

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

常磁性共鳴吸収による Λ 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

	ページ
要 旨 及 μ 参考論文リスト	i ~ iv
第一章 Λ_4 と アホ \cdot 蛋白質との相互作用	
1-1 緒 言	1
1-2 試 料	
1-2-1 プロト Λ_4 及 μ の誘導体	3
1-2-2 ミoglobinの結晶化	4
1-3 測定装置	5
1-4 単結晶中の Λ_4 方位の解析法	
1-4-1 Fe^{3+} 高スピンの場合	7
1-4-2 Fe^{3+} 低スピンの場合	10
1-5 実験結果	
1-5-1 ミoglobin(Fe^{3+})の Λ_4 方位 — 配位子の影響 —	15
1-5-2 ミoglobin(Fe^{3+})の Λ_4 方位 — Λ_4 側鎖の影響 —	
A) 2, 4 位の ヴィニル基の影響	19
B) 6, 7 位の プロピオン酸基の影響	24
1-6 考 察	
1-6-1 配位子の Λ_4 面に対する影響	27
1-6-2 Λ_4 側鎖の影響	
A) ホルフィン環の 2, 4 側鎖の ヴィニル基の影響	30
B) ホルフィン環の 6, 7 側鎖のプロピオン酸基の影響	32
第二章 Λ モグロビン(Hb)の四次構造と Λ_4 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	一酸化窒素-Hb (NO-Hb) 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グロブリン-Hb の EPR	42
2-4-3	種々の一酸化窒素ヘムグロブリン-Hb の光解離	44
2-4-4	5配位一酸化窒素ヘムモデル物質の光解離	47

第三章 ヘムグロブリン (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・ヘムグロブリン-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+} -高スピンの EPR スペクトル	52
3-3	異常 Hb M の EPR	55
3-3-1	Hb M Milwaukee-1 (11E (367) Val. \rightarrow Glu.)	57
3-3-2	Hb M Boston (7E (258) His. \rightarrow Tyr.)	61
3-4	結語	

第四章 還元型・デオキシヘムグロブリン (Fe^{2+} 高スピン) 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	トルク測定的一般原理	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・デキシンHb単結晶のトルク測定結果及び考察	74
4-4	ヒト・デキシン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・デキシンHb及び Fe^{2+} -高スピン Λ_4 モデル化合物の遠赤外測定	
4-5-1	ヒト・デキシンHbの遠赤外測定	82
4-5-2	ピケット・フェンス・ Λ_4 の合成	83
4-6	結語	
謝辞		87
参考文献		88

<要旨>

脊推動物の赤血球中において、酸素分子を肺から諸組織に運搬するヘモグロビンや、筋肉中において、酸素分子の貯蔵にあた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いる役割を知るために、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、ヘムがどのように、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、ヘム面方位あるいは g テンソルの主値の方位を決定した。その結果、ミオグロビンのヘムは蛋白質の中で、ある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なって、ヘム面の異方性(g -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配位子のヒスタ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、ヘムの電子状態に、どのように影響しているかを調べる為に、ポルフィリン環の2,4側鎖のウイ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。その結果、2,4側鎖のウイ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割をはたして

いる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メーションが変化する場合、配位子の結合により、一つのサブユニットにおこった変化が、どのようにして他のサブユニットの Λ_4 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に言論じた。

先づ、第二章では、一酸化窒素(NO)ヘモグロビンの 42°K における常磁性共鳴 μN 、近赤外領域におけるNOの光解離実験より、NOヘモグロビンの Λ_4 の電子状態と、ヘモグロビンの四次構造との関係を言論じた。

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 α 鎖のNO- Λ_4 は5配位構造をとる。NOのNの核スピンのよるするとい3本の特徴的な超微細構造を示した。キシン型の四次構造(R状態)をとるNO-ヘモグロビンでは、6配位構造をとる。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、 42°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 Λ_4 から解離し、 42°K に保つ限り、いつまでも再結合をしない事が知られているので、常磁性共鳴 μN 近赤外の低温スペクトルがNOの光解離に伴って、どのような変化をするか、それが又、 $R \rightleftharpoons T$ の四次構造の平衡と、どのような関係があるかを調べた。その結果、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本のすると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- Λ_4 モデル物質で行った。3% SDS中のNO- Λ_4 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ことを見出した。この事は、蛋白部分が、 Λ_4 から解離したNOをトラップする重要な役割をしている事を示唆するものである。

第三章では、 Λ_4 間相互作用のメカニズムと電子状態のレベル

で理解する為には、酸化型 (Fe^{3+}) 高スピン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・ハイグッド・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、酸化、還元に伴い、どのような変化をするのかを調べた。

その結果、バレンシー・ハイグッド・ヘモグロビンの常磁性共鳴については、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引き起こされ、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 $g \sim 6$ 付近に、通常の Fe^{3+} の $g = 6$ の常磁性共鳴スペクトルの他に、フロードなシグナルを示した。又、R 構造である $\alpha\text{-ヘモグロビン} (\alpha_2^3 \beta_2^3)$ に IHP を加えると $g \sim 6$ 付近に、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・ハイグッド・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・ハイグッド・ヘモグロビンの様に Hill の n 値との関係を見つけ出す事は出来なかった。

しかし、今まで $M_{\text{Hyde park}}$ 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 Fe^{3+} に配位している配位子の動きと、蛋白質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+} , 高スピン) の常磁性共鳴の可能性を追究した。その為には、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、 $g = 2.0$ という仮定をおかなくても零磁場分離 D が求まる事を示した。その結果、 D は 5 cm^3 前後であることを確認した。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 deuterio-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 Nitrosyl 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7解析結果は未発表

第一章 ハムとアポ蛋白質との相互作用

1-1 緒言

脊椎動物の赤血球中において、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)、筋肉中において、酸素分子の貯蔵にあたるミオグロビン(Mbと略記)等のハム蛋白質の活性中心は、補欠分子族とよばれるハムである。

