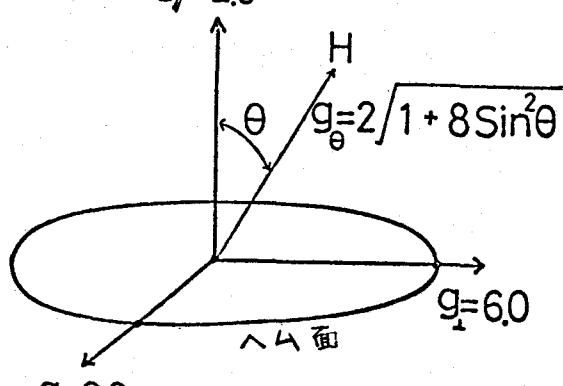


図-6 g-値

図-6 にヘムのg値のとり方を示す。ここで示すg値とは前述した様に、「見掛けのg値」で $\hbar\nu/\beta H$ で定義されるものである。

ヘム法線(g_{\perp} の方向)とθの角度をなす方向に磁場をかける。

g値は

$$g_{\theta}^2 = g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta \quad (4)$$

で与えられる。

今、 $g_{\parallel} = 2.0$, $g_{\perp} = 6.0$ より 上式は.

$$g_0 = 2 \sqrt{1 + 8 \sin^2 \theta} \quad (5)$$

となる。

したがって、単結晶の a 軸, b 軸, c^* 軸 方向に磁場をかけて、 g_a , g_b 及び g_{c^*} を求めれば、結晶軸 a , b , c^* 軸と八方電線のなす角度 θ が計算される。

Ingram ⁽⁶⁾ は、この方法を用いて酸化型 Mb, Hb の単結晶中の八方位を決定した。我々も、 Fe^{3+} ・高スピノンの八方位決定にはこの方法を使用した。

1-4-2 Fe^{3+} ・低スピノンの場合。

Fe^{3+} ・低スピノンの電子状態について論じる。

Fe^{3+} ・低スピノンの場合、基底状態は立方対称場では、 $2T_2$ で表わされる。即ち、強い結晶場に由る、2重縮重の e_g 軌道と、3重縮重 t_{2g} 軌道の分裂が、スピノンの対化エネルギーより大きくなるので、5個の 3d 電子は e_g 軌道に入らず、全て t_{2g} 軌道に入る。したがって、電子状態は t_{2g}^5 となる。即ち、 t_{2g} 軌道は、6個の電子で完全に閉殻となり、 e_g 軌道の影響を無視すれば、近似的に 1個の空孔が、 t_{2g} 軌道にあると考えればよい。即ち、 t_{2g}^5 の 5 電子とこの計算は、3d¹ の空孔の計算で置きかえる事が出来る。

Gibson ⁽¹¹⁾, Kotani ⁽¹²⁾ は、酸化型 HbN₃⁻ の g-テンソルの解析より（主値： $g_{xx} = 1.72$, $g_{yy} = 2.22$, $g_{zz} = 2.80$ ）。 t_{2g} 軌道 (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} 軌道) のエクスギー準位を計算してある。同様の計算が、Salmeen ⁽¹³⁾ による、ウシ心筋 4トコ-4C (Cyt.C. (Fe^{3+}) と略記) と、Hori ⁽¹⁴⁾ による、カツオ心筋 Cyt.C (Fe^{3+}) におけるも計算されている。

t_{2g} の閉殻に対して、1個の空孔が d_{xy} , d_{yz} , d_{xz} のいずれにあらかじめあるかによって、3通りの場合が生じ、各々のスピノンを考えて、

3つの又重項状態を作り、ゼーマン分離をさせれば、EPRが可能になる。これは、磁場がどの方向にあっても、 $\bar{m}_s = 2$ となるはずであるが、実際、 $l=1$ は、 g 値はかなりえどりずれて、かつ異方性を示している。

これは、スピン軌道相互作用

$l=1, 2, 3$ の又重項状態が、混り合って軌道的には、

一重であるが、スピン又重項をもつ、新しい3つの軌道

(d_{xy}, d_{xz}, d_{yz}) $l=1$ なると
(て説明される。したがって、
最低状態のクラマース = 重項
のスピン・軌道関数は、

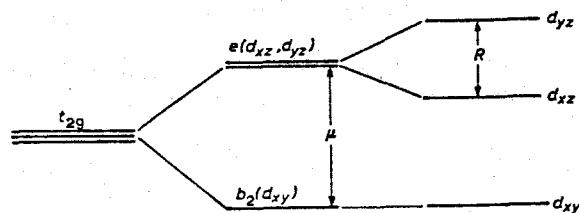


図-7 t_{2g} 軌道のエネルギー準位

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu : \text{軸対称のゆがみ} \\ R : \text{斜方向(面内)のゆがみ} \end{array} \right.$$

(1 空孔の計算では、準位が逆転する。)

$$\left\{ \begin{array}{l} \Psi^+ = A d_{yz}^+ + i B d_{xz}^+ + C d_{xy}^- \\ \Psi^- = -A d_{yz}^- + i B d_{xz}^- + C d_{xy}^+ \end{array} \right. \quad \text{となり。}$$

これより得られる g -テンソル主値は、

$$\left. \begin{array}{l} g_x = 2 |(B+C)^2 - A^2| \\ g_y = 2 |(A-C)^2 - B^2| \\ g_z = 2 |(A-B)^2 - C^2| \end{array} \right\} \quad (6)$$

で与えられる。但し、 $A^2 + B^2 + C^2 = 1$ である。

Harris Loew⁽¹⁵⁾ は、種々のへム蛋白質の低スピノン (Fe^{3+}) の g 値を解析して、 Fe^{3+} 低スピノンへム蛋白質を 5 つの型に分類している。

さて、 x, y 軸は、へム面内に、 z 軸はへム面に垂直な方向であると仮定し、これらの軸が、結晶軸 a, b, c^* 軸と、いかなる

角度をなしているかを計算する。⁽¹⁶⁾

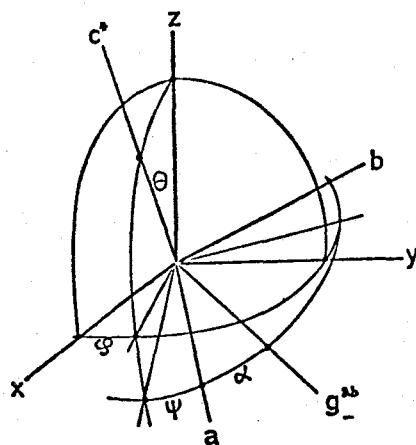
Mb 単結晶は、X線の結果より、単位胞中に2個の分子を含んでおり、2個の八面体は、結晶内で異った方向を向いている。そこで、2個の八面体のうち、1つに (x, y, z) 直交座標系を設定する。 x, y 及び z 軸方向は、 g -テンソルの主値の方向 (g_x, g_y, g_z 及び g_{c^*} の方向) 1つ一致しているものとする。又、 g_a, g_b 及び g_{c^*} は、各結晶軸 a, b 及び c^* 軸方向に磁場をかけたときの g 値である。

g -主値の方向に、方向余弦 (l, m, n) をこの方向の g 値は、一般に

$$g^2(l, m, n) = g_x^2 l^2 + g_y^2 m^2 + g_z^2 n^2 \quad (7)$$

で与えられる。

したがって、 g -主値の方向を知るには、結晶に設定された直交座標系（結晶軸 a, b, c^* ）と、八面体に設定した直交座標系 (x, y, z) の間のオイラー角を計算すればよい事になる。



オイラー角の順序は図-8に示す。

(x, y, z)

$\downarrow \vartheta$: z 軸のまわりの回転

(x', y', z)

$\downarrow \alpha$: y' 軸のまわりの回転

(x'', y'', z')

$\downarrow \psi$: x'' 軸のまわりの回転

$$(a, b, c^*) = (x'', y'', z')$$

のオイラー角を使って、 (g_a, g_b, g_{c^*}) \times (g_x, g_y, g_z) の関係を求

めると、次の様になる。

$$\begin{aligned}
 g_a^2 &= g_x^2(\cos^2\psi\cos^2\varphi\cos^2\theta + \sin^2\psi\sin^2\varphi - 2\cos\psi\sin\psi\sin\varphi\cos\varphi\cos\theta) \\
 &\quad + g_y^2(\cos^2\psi\sin^2\varphi\cos^2\theta + \sin^2\psi\cos^2\varphi + 2\cos\psi\sin\psi\sin\varphi\cos\varphi\cos\theta) \\
 &\quad + g_z^2\cos^2\psi\sin^2\theta \\
 g_b^2 &= g_x^2(\sin^2\psi\cos^2\varphi\cos^2\theta + \cos^2\psi\sin^2\varphi + 2\cos\psi\sin\psi\sin\varphi\cos\varphi\cos\theta) \\
 &\quad + g_y^2(\sin^2\psi\sin^2\varphi\cos^2\theta + \cos^2\psi\cos^2\varphi - 2\cos\psi\sin\psi\sin\varphi\cos\varphi\cos\theta) \\
 &\quad + g_z^2\sin^2\psi\sin^2\theta \\
 g_c^{ab} &= g_x^2\cos^2\varphi\sin^2\theta + g_y^2\sin^2\varphi\sin^2\theta + g_z^2\cos^2\theta \\
 g_{-ab}^2 &= g_x^2\{\cos^2(\psi+a)\cos^2\varphi\cos^2\theta + \sin^2(\psi+a)\sin^2\varphi - 2\cos(\psi+a)\sin(\psi+a)\sin\varphi\cos\varphi\cos\theta\} \\
 &\quad + g_y^2\{\cos^2(\psi+a)\sin^2\varphi\cos^2\theta + \sin^2(\psi+a)\cos^2\varphi + 2\cos(\psi+a)\sin(\psi+a)\sin\varphi\cos\varphi\cos\theta\} \\
 &\quad + g_z^2\cos^2(\psi+a)\sin^2\theta
 \end{aligned} \tag{8}$$

$= \gamma$ 。 γ_{ab} は結晶 ab 面内に於ける γ 値の最小値である。

角度 α は a 軸と γ_{ab} 方向のなす角度である。

1つの面の測定から Euler 角 (θ, φ, ψ) を求めめる為に使用した実験値は $\gamma_a, \gamma_b, \gamma_c^{ab}, \gamma_x, \gamma_y, \gamma_z, \gamma_{-}, \gamma_{+}$ (ab 面の場合) 及び α であるが、これらの値は互いに独立ではない。

事実、

$$\begin{aligned}
 g_a^2 + g_b^2 + g_c^{ab2} &= g_x^2 + g_y^2 + g_z^2 \\
 g_a^2 + g_b^2 &= g_{+ab}^{ab2} + g_{-ab}^{ab2}, \quad g_a^2 = g_{-ab}^{ab2} \cdot \cos^2\alpha + g_{+ab}^{ab2} \cdot \sin^2\alpha
 \end{aligned} \tag*{"という関係がある。"}$$

これらの式より

$$\begin{aligned}
 \sin^2\varphi &= \frac{(g_z^2 - g_x^2) \left\{ \frac{(g_+^2 - g_-^2)^2 + (g_a^2 - g_b^2)^2 + 2(g_a^2 - g_b^2)(g_+^2 - g_-^2)\cos 2\alpha}{\sin^2 2\alpha} - (g_z^2 - g_c^{ab2} - g_y^2 + g_x^2)^2 \right\}}{(g_y^2 - g_x^2) \left\{ \frac{(g_+^2 - g_-^2)^2 + (g_a^2 - g_b^2)^2 + 2(g_a^2 - g_b^2)(g_+^2 - g_-^2)\cos 2\alpha}{\sin^2 2\alpha} + \right.} \\
 &\quad \left. + 4(g_z^2 - g_c^{ab2})(g_z^2 - g_x^2) - (g_z^2 - g_c^{ab2} + g_y^2 - g_x^2)^2 \right\} \\
 \sin^2\theta &= \frac{g_z^2 - g_c^{ab2}}{(g_z^2 - g_x^2) - (g_y^2 - g_x^2)\sin^2\varphi} \\
 g_a^2 - g_b^2 &= A \cos 2\psi + B \sin 2\psi \\
 A &= g_x^2(\cos^2\varphi\cos^2\theta - \sin^2\varphi) + g_y^2(\sin^2\varphi\cos^2\theta - \cos^2\varphi) + g_z^2\sin^2\theta \\
 B &= 2(g_y^2 - g_x^2)\cos\varphi\sin\varphi\cos\theta
 \end{aligned} \tag{9}$$

を得る。

以上の式より 32通りの解が得られるが、計算は 1つの面での γ 値の角度変化曲線しか使用していないので「虚解」が含まれる。

先づ、これらの 32通りの解は 2組に分ける事が出来る。この 2組は、結晶の空間群の対称操作をほどこしても、又 x, y, z 軸の符号を変える事によつても、一致しない全く独立な解である。

したがって、同様の計算をもう一つの結晶面、例えは bc^* 面の測定値を使って行なわねばならない。この場合も、前と同様 (= 2組の解が得られる)。この内の 1組は、 ab 面の計算から得られた 2組の解の 1組と一緒に致する。(方向余弦に換算して) ここで、一致しなり他の 1組の解は捨て去ってよい。

次に結晶の表裏の区別をする必要がある。 ac^* 面(又は ac 面)から得られた結果を用いて、正しい解として、8通りの解が得られる。これらの中の 8通りの解は、 x, y, z 軸の符号を変えれば、全く同等である。

したがって、2つの独立な解が得られる。もちろん、これらの中の 2つの解は実験より得られる 2本の g 値の角度変化曲線に対応しており、結晶の空間群の対称操作で一致するものである。この様にして、結晶軸(a, b, c^* 軸)とへ4面に設定した x, y, z 軸との関係を求める事が出来る。

以上述べた解析法とは別に、Schonland⁽¹⁷⁾ の解析法が古くからあるが、本質的な相異は、Schonland の解析法では、単結晶から得られるデータのみを使用していいる。即ち、 G テンソル (g^2 テンソル) の対角化より、 g_x, g_y, g_z の g 主値を計算して、固有ベクトル(方向余弦に對応)を求めていふのに對して、上記解析法では、溶液試料(凍結試料)の測定から得られた g_x, g_y 及び g_z の g 主値⁽¹⁸⁾を使用し、単結晶から得られた値は、 ab 面の g 値の角度変化より得た値 ($g_a, g_b, g_{-}^{ab}, g_{+}^{ab}$ 又) 及び g_c^* を使用している。 g_a, g_b, g_c^* は 2本の g 値の角度変化曲線の交点で与えられ、2本の EPR ニブナルが 1本に重なる真であるので、 g 値の測定誤差は小さくなる。 g_{+}^{ab} 及び g_{-}^{ab} については、多少誤差は大きくなるが、 $g_a^2 + g_b^2 = g_{+}^2 + g_{-}^2$ の関係より、 g 値の不確かさは簡単に検討できる。又、 $Mb(Fe^{3+})\cdot CN^-$ や $Mb(Fe^{3+})OCN^-$ の低スピノンの g_x のニブナルの様に非常にブロードで g_x の値が不確かの場合には $g_a^2 + g_b^2 + g_c^2 = g_x^2 + g_y^2 + g_z^2$ の関係より、 g_a, g_b, g_c^*, g_x 及び g_z の値を使って g_x を求めらる。 bc^* 面及 ac^* 面(ac 面)による計算は、 ab 面から得た解の内から正しい解を選ぶ為に使用したはずである。

したがって、本解析法は、溶液試料から g 値が判つてゐる単結晶について非常に便利な方法といえる。特に、Mb 単結晶 (91.9° A) は、ab 面が非常によく成長しており、結晶の軸方向の設定誤差をより小さく抑えられたので、上記解析法によろ解析が適しているといえる。

1-5 実験結果

1-5-1 ミオグロビン (Fe^{3+}) の八面方位 — 配位子の影響 —

本節では、ミオグロビン (Mb) 中での八面方位、八面の異方性の方向を決めていける因子が何であるかを知る為に、配位子を色々変えて、単結晶中での g の異方性の方向を決定した。

第6配位子 (図-2のX) として、 CN^- , N_3^- , Im^- , OCN^- を使った。
図-9 (a) 溶液 (凍結試料) の EPR スペクトルを示す。

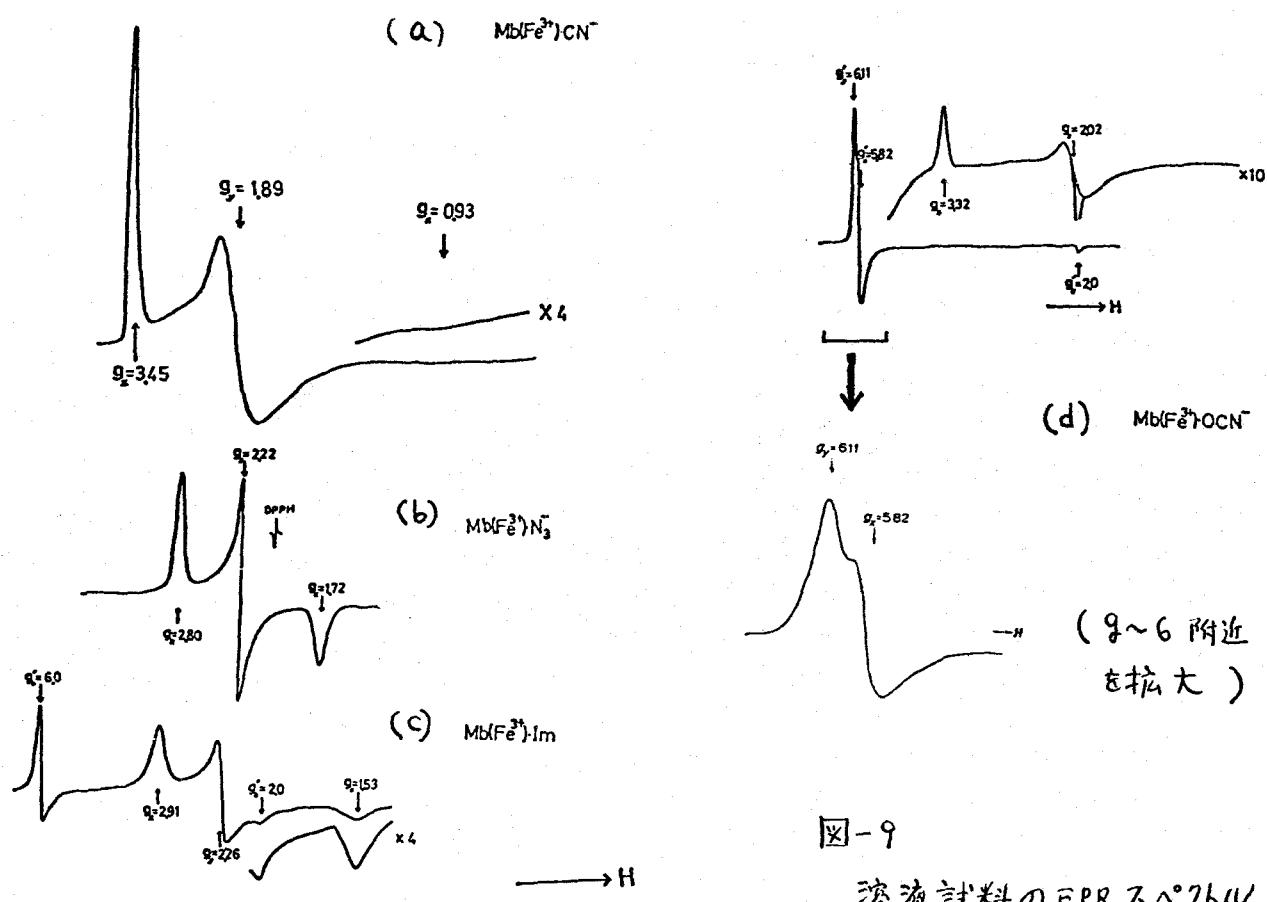


図-9

溶液試料の EPR スペクトル

測定は液体水素温度(20°K)で行つたものである。

$\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{CN}^-$, $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{N}_3^-$, $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{Im}$ は典型的な低スピニ型であるが、

$\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{OCN}^-$ は高スピニ型と低スピニ型の両方のシグナルが得られる。

図-10 (=) これら の単結晶の ab 面 (C^* 軸のまわりの回転) 内の g-値の角度変化を示す。

bc^* 面内の g-値の角度変化の図は同じようなグラフになるが、 ac^* 面 (ac 面) 内の g-値の角度変化は、結晶を結晶 2 回対称軸の b 軸のまわりで回転させる為、1 本の角度変化曲線しかあらわれない。

解析に使用した g_a , g_b , g_{c^*} は、2 本の g-値の角度変化曲線の交点から求め事が出来る。

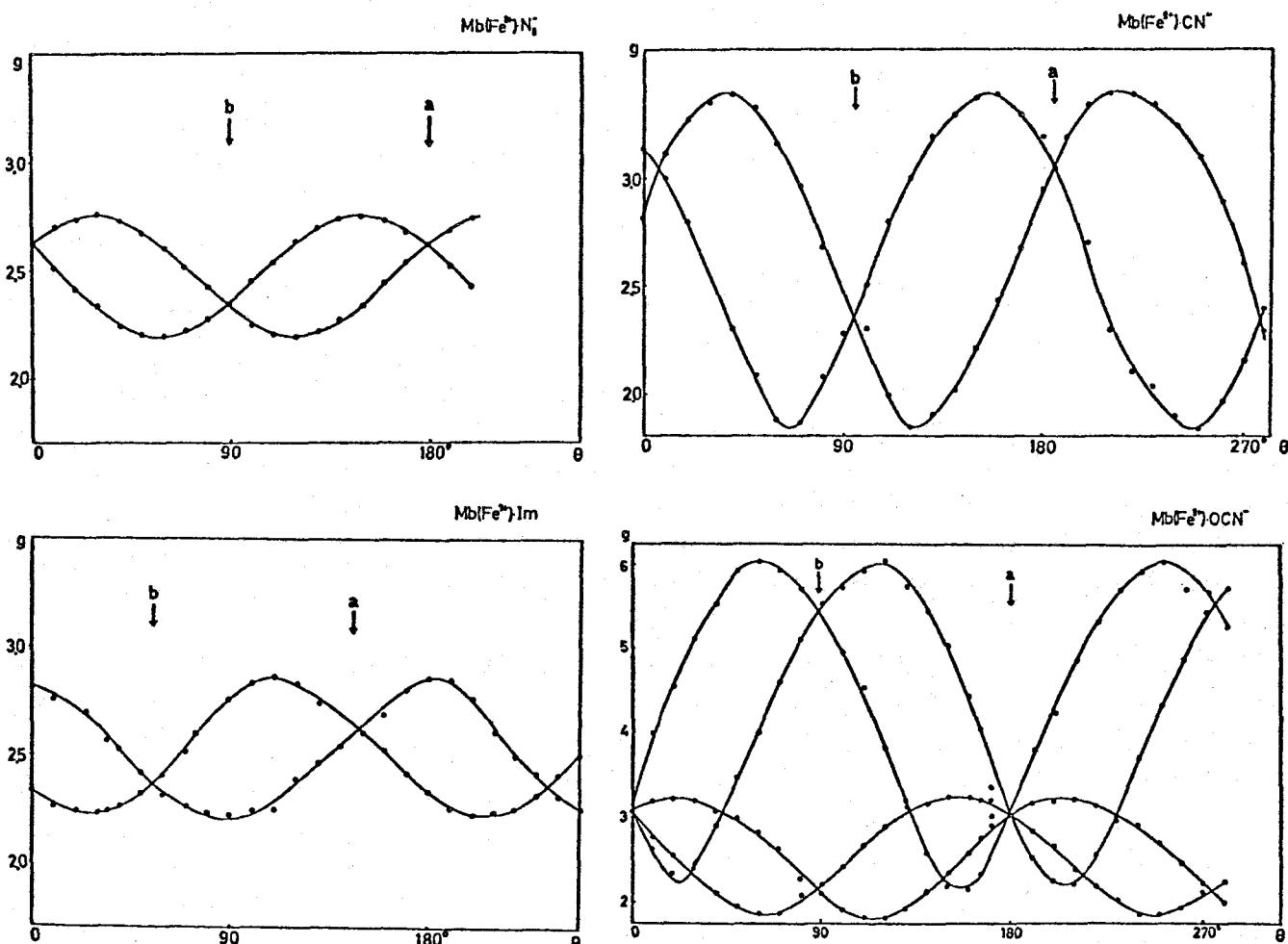


図-10 ab 面内の g-値の角度変化 (20°K)

得られた結果 (a, b, c^* 軸と x, y, z 軸のなす角度) を表-I に示す。

表-I

| 化合物 | 基底状態 | g主値 | 結晶軸との角度 | | |
|---|------|--|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | | a | b | c^* |
| Mb(Fe ³⁺)·N ₃ ⁻ | 低スピン | $g_x = 1.72$ $g_y = 2.22$ $g_z = 2.80$ | 109° 67° 31° | 83° 152° 63° | 21° 75° 76° |
| Mb(Fe ³⁺)·Im. | 低スピン | $g_x = 1.53$ $g_y = 2.26$ $g_z = 2.91$ | 114° 67° 35° | 83° 152° 63° | 26° 76° 70° |
| Mb(Fe ³⁺)·CN ⁻ | 低スピン | $g_x = 0.93$ $g_y = 1.89$ $g_z = 3.45$ | 108° 65° 32° | 80° 148° 60° | 21° 72° 79° |
| Mb(Fe ³⁺)·OCN ⁻ | 低スピン | $g_x = 1.08$ $g_y = 2.02$ $g_z = 3.32$ | 113° 77° 27° | 72° 151° 69° | 31° 65° 74° |
| Mb(Fe ³⁺)·OCN ⁻ | 高スピン | $g_x = 5.82$ $g_y = 6.11$ $g_z = 2.00$ | 115° 81° 27° | 60° 141° 68° | 41° 52° 76° |
| Mb(Fe ³⁺)·H ₂ O | 高スピン | $g_x = 2.00$ | 28° | 69° | 73° |

単位胞中にあるもう1個の八面の方位は、結晶の対称操作によつて求めることが出来る。

bc^* 面又は ac^* 面から得られた結果は、 ab 面から得られた結果と最大誤差が 5° 以内でよく一致した。

二八誤差の原因として考えられる事は、シグナルの線幅から生ずる g 値の不確かさ 及び、試料支持台上に単結晶をのせた際の軸方向の不確かさがあげられる。

特に、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ の場合、上で得られた結果(表-I)を使って、単結晶中の x 及び z 軸方向に磁場をかけて、 g_x (g 最小) 及び g_z (g 最大) を求めた。

単結晶より求めた g_x 及び g_z は、溶液で測定した g_x 及び g_z とよく一致した。

結晶軸 (a, b, c^* 軸) に対する z 軸 及び xy 面の方位を、ステレオ投影図で 図-11 に示す。

ここで、大円は xy 面を示す。同時に X 線結晶解析から得られた八面を点線の大円で示した。

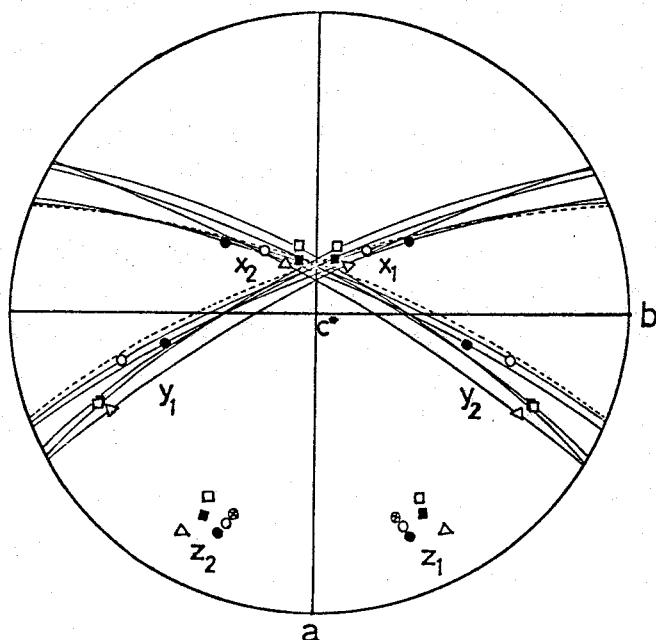


図-11

$x-y$ 面及び
Z軸の方位

- ◎ : MbH_2O (-----) , \triangle : MbCN
- : MbOCN (高スピン) , ■ : MbN_3
- : MbOCN (低スピン) , □ : MbIm