ハムは 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はプロトハムを示す)

ハムの鉄は、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を中心とするハム蛋白質の研究は、Hbが酸素分子といかなる機構によって結合、

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、いかに

なる役割をはたしているのか。鉄の電子状態を知る為には、磁気的方法が、もっとも有効な手段である。それは、この鉄が、ポルフィリンという光吸収のつよいπ電子系にはまっていますために、d電子の光吸収スペクトルをみる事ができなくなり、もっとも大きな理由の一つになっている。磁気的方法としては、常磁性共鳴吸収、メスバウアー効果、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。単にエネルギー準位を詳細に決定するだけであれば、それは、錯体化学、物性物理の域と出ない。我々の知りたいのは、エネルギー準位はもちろんの事ではあるが、活性中心の電子状態の変化がハム蛋白質の機能にはたしている役割は何かということである。それを知るためには、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

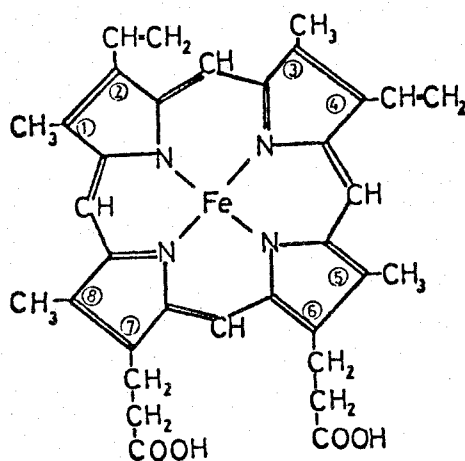


図-1 プロトハム

ついで 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 各種の 情報と、その他の 物理化学的測定結果とを 対比させる事によって、 Hb 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いうものである。

Hb 蛋白質の Hb 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、その全スピン量子数は $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{2}$, $\frac{5}{2}$ の3種類が可能である。酸化型 Mb (鉄は3個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+} と配位子がイオンの結合している場合は、 $S = \frac{5}{2}$ のもの (これを高スピン型という) 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う) が基底状態になる。

一、 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、その全スピン量子数は 0 , 1 , 2 の3種類が可能である。酸素分子の結合している状態は $S = 0$ となり、酸素分子の結合していない状態 (これをデキシ Mb , デキシ Hb という) 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、高スピン型という。 $S = 0$ 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 1.4 \AA 高分解能 X 線結晶解析によって、明らかにされており、それによると、 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 $\frac{3}{4}$ 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、全体としてはよく詰った構造を作っている。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までの記号がつけられている。そこで、蛋白質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、ポリペプチド鎖の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るようにして、プロトハムがある。

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

ハムは主として、非極性基によって囲まれており、ハ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中のハムは、ある一定の方向性を持っててしか安定に入れられないように、立体構造的に制限されていると推定される。

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

ハムの鉄に配位している配位子、ハ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、ハム側鎖のプ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単結晶中でのハム面方位、ハム面の異方性の方向が配位子の種類や、ハムの側鎖を変える事によって、どのように影響されるかを調べ、上記観点よりハムと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 プロトハム 及び その誘導体

Mbのハムはプロトハムと呼ばれる。ハム蛋白質にもっともよくみられるハムである。後述するHbのハムもプロトハムである。ハ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、ハムの抜けたHbやMbに再びハムを入れることもできる。

ハ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う)

のイミダゾール窒素(N)が配位している。

反対側は、生体内では O_2 が配位する。

図-2 の X で示した箇所である。

Fe^{3+} の状態では、X は H_2O , F^- ,

OCN^- , N_3^- , 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 もう一つのヒスタジン (distal His. あるいは

遠位ヒスタジンという) のイミダゾールがあり。

プロトハ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。

プロトハムの特徴は、図-1 に示したように

3,4 側鎖に ヴィニル基 ($-CH=CH_2$) を持って

いることであるが、このヴィニル基の二重結合を

各々 2 個の水素原子で飽和させて、 $-CH_2-CH_3$ としたハムをメゾ-ハムと云う。

Mb のプロトハムをこのメゾハムで置き換えたものを再構成メゾ Mb (

R-メゾ-Mb と略記する。特に断わらない限り、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 $-CH=CH_2$ 全体を水素原子で置き換えたものを

テラ-テロ-ハムと称し、Mb のプロトハムをこのハムで置き換えたものを

再構成テラ-テロ Mb (R-テラ-テロ-Mb と略記) と云う。

又、6,7 側鎖のプロピオン酸基 ($-CH_2-CH_2-COOH$) をエステル化

(した ($-CH_2-CH_2-COOCH_3$) ハムをプロトハム-ジメチルエステルと称し、

Mb のプロトハムをこのハ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。

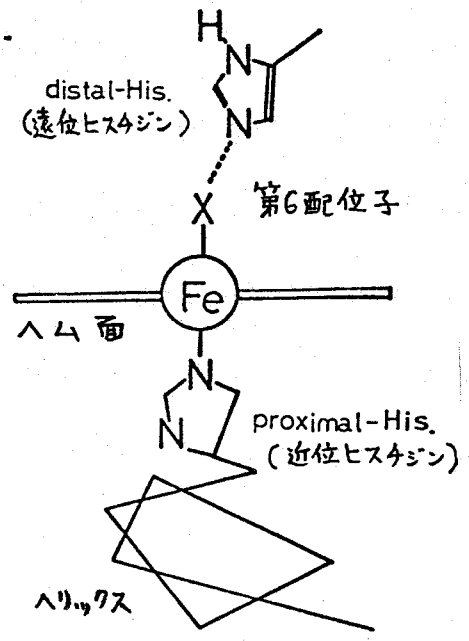


図-2 ハムの上下の配位子

1-2-2 ミオグロビンの結晶化

本研究で扱う Mb は、マッコウクジラの赤肉から Kendrew ⁽²⁾ の方法で基礎として抽出、精製されたものである。精製された酸化型 Mb (Fe^{3+}) は約 80% 飽和硫酸 (pH ~ 6 に調整) 中で容易に結晶化される。

これらの結晶はタイプ-A と呼ばれ、Kendrew さんが X 線結晶解析に使用したものと同じタイプ³⁾の結晶である。

この結晶は、単斜晶系に属し、 $a = 64.6 \text{ \AA}$, $b = 31.1 \text{ \AA}$, $c = 38.8 \text{ \AA}$, $\beta = 105.5^\circ$ であり³⁾、単位胞中に 2 個の分子が含まれる。この空間群は P_2 と表わされる。

硫酸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^* 軸に与える) は容易に肉眼で決定できる。

メト-Mb は単結晶のまま、種々の誘導体を作る事が出来る。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、 $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{CN}^-$, $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\cdot\text{N}_3^-$, $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\cdot\text{Im}$, $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{OCN}^-$ 及び $\text{Mb}(\text{Fe}^{3+})\text{F}^-$ の単結晶が出来る。

次に、再構成 Mb であるが、プロト A は化学的処理によって蛋白質本体 (アポ蛋白) から容易に取り外したり、再び化学的に結合させる事が出来る。本研究で扱うアポ-Mb は Teale⁴⁾ 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。アポ Mb は、プロト A, メソ A, デューテロ A, プロト A-ジメチルエステルと各々、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させる事が出来た。R-プロト-Mb, R-メソ-Mb 及び R-デューテロ-Mb の単結晶は面角の測定より全て、タイプ-A の単結晶であった。

しかし、R-ジエステル-Mb の単結晶はタイプ-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

$$H(\text{ガウス}) = 23487 \times \nu^H(\text{MHz})$$

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ワービンに挿入する。

デュワービンは更に、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。試料ホルダー軸のまわりを手でまわして、 θ 値の角度変化を測定する。

測定は10°間隔で行った。

試料ホルダー上の結晶の軸方向は、肉眼で決定した。特に、 π 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ダーを使用した。

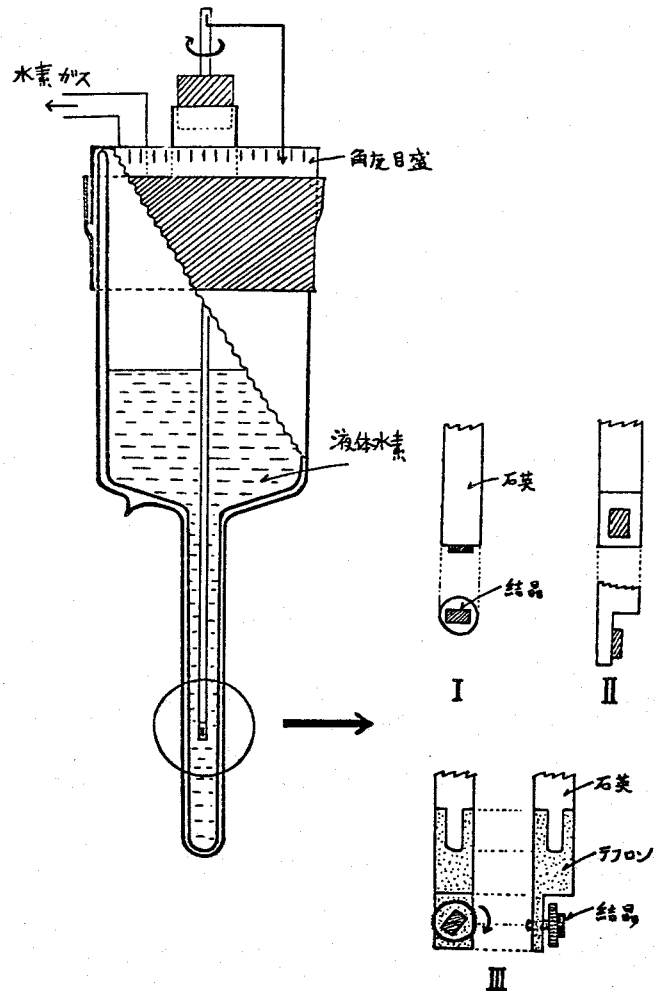


図-3 単結晶用デュワー
及NMR単結晶支持台

1-4 単結晶中の Λ_4 方位の解析法1-4-1 Fe^{3+} - 高スピンの場合

Fe^{3+} 高スピンの EPR について論じる。

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く、スピンの向きによって、6 重項状態になっている。鉄がホルファイリンに入ると、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 のスピン 6 重項は、磁場を加えなくても、 Λ_4 の低い対称性の為に 3 個のクラマス 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ンハミルトニアン：

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

で書き表わされる。

ここで、 S_x, S_y, S_z は合成されたスピンの x, y, z 成分を表わし、D は Λ_4 面に垂直な方向の異方性の強さ、E は Λ_4 面内の異方性の強さ (対称性の低さ) と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、スピン・軌道相互作用によって、基底状態の 6A_1 に少し混ってきている。その混り方が、 $S_z = \pm 1/2, \pm 3/2, \pm 5/2$ によって異なっている為、 6A_1 が 3 つのスピン 2 重項 (クラマス 2 重項) に分裂するようになる。

(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 $\Delta E_x, \Delta E_y, \Delta E_z$ とすると計算の結果、

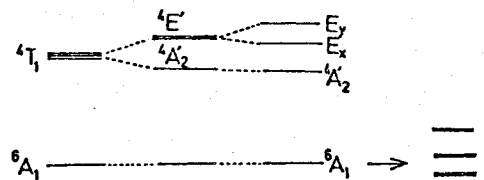


図-4 6A_1 の分裂

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

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

と書ける事が知られている。ここで a 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 ($\wedge 4$ 面に垂直) を主軸方向にとることにより、 $\Delta E_x = \Delta E_y$ 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。 $\wedge 4$ 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ことに基づいていると考えられている。