図-11で示した高スピン型 Mb 誘導体と低スピン型 Mb 誘導体のZ軸の方向の差を確かめる為に $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ と $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{N}_3^-$ を同時に単結晶中に含む結晶を用いて、 g 値を測定した。
即ち、7磁場を $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ の Z 軸方向にかけると、 $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{N}_3^-$ の g 値は 2.76 となり。一方、 $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{N}_3^-$ の Z 軸方向に 7 磁場をかけると ($g_z = 2.80$)、 $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ の g 値は 2.05 となる。したがって、両者の Z 軸の差は約 7° 程度と考えられる。

表-II

次に、1個の空孔による計算に基づいて、

t_{2g} 軌道エネルギー準位を計算した。

表-II に示す。電子のエネルギー準位は d_{xy} 軌道が一番最低になり、 d_{xz}, d_{yz} 軌道はその上にある。この事実は、Z 軸を $x-y$ 平面に垂直の方向に選んでよいことを保証してくれる。

| 化合物 | μ | R |
|--|-------------------|-------------------|
| $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{N}_3^-$ | 4.735\AA | 2.403\AA |
| $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{Im.}$ | 3.325\AA | 1.929\AA |
| $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{OCN}^-$ | 3.184\AA | 1.107\AA |
| $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{CN}^-$ | 3.264\AA | 0.897\AA |

μ : 軸対称のゆがみ
 R : 斜方向のゆがみ
 $a \sim 400 \text{ cm}^{-1}$

1-5-2 ミオグロビン (Fe^{3+}) のヘム方位 — ヘム側鎖の影響 —

本節では、ヘムの側鎖を変化させた場合、ミオグロビン (Mb) 分子中で、ヘム面が“ γ ”のような影響を受けるかを調べた。

A) 2,4 位のジイソル基の影響 ⁽¹⁹⁾

Mb 分子の内側に向って立るヘムの 2,4 側鎖を変化させた場合、即ち、R-プロト-Mb, R-メソ-Mb, R-デュテロ-Mb について調べた。

常温での可視スペクトルは典型的な高スピニン型であるが、R-メソ-Mb, R-デュテロ-Mb は、ポルフィリン環 2,4 側鎖のジイソル基の二重結合をもつた影響で、全体に 10 nm 程度、短波長側にシフトしている。

溶液での EPR スペクトル ($\text{pH } 7.0, 20^\circ\text{K}$) は、 $g_{\perp} = 6, g_{\parallel} = 2$ と $\gamma - \epsilon$ を持つ典型的な Fe^{3+} -高スピニン型のシグナルである。

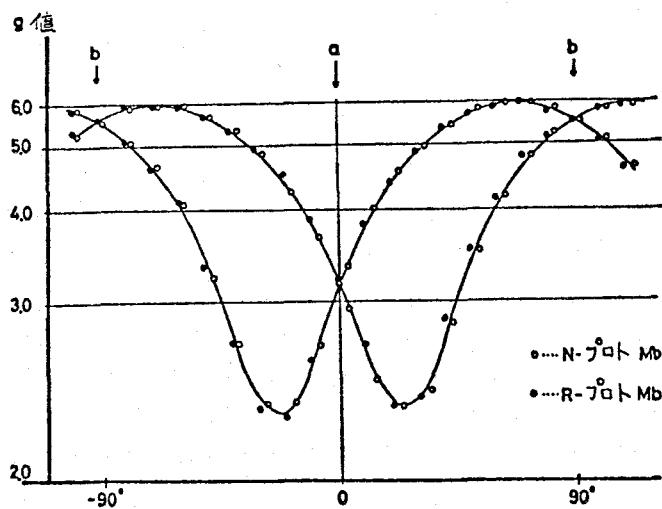


図-12-A

N-プロト-Mb と R-プロト-Mb の
g-値の角度変化 (ab 面)

図-12-A 1 = N-プロト-Mb と
R-プロト-Mb の単結晶の ab
面での g 値の角度変化を示す。

これらの単結晶はタイプ-A で、
ab 面がよく発達するので、
実験誤差を小さくする為に
ab 面での g 値の角度変化
を測定し、比較した。

測定は 10° 間隔で行った。
N-プロト-Mb と R-プロト-Mb
では、g 値の角度変化に
於て、差は認められなかった。

この事は、Mb のプロトヘムを取り出して、再びプロトヘムと
蛋白に入れても、ヘム方位には何の影響もない事を示している。

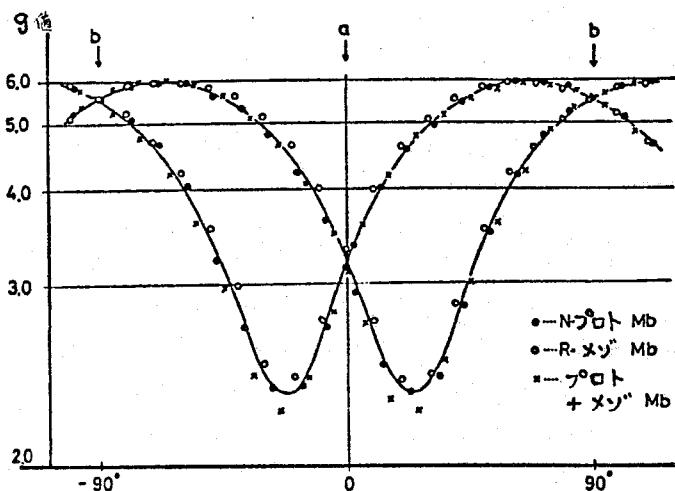


図-12-B R-Xy-Mb の g 値の角度変化

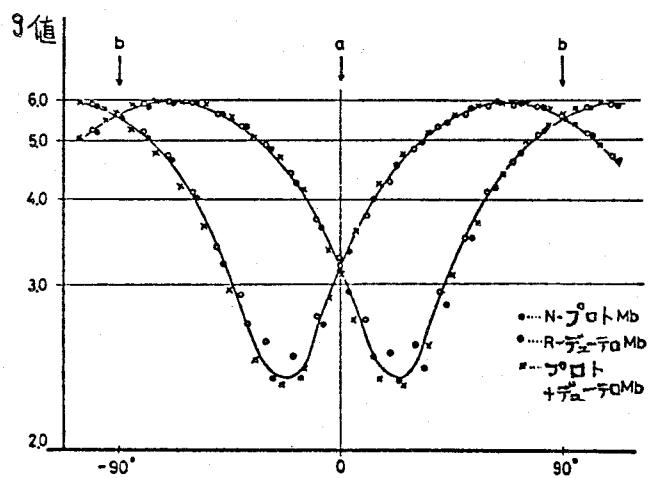


図-12-C R-Dy-Tro-Mb の g 値の角度変化

即ち、R-Xy-Mb 及び R-Dy-Tro-Mb の g-値の角度変化曲線はプロト-Mb の g-値の角度変化曲線と完全に一致してない。これが有意な差かどうかが問題である。各曲線より R-Xy-Mb, R-Dy-Tro-Mb 及び プロト-Mb の ab 面の法線(Z-軸)の結晶中での方位を計算すると、最大 $\pm 2^\circ$ の誤差が生じた。そこで、プロト-Mb と R-Xy-Mb 及び R-Dy-Tro-Mb の ab 面の法線方位が、どの程度の誤差範囲で一致するのか調べる為には、1つの単結晶中に、プロト-Mb と R-Xy-Mb 及び R-Dy-Tro-Mb が共存してゐる単結晶での g 値の角度

次に、R-メソ-Mb 単結晶の ab 面内の g 値の角度変化を図-12-B 1 示した。

同時に、N-プロト-Mb 単結晶の ab 面内の g 値の角度変化を示した。

又、図の X 印で示したもののは、1つの結晶中に R-プロト-Mb と R-メソ-Mb を含んだものについての測定である。

図-12-C 1 R-Dy-Tro-Mb 単結晶の ab 面内の g 値の角度変化を示した。

これらの図からも明らかなる様に、R-メソ-Mb 及び R-Dy-Tro-Mb の g 値の角度変化の場合、結晶回転台に結晶を置く際に生ずる誤差を考えると、プロト-Mb の g 値の角度変化と同じであるかどうか断定できない。

変化を測定する必要がある。(図12.B~CのX印)

両方のヘムの共存する単結晶は、プロト-Mbの単結晶と同一結晶構造をとり、空間群が P_{2_1} の $\bar{1}4\bar{1}\bar{0}$ Aの単結晶であった。したがって、例えば、プロトヘムとメソヘムの方位が、結晶中で異なっていふとすれば、磁場を結晶の任意の方向にかけた場合、空間群が P_{2_1} より4本のEPRシグナルが観測されるはずである。又、両ヘム面の方位が、結晶中で同じであるとすれば、当然EPRシグナルは2本になる。測定では、2本のEPRシグナルしか見出されなかつた。しかし、EPRシグナルが2本たつからといって、両ヘム面の法線が一致していふとは断定できない。何故なら、EPRシグナルの線幅の角度変化がある。線幅のP-P値(ガウス)は最大で200ガウス程度(最小で20ガウス程度)もあり、EPRシグナルが少しずれて重なっていても区別できないう危険性がある。特に、磁場をヘムの法線方向にかけた場合($g=2.0$)、EPRシグナルが突然鋭くなる(~25ガウス)ことを利用すれば、両ヘム面の法線の方位の差をより精度よく見出せるはずである。

$z=z$ 、プロト-Mb、R-メソ-Mb、プロト+メソ-Mbの三種類の単結晶について、ヘム法線の近傍で磁場を回転させた。
図-13-A,Bに示す。測定は 1° 刻みで行った。

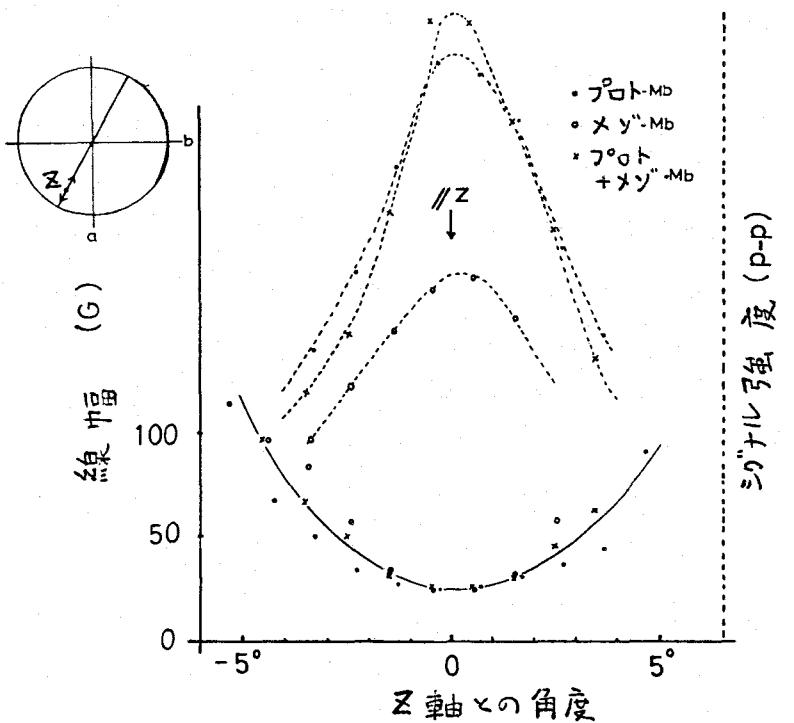


図-13 A

ヘム法線近傍での
線幅の角度変化。

図中のステレオ投影図(ab面)に示した方向に
磁場を回転させた。
(図のX印はヘム法線)

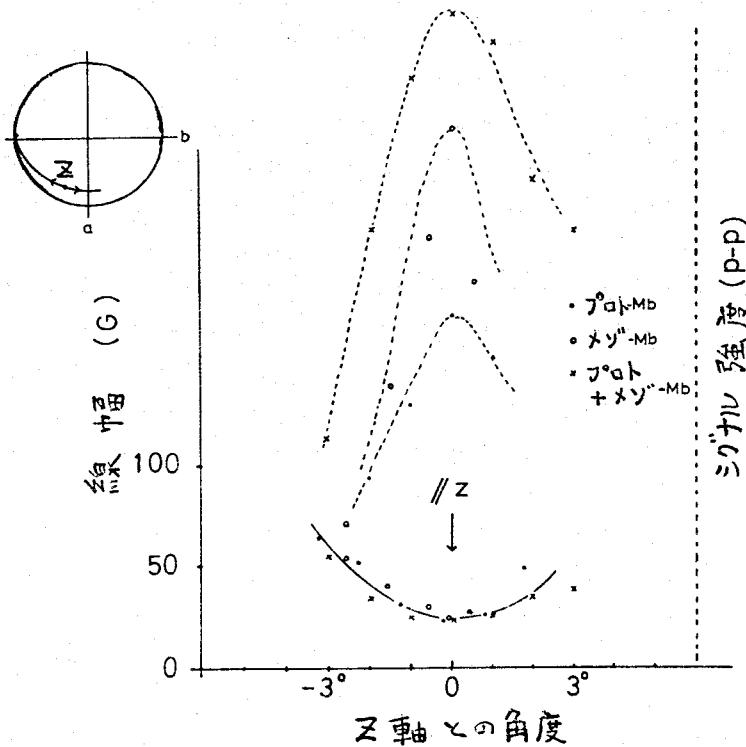


図-13-B

ステレオ投影図に示した
方向に磁場を回転させ
た。

1° の角度変化に対する EPR シグナルの線幅の変化は、はっきりとわかっている。その変化をよりはっきりさせるために、角度変化に対する EPR シグナルの強度変化も示した(----線)。ヘム法線から少しだけずれて、シグナル強度が大きく変化することがわかる。

以上より、Prot-Mb, R-Myo-Mb, Prot+Myo-Mb の三者について、 $g_{\parallel} = 2.0$ の EPR シグナルの線幅誤差は ± 1 ガウス以下で、非常によく一致している事が判る。これは、単結晶中で、Prot-Mb と R-Myo-Mb のヘム面方位が $\pm 0.5^{\circ}$ 以下で一致していることになる。 \approx の実験は、溶液の EPR シグナルより得た g 値は、Prot-Mb と R-Myo-Mb は完全に一致している事の証明にもなる。

同様の結果を Prot-Mb と R-Deoxy-Prot-Mb の場合からも得た。

$\approx 3^{\circ}$ 。1つの単結晶中に Prot-Mb と R-Myo-Mb あるいは、Prot-Mb と R-Deoxy-Prot-Mb が、本当に両者とも含まれてゐるか否かを調べるために、 g 値の角度変化を測定した後、結晶を pH 7.0 の 0.5 M リン酸緩衝液に溶かして、可視スペクトルを測定した。図-14 に示す。Soret 帯の波長は、例えは R-Myo-Mb (Fe^{3+})

高スピン) では 394 nm , プロト-Mb (Fe^{3+} . 高スピン) では,
 409 nm であるので, R-メソ"-Mb と プロト-Mb の両方が確かに含まれて
いた事が確かめられた。これは、プロト-Mb と R-デュ-テロ-Mb の混じり合
いも同様に確かめられた。

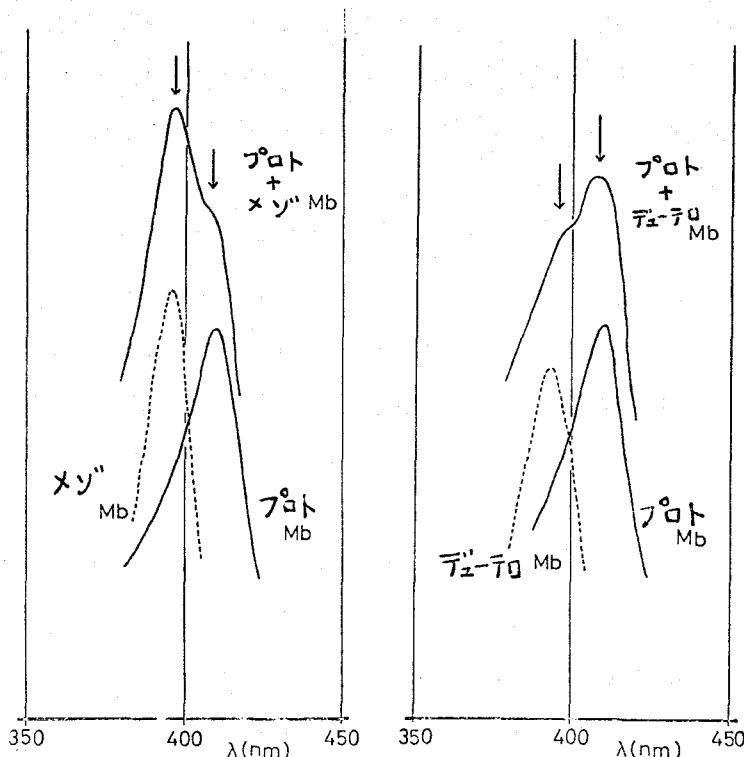


図-14

溶液を pH 7.0
 0.5 M リン酸緩衝
液に溶かしたとき
の Soret 带の
スペクトル。

以上は、プロト-Mb, R-メソ"-Mb 及び R-デュ-テロ-Mb に於て、
八面の法線方位が一致してゐる事を示したものであるが、八面の 2,4
側鎖を化学修飾した場合、たゞえ、八面の法線方位は変わらない
としても、八面内に回転が生ずる可能性が考えられる。

そこで、プロト-Mb, R-メソ"-Mb 及び プロト+メソ"-Mb に N_3^- を
配位させて、低スピン状態での γ 値の角度変化を比較した。
低スピン状態を使用するには、八面内の異方性が大きくて、X 軸、Y
及 Y 軸のずれを比較する為には好都合だからである。

図-15 に、各々の ab 面内で γ 値の角度変化を示した。

高スピン型での測定結果と同様に、X 軸及 Y 軸のずれは
認められなかった。

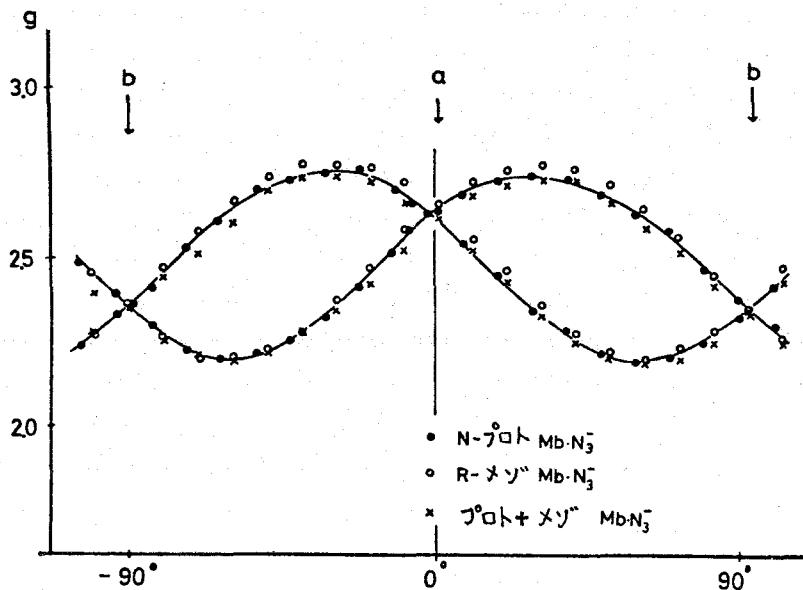


図-15

Mb-N_3^- (プロト+メソ)
の g 値の角度変化
(ab面)

B) 6, 7 位のプロピオニ酸基の影響

分子表面に近い八面の 6, 7 位側鎖を変化させた場合、Mb 分子中で八面がどのように影響を受けるかを調べた為に、R-ジエステル-Mb について調べた。

R-ジエステル-Mb の常温での可視スペクトル (pH 7.0) は典型的な高スピン型であり、プロト-Mb の場合とほとんど変わりない。ところが、低温スペクトルでは高スピン状態と低スピン状態の混合状態になっている。図-16 は低温スペクトルの温度変化を示した。図の H は高スピン、L は低スピン状態の吸収帯であることを示す。低温になると程、低スピン状態が増加する。

測定は pH 7.0, 0.5 M リン酸緩衝液で行ったが、溶液のイオン強度を変えた場合、即ち pH 7.0, 0.1M リン酸緩衝液で測定しても同じ結果であった。

図-17 は 20°K での R-ジエステル-Mb の溶液の EPR シグナルを示した。測定は pH 7.0 で行つたが、 $g_\perp = 6.0$, $g_\parallel = 2.0$ の高スピン型のシグナルの他に、新しく $g_x = 1.74$, $g_y = 2.21$, $g_z = 2.68$ の低スピン型のシグナルが現われた。この低スピン型のシグナルは低温スペクトルで現われた

低スピノ成分 I = 対応している。

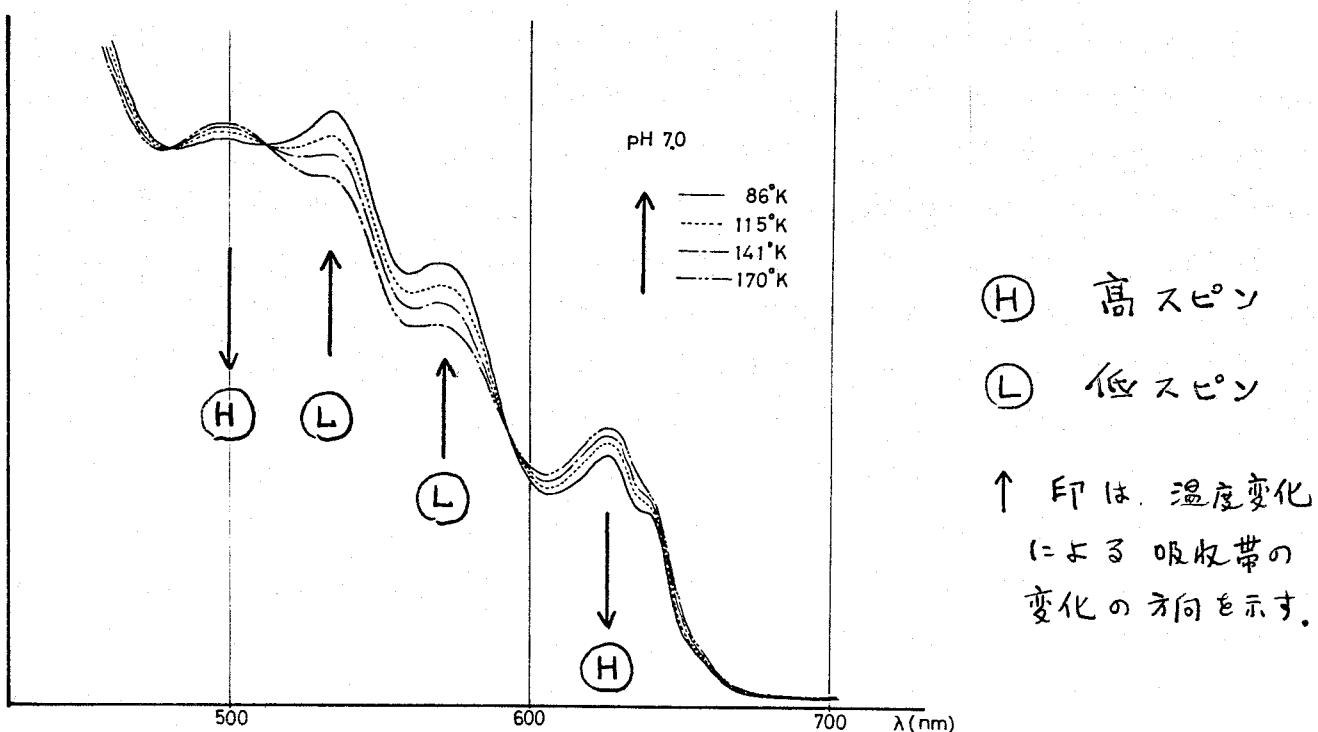


図-16 デオキシ-Mb の 低温スペクトル

(pH 7.0, 0.5 M リン酸緩衝液)

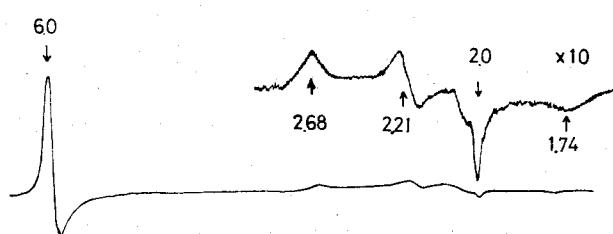


図-17

デオキシ-Mb の EPR
(20 K)

$\text{g}_x = 2.68$, $\text{g}_y = 2.21$, $\text{g}_z = 1.74$ の EPR 吸収線の強度が、 $\text{pH} \sim 8$ 附近より、新しい低スピノ型のシグナル ($\text{g}_x = 1.83$, $\text{g}_y = 2.12$, $\text{g}_z = 2.60$) が現われる。 pH の高い領域で現われる低スピノは、 $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+}) \cdot \text{OH}^-$ (= 帰因するもの) である。

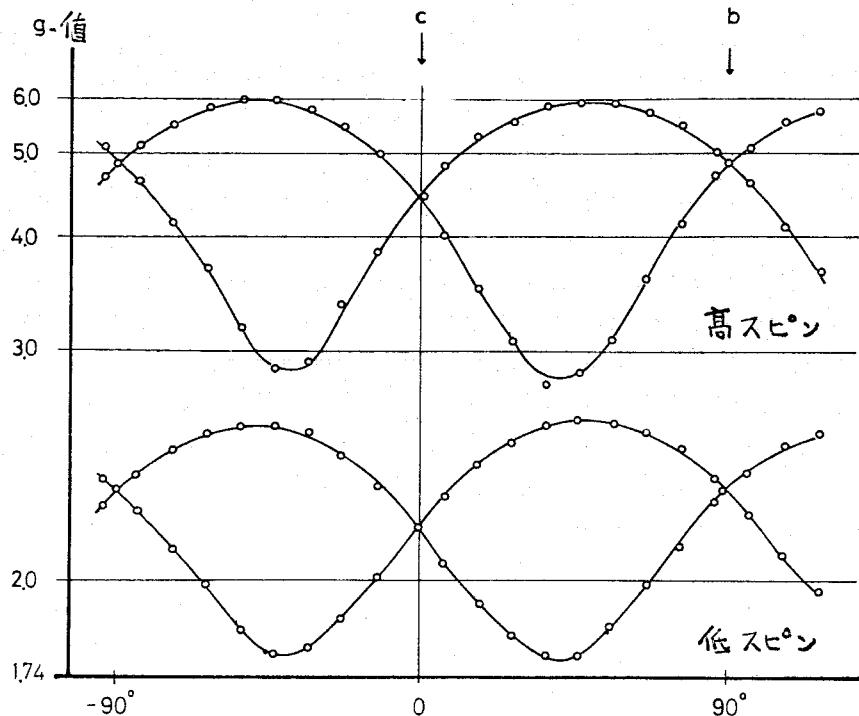


図-18

R-ジエスティル-Mb
単結晶の
g値の角度変化

図-18に、R-ジエスティル-Mb の単結晶での 低スピン 及び 高スピン の g -値の角度変化を示す。R-ジエスティル-Mb の単結晶の晶系は、プロト-Mb 単結晶の晶系(タイプ・A)とは異なる為、又、プロト-Mbとの混晶が出来ない為(即ち、80%飽和硫安中で、プロト-Mbと、R-ジエスティル-Mb を同時に入れて結晶化させても、各々が、別々の晶系で析出してくれる)、プロト-Mbとの直接の比較は出来ない。そこで、R-ジエスティル-Mb 単結晶中のヘム法線方位を計算すると表-IIIのようになる。

表-III

| | $a^\wedge z$ | $b^\wedge z$ | $c^\wedge z$ |
|------|--------------|--------------|--------------|
| 高スピン | 90° | 49° | 42° |
| 低スピン | 67° | 41° | 59° |

この結果より、高スピンと低スピンの z -軸の方向は約 10° 近くずれている事が判る。これは実験誤差以上の差異である。

1-6 考察

1-6-1 配位子の八面体に対する影響

本節では、八面体の鉄イオンと配位結合して、了第5配位子のヒストジンラベル。第6配位子の種々の配位子が、八面体方位、八面体内の異方性におよぼす影響について論述する。

先ず、低スピノ型化合物 ($Mb(Fe^{3+})-CN^-$, $-N_3^-$, $-Im$) と、高スピノ型化合物 ($Mb(Fe^{3+})-OCN^-$, $-H_2O$) での g_z の方向の違いについて検討する。