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 ($S_z = \pm 1/2$) 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 は⁽⁶⁾、 Fe^{3+} -高スピンの $\wedge 4$ 蛋白質を使って、最低の二重項 $S_z = \pm 1/2$ のゼーマン分裂による EPR を観測し、 $g_{\parallel} = 2$ ($\wedge 4$ 面に垂直方向に磁場をかけた場合の g 値)、 $g_{\perp} = 6$ ($\wedge 4$ 面内に磁場をかけた場合の g 値) を得た。EPR では g 値をもって Mg^{2+} 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。スピンハミルトニアン(1)式を使って

$$g_{\perp} \begin{cases} g_x = 6 + 24 \frac{E}{D} + 0(1/D^2) \\ g_y = 6 - 24 \frac{E}{D} + 0(1/D^2) \end{cases} \quad (3)$$

$$g_{\parallel} = g_z = 2 + 0(1/D^2) \quad \text{を得る。}$$

EPR の測定結果が、ある種の Λ_4 及び μ Λ_4 蛋白質を例外として、 $g_{\perp} \approx 6$, $g_{\parallel} = 2$ であることから、 E/D は非常に小さい値である事が予測される。

D の値は、種々の Λ_4 蛋白質、 Λ_4 モデル物質について、磁化率遠赤外⁽⁹⁾、Xスバウザー効果⁽¹⁰⁾等の測定によって決定されている。^(7,8)
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。

そこで、スピルハミルトン (1) において、 $E=0$, $D \gg 2\beta S \cdot H$ として、 $S=5/2$, $S_z = \pm 1/2$ で解けば、

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

高スピン状態 ($S=5/2$)

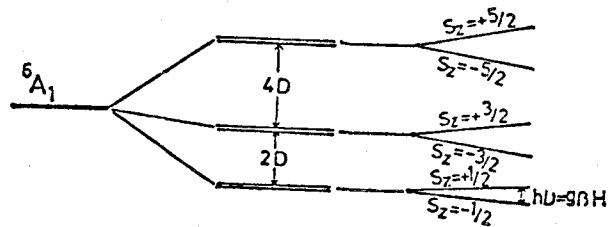


図-5 零磁場分離

の関係を得る。

磁場を z 軸 (Λ_4 面に垂直な

方向) に平行にかけると、 $g_{\parallel} = 2$ となり、x または y 軸 (Λ_4 面に平行) に平行にかけると、 $g_{\perp} = 6$ を得る。

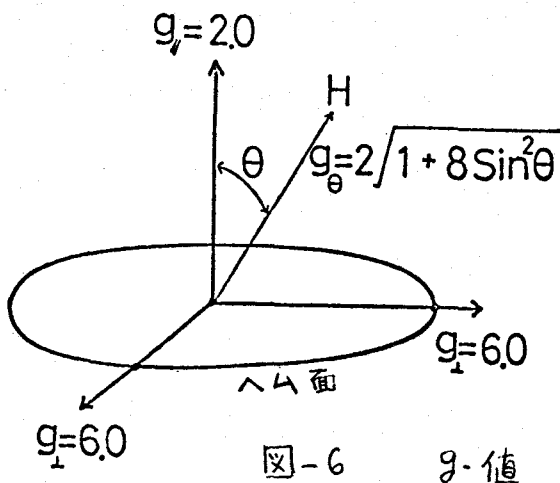


図-6 に Λ_4 の g 値のとり方を示す。こゝに示す g 値とは前述した様に、「見掛けの g 値」で $h\nu/\beta H$ で定義されるものである。

Λ_4 法線 (g_{\parallel} の方向) と θ の角度をなす方向に磁場をかけると、 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 Λ_4 法線のなす角度 θ が計算される。

Ingram の⁽⁶⁾ は、この方法を用いて、酸化型 Mb, Hb の単結晶中の Λ_4 方位を決定した。我々も、 Fe^{3+} ・高スピンの Λ_4 方位決定にはこの方法を使用した。

1-4-2 Fe^{3+} ・低スピンの場合

Fe^{3+} ・低スピンの電子状態について論じる。

Fe^{3+} ・低スピンの場合、基底状態は立方対称場では、 $2T_2$ で表わされる。

即ち、強い結晶場により、2重縮重の e_g 軌道と、3重縮重の t_{2g} 軌道の分裂が、スピ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 となるが、 t_{2g} 軌道は、6個の電子で完全に閉殻となる訳だから、 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} 軌道にあると考えられる。即ち、 t_{2g}^5 の5電子としての計算は、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 Hb N_3^- 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) のエネルギー準位を計算している。同様の計算が、

Salmeen⁽¹³⁾ により、ウシ心筋 4170-4 C (Cyt. C (Fe^{3+}) と略記) で、

又、Hori⁽¹⁴⁾ により、カウ心筋 Cyt. C (Fe^{3+}) においても計算されている。

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

3つの二重項状態を作り、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、 $g=2$ となるはずであるが、実際には、 g 値は
 かなり互よりずれて、かつ異方性を示している。

これは、スピン軌道相互作用
 によって、3つの二重項状態
 が混り合、て軌道的には、
 一重項であるが、スピン二重項を
 もつ。新しい3つの軌道

(d_{xy}, d_{xz}, d_{yz}) になると
 して説明される。したがって、
 最低状態のクマース = 二重項
 のスピン-軌道関数は、

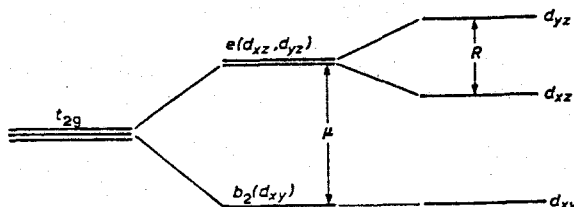


図-7 t_{2g} 軌道のエネルギー準位

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

(| 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、

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

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 Λ_4 蛋白質の低スピン (Fe^{3+}) の
 g 値を解析して、 Fe^{3+} 低スピン Λ_4 蛋白質を5つの型に
 分類している。