EPR マテンソルの解析より、低スピノ型化合物の g_z の方向は単結晶中で大体同じ方向を示しており、高スピノ型化合物の g_z の方向と約 7° の違いをもつてゐる事が判った。さて、高スピノ型化合物に（3. 低スピノ型化合物）によると、 g_z の方向が、八面体に垂直な方向であると仮定するならば、 g_z の方向が両者で 7° 違うこととは、八面体周辺で約 0.6 \AA ずれてなければならぬことである。すなはち、 $\theta = 39^\circ$ 。Stryer⁽²⁰⁾によると、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot H_2O$ と $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ の差フーリエ X 線結晶解析では、八面体の動きは見いたされなかつた。一方、Ingram⁽⁶⁾ の EPR, Kendrew⁽¹¹⁾, Takano⁽²¹⁾ の X 線解析より、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot H_2O$ の g_z の方向は、ほぼ八面体に垂直な方向であることが判つてゐる。低スピノ型化合物の g_z の方向は、八面体に垂直な方向から約 7° ずれてゐると推論される。

次に、 Fe^{3+} 、低スピノ型化合物の八面体内での大きな g 値の異方性は一体何によるのかを検討する。

我々の実験結果では、第6配位子（8F(93)ヒストジンの反対側の配位座の配位子）の種類によって、 g 値の異方性の大きさは異なつてゐるにもかかわらず、八面体内の x , y 軸 (g_x , g_y 方向) は、配位子の種類によつてはほとんど依つてないことが判つた。図-19は第5配位座の8F(93)ヒストジンのイミダゾールの2個の炭素 (C_1 , C_2 と示す) の八面体への投影^{(1), (21)} 及び各低スピノ型化合物の x 軸

(g_x 方向) の八面への投影図を示す。

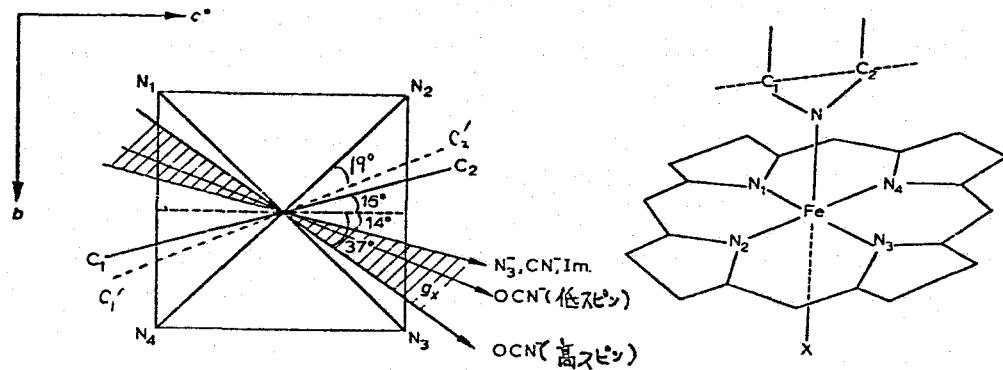


図-19 g_x の方向。($C'_1 \dots C'_2$ は最近の Takano⁽²¹⁾ の結果である)

Griffith⁽²²⁾によると、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ のエネルギー準位の計算から、 d_{xy} 軌道が一番最低であり、 d_{xz} 及び d_{yz} 軌道がその上にきている事は、イミダゾール面の法線が y 軸方向である（イミダゾールの N の $2P_\pi$ 軌道が y 軸方向に伸びて）とするのが一番良いと説明した。

一方、Helcké⁽²³⁾によると $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ の八面内での最小の γ 値の方向 (g_x 方向) は 図-19 に示した C_1, C_2 線の方向にほぼ平行であると報告している。この結果は、Griffith の解析を支持する様にみえるが、我々のデータと全く異なる結果を示している。

この食違いであるが、我々の解析法で述べてきた「虚解」の中に、Helcké らの結果とほぼ一致するものがある。Helcké らは解析を誤ったと思われる。さらに、八面内の x, y 軸は配位子の種類にはほとんど依ってない事、特に、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot Im$ の場合は、第5、第6 配位子共にイミダゾールが配位した状態であるので、1 個のイミダゾール（近位ヒスチジンのイミダゾール）だけを八面内の γ 値の異方性の原因であると考えるのは不自然である。

そこで、第6 配位子の八面に対する結合方向を考える。

X線結晶解析によると⁽²⁰⁾ $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ では、 $Fe - N$ の距離は 2.05\AA 、 $N_\alpha - N_\beta$ 及び $N_\beta - N_\gamma$ は共に 1.15\AA (α, β, γ は、 N_3^- の 3 つの N 原子を Fe 側から順に $N_\alpha, N_\beta, N_\gamma$ としたものである) で、3 つの N 原子は直線上に並んで八面に対して 21° の角度をなしている。又、 $Fe - N$ 及び

$N-N$ の結合軸は、八面を2等分する面内 即す、図-19のピロール 2×3 (あるいは1と4) を2等分する面内にある。

一方、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot CN^-$ では、配位子は、八面にほぼ垂直であると思われていたが、八面に垂直な方向からピロール 2×3 の間の方へわずかにまげられているようである。⁽²⁴⁾ 他の配位子につけても同様の傾向をもつようであるが、さりはしてない。

そこで、 γ 値の異方性の向き (γ_x あるいは γ_y の方向) は、配位子が八面に垂直な方向から、八面のどの方向にまげられているのがかかる要因になると推論される。

又、 γ 値の異方性の大きさに影響するのは、鉄と配位子との結合の強さ、又は結合方向の八面法線からのずれの度合いにより、 d_{xy} 軌道と d_{xz} 軌道のエネルギー差 (図-7のR: 斜方向のゆがみ) が小さくなる程、八面内対称性が良くなるとされている。事実、Rは、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot CN^-$ では小さく、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ では大きくなっている (表-II)。これは、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot CN^-$ では配位子が八面にほぼ垂直に配位して、面内の対称性も良く、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ では斜めに配位して、面内の対称性が悪くなっているとして納得できる。

さて、第6配位子の八面に対する結合方向に影響を及ぼすであろう附近のアミノ酸残基として、7E(64)ヒスチジン(遠位ヒスチジン)、11E(68)バリン(Val.) や 1CD(43)フェニルアラニン(Phe.) 等がある。特に 7E(64)ヒスチジンのイミダゾール基の N_e は八面鉄のほぼ真上 約3.8Åの位置に位置し、1CD(43)phe. のフェニル環は八面に對して 25° の傾きを持つホルフィリン環の3,4のピロール環の間に位置しており、他のアミノ酸残基の向きを変えなければ“自由に動けない状態”である。したがって、配位子は蛋白質の中で、必ず一定の方向にしか入れない様に立体構造的に制限されているのである。二の様に配位子が必ず方向性をもって配位する事、又は 8F(93)の近位ヒスチジンのイミダゾールの向きが周囲のアミノ酸残基によって立体構造的に制限されている事が八面内の異方性の方向 (γ_x あるいは γ_y の方向) を決定しているものと推論される。

1-6-2 ヘム側鎖の影響

前節では、ヘムのFeイオンと配位結合している第5配位子のヒスチジン及び第6配位子の種々の配位子が、ヘム面方位、面内の異方性における影響について論じたが、本節では、ヘムの側鎖がヘム方位、ヘムの電子状態にどの様に影響しているかを論ずる。

Hb, Mb 以外の他のヘム蛋白において、 Fe^{3+} の高スピノ低スピノの熱平衡現象においては^{(25)~(27)}、ポルフィリン環とアポ蛋白との間のファン・デル・ワールス接触が極めて重要であるといわれている。したがって、ヘムの側鎖を化学修飾した場合、結晶中のヘム面の方位に何らかの影響が現われるのではないかと考えられる。又、この事から、A4とアポ蛋白の結合の安定性に何が寄与しているかを知る事が出来よう。

A) ポルフィリン環の2,4側鎖のヴィニル基の影響

X線結晶解析によると、ヘムの2,4側鎖のヴィニル基は、蛋白の非極性部に深く埋められ、多くのファン・デル・ワールス接角ををしている（図-20）。

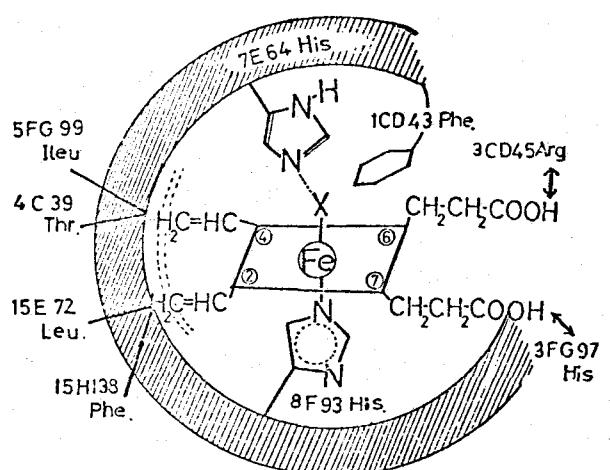


図-20 ヘム周囲

Yonetani は⁽²⁸⁾メソ-ヘム蛋白質(Fe^{3+})の磁化率、低温スペクトルの測定から、ポルフィリン環とアポ蛋白とのファン・デル・ワールス接触は、スピノ状態（高スピノ ⇌ 低スピノ）の熱平衡に極めて重要であると報告している。これは Otsuka の理論⁽²⁹⁾に基づくもので、ポルフィリン環とアポ蛋白との間の

ファン・デル・ワールス接触がなくなると、ポルフィリン環の移動が生じ、これが熱平衡の一因になるというのである。しかし本実験に於て

$R-\text{メソ}-\text{Mb}$, $R-\text{デュ-テロ-Mb}$ の結晶中のヘム面の方位に関する限り、少なくとも $\pm 0.5^\circ$ 以下の誤差範囲で、ヘム面の変動は見出されなかった。ちなみに 0.5° のヘム面の傾きがあるとすれば、約 0.1 \AA 程度の変動に相当すると言えられる。

ヘムの2,4側鎖のウイニル基とヘム周辺のアミノ酸残基の位置関係を Kendrew らの X 線結晶解析の結果からみてみると、例えば、15 E (72) Leu. (ロイシン) はヘムの第2側鎖のウイニル基と接触している (4.6 \AA)、5 FG (99) Ileu. (イソロイシン), 4 C (39) Thr. (スレオニン) はヘムの第4側鎖のウイニル基と接触するように位置している (各 3.5 \AA , 4.0 \AA)。

しかしながら、本実験に於て、プロト-ヘムの2,4側鎖の $-\text{CH}=\text{CH}_2$ の2重結合を各々2個の水素原子で飽和させて、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ とした $R-\text{メソ}-\text{Mb}$ も、2,4側鎖の $-\text{CH}=\text{CH}_2$ を各々1個の水素原子で置換えた $R-\text{デュ-テロ-Mb}$ も単結晶中で、ヘム面の方位に何ら変動がみられない。といふ事は、ヘムの2,4側鎖のウイニル基と、ヘム周辺のアミノ酸残基との間のいくつものファン・デル・ワールス接触は、ヘム蛋白分子の中に固定する主なる要因とはなっていないと考えられる。むしろ、芳香族アミノ酸の側鎖の平面は、ヘム面と平行に近く (1 CD (43) フェニルアラニン, 15 H (138) フェニルアラニン等)、これらの間に特別な相互作用がある事も考えられる。

更に、本実験ではとりあげなかつたが、例えば、ヘムの1,3側鎖のメチル基と周辺のアミノ酸残基との接触についても考慮が必要である。14 E (71) Ala. (アラニン) のメチル基は、ヘムの第1側鎖のメチル基と 3.8 \AA の距離で接触しており、又、8 G (107) イソロイシンの C_s メチル基は、ヘムの第3側鎖のメチル基と 4.3 \AA の距離で接触している。ヘムの1,3側鎖を化学修飾したとしても、ヘムの2,4側鎖を化学修飾した場合と同様に、蛋白分子中のヘムの方位には変動は見出されない事も充分予想される。

ところで、プロトヘムの2,4側鎖を化学修飾 ($+ R-\text{メソ}-\text{Mb}$, $R-\text{デュ-テロ-Mb}$ は磁化率⁽²⁸⁾, EPR⁽³⁰⁾ 及び"メスバウラー効果"⁽³¹⁾

の測定から、ヘム鉄の電子状態には、本質的には、何の変化も与えていない実験事実が報告されている。一方、 Fe^{2+} において、酸素分子等、配位子との反応性^(32, 33)に対して、大きな影響を与えている事実も報告されている。ヘム鉄の原子価の違ひと側鎖の電子吸引性の強さで説明がつくのであるが、大変興味深い問題である。

B) ホルムイリジン環の 6,7 側鎖のプロピオン酸基の影響

Mb の分子鎖内の原子は最密充填に近い構造をとっている。その内部では、側鎖は原子团のファン・デル・ワールス ホーテンシャルの包絡面から考えられる最も密で、安定な接触を保っていると考えられる。又、アミノ酸残基の疎水的、親水的な各性質は、蛋白質の二次、三次構造⁽²⁾。それらが置かれる場所に強く影響を持っている。ほんどの極性基（親水性）は、水と接する分子表面にあり、水と結合している（ヘムに配位しているヒスチジン等は例外である）。

さて、X線結晶解析によれば⁽²¹⁾、プロト-ヘムの 6,7 側鎖のプロピオン酸基のカルボキシル基（極性基）は Mb 分子の表面に向けている。ヘムの第6側鎖のプロピオン酸基は 3CD (45) Arg. (アルギニン) ×、又、第7側鎖のプロピオン酸基は 3FG (97) ヒスチジン×等々、塩結合をなしていない。本節では、プロピオン酸基のカルボキシル基がヘム面の方位に与える影響及びヘムの電子状態への影響について検討する。

O'Hagan^s ⁽³⁴⁾ は、カルボキシル基の欠落したヘムを持つ Mb を合成し、このカルボキシル基はヘムとアポ蛋白の結合の安定性に極めて重要な役目をはたしていると報告している。

R-ジエステル-Mb(Fe^{3+}) の EPR 測定及び低温スペクトル測定に於て、低スピニシブリッジが現われた事は、かなり、ヘム周辺に大きな構造変化が生じたと推測できる。カルボキシル基をエステル化すれば、分子の表面電荷の分布が変化し、これが蛋白質の

コンホーメーション変化を引き起すと思われる。この事は、次の事実からもうかがえるであろう。

R-ジエステル-Mb の単結晶はプロト-Mb の単結晶と同じ結晶化条件の下でても、その結晶系が異なっている事。又、R-ジエステル-Mb とプロト-Mb の混晶を作ろうとしても、R-ジエステル-Mb は R-ジエステル-Mb の結晶系で、プロト-Mb はプロト-Mb の結晶系という風に別別に分かれ析出してくる事は、分子の表面電荷の変化が結晶化条件を変えてしまうと考えられる。

更に、EPR シグナル Rn 低温スペクトルで低スピニシグナルが現れる事は、蛋白のコンホーメーション変化の結果、ヘム鉄の第6配位座に「何らかの配位子」が近づき、ヘム鉄の電子状態に影響を与えたと思われる。恐らく、この配位子は、7E(64)ヒスチジン(遠位ヒスチジン)のイミダゾール-IV であろうと思われるが、他のアミノ酸残基の可能性も充分考えられる。

この蛋白のコンホーメーション変化は、カルボキシル基のエステル化によって、カルボキシル基とアミノ酸残基(例えは 3CD(45)アルギニン、3FG(97)ヒスチジン等)との間の塩結合が切れて、ヘム自身がアポ蛋白の中で比較的動きやすくなつた結果と考えられる。

Hb や西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horse Radish Peroxidase: HRPと略記)で、熱平衡の低スピニシグナルが観測されているが^(35, 36)、Hb や HRP では元来、ヘムがアポ蛋白の中で比較的動きやすいのではないか、それに対して Mb の場合は、比較的しっかりとヘムがアポ蛋白と結合しており、カルボキシル基とアミノ酸残基との間の塩結合を切る事によって蛋白のコンホーメーション変化が生じ、Hb のようにヘムがアポ蛋白の中で動きやすくなると考えられる。

又、本実験に於て、試料によって、高スピニンと低スピニンの量比が異なっていふ事が判ったが、これはジエステル-ヘムの中にはモエステル-ヘムが分離できずに入った為と考えられる。モエステル-ヘムの場合、プロト-ヘムの6,7 側鎖のどちらかがエステル化されて

いふ記述だから、カルボキシル基とアミノ酸残基との塩結合が残っており、ヘムはアポ蛋白中で、R-ジエステル-Mb の場合にはどう動かやすくはなく、したがってコンホーメーション変化も少なく、低スピニ状態も減るであろうと考えられる。この様な例は Asakura ⁽³⁷⁾ によて、4トロ-4C ペルオキシダーゼ (C.C.P. と略記する) においても見出されており、ヘムの6,7側鎖のカルボキシル基のうちの1個が残っていふ事は、ヘムとアポCCPとの結合の安定化に重要な役割をしていふと報告している。又 Tamura ⁽³⁸⁾ は、HRP において、6,7側鎖のカルボキシル基のうちの1個が残っている事は、HRPの酵素活性に重要で、R-ジエステル-HRPでは、本来ある酵素の種々の性質が失なわれる事を報告している。

本実験に於ては、モ-エステル-ヘムとジ-エステル-ヘムの分離、精製 R-ヘム、ヘムの6,7側鎖のいすれか、ヘム-アポ蛋白の安定化により重要なのか比較検討することはしていな^いが、いすれにせよ、Hb, Mb, CCP, HRP 等に於て、プロトヘムの側鎖のプロピオン酸基のカルボキシル基は、ヘムとアポ蛋白との結合の安定化に極めて重要な役割をなしていふことが判った。

そこで、ヘムの2,4側鎖を化学修飾した R-X-Y-Mb, R-テロ-ヘムの Fe³⁺の状態では、鉄の電子状態には何の影響もなく、Fe²⁺の状態では酸素分子等の配位子との反応性に大きな変化を与える事は前節で述べてきたが、ヘムの6,7側鎖をエステル化した場合、本節で述べた様に、Fe³⁺の状態では、鉄の電子状態に大きな変化がみられたが、Fe²⁺の状態では、酸素分子等の配位子との反応性については、プロト-Mbとほとんど変わらないという結果が報告されている⁽³⁹⁾。

そこで、Mb や Hb では生理的活性のある Fe²⁺の状態で、ヘムとアポ蛋白とのファンデルワールス接触 及び、ヘムの2,4側鎖のグイ=IV 基の二重結合の存在が酸素分子の反応性に充分影響しており、分子表面をいくつも化学修飾しても（分子の構造変化が生ずるが）酸素分子の反応性には大きな影響を与えないの

て"は な"かと考えられる。

本章においては、1つのサブユニット 即ち Mb の様な 单量体状態の蛋白質の中で、ヘムがどうにアホモジニティ 相互作用していふのかをみてきた。

ところが、Hbでは、分子が α 鎖2個 \times β 鎖2個との4個のサブユニットから構成されており、サブユニット間の相互作用で分子全体のコンホーメーションが変化する事が知られている。配位子の結合により、1つのサブユニットにおける大変化が、他のサブユニットのヘムの電子状態の変化としてとらえられるのがを主に EPR 測定を中心には次章で論ずる。

第二章 ヘモグロビン(Hb)の四次構造とヘムの電子状態 (一酸化窒素-Hb の場合)

2-1 緒言

Hb の示す酸素飽和過程における協同現象は多くの人々によって多くから研究されていく。この理解に関して Monod ら⁽⁴⁰⁾ のアロステリックモデルはあまりにも有名である。Perutz⁽⁴¹⁾ は X 線構造解析で、オキシ型(高親和性:R) 及び テオキシ型(低親和性:T) の 2 つの四次構造の間でサブユニット間の水素結合あるいは塩結合の大まな差異を見出し、アロステリックモデルに分子レベルでの説明を与えた。即ち、Hb のヘム間相互作用は、二のような四次構造の変化が酸素化に伴っておこることはよく生じる。我々は、このメカニズムを電子状態のレベルで理解する為、分子の四次構造を色々と変化させて、Hb の α 鎖及び β 鎖のヘム鉄の状態がどのように変化するかを研究した。

Fe^{2+} 高スピノン状態、即ち 酸素分子の配位していないテオキシ-Hb では、EPR は観測されてしまう。一方、酸素分子が配位したオキシ-Hb は反磁性である為、EPR 測定は不可能である。ここで、二つの方法で四次構造変化と活性中心の電子状態の変化の繋がりを研究した。

一つの方法は、 Fe^{2+} に対して、配位子が一酸化窒素(NO)である場合である。NO は不対電子が存在する事を利用して、 Fe^{2+} (低スピノン) に結合した NO ラジカルの EPR を観測する事から Hb の構造変化の影響をとらえる事ができる。

もう一つの方法は、 Fe^{3+} では、EPR 観測が可能な事より、バレンシー・ハイブリッド-Hb ($\alpha_2(Fe^{3+})\beta_2(Fe^{2+})$ 又は $\alpha_2(Fe^{2+})\beta_2(Fe^{3+})$) を作って、 Fe^{2+} のサブユニットをオキシ化 \rightleftharpoons テオキシ化することによって、一オートナーの Fe^{3+} のサブユニットのヘム鉄の EPR がどの様に影響するかを見る方法である。

本章における一酸化窒素-Hb の 4.2°K における EPR, 近赤外低温スペクトルの光解離実験より、一酸化窒素-Hb の八四の電子状態を論ずる。なお、本章の実験は、K. Nagai らとの共同実験である。⁽⁴²⁾ (本章では、一酸化窒素-Hb を NO-Hb と略記する。)

NO-Hb はアロステリックエフェクターである IHP (イノートル 6 リン酸) を加えると、4次構造が T 状態になる事が知られている。特に α 鎖は Soret 領域にスペクトルの変化が顕著に現われる⁽⁴³⁾。一方、Maxwell や Caughey は⁽⁴⁴⁾、IHP を加えた NO-Hb の赤外スペクトルを測定し、2つの N-H の伸縮振動が現われる事、そして、これらは 5 配位の NO-八四と 6 配位の NO-八四の伸縮振動に対応する事、又、IHP が無くても、6 配位の NO-八四の伸縮振動スペクトルだけが現われる事を示した。これらの実験事実より、IHP 存在下では、 α 鎖の NO-八四は恐らく 5 配位であると推測された。又、Szabo 及び Perutz⁽⁴⁵⁾は、NO-Hb と合成 NO-八四化合物の EPR を比較して、IHP 存在下の NO-Hb の EPR スペクトルは、5 配位及び 6 配位 NO-八四化合物の EPR スペクトルの和になっていることを示唆した。

更に、Henry 及び Banerjee⁽⁴⁶⁾は、 α 鎖 (Fe^{2+}) にだけ NO を結合させたハイドロキド-Hb で NO の EPR に対する β 鎖の影響を調べ、 β 鎖が低スピニン状態のときは、 α^{N0} は単離鎖の α^{N0} と同じスペクトルを示し、 β 鎖が高スピニン状態のときは、単離鎖の α^{N0} と異なる形の EPR スペクトルを与える事を示した。実験は室温及ぶ低温で行なわれた。そこで、彼らの実験を更に押し進めて、種々のハイドロキド-Hb 中の α^{N0} 又は β^{N0} の EPR スペクトルを、種々の測定条件で測定し、同時に、近赤外領域の吸収スペクトルの光解離実験との対応関係を明らかにし、4次構造との関係を議論する。

2-2 試料

2-2-1 種々の一酸化窒素-Hb (NO-Hb)

kilmartin S^(47, 48) の方法により、ヒト Hb 及び単離鎖を精製した。本実験に使用する Hb 誘導体は、実験の目的がアロステリックエフェクトである IHP の影響を問題とするので、脱塩カラムを通じて有機リン酸塩を除去した、いわゆる 脱塩 Hb 誘導体を出发物質とする。
オキシ Hb (O_2 -Hb) 又はオキシ型単離鎖 (ヘム当りの濃度へ 1mM) の溶液は 5L ピン中で脱気 $\rightarrow N_2$ 加入 …… を繰り返すにより、テオキシ Hb 又はテオキシ型単離鎖 にすることができる。

NO ガスは空気又は酸素に触れるごとに直ちに褐色の一酸化窒素 (NO_2) となる。又、 NO_2 はアルカリ水溶液と作用して、亜硝酸と、硝酸又はその塩となるので、NO ガスは 1N-KOH 溶液を通してから使用する。酸素が入らない N_2 ガス雰囲気下で、上記精製した NO ガスをテオキシ Hb 誘導体に結合させ、NO-Hb 誘導体を作る。NO-Hb 誘導体は空気又は酸素に触れるごとに変性し、沈殿が生ずるので、取扱いは N_2 ガス雰囲気で“行いねば”ならない。

溶液中に溶けているフリーの NO はラジカルであるので、EPR 測定に影響する危険性がある。又、NO-テオキシ・ハイブリッド Hb ($\alpha_2^{\text{NO}} \beta_2^{\text{テオキシ}}$ 又は $\alpha_2^{\text{テオキシ}} \beta_2^{\text{NO}}$) については、1つの単離鎖をテオキシ状態にしておき、パートナーの単離鎖を NO が配位した状態にしておき、各々当量ずつ混ぜて作った訳であるが、NO の Hb に対する親和性が非常に高いので、NO- 単離鎖溶液中のフリーの NO は充分に除去しておかねばならぬ。そこで、溶液中のフリーの NO は脱気 $\rightarrow N_2$ 加入 …… を繰り返す事により除去する。

又、NO-テオキシ・ハイブリッド Hb の合成は、 N_2 ガス雰囲気下、冰中で行い、四量体形成、NO がテオキシ鎖へ再結合する状態をチェックする為に、混合した時刻から、約 2 時間毎に EPR 試料管

1= 試料を注入し (N_2 加入零圧気で)、直ちに、液体窒素 ($77^\circ K$) で凍結させてから 液体ヘリウム 温度 ($4.2^\circ K$) での EPR 測定を行った。

2-2-2 -酸化窒-八4 (NO-八4) 化合物

Fe^{2+} ・プロト八4・ジメチルエステル-NO については、2.4 mgm の Fe^{3+} ・プロト八4・ジメチルエステル- Cl^- を 2 ml のトルエン 及び 3 ml のメタノールに溶かし、脱気して、溶存酸素を除去し、1N-KOH 溶液 1=通じた NO 加入を注入(約1時間 反応させると、 Fe^{3+} ・八4 が NO 1=より還元されて Fe^{2+} ・八4 1=在る。^(49, 50) ロータリーエバポレーターで溶液をとはし、1晩 真空ポンプで 111℃ 乾燥させる。
 Fe^{2+} ・プロト八4・ジメチルエステル-NO の粉体を脱気したトルエンに溶かし、EPR 調べ測定に使用する。

6配位の NO-八4 化合物については、上記溶液 1= 脱気 (た 1-MeIm 又は N-MeIm と略記) を加えると、6配位の Fe^{2+} ・プロト八4・ジメチルエステル-NO・(1-MeIm) が出来る。⁽⁴⁹⁾

$10^{-4} M$ の NO-プロト八4 を 3% SDS (Sodium dodecyl sulfate の略) 1=溶かし、凍結乾燥させ、粉体を脱気 (た 水 1=再び溶かし、1 mM/L 溶液にして、SDS 中の NO-プロト八4 試料とした。
又、SDS 中では、6配位の NO-八4 化合物は出来なかつた。

4配位の 八4 (Fe^{2+}) については、トルエン中 7"の Fe^{2+} -プロト八4・ジメチルエステル は、 Fe^{3+} ・プロト八4・ジメチルエステル- Cl^- 及び $[Cr(acac)_3]_2$ ($[Cr(acac)_3]_2$ とは bis(2,4-pentanedionato)-chromium (II) といふ二価クロム錯合物の方法⁽⁵¹⁾ (つまり合成した。) で還元したものを使用した。