さて、 x, y 軸は、 Λ_4 面内に、 z 軸は Λ_4 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 ε をして 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
あり、2 個の \wedge 4 面は、結晶中で 異った方向を向いて いる。

そこで、2 個の \wedge 4 のうち、1 つに (x, y, z) 直交座標系を
設定する。x, y 及 z' z 軸 方向は、g-テンソル の 主値の
方向 (g_x, g_y 及 z' g_z の 方向) に一致して いるものとする。

又、 g_a, g_b 及 z' g_{c^*} は、各結晶軸 a, b 及 z' 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) なる 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、 \wedge 4 面に 設定した 直
交座標系 (x, y, z) の 間 の オ行一角を計算すればよい事に なる。

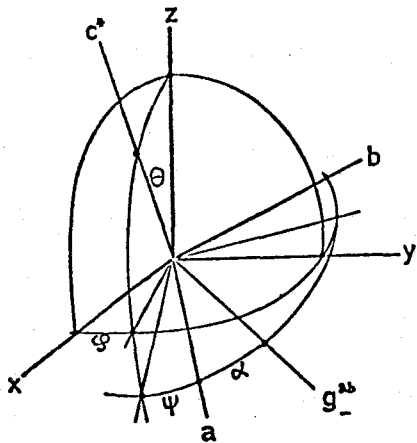


図-8 オ行一角

オ行一角の 与り方は 図-8 に 示す。

$$(x, y, z)$$

↓ φ : z 軸のまわりの回転

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

↓ θ : y' 軸のまわりの回転

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

↓ ψ : z' 軸のまわりの回転

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

このオ行一角を使って、 (g_a, g_b, g_{c^*}) と (g_x, g_y, g_z) の 関係 を 求

めると、次の様になる。

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

==で、 g_{-}^{ab} は 結晶 ab 面内に於ける g 値の最小値である。

角度 α は a 軸 と g_{-}^{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) を求める為 に使用した実験値は、 $g_a, g_b, g_c, g_x, g_y, g_z, g_{-}^{ab}, g_{+}^{ab}$ (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、

$$\begin{aligned}
 g_a^2 + g_b^2 + g_c^2 &= g_x^2 + g_y^2 + g_z^2 \\
 g_a^2 + g_b^2 &= g_{+}^{ab^2} + g_{-}^{ab^2}, \quad g_a^2 = g_{-}^{ab^2} \cdot \cos^2\alpha + g_{+}^{ab^2} \cdot \sin^2\alpha
 \end{aligned}$$

という関係がある。

これらの式より

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

$$\begin{aligned}
 A &= g_x^2(\cos^2\varphi\cos^2\theta - \sin^2\varphi) + g_y^2(\sin^2\varphi\cos^2\theta - \cos^2\varphi) + g_z^2\sin^2\theta \\
 B &= 2(g_y^2 - g_x^2)\cos\varphi \cdot \sin\varphi\cos\theta
 \end{aligned}$$

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 g 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ととじて、又、 x, y, z 軸の符号を変えり事によっても、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、例えば bc^* 面の測定値を使って行なわねばならない。この場合も、前と同様に、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組と一致する。(方向余弦に換算して) ところで、一致しない他の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使用して、正しい解として、8通りの解が得られる。これらの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 hkl 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使用している点、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(方向余弦に対応)を求めているのに対して、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($g_a, g_b, g_{-}^{ab}, g_{+}^{ab}, \lambda$) 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シグナルが1本に重なる点であるので、 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、 $Mb(Fe^{2+})-CN^-$ や $Mb(Fe^{2+})OCN^-$ の低スピンの g_x のシグナルの様非常にブロードで g_x の値が不確かな場合は $g_a^2 + g_b^2 + g_{c^*}^2 = g_x^2 + g_y^2 + g_z^2$ の関係より、 g_a, g_b, g_{c^*}, g_y 及び g_z の値を使って g_x を求められる。

bc^* 面 及び 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は使用したにすぎない。

したがって、本解析法は、溶液試料から g 値が判ってい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 ($917^{\circ}A$) 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押えられたので、上記解析法による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 $\wedge 4$ 方位 — 配位子の影響 —

本節では、ミオグロビン (Mb) 中での $\wedge 4$ 面方位、 $\wedge 4$ 面の異方性の方向を決めている因子が何であるかを知らる為には、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 に、溶液 (凍結試料) の EPR スペクトルを示す。