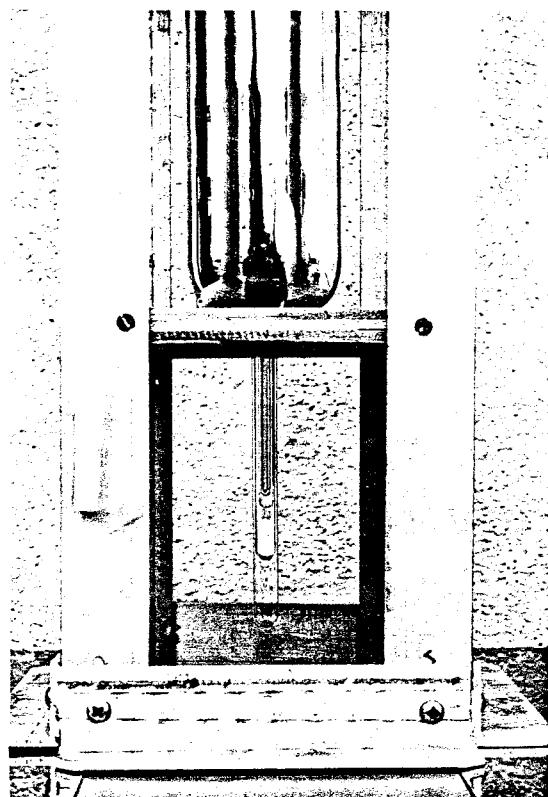
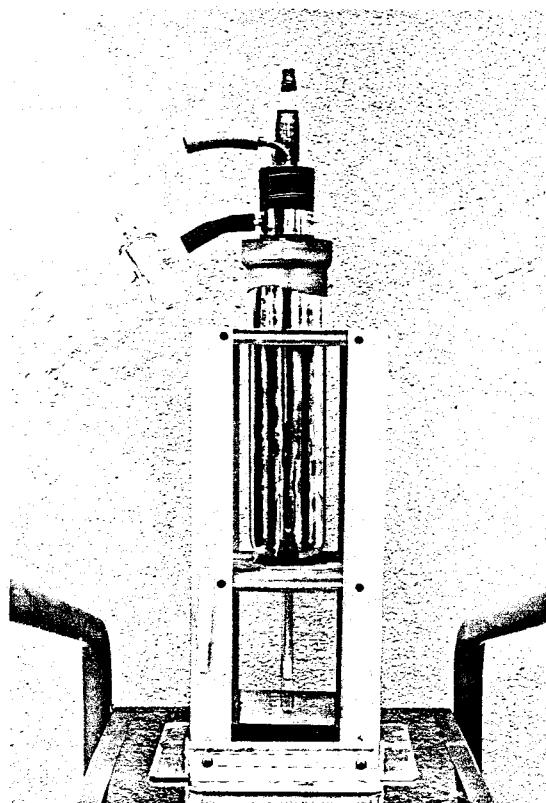
又、3% SDS 中での プロト・八4 (Fe^{2+}) は、プロト・ヘミン (Fe^{3+}) をメドロサルファイト ($Na_2S_2O_4$) で還元したものを使用した。

2-3 測定装置

低温スペクトルは島津 D-40DF-S 分光装置で、液体ヘリウム温度(4.2°K)で測定した。

EPRスペクトルは日本電子 JOEL-ME-ZX (X-バンド) を使用し、実験条件は、マイクロ波出力 5mW 、磁場変調幅 5 ギガス、 100kHz 変調で行い、測定は液体ヘリウム温度(4.2°K)及び液体窒素温度(77°K)で行った。

液体窒素温度では前章 図-3 で示した挿入型デュワー(一重)であるが、液体ヘリウム温度の測定では写真に示す様な挿入型二重デュワーを設計、作製した。



このデュワーは、使用 液体ヘリウム が、重さが 150ml 程度では重過ぎ、試料管のさしかえをしながら、約 5 時間の使用に耐えた。試料管は 0.1ml 以下の量でよく、スマイクロ波の立体回路の再調整をすることなく、試料管をとりかえた事が可能で、比較実験ができる。

光解離実験用の光源は、スライドフロシエッターの300ワット・ランプ・ステン・ランプを使用して、空洞共振器の光照射窓より照射した。光照射による試料の温度上昇はEPRスペクトルが変化しない（光解離（ま）試料について）事より認められ在った。

2-4 結果 及び考察

2-4-1 単離鎖 (α^{NO} , β^{NO}) の EPR

図-21 に単離 (α^{NO} 及び β^{NO}) の EPR を示す。測定は、 77°K 及び 4.2°K で行った。

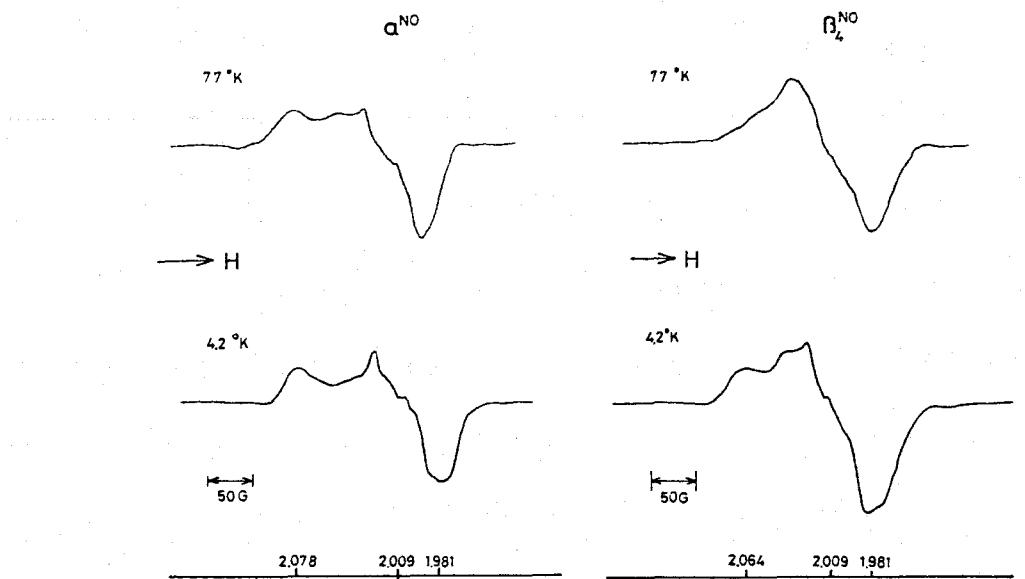


図-21 単離鎖 NO の EPR 温度変化

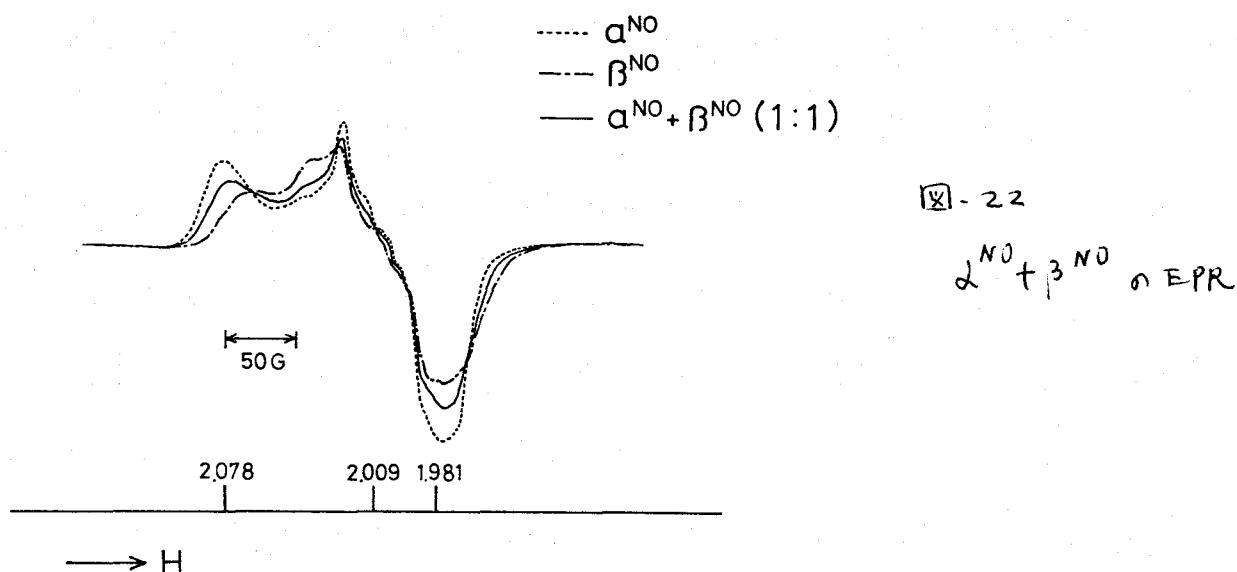
単離 α^{NO} の EPR スペクトルは、 δ 値の異方性が大きく、 77°K 及び 4.2°K で、この差異は認められ在り。一方、単離 β^{NO} の EPR スペクトルでは 4.2°K の方が δ の異方性が大きくなつてゐることが判る。このことは、ヘリウム配位にている NO の動きが、 α 鎖と β 鎖で異なる事を示してゐる。即ち、 α 鎖では、すべてに 77°K で NO の動きが、ガラス状態によつて束縛されてしまつてゐるのに對し、 β 鎖では 77°K で

また NO はある程度動く様に、Hb 周辺のグロビンの構造が出来ていると推論される。

$\gamma = 3.2$ 。IHP の存在しない状態で、NO-Hb の EPR スペクトルは α^{NO} と β^{NO} を 1:1 で混ぜ合わせた時のスペクトルと等しい。既に常温、27°C で示されてる⁽⁵²⁾。

$\gamma = 2$ 。同じ実験を 4.2°C で行った。図-22 が示す。

測定条件は、試料濃度 1mM/Hb、0.1 M ビス・トリス、pH 6.5 で。



ある（ビス・トリス：2,2-bis(hydroxy methyl)-2,2',2"-nitrile ethanol の略）図-22 の実線は $\alpha^{NO} + \beta^{NO}$ (1:1) を示す。同濃度の NO-Hb の EPR スペクトルと一致する。

したがって、4.2°C においても、IHP の存在しない状態では、NO-Hb の EPR スペクトルは α^{NO} と β^{NO} の和スペクトルとなる。

2-4-2 種々の NO-ハグリッド-Hb の EPR

図-23 は NO-Hb に IHP を入れた場合と、入れない場合の EPR スペクトルを示す。

IHP 存在下の NO-Hb (特徴的なことは、 $\delta = 2.009$ を中心とする 3 本の超微細構造(hfsと略記)を示すことである。⁽⁵³⁾)

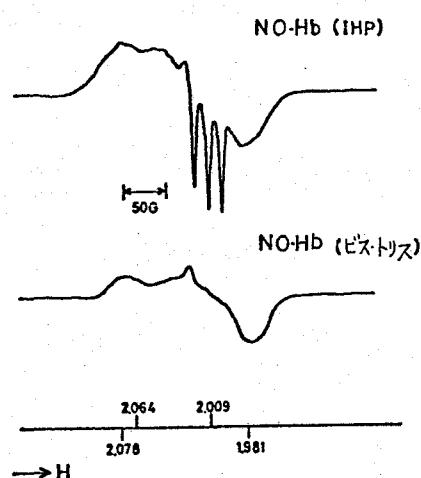


図-23 NO-Hb+IHP の EPR

この EPR スペクトルは、もはや単離 α^{NO} と β^{NO} の和では説明できないものである。Hb の構造が、IHP の存在によって、 α^{NO} と β^{NO} の構造から大きく変化した事を示してくれる。

それで、この 3 本のすうごい hfs をもつ EPRスペクトルは、 α 鎖からきてるものであろうか、 β 鎖からきてるものであろうか。

さて、次に種々の NO-ハグリッド-Hb の EPR を測定した。Perutz によると種々のハグリッド-Hb を考えた場合、スピニ状態が“高スピニのものほど”、又、IHP が入るか入らないものの方が“入るか入らないものより構造がより T 状態になるとみていい。したがって、 α 鎖に NO が配位していふ場合、 $\alpha_2^{NO}\beta_2^{デオキシ} + \text{IHP}$ の方が $\alpha_2^{NO}\beta_2^{デオキシ}$ (IHP なし) より構造が T 状態で、 $\alpha_2^{NO}\beta_2^{CN}$ でも IHP が入るか入らない T 状態になる。又、 β 鎖に NO が配位していふ場合は、 $\alpha_2^{デオキシ}\beta_2^{NO} + \text{IHP}$ が T 状態であると考えられている。

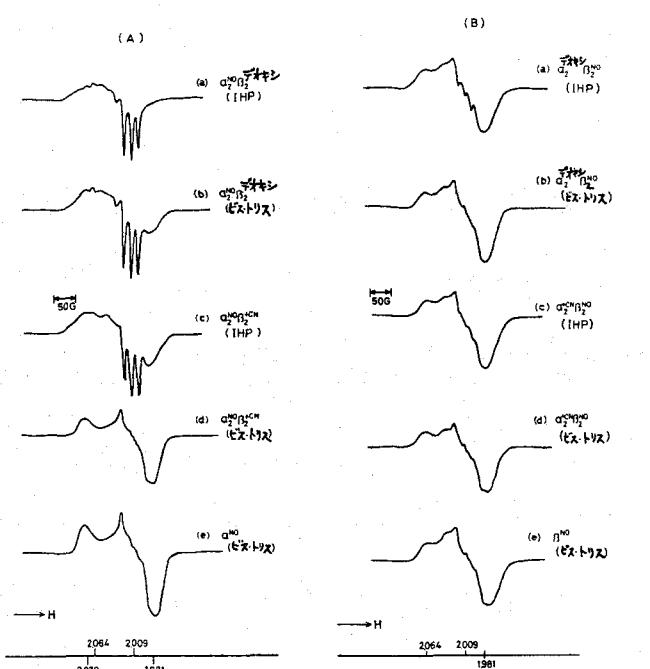


図-24 種々の NO-ハグリッド-Hb の EPR

種々の NO-ハグリッド-Hb の EPR を

図-24 に示す。図は上から下にかけて、R 状態が安定化される順に EPR スペクトルを並べた。

先づ、 α 鎖に NO が配位した場合であるが、IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{デオキシ}$ は最も強く T 状態の構造をとる。 $g = 2.009$ を中心に 3 本のすうごい hfs を示し、NO-Hb (+IHP) のときは α 鎖 + β 鎖 = $g = 1.981$ の分には全くみられない。

ビス・トリス中で^{テオキシ}の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+CN}$ (-IHP) 及び IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+CN}$ も $g=2.009$ を中心 ± 3 本の hfs を示すが、 $g=1.981$ の谷もみられる。 $\epsilon=3$ が、ビス・トリス中で^{テオキシ}の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+CN}$ は、単離 α^{NO} と全く同じで、3 本の hfs を示さない。

一方、 β 鎖 $\text{I}=\text{NO}$ が配位した場合、 α 鎖 $\text{I}=\text{NO}$ が配位した場合のようにには、ハートナーへへ4 の状態を変化させても、EPR スペクトルの変化が少ないことが判った。IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+NO}$ のみ、 $g=2.009$ を中心 \pm わずかの 3 本の hfs を示すのみで、他は全て、単離 β^{NO} のスペクトルと同じである。

$\epsilon=3$ 。Kon⁽⁵⁴⁾ 及び Wayland & Olson⁽⁴⁹⁾ は、5 配位の NO-へ4 モデル化合物の EPR を測定し、 $g=2.009$ を中心に、3 本のすこしい hfs をもつスペクトルを得た。又、彼らは、6 配位の NO-へ4 モデル化合物の EPR も測定し、 $g=1.981$ に谷のある 3 本の hfs をもたないスペクトルを得た。我々も同様な NO-へ4 化合物の 4.2°K での EPR 測定を行い、同じ結果を得た。

種々の NO-Hb の EPR スペクトルとの比較であるが、IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+NO}$ の EPR と 5 配位 NO-へ4 モデルの EPR が非常に良く似ていることより、この最も強く T 構造とするハイドロキド Hb の α 鎖の NO-へ4 は、5 配位であると推定される。又、6 配位 NO-へ4 モデルの EPR スペクトルとの比較より、ビス・トリス中で^{テオキシ}の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+CN}$ の様な R 構造とすると思われる Hb では 6 配位構造とすると思われる。

又、ビス・トリス中で^{テオキシ}の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+NO}$ や IHP 存在下での $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+CN}$ は 5 配位と 6 配位のへ4 の混りとして考えた。すなはち、 β 鎖 $\text{I}=\text{NO}$ の配位したものは、たゞ T 構造をとるが、たゞへ4 は 6 配位であると考へる。

2-4-3 種々の NO-Hb の光解離

液体ヘリウム温度 (4.2°K)において、NO-Hb では、配位子の

NO が光照射によつて、ヘム鉄から解離し、4.2°K で保つ限り、いつまでも、再結合しないことが知られている。⁽⁵⁵⁾

本節では、EPR 及び近赤外の低温スペクトルが配位子の光解離に伴つて、どの様な変化をするか、それが又、R=T の四次構造の平衡とどの様な関係にあるかを調べる。

図-25 は NO-Hb の EPR と近赤外の低温スペクトルの光照射による変化を示す。測定は、4.2°K で、0.1M ビス・トリス、pH 6.5 で、IHP は 2mM である。

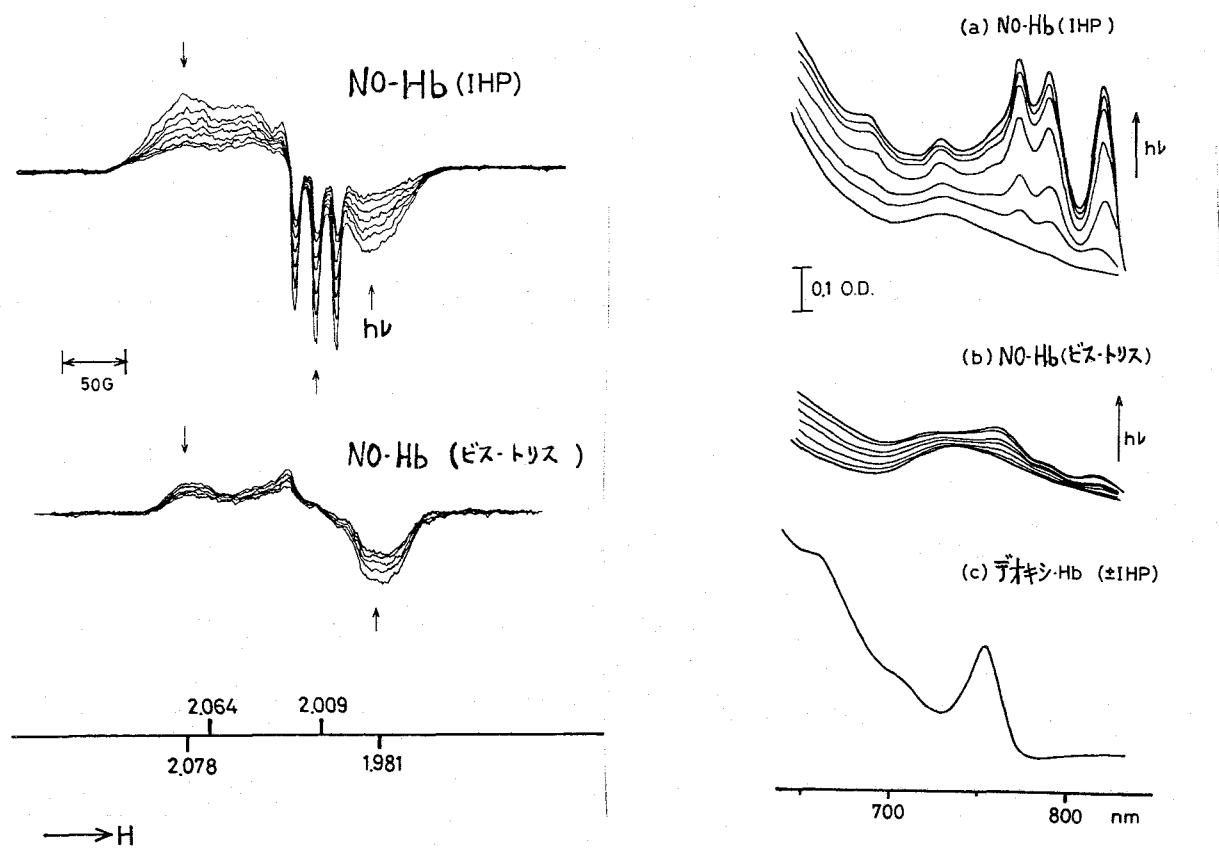


図-25 光解離 EPR スペクトル

光解離 低温スペクトル

IHP 存在下での低温スペクトルは光照射によつて、近赤外領域の 774, 790 nm, 820 nm に 3つのピーケーが現われる。

IHP の存在しない場合は、これら 3つのピーケーは、ほとんど見られないので、しかし、いずれも、一番下に示したデオキシ-Hb(±IHP) のピーケーとは全く異ったスペクトルである事が判る。

一方 EPR では、光照射によって、強度が減少していく。光照射を止めても、強度は回復しない。77°K に昇温した後、再び 42°K で測定すると強度は元に戻る。このことは、42°K に保たれている限り、NO の再結合は行なわれてない事を示す。本実験では 30 分程度の光照射で 50 ~ 70% の光解離が起り、その後はいくら光照射しても光解離しなかった。

このことは、光照射により NO は Hb から解離し、蛋白部分のとんどにトラップされるが、光照射してから間は、Hb は再結合しくくるものもあり、NO の解離と再結合の平衡をみていくことになる。光照射をやめると、再結合はおこらず、蛋白部分にトラップされた分だけ EPR 強度が小さくなると考えられる。

又、光解離した NO ラジカルの EPR を 0 ~ 5000 ガウスの間で

見い出す事は出来なかった。

一方、NO 加入を水に溶かし、低温の EPR を試みたが、EPR 信号は観測されない事から、光解離した NO ラジカルの EPR は、観測されないと思われる。

さて、IHP 存在下の NO-Hb の EPR は 3 本の hfs を示し、T 構造をも認めるが、近赤外領域に現われた光解離型吸収スペクトルと何ら関係があるのか、種々の NO-リガンド-Hb について比較検討する。

図-26 は種々の NO-リガンド-Hb の NO を光で解離した時の近赤外領域

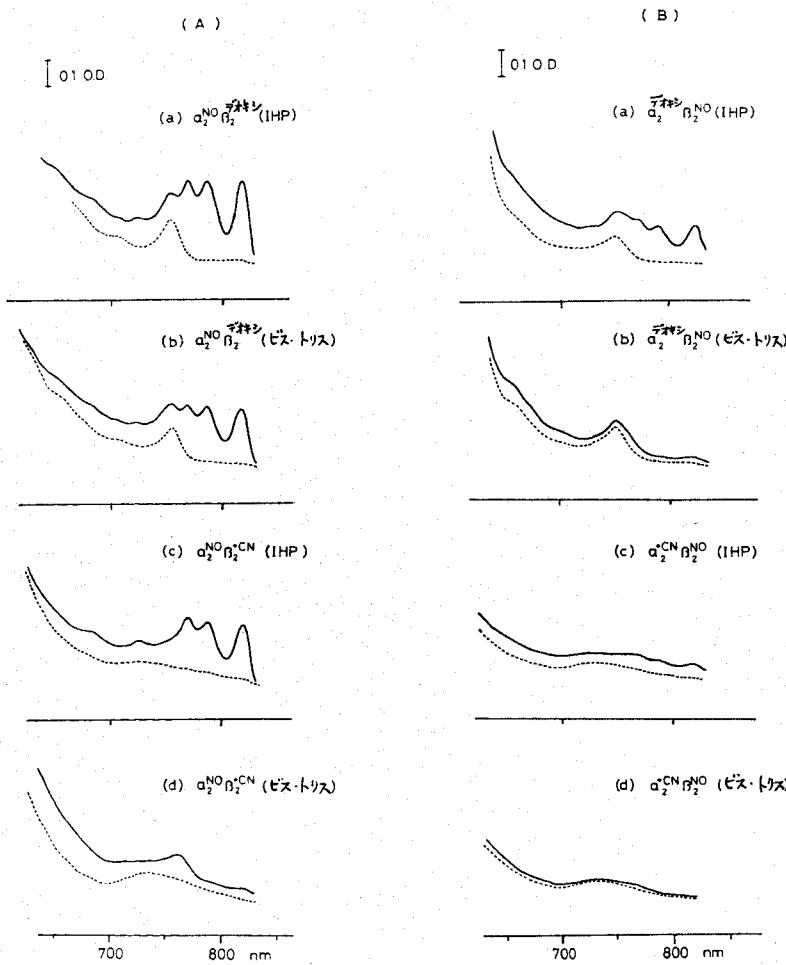


図-26 種々の NO-リガンド-Hb の低温スペクトル
(実線は光照射した後のスペクトルを示す)

の低温スペクトルである。図-24 の EPR の場合と同様に、上から下にかけて、R状態が安定化される順に吸収スペクトルを並べてある。IHP があるても、なくてても、 $\alpha_2^{NO}\beta_2^{\text{テオキシ}}$ の光解離吸収スペクトルと IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{+CN}$ の光解離吸収スペクトルは、いずれも 774, 790, 820 nm に特徴的な 3つのピークを示す。これら 3種の NO-ハグリッド-Hb は EPR 測定では、すなはち 3本の hfs を示したものである。

一方、IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{\text{テオキシ}}$ の光解離吸収スペクトルは、非常に弱い吸収であるが、 α^{NO} -ハグリッドの光解離吸収スペクトルと同様なピークがみられ、これは、EPR の、わずかな 3本の hfs に対応している。

この他の NO-ハグリッド-Hb の光解離吸収スペクトルの変化是非常に小さかった。しかし、近赤外の吸収スペクトルが変化しないのは、光解離がおこって「ないからで」はない。実際に、EPR 測定から、これらの NO-ハグリッド-Hb は光照射によって、50~70% の光解離がおこる事が確認された。

以上の結果をまとめると、NO-ハグリッド-Hb の四次構造が丁状態をとる。EPR スペクトルでは、3本のすなはち hfs を示す事、又、これらの NO-ハグリッド-Hb は光照射すると、近赤外領域での吸収スペクトルは、774, 790, 820 nm に特徴的なピークを示す事、これらの特徴は人鎖の NO-ヘムに強く現われる事が判った。

2-4-4 5配位 NO-ヘムモデル物質の光解離

NO-ヘムモデル物質 1=7112. EPR、低温スペクトルの光解離実験を行った。

図-27 1= IHP 存在下の $\alpha_2^{NO}\beta_2^{\text{テオキシ}}$ と、NO-プロトヘムを 3% SDS 溶液に溶かしたもののが EPR の光解離を示した。

前述したように、NO-ハイドロキド-Hbでは、 -2°C を保つ限り、NOの再結合はみられず、50～70%程度解離した状態で“飽和”してしまい、それ以上の光解離はないらしい。

$\gamma = 3\text{カ}^{\circ}$ 、3% SDS中のNO-プロトヘ4では、光照射した時のNOが解離し、光照射を止めると、再結合が起り、元のEPRスペクトルに戻ってしまう。しかも、照射光が強くすればほどNOの解離が増大することが判った。

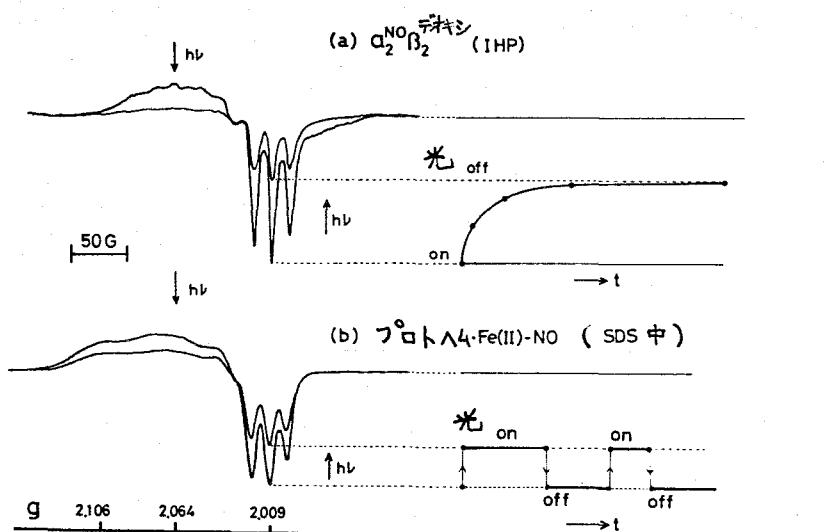


図-27. NO-H4モデルの光解離(EPR)
(NO-ハイドロキド-Hb光解離と比較して示した)

この結果は、蛋白部分が、ヘムから解離した配位子をトラップする役割をしていることを示唆している。

さて、5配位のヘムからNOが解離(たとえれば、ヘムは4配位にならざるを得ないのが自然であるが)はたいて、光解離型は4配位なのであるが、4配位のヘムモデル化合物の近赤外領域のスペクトルと比較検討した。

図-28 は、IHP存在下の $d_2^{NO}B_2 + CN^-$ と3% SDS中のNO-プロトヘ4の光解離型と、3% SDS中のプロトヘ4(Fe^{2+})の吸收

スペクトルを示した。

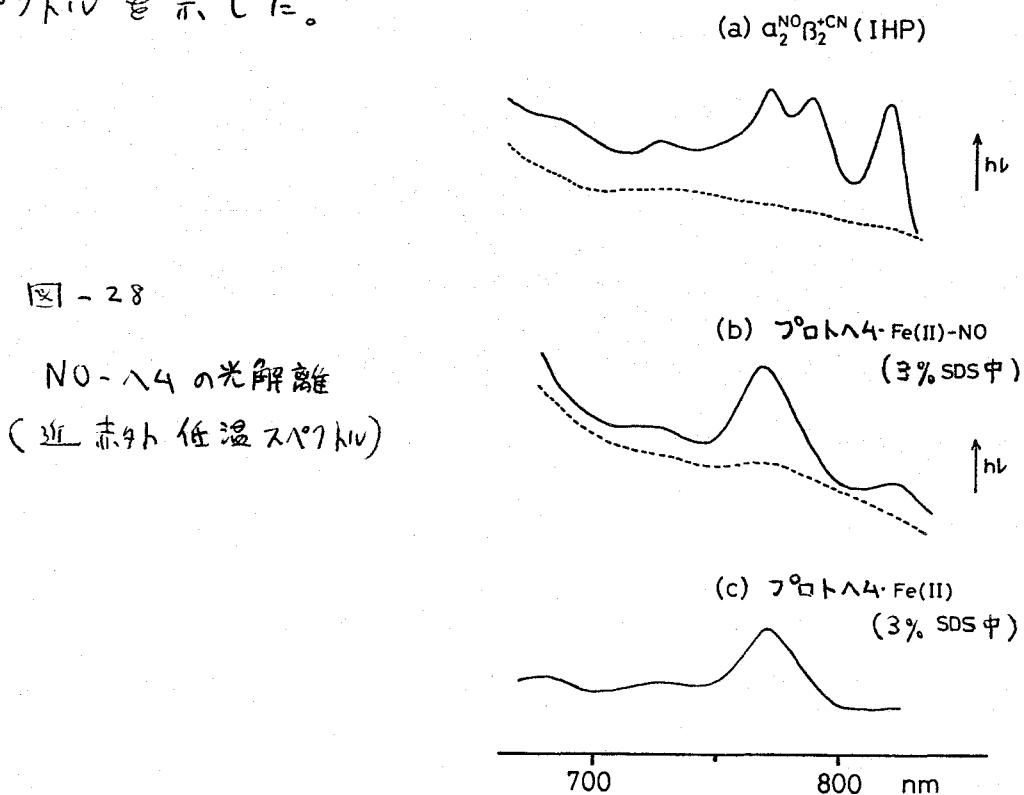


図 - 28

NO-Hb の光解離
(近赤外 低温スペクトル)

NO-プロトペルの光解離型は 770 nm に吸収が現れるが、この吸収は光照射を止めても、42 °Cでは元の吸収スペクトルに戻らない事より EPR の結果と対応するものがどうかは疑わしい。
光照射しながら、低温スペクトルを測定する事は装置的に無理である。

3% SDS 中のプロトペル (Fe^{2+}) は 4 配位のペルであると思われているが、T 状態の NO-Hb の光解離型吸収スペクトルの様に近赤外領域に特徴的な 3 本のビーグーを示さない。一方、ベンゼン中の Fe^{2+} -テトラフェニル・ポルフィリン ($Fe^{2+}\cdot TPP$ を略記) は 4 配位で、近赤外領域に 3 本の吸収をもつことが報告されている⁽⁵⁶⁾が、 $Fe^{2+}\cdot TPP$ とプロトペルではポルフィリンの骨格も異なり、又、溶媒も異なるので単純に比較はできない。

したがって、T 状態の NO-Hb のメタノール溶液の NO-Hb は 5 配位と思われるが、NO が光解離したときメタノール溶液の NO-Hb は 4 配位になっているのか、モデル物質とのスペクトルの類似性からは、はっきりさせた事が出来なかった。

第三章 ヘモグロビン(Hb)の四次構造とヘムの電子状態 (酸化型・Hb の場合)

3-1 緒言

前章でも論じた様に、Hbのヘム間相互作用は、配位子の親和性の高いオキシ型の構造をとるR状態と、親和性の低いデオキシ型の構造をとるT状態との間の構造変化によって引きおこされると理解されていく。

Perutz は⁽⁵⁷⁾これらの2つの4次構造の間の構造変化のメカニズムは、主に、ヘムのポルフィリン環から鉄原子が“とれただけ”とび出していかないように支配されたと説明した。即ち、配位子の結合したヘムでは、 Fe^{2+} 低スピノン状態で、この鉄のイオン半径では鉄原子はポルフィリン環の面内にある。デオキシ型では、高スピノン状態で、鉄のイオン半径が大きくなり、鉄原子はポルフィリン環の面内にあさまらず、近位ヒスチジン側へ0.75 Åずれていく。

酸化型Hbでも、 Fe^{3+} 低スピノン状態では鉄原子は面内にあり、高スピノン状態では0.4 Å近位ヒスチジン側へとび出していく。

デオキシ型では酸素が結合すると、鉄のイオン半径の変化によりポルフィリン環と近位ヒスチジンの属するF-ヘリックスとの距離が近くなり、蛋白の構造変化を引きおこすと考えられている。

又、Perutz^(58, 59)は紫外吸収、CD、 β_{93} SH基の反応性等の実験から、高スピノン状態の酸化型HbはアロステリックエフェクターであるIHPを加えると構造がRからTへ変化すると報告している。

ところで、アロステリック効果の典型として興味の中心となつてゐるヘム間相互作用は、四量体のサブユニットのいくつかに配位子が結合した場合、他のサブユニットの配位子の親和性が高くなるとして理解されている。ヘムが他のサブユニットから受けた影響を検出す多くの実験が報告されている。

Banerjee ⁽⁶⁰⁾ は、 $\alpha_2\beta_2$ の一方のサブユニットを酸化型にした四量体、いわゆる バレンシーハイドロ・Hb の酸素平衡を測定した。 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+})$, $\alpha_2(\text{Fe}^{3+})\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ (各々 $\alpha_2\beta_2^+$, $\alpha_2^+\beta_2$ と略記する) 共に、親和性は Hb と単離鎖との中間にあるが、 $\alpha_2^+\beta_2$ の方が少く親和性が高くなることを示した。彼らは、さらに 77°K での EPR 測定を行 ⁽⁶¹⁾、高 pH で酸化型が低スピノンになり易い条件 ($\sim \text{pH } 10$) では、 $\alpha_2^+\beta_2$ の β -ヘムがデオキシ型（高スピノン状態） $t_{1/2}$ と $g = 6$ 附近にプロードな吸収があらわれる事、又、 β -ヘムがオキシ型（低スピノン状態） $t_{1/2}$ とプロードな吸収はあらわれない事、逆に、 $\alpha_2\beta_2^+$ では α -ヘムがデオキシ型、オキシ型いずれの場合でもプロードな吸収はあらわれない事を報告している。この実験は、高 pH においても、 < 1 少量残った H_2O の配位したヘムからのシグナルのみをみており、還元鎖(Fe^{2+})のスピノン状態に対する可逆性が明確には示されていない等、難点が多い。そこで、ヘム間相互作用のメカニズムと電子状態のレベルで整理解する為に、Banerjee らと同様に、酸化型 高スピノンの EPR に着目して、酸化型 Hb 及び バレンシーハイドロ・Hb の EPR スペクトルが種々の条件下で、還元鎖の酸素化に伴てどの様な変化をするか 液体ヘリウム温度 (4.2°K) で測定した。

さらに、天然に存在するバレンシーハイドロ・Hb、いわゆる異常 Hb M についても議論する。

3-2 バレンシーハイドロ・Hb の EPR ⁽⁶²⁾

3-2-1 酸素平衡曲線の結果

Nagai ⁽⁶³⁾ は、種々の条件下でバレンシーハイドロ・Hb の酸素平衡曲線を測定した。pH 7.4, IHP の存在下での Hill の n 値が $\alpha_2^+\beta_2$ では 1.38, $\alpha_2\beta_2^+$ では 1.74 であった。 n が大きいほどより、上記条件下では $\alpha_2^+\beta_2^{\text{オキシ}}$, $\alpha_2^{\text{オキシ}}\beta_2^+$ は R 型に近い構

造をもつ。 $\alpha_2^+ \beta_2$ テオキシ, $\alpha_2^- \beta_2^+$ は T 型に近い構造をとると考えられる。

EPR 測定に使用した試料は Nagai⁽⁶³⁾ によって精製された試料である。

3-2-2 T 状態の Fe^{3+} 高スピノンの EPR スペクトル

本章では Fe^{3+} 高スピノンに特有な $g \sim 6$ の EPR スペクトルに着目する。

図-29 は 液体窒素温度 (77°K) と 液体ヘリウム温度 (4.2°K) での EPR スペクトルの線幅のちがいを示す。

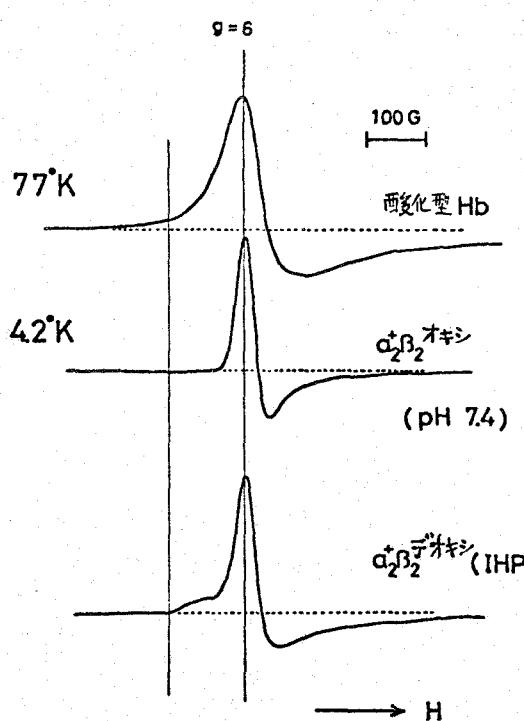


図-29 線幅の温度変化

一番上が 77°K での酸化型 Hb。
真中が 4.2°K での $\alpha_2^+ \beta_2$ オキシ
(酸化型 Hb と同じと見てよい)
の $g \sim 6$ 附近の EPR スペクトル
である。

77°K の測定にくらべ、 4.2°K では、エネルギー準位のゆらぎが
小さくなる為、EPR の線幅が
非常にせまくなっている。

特に、シグナルのたどりがり(低
磁場側)が非常にすくなく
あるので、図の一番下の様に、
線幅の微妙な変化を論ずる
場合に非常に有利になる。

今までの 77°K での測定では、
変化がシグナルの線幅にかくれてしまっていた為に、以下に論ず
るような変化をとらえる事が出来ない、たと思われる。

さて、図-30 (= pH 7.4, IHP 存在下での EPR スペクトル) を示す。
還元鉄(Fe^{2+}) をテオキシ化した場合、図中の矢印で示した
様に、通常の $g \sim 6$ の EPR スペクトルの他に、 $g \sim 6$ 附近に非常

にブロードなEPRスペクトルが現われる。還元鎖をオキシ化するとこのブロードなEPRスペクトルは消えて、通常の Fe^{3+} ・高スピニのEPRスペクトルを示す。

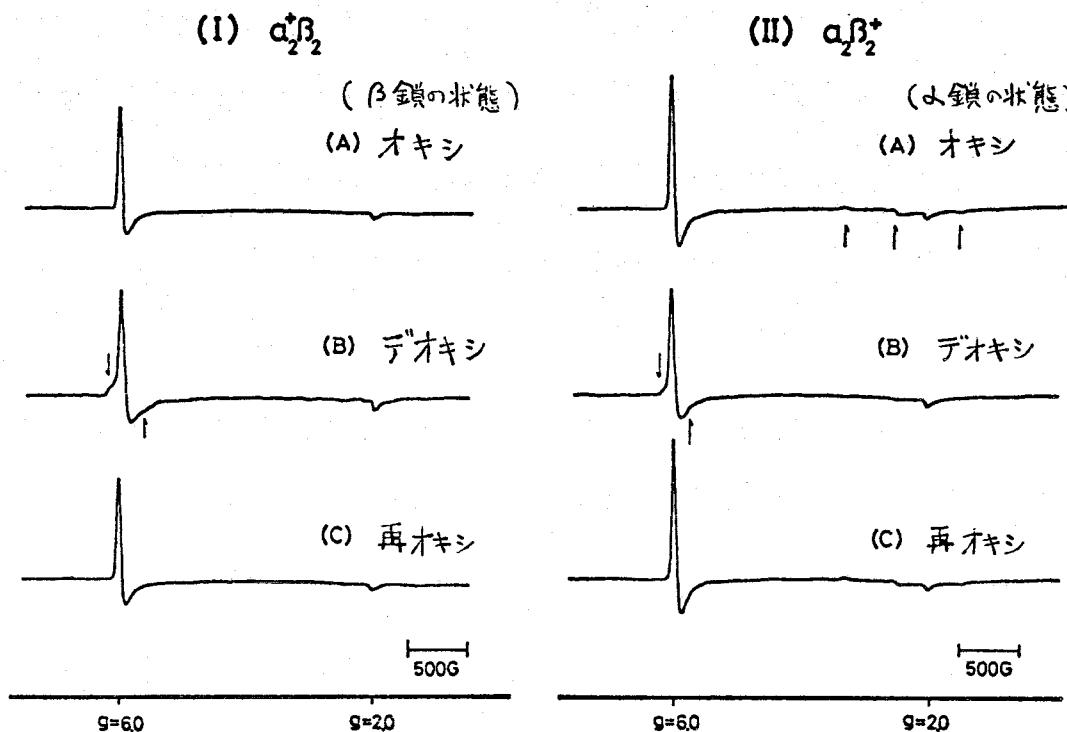


図-30 種々のバレンシー II-ヘリコッド-Hb の EPR
(pH 7.4, IHP 存在下, 4.2°K)

この化反向は $\alpha_2^+ \beta_2$, $\alpha_2 \beta_2^+$ 両ヘリコッド Hb において見られるが。
 $\alpha_2^+ \beta_2$ の変化の方が $\alpha_2 \beta_2^+$ の変化より大きい。これは、α鎖のヘムの電子状態が、パートナーのβ鎖の変化の影響をより強く受けると思われる。

図-31は $g \sim 6$ 附近の変化を拡大して示したものである。実線は還元鎖がデオキシ状態であるとき、実線はオキシ状態であることを示す。この様に Hb の構造がオキシ型の R 状態からデオキシ型の T 状態へ転移する。 Fe^{3+} ヘムの EPR は $g \sim 6$ が“ブロード”になり、通常の $g=6$ の EPRスペクトルの他に、ヘム面内の異方性の大きさ、もう 1 つの成分が混ってくる事が判った。さて、図-31 の 1 番下は、酸化型 Hb に IHP を入れた場合(実線)と

入れない場合(点線)のEPRスペクトルを示す。

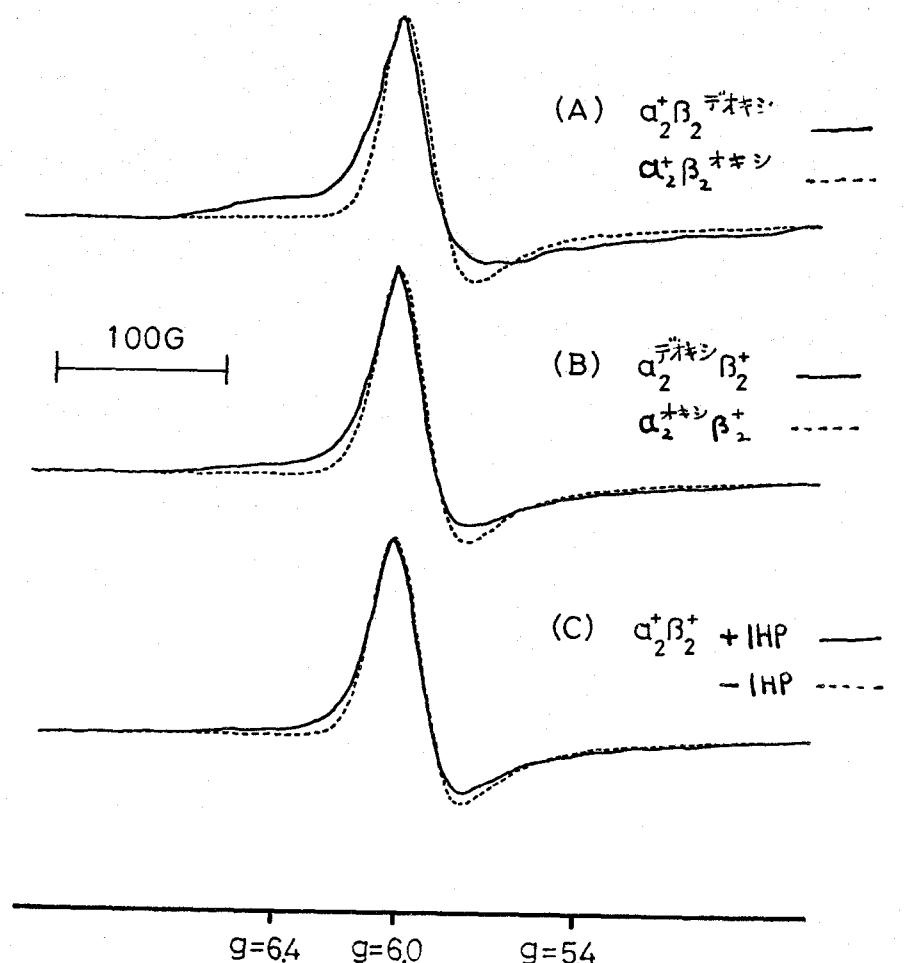


図-31

バレンシー・ハイツード
Hb の EPR
($g \sim 6$ 附近)
PH 7.4
4.2°K
(A, B は IHP
存在下)

実線で示した IHP が入っている方では、 $g \sim 6$ 附近に異方性の大きな T 状態を示す EPR スペクトルがみられる。一方、点線で示した IHP の入っていない場合は、通常の EPR スペクトルを示した。

図-32 に酸化型 Hb の全体の EPR スペクトルを示す。

IHP が存在しないときのみられた OH⁻ 型の低スピノンの EPR スペクトル(矢印)が、IHP 存在下ではみられず、IHP 存在下の方がより高スピノン状態である事を示している。以上から酸化型 Hb は、IHP の存在しないときは R 型の四次構造をとり、IHP の存在下では T 型の四次構造をとるとする Perutz の説を EPR からも支持した事になる。

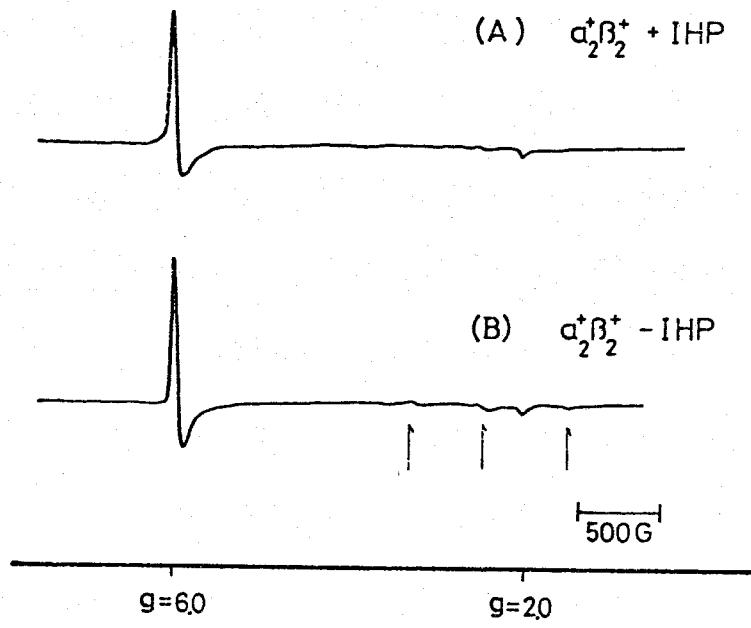


図 - 32

酸化型 $\text{Hb}(\alpha_2^+\beta_2^+) \pm \text{IHP}$

の EPR

pH 7.4

0.05 M ピーストリス

0.1 M α^-

(2 mM IHP)

又、IHP の存在下で、 $\alpha_2^{+F}\beta_2$, $\alpha_2^{+N_3^-}\beta_2$ 等についても還元鎖をオキシ状態にしたり、デオキシ状態にしたり変化させたが、 Fe^{3+} EPR 信号の線幅の変化あるいは g 値のシフトは全く見られなかつた。何故変化しないのかの理由は不明である。

3-3 異常 Hb M の EPR

ヒトの Hb の中には異常 Hb とよばれるものが存在する。即ち遺伝子に何らかの異常が起り、普通は α 鎌が β 鎌のアミノ酸の 1 個が他のアミノ酸にかわしたもので、異常 Hb の種類によれば様々な症状を示す。異常 Hb は天然に存在する「化学修飾」された Hb としてよく研究されてゐる。異常 Hb のなかで、異常 Hb M とよばれるものがあるが、これはアミノ酸置換の結果、 α 鎌又は β 鎌のヘムの鉄が 3 倍になつたといわれる天然に存在するハーレンシーハゲリ Hb である。

M は現在 5 種類知られてゐる。 α 鎌異常のものは遠位ヒスチジンがタロシンになつた為、 Fe^{3+} へ 4 になつた M_{Boston} 及び近位ヒスチジンがタロシンになつた M_{Iwate} がある。

β 鎌異常のものは、遠位ヒスチジンがタロシンになつた $\text{M}_{\text{Saskatoon}}$ 、近位ヒスチジンがタロシンになつた $\text{M}_{\text{Hyde Park}}$ 及び遠位ヒスチジン近くの $\text{Hb}(\text{Glu.})$ Val. (バリン) が Glu. (グルタミン酸) になつた $\text{M}_{\text{Milwaukee-1}}$ がある。

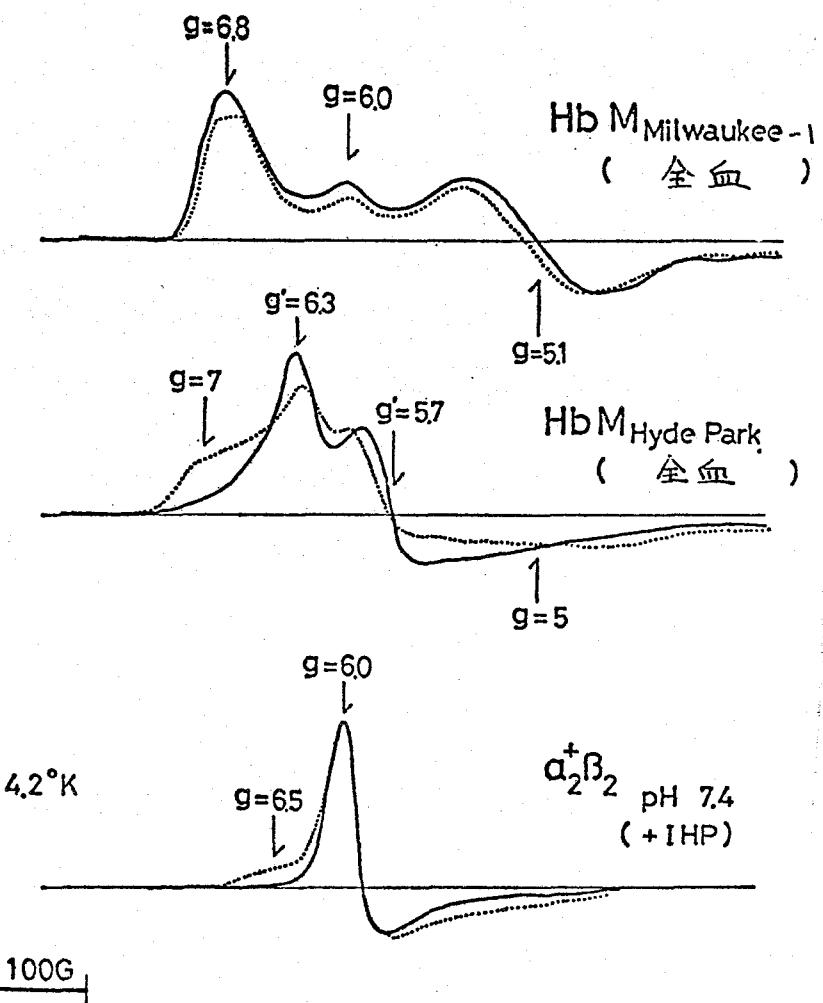


図-33

Hb M (全血) の EPR

(— 正常鎖 オキシ
- - - 正常鎖 デオキシ

図-33 1- $M_{Milwaukee-1}$, $M_{Hyde Park}$ の全血の $g \sim 6$ 附近の EPR スペクトルを示す。

特に $M_{Hyde Park}$ 1- では正常鎖(Fe^{2+})のメ鎖をデオキシ化すると、 $g \sim 6$ 附近に異方性の大きなブロードなシグナル ($g_1=7$, $g_2=5$) が現われる事はすでに液体窒素温度(77K)での測定が報告されている。⁽⁶⁴⁾ 今回、液体ヘリウム温度(4.2K)で同じ測定を行ったが、線幅の変化は認められなく、液体窒素温度での結果と全く同じであった。

デオキシ- $M_{Hyde Park}$ の異方性の大きなシグナルの出現は、図-33の一一番下に示した IHP 存在下の バレンシー-ハイドロ-Hb での変化と非常によく似ているが、この様に正常鎖のデオキシ化により、異方性の大きなスペクトルが出現するとの原因が何であるか明確でない。

$\chi = 3.2$ 。今まで $I = M_{Hyde\ Park}$ 以外で、正常鎖をオキシ状態から、デオキシ状態へ、又は、その逆の変化をさせたとき、EPRスペクトルが変化したという例は報告されていないが、 42°K で、種々の条件下 EPR を測定すると、いずれの HbM においても正常鎖の影響が異常鎖の EPR スペクトルに影響する事が明らかとなつた。

本実験で使用した HbM は、 $M_{Hyde\ Park}$, $M_{Milwaukee-1}$ と M_{Boston} である。試料は、大阪大学 医学部 第三内科 林昭先生より提供されたもの。 $M_{Milwaukee-1}$ については Hayashi⁽⁶⁵⁾ の方法により精製したものを使用した。

3-3-1 $\text{HbM}_{Milwaukee-1}$ ($\text{Hb}(\beta 67) \text{Val} \rightarrow \text{Glu.}$)

図-33. 1番上は $\text{HbM}_{Milwaukee-1}$ の全血の EPR スペクトルである。特徴的なことは、 $g=6$ のシグナルともう一つ、 $g_1 = 6.8$, $g_2 = 5.1$ という異方性の大きな成分の混りであることが判る。

又、全血の状態で $\text{HbM}_{Milwaukee-1}$ の α 正常鎖をオキシ状態（実線）にすると、 β 異常鎖の異方性はより大きくなっている。この変化は、 $\text{HbM}_{Hyde\ Park}$ とは逆の変化である（図-33 の真中の図）。