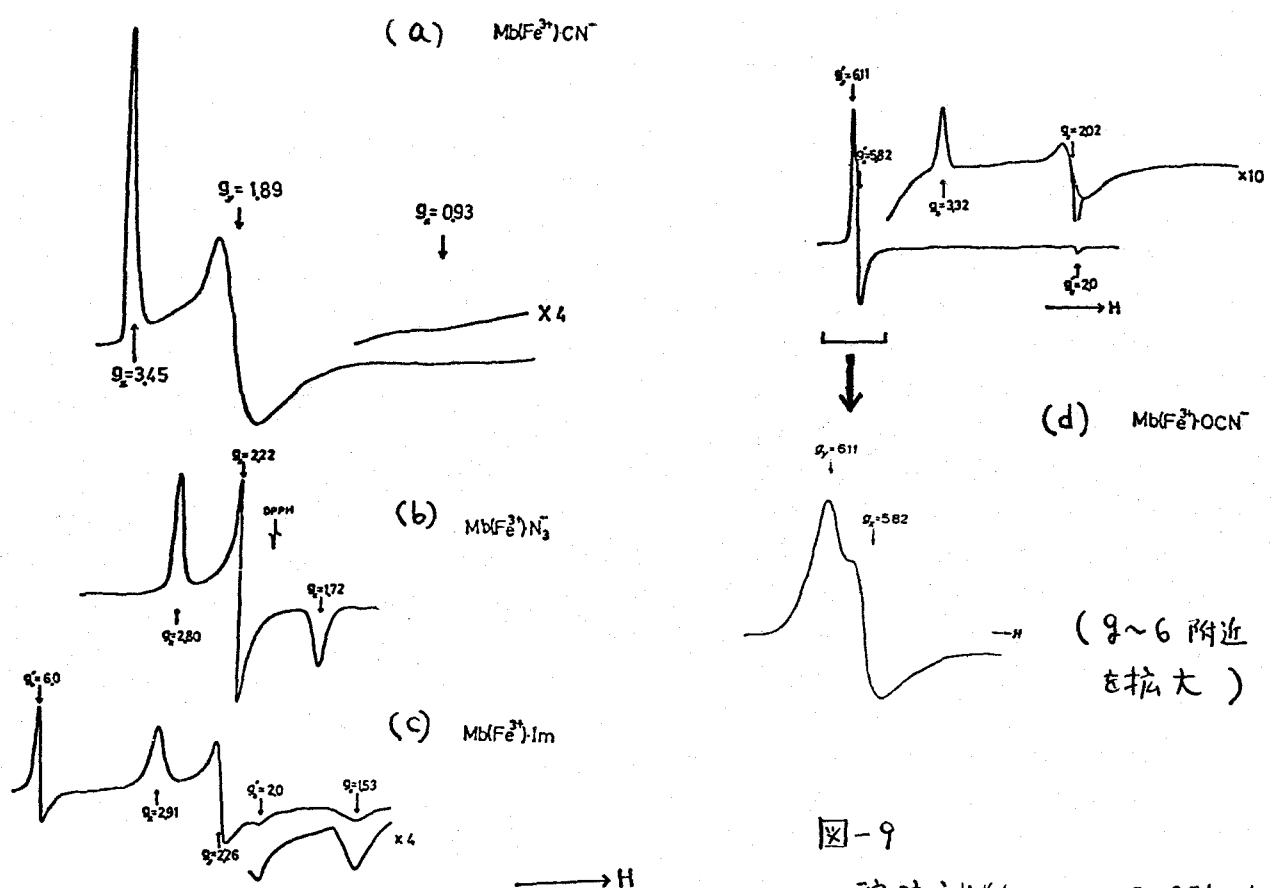


図-9 溶液試料の EPR スペクトル

測定は液体水素温度 (20°K) で行、たものである。

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

$\text{Mn}(\text{Fe}^{3+})\text{OCN}^-$ は高スピン型と低スピン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る事が出来る。

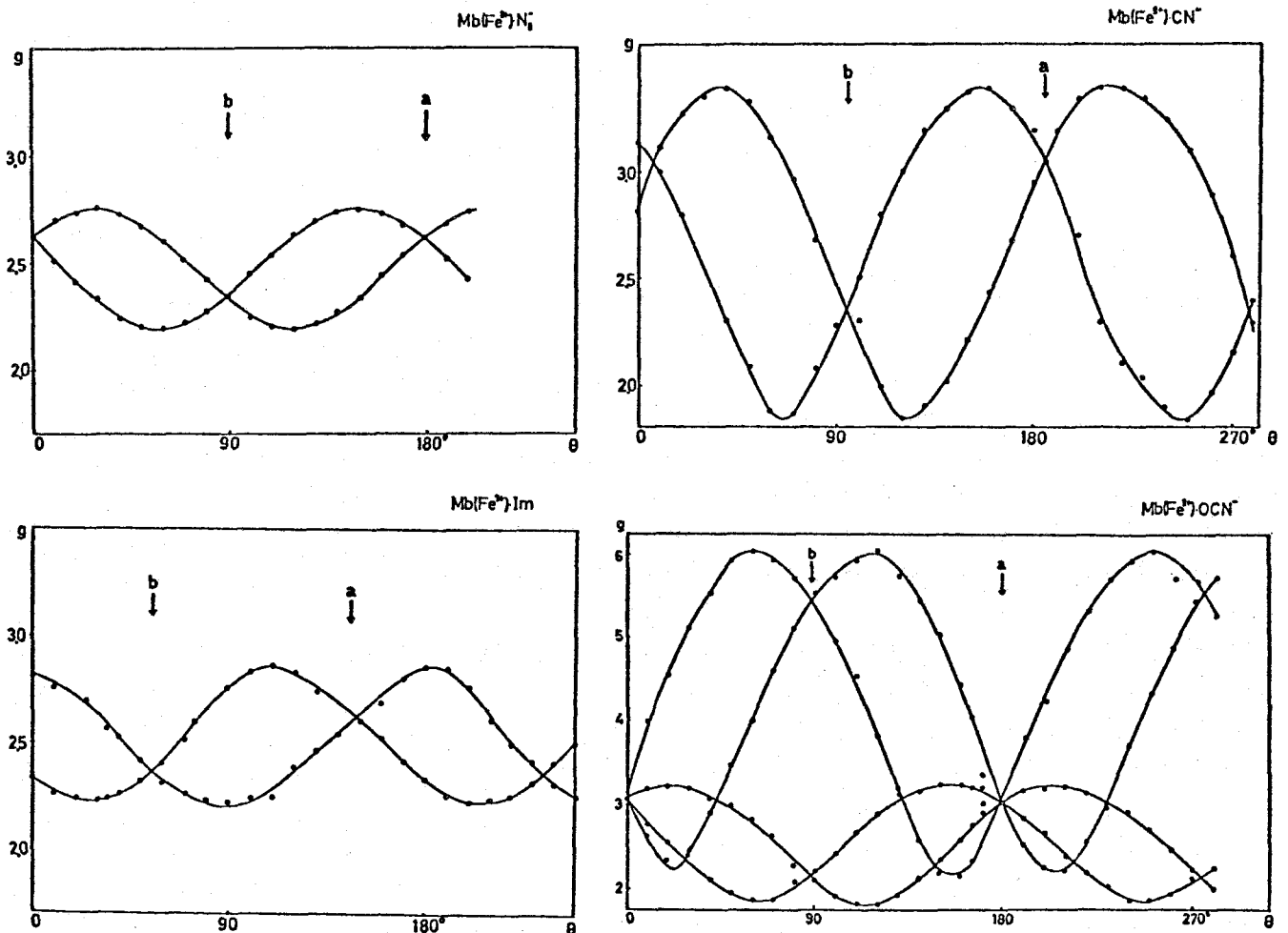


図-10 ab 面内の g -値の角度変化 (20°K)