そこで、次に、精製（た $\text{HbM}_{Milwaukee-1}$ について種々の条件下で、EPR を測定した。図-34 に示す。

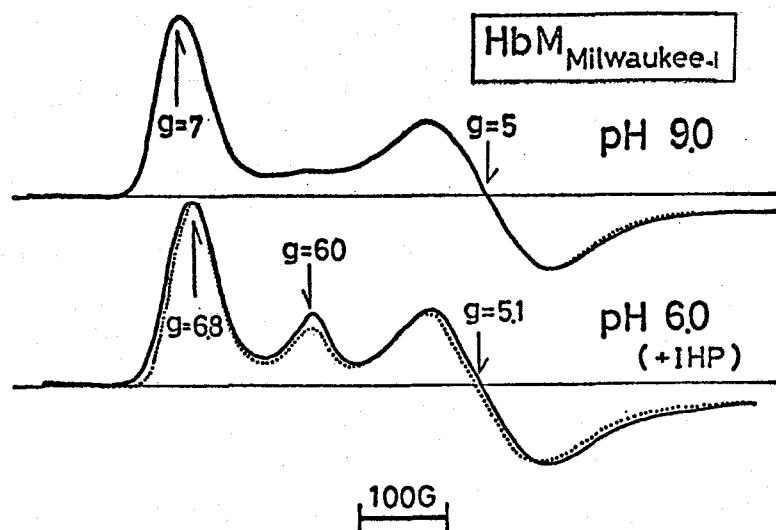


図-34

 $\text{HbM}_{Milwaukee-1}$ EPR

— 正常鎖 オキシ
- - - - 正常鎖 デオキシ

先づ、PH 9.0 (0.05M トリス, 0.1M Cl^-) にすると、正常鎖をオキシ状態、あるいは デオキシ状態にしても、異常鎖の EPR スペクトルは変化しないが、全血の場合との大きさを違ひは、 $g = 6.0$ の EPR シグナルが消えてしまい、 $g_1 = 6.8$, $g_2 = 5.1$ の異方性の大きなシグナルが、より異方性の大きい $g'_1 = 7$, $g'_2 = 5$ のシグナルに変化している事である。

次に、PH 6.0 (0.05M ピス-トリス, 0.1M Cl^- , $\pm 2\text{mM IHP}$) では、正常鎖をオキシ状態にすると、 $g = 6.8$ の異方性が大きくなる。又、IHP を加えた場合と 加えない場合は、 $g = 6.0$ のシグナルが IHP 存在下で少し ブロードになり、正常鎖が デオキシ状態の方がよりブロードになる傾向を示した。この傾向は、 $g = 6.0$ のシグナルのすきが $g_1 = 6.8$ の異方性の大きさをシグナルにかくれてはっきりしないが、前節でのバレンシー・ハイツップ-Hb での変化と類似した変化と思われる。又、PH 7.4 で同じ測定を行ったが、PH 6.0 の場合ほど変化はしなかった。

ところで、HbM の中で、HbM Milwaukee-1 の g の異方性は、特別に大きい。第一章で述べたように、 Fe^{3+} ・高スピノンの八面体内の g 値は、異方性の大きい場合 $g_{\perp} = 6 \pm 24\text{E/D}$ で、あらわす事が出来た。HbM Milwaukee-1 の場合、 $g'_1 = 7$, $g'_2 = 5$ となり、異方性の大きさを示す E/D は 0.042 程度となり、 $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})\text{H}_2\text{O}$ 等に比べると異方性がずい分大きくなる。

さて、E/D の値を大きくしてるのは、E の項が大きい為であろうか、それとも D の項が小さくなつた為であろうか。もし、E 項は HbM の種類によって、それほど大きさが変化しないものであり、D 項のみが配位子の結合の仕方等によって変化するものと仮定するならば、HbM Milwaukee-1 のように g 値の異方性の大きなものでは、D の値がずい分小さくなると考えられる。

したがって、高磁場において、磁場を Z 方向(八面に垂直方向)にかければ、 $S_z = -\frac{3}{2}$ の状態と $S_z = -\frac{1}{2}$ の状態の間

に、遷移確率があり、EPR が観測されるはずである。

そこで、超伝導磁石を使って、K-バンド (24 GHz) 周波数で、0 ～ 60 K ガウスまで 磁場掃引したが、シグナルをとらえることは成功しなかった。もう少し、シグナルが観測されないからといって、「D が小さくなる」という仮定を否定はできない。

遷移確率の小さい事により、測定困難という事も考えられ、単結晶を用いた実験が期待される。

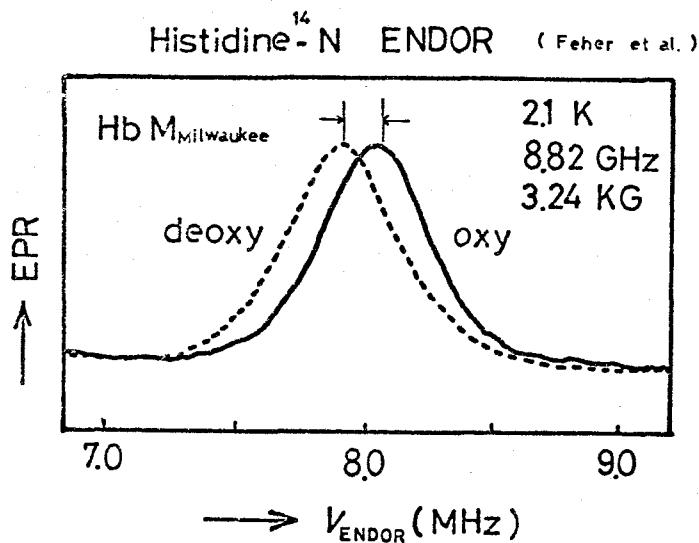


図-35 Hb M Milwaukee-1 の ENDOR

図-35 は Feher ら (66) によって行なわれた Hb M Milwaukee-1 の異常鎖 (β 鎖) の近位ヒスチジンの ¹⁴N に対する ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance 核=重共鳴の略。) の結果を示した。
正常鎖をオキシ状態あるいはデオキシ状態にする事によると、異常鎖の鉄と近位ヒスチジンとの相互作用がわずかに変化している事を示している。

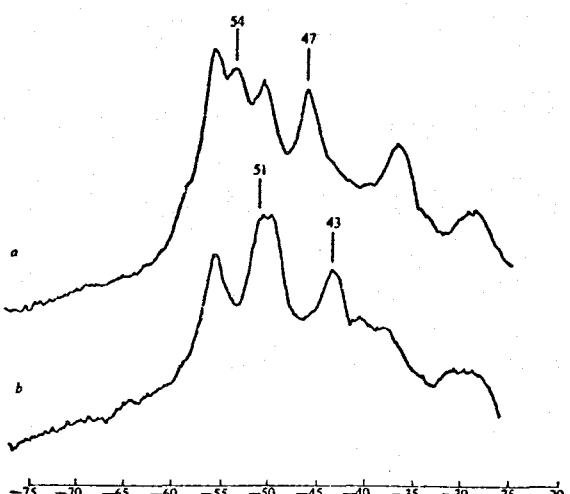
図-36

Hb M Milwaukee-1 の NMR

(a) デオキシ Hb M Mil.

(b) 一酸化炭素 Hb M Mil
(CO)

0.1 M リン酸緩衝液
pD 7.0, 31°C



(Lindstrom et al.)

又、Lindstrom S⁽⁶⁷⁾ は、Hb M Milwaukee-1 の NMR を測定し、正常鎖に配位子を結合させると、異常鎖 β ヘムプロトンの磁場性シフトが減少する事を報告している。これを図-36 1 示しておくる。

又、Perutz M⁽⁶⁸⁾ は、正常鎖に一酸化炭素を結合させると、異常鎖 β ヘムの可視スペクトルが変化する事を報告している。

これらの変化は、全て、正常鎖のヘムの変化が Hb の四次構造に変化を与える、その影響が、異常鎖のヘムにあわれた事を示している。

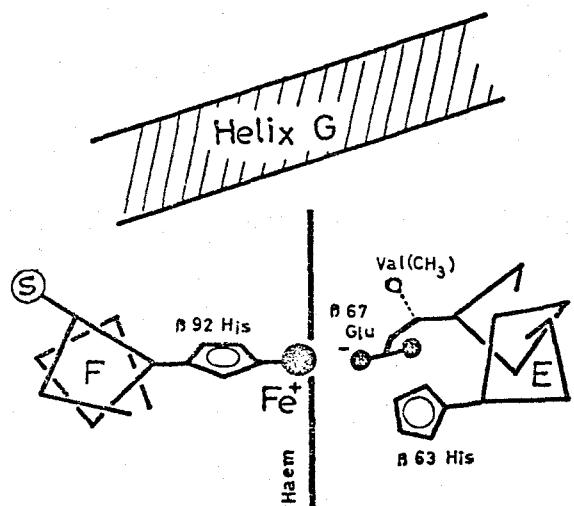


図-37 Hb M Milwaukee-1 (M.F.Perutz)

さて、図-37 は、Hb M Milwaukee-1 のヘム周辺を示したものである。X線結晶解析、ENDORの結果より、 β ヘムは近位ヒスチジンが配位していると思われる。ヒスチジンが配位していないなければ、¹⁴N の ENDOR は観測されない（例えは、Hb M Hyde Park ではタロシンが配位しているので ¹⁴N の ENDOR は出ない事が報告されている）。

又、 β 67 のグルタミン酸の $-COO^-$ が ヘム鉄の近傍にきている事をやがていい。

EPR 測定では、 $g=6.0$ のシグナル、 $g_1 \sim 7, g_2 \sim 5$ のシグナルの2種類が観測されている。

それは、 $g=6$ のシグナルを与えるのは、Glu. が配位していないもしくは、 Fe^{3+} との相互作用が弱い場合であり、異方性の大きなシグナルを与えるのはグルタミン酸が配位しているもしくは、 Fe^{3+} との相互作用が強く在った場合で、両状態の交換が EPR の時間より充分遅い為、両方の EPR が観測されると考える。

この様に考えると、正常鎖の酸素化に伴って、 g の異方性が

増大する事の説明は、四次構造が R 構造へ変化したから。
異常鎖のヘム周辺にもなんらかの変化が起っている訳だが、
例えは、鉄原子が 近位ヒスチジン側に押されて、ホルフィリン環により近
づいた為、遠位ヒスチジン側にはグルタミン酸との相互作用がより強くなり、
 g の異方性の大きさ シグナルが更に異方性の大きさ シグナルへ変化した
と考える。

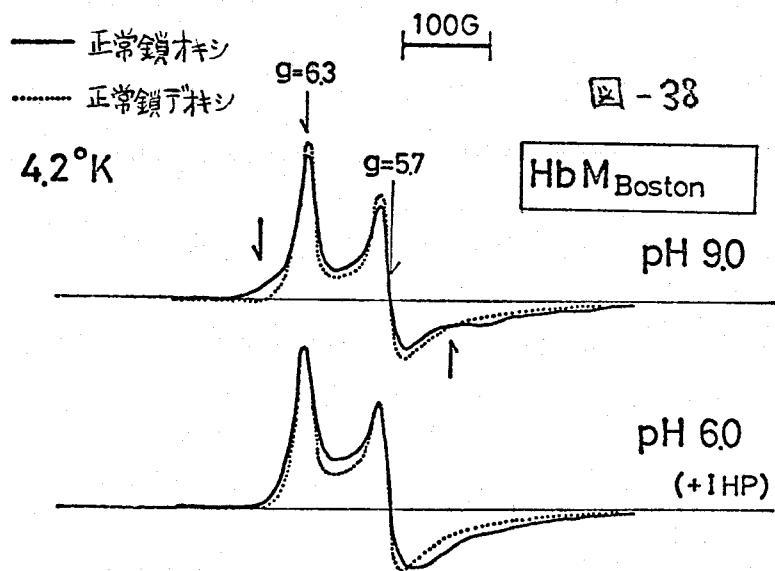
一方、 $g=6$ のシグナルの変化は、正常鎖をデオキシ化した場合
あるいは、IHP を加えるとシグナルが "フロード" にならむ。バレンシ
ハイツィッドの時と同様に 鉄原子がより近位ヒスチジン側へ
移動した為であると考える。

pH 9.0 で $g=6$ のシグナルが消えたのは、 g の異方性が増加
した事を考慮すると遠位ヒスチジン側のグルタミン酸がより強く鉄原子に置換
した為と考える。pH 9.0 での ENDOR で ^{14}N のシグナル
が消えれば、上の推測は正しい事が証明されるであろう。

以上述べた事は、一つの仮定であって、今後、ENDOR や、
単結晶での解析等より証明される事を期待したい。

3-3-2 HbM_{Boston} ($\gamma E(\lambda 58)$ His. \rightarrow Tyr.)

図-38 に精製した HbM_{Boston} の EPR スペクトルを示す。



HbM_{Boston} はヘムが異
常鎖 (Fe^{3+}) で遠位ヒスチジン
が タイロシン (Tyr.) にかわった
ものである。

鉄にはタロシンが置換
してある事が X 線より
判別できる。(69)

又、酸素平衡の実験
では Hill の n 値は
1.2 、 Nishikura S⁽⁷⁰⁾

によつて行なわれた EIC (ethyl isocyanide) の反応性では HbM_{Boston} ($\alpha_2 \beta_2^{2+}$) では $n=1.0$ 、異常鎖も還元した状態 ($\alpha_2 \beta_2^{2+}$) では $n=2.4$ であると報告してゐる。

一方、今まで EPR スペクトルは、正常鎖を変化させても、影響されないと報告されてゐた。 $\tau=3$ が。EPR スペクトルは、pH 9.0 で β 正常鎖を酸素化すると、又異常鎖に異方性の大きさもう一つのシグナル(実線)が現われる事が判った。又、pH 6.0 でも、正常鎖を酸素化すると、スペクトル全体がブロード化する傾向を示した。

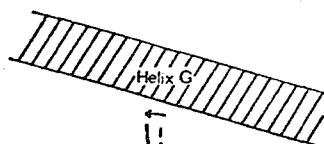
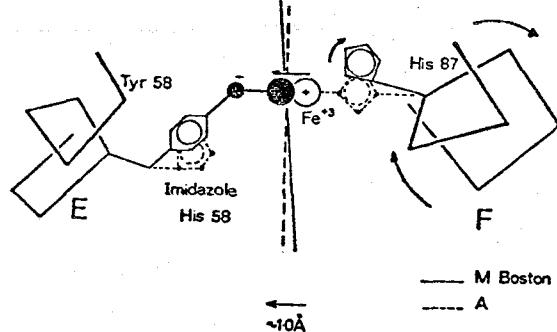


図-39



α鎖のヘム近傍：

HbM_{Boston} - デオキシHbA

(特に断わらない限りヒトHbはHbAを示す)

(P.D. Palsinelli et al.)

図-39 は HbM_{Boston} の α 異常鎖へム周辺の構造を示した。デオキシHb(点線)との比較がしてある。遠位側のタイロシンが鉄に配位した為、近位ヒスチジンが鉄原子から遠ざけられ、Fヘリックスが少し回転した構造である。これは T状態がより安定になつた構造であると考えられる。(HbM_{Boston}の単結晶はデオキシHbの単結晶と同一結晶構造である) $\tau=3$ が。pH 7 附近での酸素平衡曲線の結果では n 値は小さく、正常鎖に酸素分子を配位させても構造が T \rightarrow R となる可能性は少ないと考えられる。 $\tau=3$ が。pH 9 で正常鎖を酸素化すると異常鎖へムの $g_1 = 6.3$, $g_2 = 5.7$ という異方性のある g 値の他にさらに異方性の大きな g 値が観測された。

と“いう事は、ヘムの周辺に、異方性を大きくする構造変化が”起つた事を示している。

ここで、pH 9.0では、 η 値が大きくなる事が期待される。

EPR の変化の一つの解釈として、 β 正常鎖を酸素化する事で構造が $T \rightarrow R$ の変化が起るとして、ヘムのフヘリックスの回転が元の状態に戻るとしているのではないか。この結果、近位ヒスチジンが鉄原子に近づく為、ヘムにより強い歪がかかるのではないかと考えられる。

3-4 結 語

本章では、バレンシーハイブリッド-Hb の Fe^{3+} ヘムの EPR に着目し、 HP トナーのサブユニットの Fe^{2+} ヘムのスピinn状態を変える事により、どの様な構造変化が引きおこされ、それが、どの様にして Fe^{3+} ヘムに影響されるかを見てきた。

今まで、Hb の構造変化にともなって、 Fe^{3+} ヘムの EPR スペクトルに変化がみとめられなかったものに対して、種々の条件下で精密に実験を行なうと何らかの変化がみとめられる事が判った。

R 構造である酸化型 Hb ($\alpha_2^+ \beta_2^+$) はアロステリックエフェクターである HP (イミドールホリノ酸) を加えると、R \rightarrow T の四次構造の変化が起り、9~6 附近に、T 状態に特有のブロードなシグナルを示した。この事は、「高スピinn状態の酸化型 Hb + 1HP は、T 状態の四次構造をとる」とする Perutz の説を EPR から支持したものである。

又、バレンシーハイブリッド-Hb の EPR については、1HP の存在下で、Hill の η 値が大きいものは、還元鎖 (Fe^{2+}) を酸素化あるいはデオキシ化する事により $R \rightleftharpoons T$ の四次構造の変化が引きおこされ、酸化鎖 (Fe^{3+}) の EPR スペクトルが変化した。即ち、分子の構造が T 状態をとるとき、

$g=6$ の通常の EPR スペクトルの他に、 $g \sim 6$ 附近に幅広い特徴的なシグナルを示すことが判った。

ところが、異常 HbM については、バレンシー・マグリッド・Hb の様に、 n 値との関係をつける事は出来ないようであった。

例えば、HbM_{Hyde park} では n 値は、ほとんど 1 であるが、正常鎖をデオキシ化すると、異常鎖の EPR は異常な変化を示してくれた。又、HbM_{Milwaukee-1} や HbM_{Boston} (= お) では、HbM_{Hyde park} とは逆の変化を示しており、異方性の原因については推測の域を出ない。

今まででは、一方のサブユニットの配位子を変えると、パートナーのサブユニットのヘムの鉄の電子状態が変化するることは、むしろ例外的であると考えられていたが、本論文に示した様に、むしろ、バレンシー・マグリッド・Hb でも、異常 HbM でもたゞ一の場合、鉄の電子状態の変化として伝わることが示された。

3d 電子が比較的、鉄の原子のまわりに小さく分布している事を考慮すると、本論文で示されたヘム間相互作用は、鉄の最近接原子の立体的な位置が動いたものと考えられる。

第四章 還元型デオキシヘモグロビン(Fe^{2+} , 高スピン)のへ4の電子状態

4-1 緒言

Mb や Hb が“酸素分子を吸着した”。解離したりする活性は、へ4の鉄が“2価(Fe^{2+})”の状態のときにはみられるものである。

へ4蛋白質の電子状態の研究では、へ4の鉄が“3価(Fe^{3+})”の状態で著しい成果を収めていたが、生理的に最も重要な Fe^{2+} のへ4の電子状態の研究はあまり進んでいないとは云えない。

Fe^{2+} -高スピンの EPR が観測されてない事、又、 Fe^{2+} -低スピンでは磁気モーメントがなく、磁気測定が困難である事が、 Fe^{3+} のへ4の鉄の研究に比べて、 Fe^{2+} へ4の鉄の電子論的研究を遅らせた大きな原因と思われる。

Hb のへ4間相互作用等の研究に対して、 Fe^{2+} -高スピンの EPR 測定が“可能に在れば”、従来の Fe^{3+} へ4鉄の EPR や、他の物理化学的測定では得られなかた新しい研究手段と結果とともにたらすであろう。されば、 Fe^{2+} -高スピン EPR 測定の可能性を追究する事は大きな意味がある。

さて、ちく Pauling らの実験⁽¹¹⁾によれば、デオキシ Hb (Fe^{2+}) における有効ボーア 磁子数は室温で $M_{\text{eff.}} = 5.4$ を得ている。

これは還元型 Hb のへ4鉄の 3d 電子が 6 個であることを考慮すると合成スピン量子数は $S = 2$ に対応する。デオキシ Hb の室温におけるボーア 磁子数が“5.4”で、 $S = 2$ に対するスピンだけの値 $m = 2\sqrt{S(S+1)} = 4.9$ よりかなり高いが、これは軌道運動による磁気モーメントの寄与がかなりあると考えられる。

Kotani⁽¹²⁾ は、これを説明する為には、正方形対称場又は、斜方対称場の配位子場が “ Fe^{3+} の場合より”、かなり弱いためであると推測している。

Fe^{2+} -高スピンの基底状態は ^5B と推定されている。

スピン軌道相互作用 及びゼーマンエネルギーの大きさが“基底状態

5B と励起状態 5E とのエネルギー差に比べて、充分 小さいとすれば、
摂動論的取扱いが可能となる。還元型の微細構造は、酸化型の場合(1)と同様のスピンハミルトニアレ

$$\mathcal{H} = D S_z^2 + E (S_x^2 - S_y^2) + \beta \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} \quad (10)$$

で表わせる。(図-40)

N. Nakano らは⁽¹²⁾ ヒトデオキシHb、マウスクシラ・デオキシMbの磁化率の磁場依存性、磁化率の温度依存性の測定を行い、計算機によるカーブ・フィティングから、エネルギー準位の微細構造を決めよパラメーターを決めた。

それによると、 $E=0$ 、 $g=2$ と仮定して、 $D=5 \text{ cm}^{-1}$ とすることを報告している。更に N. Nakano らは⁽¹³⁾ ヒト・デオキシ-Hbの単結晶について常磁性磁化率(トルク)の測定を極低温領域で行い、 $g_z=2.0$ と仮定して($g_z=2.0$ にて、 g_x, g_y は D, E 及びスピン軌道相互作用定数 α により求まる量で、したがって仮定がある) $D=5.3 \text{ cm}^{-1}$ 、 $E=0.9 \text{ cm}^{-1}$ とするのが最も良く実験結果を説明できるとした。しかし、 $g_z=2.0$ と仮定して解析する事には問題があるのだ。 $g_z=2.0$ という仮定をとりはらった解析法を考へ、ヒト・デオキシ-Hb 単結晶のトルクの精密測定を液体窒素温度(77°K)以上と、液体ヘリウム温度(4.2°K)以下で行い、

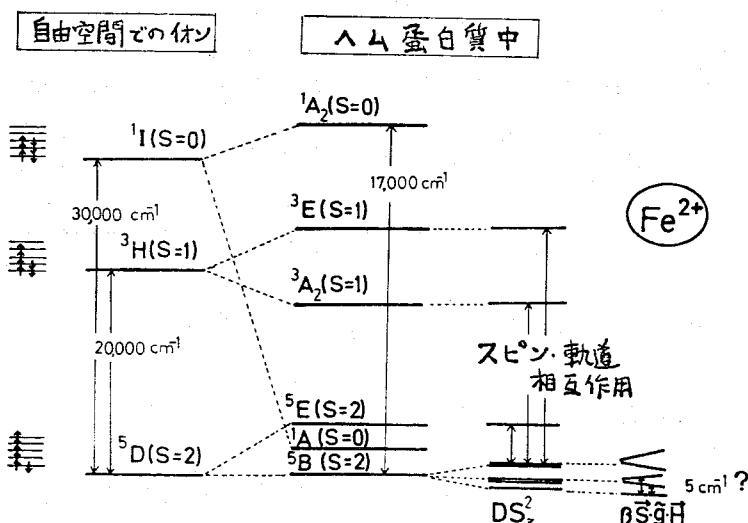


図-40 $S=2$ (Fe^{2+} 高スピン) のエネルギー準位。

解析のやり直しを行った。本章で論ずる解析法では、 D の値しか求まらない(g_z の方向が、ヘム面に垂直方向であると仮定して、X線結晶解析の結果を代入すると、得られた D の値を使つて g_z

が求まる)。その結果、得られた D の値は、約 5 cm^{-1} である。

N. Nakano らの結果とほぼ一致するものである。

$\beta = 7^\circ$ $D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ とすれば、常磁性共鳴(EPR)の観測が可能なはずである。即ち、外部磁場が S_z 方向に平行に作用した場合、 $S_z = -1$ の準位が $S_z = 0$ の最低状態の準位に近づき、この場合、マイクロ波の振動磁場が外部磁場に垂直方向にかかるとすれば、 $S_z = 0$ と $S_z = -1$ のエネルギー準位間に有限な遷移確率がある。マイクロ波周波数 249 Hz (K-バンド)を使用すると、共鳴は $40 \sim 50 \text{ kGauss}$ で起るところとなる。この可能性については、

C. Rudowicz⁽⁷⁴⁾ も高次の摂動計算からエネルギー準位を理論的に求め、EPR 測定の可能性を示唆している。

4-2 ヒトデオキシ Hb 単結晶のトルク測定

4-2-1 ヒトデオキシ Hb 単結晶

Hb はヒトの赤血球より抽出した。ヒトデオキシ-Hb の単結晶は Perutz の方法によった⁽⁷⁵⁾。但し、還元剤として、ハイドロケルマット ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 存在下で結晶化を行った。

Perutz の X 線結晶解析の結果によると、ヒトデオキシ Hb の単結晶は单斜晶系で、空間群は P_{2_1} である。又、単位胞中に 2 分子の Hb を含んでいるから、単位胞中に 8 個の八面体を含むことになる。結晶の dyad axis (対称軸) は b 軸であるが、分子 2 回軸 (Hb 分子の 2 回軸は、2 つの α 鎮の中心と 2 つの β 鎮の中心とを結んだ方向にある) の方向と結晶の対称軸の方向は一致していない。

結晶軸は、 $a = 63.4 \text{ \AA}$, $b = 83.6 \text{ \AA}$, $c = 53.9 \text{ \AA}$, $\beta = 99^\circ 15'$ である⁽⁷⁵⁾。

4-2-2 トルク測定の一般原理

常磁性の結晶物質を磁場の中におくと、その物質は一般に回転力をもつ。これが、この物質の磁気異方性エネルギー一起因するトルクである。

さて、常磁性結晶の磁気異方性は、その磁化率 χ が結晶方向によって異なることから生ずる。

いま、磁化 M 、磁場 H とする。磁化の主軸 X, Y, Z を選ぶことにより

$$M = \begin{pmatrix} M_x \\ M_y \\ M_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} X_x & 0 & 0 \\ 0 & X_y & 0 \\ 0 & 0 & X_z \end{pmatrix} \begin{pmatrix} H_x \\ H_y \\ H_z \end{pmatrix} = \tilde{\chi} \cdot H \quad (11)$$

と表わせる。

物質が磁場の中でもつ自由エネルギーは、

$$F = -V \int_0^H H \cdot dM = -\frac{H \cdot \tilde{\chi} \cdot H}{2} V = -\frac{(M \cdot H)}{2} V \quad (12)$$

と表わせる。

Z 軸を中心軸として、 XY 面内に働くトルクは、

$$\begin{aligned} L &\equiv -\frac{\partial F}{\partial \theta} = -\frac{\partial}{\partial \theta} \left[-\frac{X_x H_x^2 + X_y H_y^2}{2} \right] \\ &= -\frac{\partial}{\partial \theta} \left[-\frac{H^2 (X_x \cos^2 \theta + X_y \sin^2 \theta)}{2} \right] = \frac{X_y - X_x}{2} H^2 \sin 2\theta \end{aligned} \quad (13)$$

となる。

ここで、 θ は XY 面内の磁場 H の X 軸からの角度である。

$X_x > X_y$ ならば、 X 軸がエネルギー極小の安定方向である。

トルク曲線の特徴は、 π の周期で変化する正弦曲線であり。正弦曲線の振幅は磁場の強さの2乗に比例するといふことである。エネルギー準位が半周期であるときは、分配関数 Z を求め、自由エネルギー F からトルク L が得られる。

4-2-3 ヒトデオキシHb 単結晶のトルク測定の解析法

さて、ヒト・デオキシHb 単結晶のトルク測定であるが、N. Nakano の実験では極低温領域を中心で、 $g_z = 2.0$ と仮定して、解析したものであった。

そこで、トルク測定・解析をより精密に行い、 $g_z = 2.0$ と仮定しないで直接 D を求めた。

77°K 以上の範囲では、スピンハミルト=アン(10) の E 項を無視できるので、トルクを $\frac{1}{T}$ (T は絶対温度) に比例する項 (g の異方性に起因する) と $\frac{1}{T^2}$ に比例する項 (微細構造に起因する) 及び 温度 T に依存しない項 (反磁性項等) とを分離して解析した。又、4.2°K 以下の測定では、磁場の 4 乗に比例する項と 2 乗に比例する項とを分離し、磁場の 2 乗に比例する項を詳細に解析した。

77°K 以上のトルクの温度変化と、4.2°K 以下の磁場の 2 乗に比例する項の温度変化とから、単結晶中の八面方位 (正しくは磁化率テンソルの主値方向) による g 値を知らなくても、直接 D の値を計算できる。以下にこの解析法を述べる。

(10) 式のスピンハミルト=アンを

$$H = F \cos \alpha \cdot (S_z^2 - \frac{1}{3} S^2) + \frac{1}{\sqrt{3}} F \sin \alpha \cdot (S_x^2 - S_y^2) + g_x \beta H_x S_x + g_y \beta H_y S_y + g_z \beta H_z S_z \quad (14)$$

と書きかえた。但し、 $D = F \cos \alpha$, $E = \frac{1}{\sqrt{3}} F \sin \alpha$

二次運動のエネルギー計算より次の様になる。

$$E_{\pm 2} = 4F \cos \alpha + \frac{F \sin^2 \alpha}{2 \cos \alpha} + \frac{(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{3F \cos \alpha} \pm \left\{ 4g_z^2 \beta^2 H_z^2 + \frac{F^2 \sin^4 \alpha}{4 \cos^2 \alpha} - \frac{(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2)^2 \beta^4}{18 F^2 \cos^2 \alpha} \right\}^{1/2}$$

$$E_{\pm 1} = F \cos \alpha + \frac{7(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{6F \cos \alpha} \pm \left\{ g_z^2 \beta^2 H_z^2 + 3F^2 \sin^2 \alpha + 3\sqrt{3} \beta^2 (g_x^2 H_x^2 - g_y^2 H_y^2) \tan \alpha + \frac{9\beta^4 (g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2)^2}{4F^2 \cos^2 \alpha} \right\}^{1/2}$$

$$E_0 = - \frac{3(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{F \cos \alpha} - \frac{F \sin^2 \alpha}{\cos \alpha} \quad (15)$$

A) 高温近似

分配関数 Z を求める。

$$Z = e^{-E_2/kT} + e^{-E_{-2}/kT} + e^{-E_x/kT} + e^{-E_{-x}/kT} + e^{-E_y/kT} \quad (16)$$

$D \gg E$ にて計算して.

$$Z \approx \{ 1 + 2e^{-D/kT} + 2e^{-4D/kT} \}$$

$$\begin{aligned} & \times \left\{ 1 + 2e^{-D/kT} \left(\frac{2g_z^2\beta^2H_z^2}{k^2T^2} - \frac{(g_x^2H_x^2 + g_y^2H_y^2)\beta^2}{3DkT} \right) \right. \\ & + 2e^{-D/kT} \left(\frac{g_z^2\beta^2H_z^2}{2k^2T^2} - \frac{7(g_x^2H_x^2 + g_y^2H_y^2)\beta^2}{6DkT} \right) \\ & \left. + \frac{3(g_x^2H_x^2 + g_y^2H_y^2)\beta^2}{DkT} \right\} \\ & (1+2e^{-D/kT}+2e^{-4D/kT}) \end{aligned}$$

$$\text{自由エネルギー } F = -NkT \log Z \text{ なり} \quad (17)$$

$$F \approx -NkT \log \{ A \} - NkT \left\{ \frac{\frac{g_z^2\beta^2H_z^2}{k^2T^2}(e^{-D/kT} + 4e^{-4D/kT}) + \frac{(g_x^2H_x^2 + g_y^2H_y^2)\beta^2}{3DkT}(9 - 7e^{-D/kT} - 2e^{-4D/kT})}{(1 + 2e^{-D/kT} + 2e^{-4D/kT})} \right\}$$

$$\text{但し. } A = 1 + 2e^{-D/kT} + 2e^{-4D/kT} \quad (18)$$

トルク L は $L \equiv -\frac{\partial F}{\partial \theta}$ より得られる。

いままで"は、単位胞中に 1 つの H4 しかない"にて計算してきたが、ヒト・デオキシHb"は、前述した如く、単位胞中に 2 分子の Hb 分子を含む。即ち、単位胞中に 8 個の H4 を含むので、全ての H4 のつり合の総和をとらねばならない。

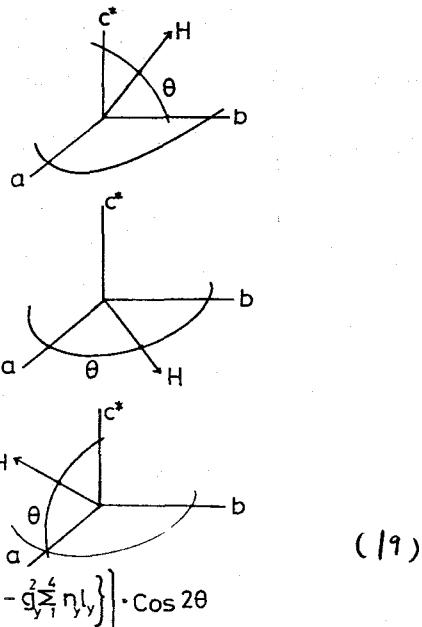
8 個の H4 のうち、4 個は、b 軸が結晶の対称軸であるので"対称操作で"残りの 4 個と重なる事が出来る。

入力の磁化率の主軸を x, y, z 方向として、結晶軸 a, b, c^* (c の代')は a, b 軸に垂直な c^* 軸である)はに対する方向余弦を各々 (l_x, m_x, n_x) , (l_y, m_y, n_y) , (l_z, m_z, n_z) とする。計算の結果、ヒト・デオキシHbでは、各結晶軸のまわりのトルクは次のようになる。

$$L^{bc} = \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \left[\frac{3}{4} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 (n_z^2 - l_z^2) + g_x^2 \sum_1^4 (n_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (n_y^2 - l_y^2) \right\} - \frac{21D}{40kT} \left\{ 2g_z^2 \sum_1^4 (n_z^2 - l_z^2) - g_x^2 \sum_1^4 (n_x^2 - l_x^2) - g_y^2 \sum_1^4 (n_y^2 - l_y^2) \right\} \right] \cdot \sin 2\theta$$

$$L^{ab} = \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \left[\frac{3}{4} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) + g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} - \frac{21D}{40kT} \left\{ 2g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) - g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) - g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} \right] \cdot \sin 2\theta$$

$$L^{cc} = \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \left[\frac{3}{4} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 (n_z^2 - l_z^2) + g_x^2 \sum_1^4 (n_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (n_y^2 - l_y^2) \right\} - \frac{21D}{40kT} \left\{ 2g_z^2 \sum_1^4 (n_z^2 - l_z^2) - g_x^2 \sum_1^4 (n_x^2 - l_x^2) - g_y^2 \sum_1^4 (n_y^2 - l_y^2) \right\} \right] \cdot \sin 2\theta + \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \left[\frac{3}{2} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 n_z l_z + g_x^2 \sum_1^4 n_x l_x + g_y^2 \sum_1^4 n_y l_y \right\} - \frac{21D}{20kT} \left\{ 2g_z^2 \sum_1^4 n_z l_z - g_x^2 \sum_1^4 n_x l_x - g_y^2 \sum_1^4 n_y l_y \right\} \right] \cdot \cos 2\theta$$



ab 面内のトルクを例にとる。(ab 面内でのトルクを L^{ab} と書く)
 L^{ab} は、ある磁場 H でのトルク曲線の最大振幅 L_{max}^{ab} の温度変化は。

$$\frac{3k L_{max}^{ab} \cdot T}{N\beta^2 H^2} = \frac{3}{4} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) + g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} - \frac{21D}{40k} \left[2g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) - \left\{ g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} \right] \cdot \frac{1}{T}$$

で与えられる。

$\tau = \tau'$ 。平行軸 $L \cdot T$ は比例した量、ヨコ軸に $1/T$ のグラフを書けば、その係数は。

$$-\frac{21D}{40k} \left[2g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) - \left\{ g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} \right] \quad (21)$$

を与え。 θ 軸との切片は。

$$\frac{3}{4} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 (m_i^2 - l_i^2) + g_x^2 \sum_1^4 (m_i^2 - l_i^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_i^2 - l_i^2) \right\} \quad (22)$$

を与えたところである。

実際のトルク L には、反磁性項等、温度 T に依存しない項 L_0 が含まれ (L_0 は小さい)、 $L = L_0 + A/T + B/T^2$ (A, B は定数) と書きあらわされるので、まず、 θ のトルク測定値 L と $1/T$ のグラフを書き、 $1/T \rightarrow 0$ (即ち $T \rightarrow \infty$) より L_0 を求める (実際 L は最小二乗法により L_0, A, B が求まる)。

次に $L - L_0$ を常磁性によるトルク L にて上記解析法を適用する。

他の結晶面についても同様に計算である。

今、ラテンソル主値及 m 方向余弦 (l_i, m_i, n_i): ($i = x, y, z$) が不明 ("ある") ので、高温近似だけでは D 値は定まらない事が判る。もし、 $g_z = 2.0$, (l_z, m_z, n_z) を入射面上垂直方向として、X 線結晶解析の結果が "使之ると仮定すれば" (21) 式、(22) 式より D の値が求まる。

B) 極低温の解析

磁場の小さい範囲で考える。トルク測定において、 $H^4 I$ に比例する項と $H^2 I$ に比例する項とを分離して、 $H^2 I$ に比例する項だけを考える。前と同様、先づ、1 個の八面体 (15) より分配関数を考える。

$$\begin{aligned} \Sigma &\approx 2 e^{-\frac{4F \cos \theta}{kT}} \left\{ 1 - \frac{F \sin^2 \theta}{2kT \cos \theta} + \frac{F^2 \sin^4 \theta}{8k^2 T^2 \cos^2 \theta} + \frac{2g_z^2 \beta^2 H_z^2}{k^2 T^2} - \frac{(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{3kT \cdot F \cos \theta} + \dots \right\} \\ &+ 2 e^{-\frac{F \cos \theta}{kT}} \left\{ 1 + \frac{3F^2 \sin^2 \theta}{3k^2 T^2} + \frac{\sqrt{3} \beta^2 (g_x^2 H_x^2 - g_y^2 H_y^2) \tan \theta}{k^2 T^2} + \frac{g_z^2 \beta^2 H_z^2}{2k^2 T^2} - \frac{7(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{6kT \cdot F \cos \theta} \right\} \\ &+ 1 \cdot \left\{ 1 + \frac{F \sin^2 \theta}{kT \cos \theta} + \frac{3(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{kT \cdot F \cos \theta} \right\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&= \left\{ 1 + 2e^{-F \cos \theta / kT} + 2e^{-4F \cos \theta / kT} \right\} \\
&+ \left\{ 2e^{-4F \cos \theta / kT} \cdot \left(\frac{F^2 \sin^2 \theta}{8k^2 T^2 \cos^2 \theta} - \frac{F \sin^2 \theta}{2kT \cos^2 \theta} \right) + 2e^{-F \cos \theta / kT} \left(\frac{3F^2 \sin^2 \theta}{2k^2 T^2} + \frac{F \sin^2 \theta}{kT \cos^2 \theta} \right) \right\} \\
&+ \left\{ 4e^{-4F \cos \theta / kT} + e^{-F \cos \theta / kT} \right\} \cdot \frac{g_x^2 \beta^2 H_x^2}{k^2 T^2} + \frac{2\sqrt{3}\beta^2 (g_x^2 H_x^2 - g_y^2 H_y^2) \tan \theta}{k^2 T^2} \cdot e^{-F \cos \theta / kT} \\
&+ \left\{ 9 - 2e^{-4F \cos \theta / kT} - 7e^{-F \cos \theta / kT} \right\} \cdot \frac{(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{3kT \cdot F \cos \theta} \quad (23)
\end{aligned}$$

を得る。

前と同様、自由エネルギーを求めて、8個の八面を考慮して、結晶軸のまわりのトルクを計算すると、ab面内で^{ab}Lは、

$$\begin{aligned}
L^{ab} &= \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \cdot \frac{1}{4A} \cdot \left[3g_x^2 \sum (m_x^2 - l_x^2) \left\{ 4\exp(-\frac{4D}{kT}) + \exp(-\frac{D}{kT}) \right\} \right. \\
&\quad \left. + \frac{kT}{D} \left\{ g_x^2 \sum (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum (m_y^2 - l_y^2) \right\} \left\{ 9 - 2\exp(-\frac{4D}{kT}) - 7\exp(-\frac{D}{kT}) \right\} \right. \\
&\quad \left. + 6\sqrt{3} \tan \theta \left\{ g_x^2 \sum (m_x^2 - l_x^2) - g_y^2 \sum (m_y^2 - l_y^2) \right\} \cdot \exp(-\frac{D}{kT}) \right] \cdot \sin(2\theta) \quad (24)
\end{aligned}$$

但し、 $A = 1 + 2\exp(-\frac{D}{kT}) + 2\exp(-\frac{4D}{kT})$ である。

他の結晶面でのトルクを同様の式で与えられる。角度θのx'方は、高温近似の場合と同じである。

$\vec{x} = \vec{x}'$ 、 L^{ab} はつれて $T \rightarrow 0$ の極限を考えてみよう。第1項と第3項は0に近づく、第2項は0ではない有限の値

$$\frac{3N\beta^2 H^2}{4D} \left\{ g_x^2 \sum_i^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_i^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} \text{ に近づく}。$$

(ただし、 $\vec{x} = \vec{x}'$ 、 $\vec{y} = \vec{y}'$ 軸は $L^{max} / N\beta^2 H^2$ を

とす)。ヨコ軸は温度Tをとる。

図-41 に示すように、タテ軸との切片が

$$\frac{3}{4D} \left\{ g_x^2 \sum_i^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_i^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} \quad (25)$$

を与える。

(25)

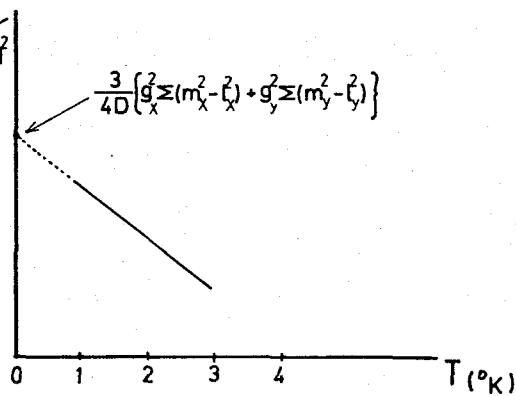


図-41 $L - T$ (極低温)

さて、高温近似の解析 及び、極低温での解析を結びつけ
る。 (21), (22) は実測された量である。

$$a = -D \left[2g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) - \{ g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \} \right]$$

$$b = \{ g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) + g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) \}$$

より、 $g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2)$ を消却して、 $g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2)$ を求める。

$$g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) = \frac{1}{3D} a + \frac{2}{3} b \quad \text{となる。}$$

これを (25) のもう1つの実測値

$$C = \frac{3}{4D} \{ g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \}$$

代入すれば、 $C = \frac{1}{4D} \left(\frac{a}{D} + 2b \right)$ となり。これを解くことより D の値が求まる。

4-3 ヒト・デオキシHb単結晶のトルク測定結果及び考察、

使用したトルク計は、Morimoto, Iizuka ⁽⁷⁶⁾ によって開発された高感度トルク計と同型のものを試作し、測定した。 10^{-4} dyne·cm 程度のトルクまで測定可能である。

液体窒素温度 (77°K) 以上の測定は、窒素、アーウィーの中に入れて、温度変化させた。

液体ヘリウム温度以下の測定は、減圧ヘリウムで行った。

測定後は、結晶を pH 7.4 の 0.01 M トリス-塩酸緩衝液にとかし、酸化型Hbがない事を確かめ、ピリシンヘモクロモーキン法でヘム濃度を定量した。

以下、ab面内で磁場を回転させたときのトルク測定を例として

説明する。

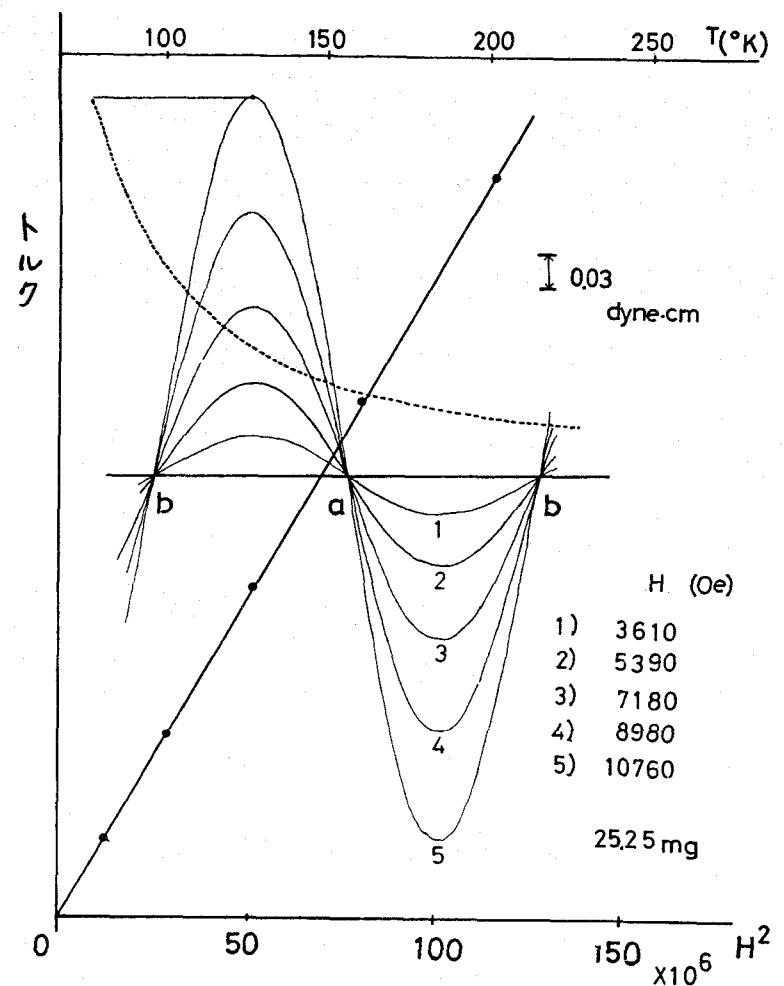


図-42

ab面内のトルク曲線
(77°K)

図-42は、77°K以上でのトルク曲線を示す。

実線で示した正弦曲線は、77°Kでのトルク測定を示す。

a, b軸を通るきれいな正弦曲線を示す。実線で示した直線は、トルク最大値が磁場の2乗にきれいに比例している事を示している。

点線で示した曲線は、トルク最大の比=3 (=磁石を固定して、温度を上昇させたとき)に得られる曲線である。

これを $L \cdot T - \frac{1}{T}$ プロットしたものが図-43である。
(トルクLは、反磁性項を差し引いて補正した値である)
ab面以外の他の結晶面についても同時に示した。

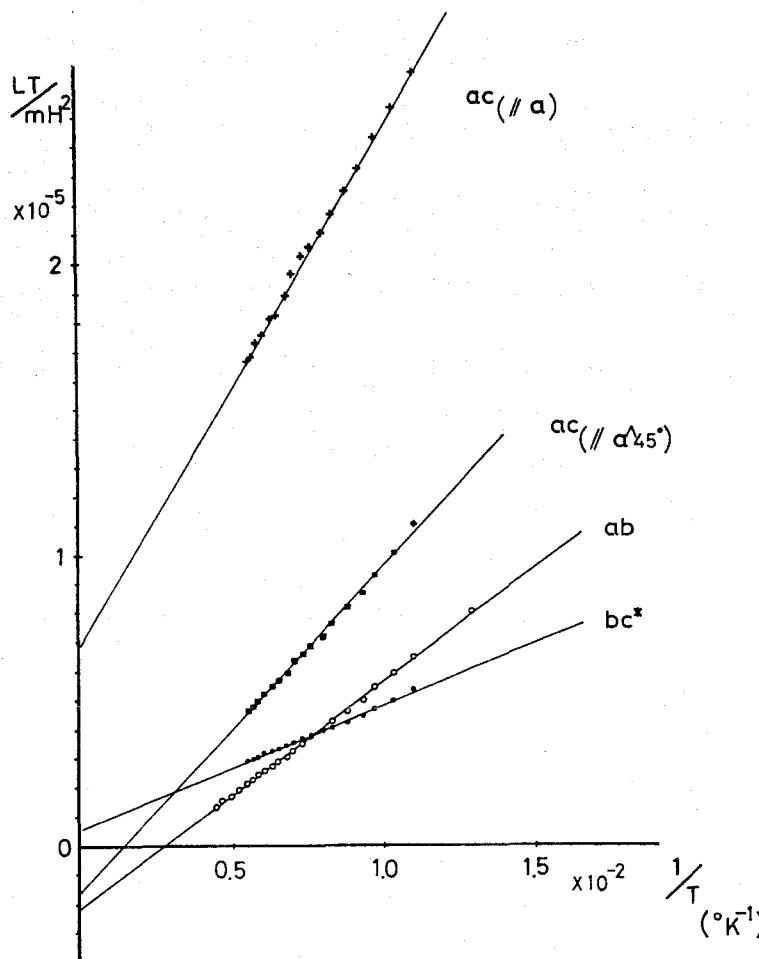


図-43

$L \cdot T - \frac{1}{T}$ の関係。
(77°K以上)

図-44 は液体ヘリウム温度
(4.2°K) での ab 面内で
の測定を示す。

トルクの P-P 値が磁場の
2乗 (H^2) に比例しなくなる
事がよくわかる。

これをトルク L を
 $L = aH^2 - bH^4$ と
(a, b は定数)。

$L/H^2 - H^2$ をプロットし
グラフの y 軸の切片より
 a を求め、 H^2 の係数と
した。

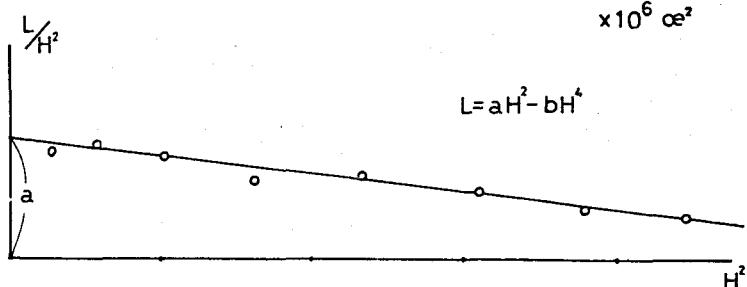
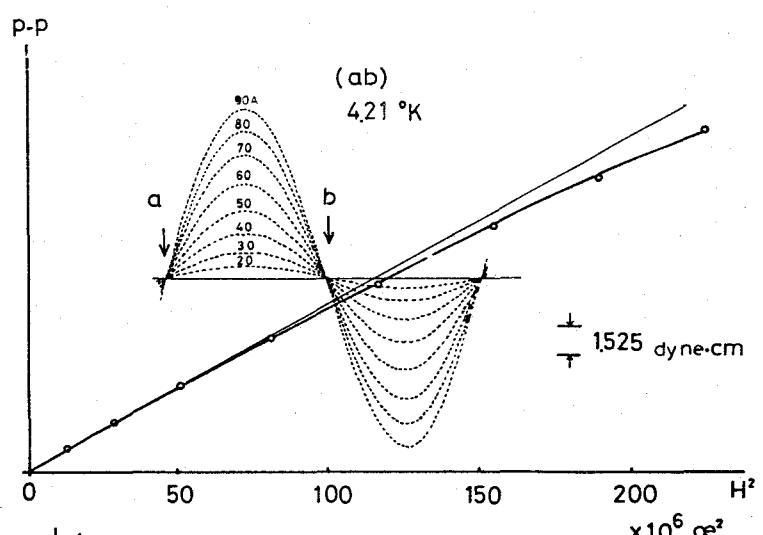


図-44 極低温でのトルク

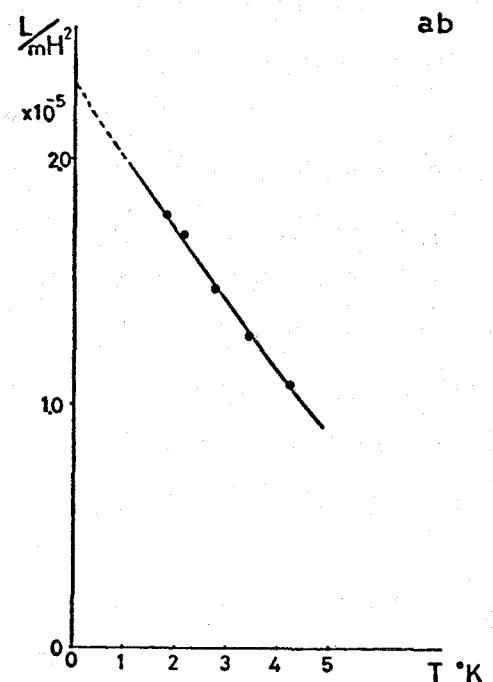


図-45 極低温でのトルクの温度変化
(ab面内)

測定より得られる二つである。

表IVに各結晶面の測定から得たDの値を示す。

表 - IV

| 測定面 | D |
|---------|----------------------------|
| bC*面内 | 3.6 ~ 4.8 cm ⁻¹ |
| ab面内 | 4.7 cm ⁻¹ |
| ac面内 | |
| a//H | 4.8 cm ⁻¹ |
| a^H:45° | 4.8 cm ⁻¹ |

トルク測定では、結晶軸方向を誤ると、どんな結果を与えてしまうので、軸決定は、充分な注意が必要である。

特に、bC*面内の測定で大きなバラツキが生じた。二の結晶面内の測定では、結晶が、α軸方向によく成長している為に、回転軸に平行に

a 軸がくろようには結晶を試料ホルタ"一にとりつけた事が"むづかしい事による。多少のバラツキはみられるが、本実験の解析から、 D の値は 4.8 cm^{-1} 程度であると決定された。

この結果は、N. Nakano ら⁽⁷³⁾が求めた結果、 $D = 5.3 \text{ cm}^{-1}$ と大きさを差はない事を示している。

$g_z = 2.0$ 、 g_z の方向が、Z 方向の磁化率主軸に一致し、それが"へム面に垂直である"と仮定すれば、Perutz のヒト・デオキシHb の X 線結晶解析の結果を使用して、(21), (22) 式より、 D の値を求める事が出来る。各結晶面での計算の結果は $6 \sim 10 \text{ cm}^{-1}$ の範囲にバラツいた。

又、高温近似と極低温の測定から求めた D 値を使って、 g_z の方向が、Z 方向の磁化率主軸に一致し、それが"へム面に垂直である"と仮定し、X 線結晶解析の結果を代入して、 g_z を求めると、各結晶面での計算の結果は $2.2 \sim 2.5$ の範囲にバラツいた。

したがって、少なくとも、 $g_z = 2$ と仮定する事、あるいは、 g_z の方向が"へム面に垂直である"と仮定する事には無理があることが判った。

さて、(19)式の ac 面内で"のトルクを求める事"であるが、温度によって、トルクの位相が"変れる事を示している。

本実験においては、位相の温度依存性の解析から、D 又は \tilde{g} の情報を得る努力はしなかった。ただ、ac 面内で"の測定が正しかったかどうか、特に、結晶取り付けが正しかったか否かのチェック実験として、 77°K で"トルク零"にならず $= 3$ に磁石を固定して、温度を上昇させた実験を行った。温度を上昇させると、トルクがあらわれてきて、ある温度($\approx 100^\circ\text{K}$)で"最大値"となり、再び"トルクが減少してゆく。測定では、 160°K で"トルクが"再び"零となつた。

そこで、 77°K と 160°K の 2 点に対して、先に求めた $g_z^2 \sum_i^4 (m_z^2 - l_z^2)$

や、 $g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2)$ の値を代入して、トルクが零になるのは、結晶 α 軸から何度の $\theta = 3$ 度を求めるか 27° となり。実際の磁石の固定角度からの読みと非常によく一致した。この事は、確かに α C 面内でトルク測定を行ったことの保証となる。

又、極低温領域において、磁石の $4\pi M$ に比例する項から、得られる情報については、本解析ではとりあげなかった。

g_z や E の値を求めるには、更に精密な解析が必要になるが。今回のトルク測定によって、D 値は 5 cm^{-1} 前後である事が再確認された。

4-4 ヒト・デオキシHb (Fe^{2+} : 高スピノン) のEPR測定

ヒト・デオキシHb 単結晶のトルク測定より、 Fe^{2+} ・高スピノン ($S=2$) の零磁場分離 D 値は 5 cm^{-1} 前後である事が判った。

D $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$ とした場合、ヒト・デオキシHb の EPR の可能性を議論する。現在まで、 Fe^{2+} ・高スピノンで EPR の実測されているのは、M. Tinkham⁽⁷⁷⁾ による ZnF_2 中の Fe^{2+} ($g'_z = 8.97$)、W. Low⁽⁷⁸⁾ による MgO 中の Fe^{2+} ($g = 3.43$) が報告されているが。人間蛋白質については、EPR は実測されていない。

そこで、デオキシHb の EPR の可能性を考えると次の 2つの場合が考えられる。

4-4-1 高温部での測定

この場合、外部磁場が Z 方向に平行に作用し、これと平行に偏向したマイクロ波（マイクロ波の振動磁場が外部磁場と平行）を用いた場合に、 $S_z = \pm 2$ のエネルギー準位間に有限の遷移確率をもつ。