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

表-I

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

単位胞中にあるもう1個の \wedge の方位は、結晶の対称操作により求める事が出来る。

b, c^* 面又は a, c^* 面から得られた結果は、 a, b 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。

この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、試料支持台に単結晶をのせし、階の軸方向の不確かさがある。

特に、Mb(Fe³⁺)·N₃⁻ の場合、上で得られた結果(表-I)を用いて、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 x, y 面の方位を、ステレオ投影図で図-11 に示す。

ここで、大円は x, y 面を示す。同時に X 線結晶解析から得られた \wedge 面を点線の大円で示した。

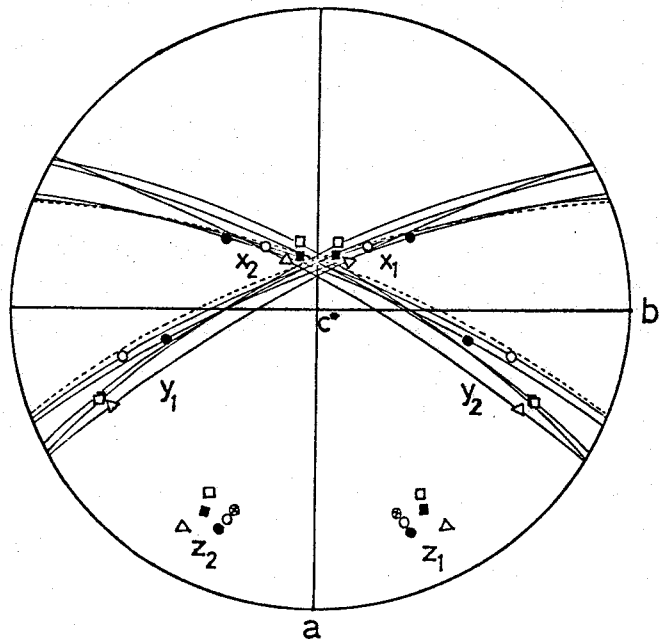


図-11

xy面及z
z軸の方位

- : MbH₂O (-----) , Δ: MbCN
- : MbOCN(高スピン) , ■: MbN₃
- : MbOCN(低スピン) , □: MbIm

図-11で示した高スピン型Mn誘導体と低スピン型Mn誘導体のz軸の方向の差を確かめる為に $Mb(Fe^{3+}) \cdot H_2O$ と $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ を同時に単結晶中に含む結晶を使って、g値を測定した。即ち、磁場を $Mb(Fe^{3+}) \cdot H_2O$ のz軸方向にかけると、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ のg値は2.76となり、一方、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ のz軸方向に磁場をかけると ($g_z = 2.80$)、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot H_2O$ のg値は2.05となった。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

化合物	μ	R
$Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$	4.735a	2.403a
$Mb(Fe^{3+}) \cdot Im.$	3.325a	1.929a
$Mb(Fe^{3+}) \cdot OCN^-$	3.184a	1.107a
$Mb(Fe^{3+}) \cdot CN^-$	3.264a	0.897a

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 ab 平面に垂直の方向に選んでよいことを保証してくれる。

(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oglobin (Fe^{3+}) の Λ_4 方位 — Λ_4 側鎖の影響 —

本節では、 Λ_4 の側鎖を変化させた場合、ミoglobin (Mb) 分子で Λ_4 面が " と " のような影響を受けるかを調べた。

A) 2, 4 位の ヴィニル基の影響⁽¹⁹⁾

Mb 分子の内側に向いている Λ_4 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-デューテロ-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ン型であるが、R-メソ-Mb, R-デューテロ-Mb は、ポルフィリン環 2, 4 側鎖のヴィニル基の二重結合をいじった影響で、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 (pH 7.0, 20°K) は、 $g_{\perp} = 6$, $g_{\parallel} = 2$ にピークを持つ典型的な Fe^{3+} ・高スピン型のシグナルである。

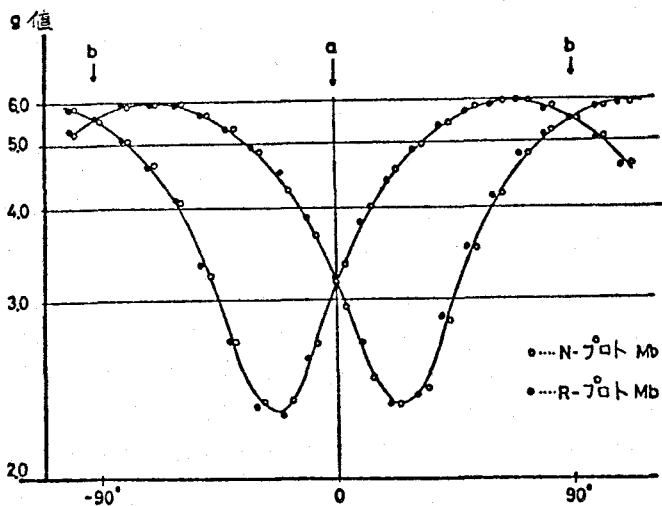


図-12-A

N-プロト-Mb と R-プロト-Mb の
g-値の角度変化 (ab 面)

図-12-A は 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 とでは、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 Λ_4 を取り出して、再び プロト Λ_4 を蛋白質に入れても、 Λ_4 方位には何の影響もない事を示している。