$D = 5.3 \text{ cm}^{-1}$ 、 $E = 0.9 \text{ cm}^{-1}$ 、 $g_z = 2$ とすれば、磁場をかけない

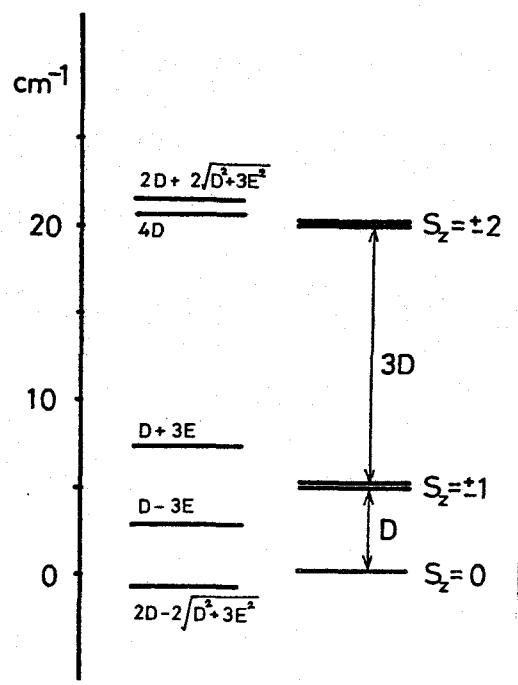
とき I = 図-46 I = 示す様 I = .
既 I = . $S_z = \pm 2$ のエネルギー準位が"約 0.4 cm^{-1} 分離して" $\approx I =$ なる。

ここで、使えたマイクロ波周波数は X-バンド" (0.3 cm^{-1}) は不可能で、K-バンド" (0.8 cm^{-1}) となる。

K-バンド" を使った場合、約 1800 ガウスで"共鳴が" 起るはずであるが、デキシ Hb, デキシ Mb I = ついては、

$20 \sim 77^\circ\text{K}$ では、EPR は観測されなかつた。もともと、測定周波数が K-バンド" (0.8 cm^{-1}) であつても、 $D = 5.3 \text{ cm}^{-1}$ にて、 $E > 1.2 \text{ cm}^{-1}$ では、 $S_z = \pm 2$ の

エネルギー準位の分離が" 0.8 cm^{-1} 以上になり測定が" 不可能になつた事も考えられる。



$$\begin{aligned} D &= 5.3 \text{ cm}^{-1} & D &= 5 \text{ cm}^{-1} \\ E &= 0.9 \text{ cm}^{-1} & E &= 0 \end{aligned}$$

図-46 エネルギー準位

4-4-2 極低温での測定

外部磁場が S_z 方向に平行に作用した場合、 $S_z = -1$ の準位が $S_z = 0$ の最低状態の準位に近づき、この場合、マイクロ波の振動磁場が外部磁場に垂直方向にかかるれば、 $S_z = 0$ と $S_z = -1$ のエネルギー準位間に有限の遷移確率がある。マイクロ波周波数 24 GHz (K-バンド) を使用すると、共鳴は 40 ～ 50 K ガウスで"起つ" $= I =$ なる。ここで、超伝導磁石を使用して、高磁場での測定を試みた。

磁場発生源、これは、三菱電機 K.K. 製作のソレノイド型超伝導磁石(最大磁場 60 K ガウス、コイル内径 30 mm) を使

用した。

EPR用空洞共振器は、K-バンド用で高Q値をとる様に、TE₀₁₁型を自作した。感度を向上させた為に、磁場変調周波数100 kHzを変調を使用した。

装置が正常に動いていたか否か、及び磁場校正是、低磁場側では酸化型Hb(Fe³⁺-高スピノン, g=6.0)やDPPH(標準試料, g=2.003)で、高磁場側(~50 Kガウス)では、Cr₂O₃の反強磁性共鳴(磁場//結晶C軸)より調べた。

測定は液体ヘリウム温度、4.2 K ~ 2.15 K(減圧He)の範囲で行たが、デオキシHb, Mb, 血球デオキシ, デオキシ-Hb多結晶, 単結晶の測定では、いずれも予想される磁場附近でEPRシグナルは観測できなかつた。不純物によるシグナルと思われるものを観測した場合は、同じ試料管を使つて一酸化炭素Hb, 一酸化炭素Mb(反磁性になつた)の観測を行つて、Fe²⁺高スピノンによるものではない事を確めた。

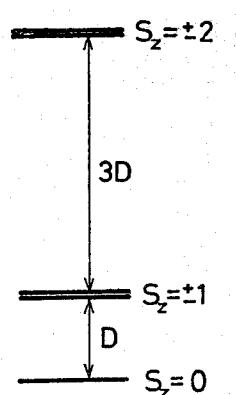
Y. ALpertら⁽⁷⁹⁾は、デオキシHbの磁化率の測定を行つた。

アロステリックエフェクターである2,3DPG(2,3-diphosphoglycerateの略)又は、IHP(イミトール六リン酸)を加えたデオキシHbと、脱塩Hb(有機リン酸を含まないHb)とでは、磁化率が異なりと報告している。これによると、脱塩-Hbの有效ボーア電子数N_{eff}が、S=2に対するスピンたけの値に近い(軌道角運動量の寄与が小さい)。したがつて、Dの値も小さくなることが期待されるので、脱塩-デオキシHb溶液でEPRを測定(たがシグナルは観測されなかつた)。

以上の測定結果から、(Fe²⁺のS_z=0とS_z=-1のエネルギー準位が接近する場合のEPRでは、緩和時間が何らかの影響を受けて、吸収線幅の増大が起り、シグナル観測が不可能にするという可能性は無視できない)。デオキシHbのEPRは観測できなかつた。

4-5 ヒトデオキシHb 及び Fe^{2+} ・高スピノ・ヘムモチル化合物の遠赤外測定

前節で論じた様に、波長1.2 cm のマイクロ波(K バンド; 0.8 cm^{-1})を用いた超伝導 EPR(0~60 Kガウス)では、ヒトデオキシHbの観測は成功しなかった。



さて、スピノハミルトニアソ Iにおいて、今、E項を零として無視すれば、 $S_z = 0$ と $S_z = \pm 1$ のエネルギー準位の大ささは、丁度 D に相当する(図-47)。

前節のトルク測定の結果、 $D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ であるから、これは、丁度サブミリ波の遠赤外領域 I に入る。

図-47 エネルギー準位
($E=0$ の場合)

ここで、ラメラー格子型フーリエ分光装置 I に、遠赤外の測定を行った。

4-5-1 ヒト・デオキシHb の遠赤外測定

本研究において使用したサブミリ波領域の遠赤外測定装置は、大阪大学工学部応用物理で開発されたラメラー格子型フーリエ分光装置である。

この分光装置では、スペクトルをフーリエ変換した「インターフェログラム」と呼ばれる信号が得られて、これを逆変換する事により、元のスペクトルを得る。この分光法では、スリットを使用していない為、従来のスリットを使用した一般的な分光器に比べ、大きな光量を利用できるので、スリット型分光器と同じ測定時間では S/N 比をあげることが出来る。したがって、光源の輝度の弱いサブミリ波領域の測光に威力を發揮する。装置等については文献(80)に詳しい。

先づ、血球・デオキシ・デオキシHb 液にて測定を試みた(4.2 K)が、現在使用している装置の感度では、スピノ数が不足で、観測に成功

しなかった。(比較実験と(2)。D値の判っていふ $H_b(Fe^{3+}) \cdot F^-$ も観測に成功しなかった。)

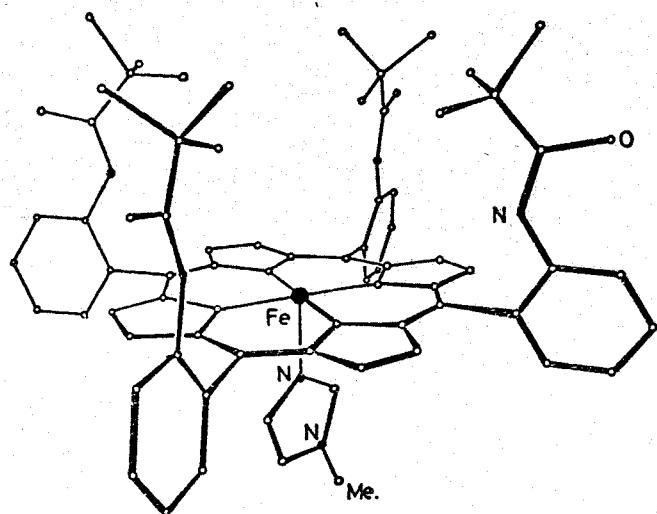


図-48
 $Fe(aaaa\text{-TPivPP})(1\text{-MeIm})$
 (ヒドロキシル・フェンスヘム)

では、スピニ数をかせぐ為には、蛋白部分のないヘム鐵たるけで、しかも Fe^{2+} ・高スピニのモデル化合物が必要になる。

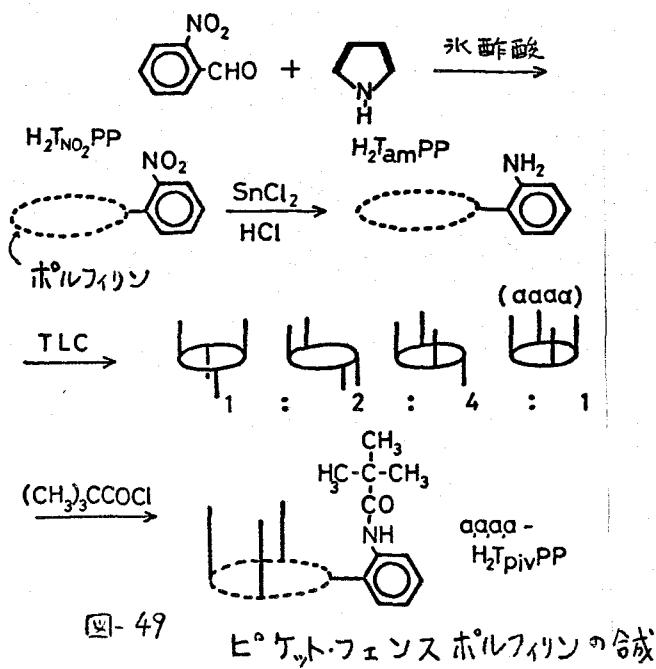
幸い、Collman らのグループによつて、デオキシHb、デオキシMb のモデル物質が合成された。

図-48 に示すようだ、いかゆるヒドロキシル・フェンス・ポルフィリン鉄錯体である⁽⁸¹⁾。
 このモデル化合物を使えば、

スピニ数も充分にとれ、遠赤外測定の可能性もでてこうといつものであるが、遠赤外測定には通常 100~200 mg の試料を必要とするので、先づこのモデル化合物を多量に合成しなければならない。

4-5-2 ヒドロキシル・フェンス・ヘムの合成⁽⁸¹⁾

まず、オルト・ニトロベンズアルdehyドとヒドロキシル・フェンス・ポルフィリン ($H_2T_{NO_2}PP$) を得る。
 メソ・テトラ・オルトニトロフェニル ポルフィリン ($H_2T_{NO_2}PP$) を得る。
 ニホウ酸性条件下で $SnCl_2$ でニトロ基をアミノ基に還元する⁽⁸¹⁾。
 メソ・テトラ・オルトアミノフェニル ポルフィリン ($H_2T_{Am}PP$) を得る。このポルフィリンは、オルト置換基の $-NH_2$ の方向性で 4 種類の異性体をもつ。4 個の $-NH_2$ が全て同じ向きを持つものを $(\alpha\alpha\alpha\alpha)$ 、1 つだけ逆向きのものを $(\alpha\alpha\alpha\beta)$ 等と書く⁽⁸¹⁾。これらの異性体が 1:2:4:1 の統計的割合で存在する⁽⁸¹⁾。これらの異性体はシリカゲルカラム又び薄層クロマト (TLC) により簡単に分離する事が出来る。



略記する) が得られる。これがいわゆる ピ⁰ケット・フェンス・ポルフィリンである。反応の模式図を図-49 に示しておく。

このポルフィリンとテトラハイドロフラン (THF) 還流下で FeBr_2 と反応させると、3価鉄錯体を得る。

この3価鉄錯体は、ベンゼン中で $[\text{Cr}(\text{acac})_3]_2$ によって、2価鉄に還元できる。 $[\text{Cr}(\text{acac})_3]_2$ (前述) は Ocone の方法⁽⁵¹⁾ により合成したものである。

我々も上記 Collman の方法⁽⁸¹⁾ によつて、ピ⁰ケット・フェンス・ヘムの合成を行つた。現在、 Fe^{3+} の還元が完全でなく、オキシ型ヘムの結晶化、更には、デオキシ型ヘムの結晶化には成功してない。

デオキシ型ピ⁰ケット・フェンス・ヘムの測定に成功してないが、ピ⁰ケット・フェンス・ヘムには酸素分子を脱着する事は出来ない。 Fe^{2+} 高スピンヘムへモデル化合物として $\text{Fe}^{2+} \cdot \text{TPP} \cdot 2 \cdot \text{MeIm} \cdot \text{EtOH}$ ⁽⁸²⁾ 微結晶を合成し、遠赤外スペクトルを測定した。

図-50 は測定結果を示す。 8cm^{-1} 附近には、ゆずかず吸収が認められる。試料が Fe^{2+} 化合物ではないことは、EPR 測定 (77°K) により Fe^{3+} のシグナルが認められること、空气中にさらしておとく、 Fe^{3+} の EPR シグナル ($g=6$) が現われてくる事より保証され

(d₂₂₂₂) 体を分離した残りの混合物をトルエン中で還元すると、フェニル基の回転が生じ、再び4種類の異性体が、
1:2:4:1 の平衡比で存在してくるので。(d₂₂₂₂) 体の收量を増やし続ける事が出来る。

この(d₂₂₂₂) 型 H_2TamPP は $(\text{CH}_3)_3\text{CCOCl}$ を反応させて、メソ・テトラ-(エミノ・オルト・パivalアミド) ポルフィリン ($\text{dddd-H}_2\text{T}_{\text{Piv}}\text{PP}$ と

る。

そこで、遠赤外スペクトルのわざか在吸收が、 Fe^{2+} -高スピノンによるものかどうかを調べた。試料を空気にならした後、再び遠赤外測定を行なう。

8 cm^{-1} 附近の吸收が消えかどうかを調べた。変化はある程度すが、わざかで、あつた。高圧下で円盤状にした試料を空気になら（した場合、円盤内部まで酸化されるかどうかの疑問は残る。したがって、現在の $\epsilon = 3$ の吸收が、 Fe^{2+} -高スピノンによるものかどうかについては断定できない。又、サブミリ波領域での遠赤外装置では、光源の輝度、検知器の感度等に関する、 5 cm^{-1} 以下の測定が非常に困難である事を付記しておく。

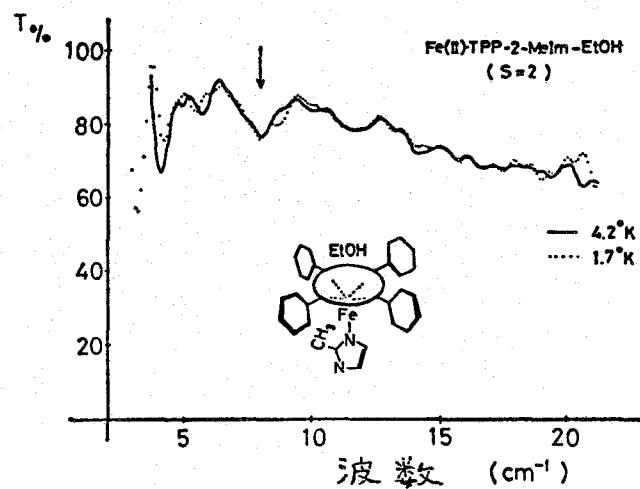


図-50 Fe^{2+} -高スピノン・ヘムの遠赤外スペクトル

4-6 結語。

本章においては、ヒト-デオキシHb (Fe^{2+} -高スピノン) について、特に EPR の可能性を追究した。

この為に、ヒト-デオキシHb 单結晶のトルク測定を、液体窒素温度 (77 K) 以上、及ぶ液体ヘリウム温度 (4.2 K) 以下で精密に行な、 $g_z = 2.0$ と仮定しても、直接零磁場分離定数 D を求められた事が判った。

その結果、D の値は 5 cm^{-1} 前後である $\epsilon = 2$ 。 ϵ の結果は、N. Nakano さんが求めた結果と大きな差はない事が判った。しかし、 $g_z = 2.0$ 、 g_z の方向が、Z 方向の磁化率主軸の方向と一致し、それがヘム面と垂直であると仮定すれば、X 線結晶

解析の結果(座標)を使い、Dを求め事が出来、各結晶面での計算の結果は、 $6 \sim 10 \text{ cm}^{-1}$ の範囲にハラつた。

又、 $D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ として、 g_z の方向が八面に垂直であると仮定して、X線結晶解析の結果(座標)を使い、 g_z を求めよと、各結晶面での計算の結果は $g_z = 2.2 \sim 2.5$ となつた。

したがつて、 $g_z = 2$ と仮定する事、あるいは、 g_z の方向が、八面に垂直であると仮定する事には無理があるが、結果として、Dの値にあまり影響してない事が判つた。

$D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ とすると、ヒト・デオキシ-Hb(Fe^{2+} 、高スピン状態)のEPRの測定の可能性があるので、種々の条件でEPR測定を行つたが、観測できなかつた。又、サブミリ波領域の遠赤外吸収スペクトル測定も試みたが、吸収の観測には成功しなかつた。

以上、四章にわたつて、常磁性共鳴を手段として、Hbを中心とする八面蛋白質の構造と機能の関係を、八面の電子状態の変化としてとらえようとしてきた。

現在、還元型(Fe^{2+})高スピンの八面鉄についてのEPRの観測に成功していいないので、EPRの可能なコバルト置換の八面蛋白、あるいはスピンラベル法によつて八面蛋白質の構造と機能を知るべく努力が払われてゐる。

Fe^{2+} -高スピンの八面鉄についてのEPRシグナルの観測が可能になれば、従来の Fe^{3+} 八面鉄のEPR、その他の物理化学的測定だけでは得られなかつた新しい研究手段と情報、結果などをもたらすであろう。

謝 辞

本稿を終るにあたり、測定結果を検討、及び種々の問題
実の示唆等、理論、実験両面にわたって、貴重な助言を
与えて下さった小谷正雄先生（東京理科大）、森本英樹先生、
飯塚哲太郎先生（慶大、医化学）に対し心から感謝致します。

又、 Fe^{2+} EPR 測定に關し、研究条件について色々の配慮を
して下さった田崎明先生（筑波大）、大塚仁也先生（東京理科大）
中野儀人氏に。

又、遠赤外測定に關し、快く装置を使用させて下さった
阪井清美先生（大阪大学工学部）、市村克彦氏に。

又、種々のヘムの合成について助言、協力して下さった
生越久靖先生（京都大学工学部）、当研究室の宮崎源太郎
先生、阪本肇氏に。

又、バレンシー・ハイドロ- Hb 、 NO-Hb 、 HbM の実験において全面
的に協力して下さった長井潔氏に心から感謝の意を
表します。

最後に、本研究を遂行するに当って、終始、筆者を
激励し、貴重な物質的、精神的援助を与えて下さった
当研究室並びに当生物工学科の諸氏に心から御礼
申しあげます。

参考文献

- 1) J.C.Kendrew, R.E.Dickerson, B.E.Strandberg, R.G.Hart, D.R.Davis,
D.C.Phillips & V.C.Shore,
Nature(London), 185, 422(1960)
coordinate;
J.C.Kendrew, H.C.Watson & D.C.Phillips
(unpublished results)
H.C.Watson, Prog.Stereochemistry, 4, 299(1969)
- 2) J.C.Kendrew & R.G.Parrish,
Proc.Roy.Soc.A, 238, 305(1956)
- 3) J.C.Kendrew, R.G.Parrish, J.R.Marrack & E.S.Orleans,
Nature, 174, 946(1954)
- 4) F.W.J.Teale, Biochim.Biophys.Acta., 35, 543(1959)
- 5) N.Tanaka, (private communication)
- 6) J.E.Bennett, J.E.Gibson & D.J.E.Ingram,
Proc.Roy.Soc.A, 240, 67(1957)
- 7) H.Morimoto, T.Iizuka, J.Otsuka & M.Kotani,
Biochim.Biophys.Acta., 102, 624(1965)
- 8) A.Tasaki, J.Otsuka & M.Kotani,
Biochim.Biophys.Acta., 140, 284(1967)
- 9) G.C.Brackett, P.L.Richards & W.S.Caughey,
J.Chem.Phys., 54, 4383(1971)
- 10) G.Lang & W.Marshall, Proc.Phy.Soc.(london) 87, 3(1966)
- 11) J.F.Gibson & D.J.E.Ingram,
Nature, 180, 30(1957)
- 12) M.Kotani, Theoret.Phys.(Kyoto) Suppl., 17, 4(1961)
- 13) I.Salmeen & G.Palmer, J.Chem.Phys., 48, 2049(1967)
- 14) H.Hori & H.Morimoto, Biochim.Biophys.Acta., 200, 581(1970)
- 15) G.M.Harris Loew, Biophys.J., 10, 196(1970)

- 16) H.Hori, Biochim.Biophys.Acta., 251, 227(1971)
- 17) D.S.Schonland, Proc.Phys.Soc., 73, 788(1959)
- 18) F.K.Kneubühl, J.Chem.Phys., 33, 1074(1960)
- 19) H.Hori, Biochim.Biophys.Acta., 278, 399(1972)
- 20) L.Stryer,J.C.Kendrew & H.C.Watson, J.Mol.Biol., 8, 96(1964)
- 21) T.Takano, J.Mol.Biol., 110, 537(1977)
- 22) J.S.Griffith, Nature, 180, 30(1957)
- 23) G.L.Helcké,D.J.E.Ingram & E.F.Slade, Proc.Roy.Soc.B, 169, 275(1968)
- 24) P.A.Bretscher, Nature, 219, 606(1968)
- 25) P.George,J.Beestlestone & J.S.Griffith, Revs.Mod.Phys., 36, 441(1964)
- 26) T.Iizuka & M.Kotani, Biochim.Biophys.Acta., 181, 175(1969)
- 27) T.Iizuka & M.Kotani, Biochim.Biophys.Acta., 194, 361(1969)
- 28) T.Yonetani,T.Iizuka & T.Asakura, J.Biol.Chem., 247, 863(1972)
- 29) J.Otsuka, Biochim.Biophys.Acta., 214, 233(1970)
- 30) G.Lang,T.Asakura & T.Yonetani, J.Phys.Ser.C, 2, 2246(1969)
- 31) G.Lang,T.Asakura & T.Yonetani, Biochim.Biophys.Acta., 214, 381(1970)
- 32) A.Rossi-Fanelli & E.Antonini, Arch.Biochem.Biophys., 72, 243(1957)
- 33) M.H.Smith & Q.H.Gibson, Biochem.J., 73, 101(1959)
- 34) J.E.O'Hagan & P.George, Biochem.J., 74, 424(1960)
- 35) N.Nakano,K.Nakano & A.Tasaki, Biochim.Biophys.Acta., 251, 303(1971)
- 36) M.Tamura & H.Hori, Biochim.Biophys.Acta., 284, 20(1972)
- 37) T.Asakura & T.Yonetani, J.Biol.Chem., 247, 2278(1972)

- 38) M.Tamura, T.Asakura & T.Yonetani,
Biochim.Biophys.Acta., 268, 292(1972)
- 39) Y.Sugita & Y.Yoneyama, J.Biol.Chem., 246, 388(1971)
- 40) J.Monod, J.Wyman & J.P.Changeux,
J.Mol.Biol., 12, 88(1965)
- 41) M.F.Perutz,
Nature, 228, 726(1970)
- 42) K.Nagai, H.Hori, S.Yoshida, H.Sakamoto & H.Morimoto,
Biochim.Biophys.Acta., in the press
- 43) M.F.Perutz, J.V.Kilmartin, K.Nagai, A.Szabo & S.R.Simon,
Biochemistry, 15, 378(1976)
- 44) J.C.Maxwell & W.S.Caughey,
Biochemistry, 15, 388(1976)
- 45) A.Szabo & M.F.Perutz, Biochemistry, 15, 4427(1976)
- 46) Y.Henry & R.Banerjee, J.Mol.Biol., 13, 469(1973)
- 47) J.V.Kilmartin, J.Fogg, M.Luzzana & L.Rossi-Bernardi,
J.Biol.Chem., 248, 7039(1973)
- 48) J.V.Kilmartin, J.V.Hewitt & J.F.Wooton,
J.Mol.Biol., 93, 203(1975)
- 49) B.B.Wayland & L.W.Olson, J.Amer.Chem.Soc., 96, 6037(1974)
- 50) W.R.Scheidt & M.E.Frisse,
J.Amer.Chem.Soc., 97, 17(1975)
- 51) L.R.Ocone & B.P.Block, Inorg.Syn., 8, 125(1960)
- 52) T.Shiga, K.J.Whang & I.Tyuma,
Biochemistry, 8, 378(1969)
- 53) H.Rein, O.Ristau & W.Scheler,
FEBS Lett., 24, 24(1972)
- 54) H.Kon,
Biochim.Biophys.Acta., 379, 103(1975)
- 55) T.Iizuka, H.Yamamoto, M.Kotani & T.Yonetani,
Biochim.Biophys.Acta., 351, 182(1974)

- 56) D.Bawlt & M.Rouge, Biochemistry, 13, 4598(1974)
- 57) M.F.Perutz, Nature, 237, 495(1972)
- 58) M.F.Perutz, A.R.Fersht, S.R.Simon & G.C.K.Roberts, Biochemistry, 13, 2174(1974)
- 59) M.F.Perutz, E.J.Heidner, J.E.Ladner, J.G.Beestlestone, C.Ho & E.F.Slade Biochemistry, 13, 2187(1974)
- 60) R.Banerjee & R.Cassoly, J.Mol.Biol., 42, 351(1969)
- 61) R.Banerjee, F.Stetzkowski & Y.Henry, J.Mol.Biol., 73, 455(1973)
- 62) K.Nagi & H.Hori, (unpublished results)
- 63) K.Nagai, J.Mol.Biol., 111, 41(1977)
- 64) A.Hayashi, T.Suzuki, A.Shimizu, H.Morimoto & H.Watari, Biochim.Biophys.Acta., 147, 407(1967)
- 65) A.Hayashi, T.Suzuki, K.Imai, H.Morimoto & H.Watari, Biochim.Biophys.Acta., 194, 6(1969)
- 66) G.Feher, R.A.Isaacson, C.P.Scholes & R.Nagel, Annals New York Academy of Sciences, (1973)
- 67) T.R.Lindstrom, C.Ho & A.V.Pisciotta, Nature(N.B.), 237, 263(1972)
- 68) M.F.Perutz, P.D.Palsinelli & H.M.Ranney, Nature(N.B.), 237, 259(1972)
- 69) P.D.Palsinelli, M.F.Perutz & R.L.Nagel, Proc.Nat.Acad.Sci.USA., 70, 3870(1973)
- 70) K.Nishikura, Y.Sugita, M.Nagai, Y.Yoneyama & R.Jagluburg, Nature, 254, 727(1975)
- 71) L.Pauling & C.D.Coryell, Proc.Nat.Acad.Sci.USA., 22, 210(1936)
- 72) N.Nakano, J.Otsuka & A.Tasaki, Biochim.Biophys.Acta., 236, 222(1971)

- 73) N.Nakano, J.Otsuka & A.Tasaki,
Biochim.Biophys.Acta., 278, 355(1972)
- 74) C.Rudowicz,
Bioghim.Biophys.Acta., 490, 301(1977)
- 75) M.F.Perutz,
J.Cryst.Growth , 2, 54(1968)
- 76) H.Morimoto et al.,
Biochim.Biophys.Acta., 102, 624(1965)
- 77) M.Tinkam,
Proc.Roy.Soc.A, 236, 535(1956)
- 78) W.Low & M.Weger,
Phys.Rev., 118, 1119(1960)
- 79) Y.Alpert, R.Banerjee & J.Denis,
Nature(N.B.), 243, 80(1973)
- 80) 阪井清美 et al.,
元用物理, 第46巻, 第3号 239(1977)
- 81) J.P.Collman et al.,
J.Amer.Chem.Soc., 97, 1427(1975)
- 82) J.P.Collman et al.,
J.Amer.Chem.Soc., 95, 2048(1973)