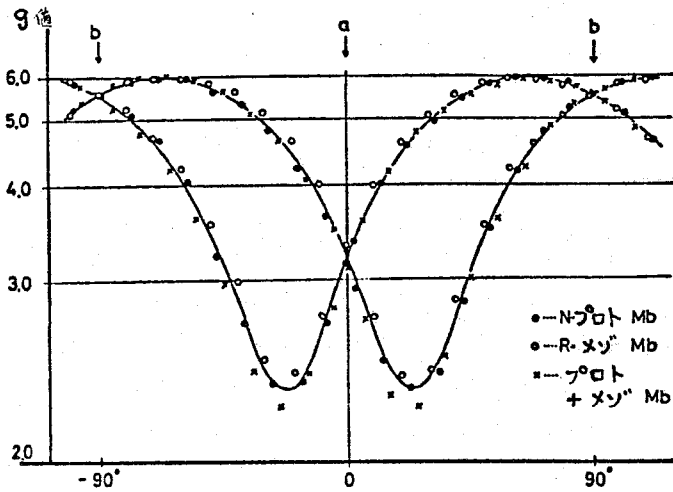


図-12-B R-メジ-Mbのg値の角度変化

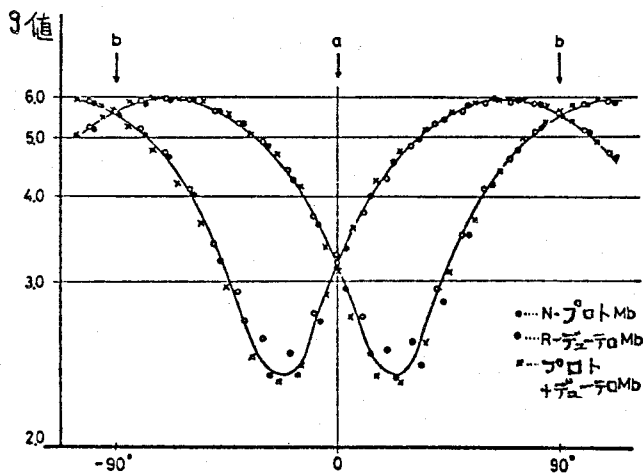


図-12-C R-テロ-Mbのg値の角度変化

次に、R-メジ-Mb単結晶のab面内のg値の角度変化を
図-12-Bに示した。

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×印で示したものは、一つの結晶中に、R-プロトMbとR-メジ-Mbとを含んだものについての測定である。

図-12-CにR-テロ-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様に、R-メジ-Mb及びR-テロ-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。

即ち、R-メジ-Mb及びR-テロ-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ゐない。これが有意な差かどうかの問題である。各曲線よりR-メジ-Mb、R-テロ-Mb及びプロト-Mbのhkl面の法線(z軸)の結晶中での方位を計算すると、最大±2°の誤差が生じた。そこで、プロト-MbとR-メジ-Mbあるいはプロト-MbとR-テロ-Mbのhkl面の法線方位が、どの程度の誤差範囲で一致するのかが調べる為には、一つの単結晶中に、プロト-MbとR-メジ-Mbあるいはプロト-MbとR-テロ-Mbが共存してゐる単結晶でのg値の角度

変化を測定する必要がある。(図12. B~C の X印)

両方の Λ_4 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 の $91^\circ A$ の単結晶であった。したがって、例えば、プロト Λ_4 と XZ Λ_4 の方位が、結晶中で異なっているとすれば、磁場を結晶の任意の方向にかけた場合、空間群が P_2 より 4本の EPR シグナルが観測されるはずである。又、両 Λ_4 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本に落ちる。測定では、2本の EPR シグナルしか見出しできなかった。しかし、EPR シグナルが 2本だからといって、両 Λ_4 面の法線が一致しているとは断定できない。何故ならば、EPR シグナルの線幅の角度変化があって、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危険性がある。特に、磁場を Λ_4 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) を利用すれば、両 Λ_4 面の法線の方位の差をより精度よく見出し得るはずである。

そこで、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、 Λ_4 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。

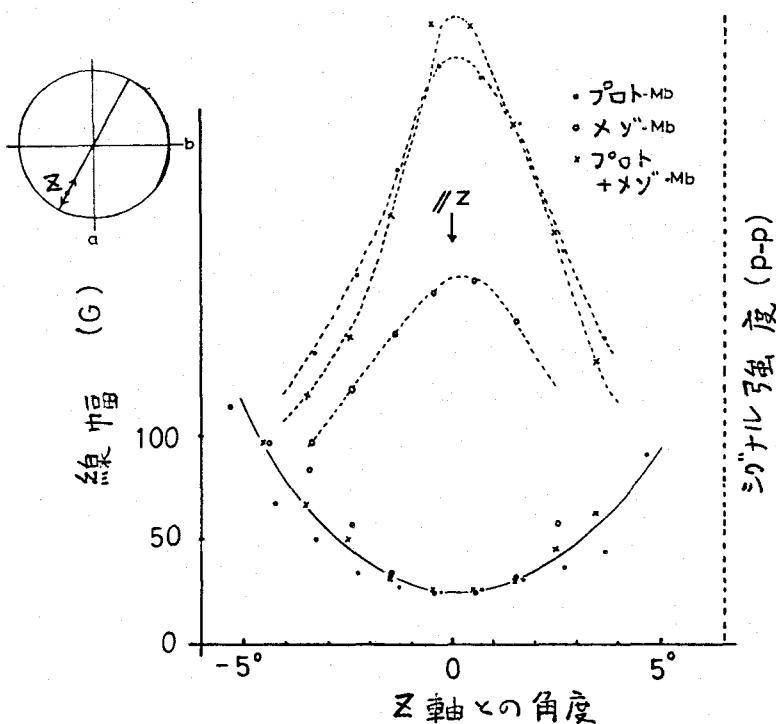


図-13 A

Λ_4 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 α 印は Λ_4 法線)

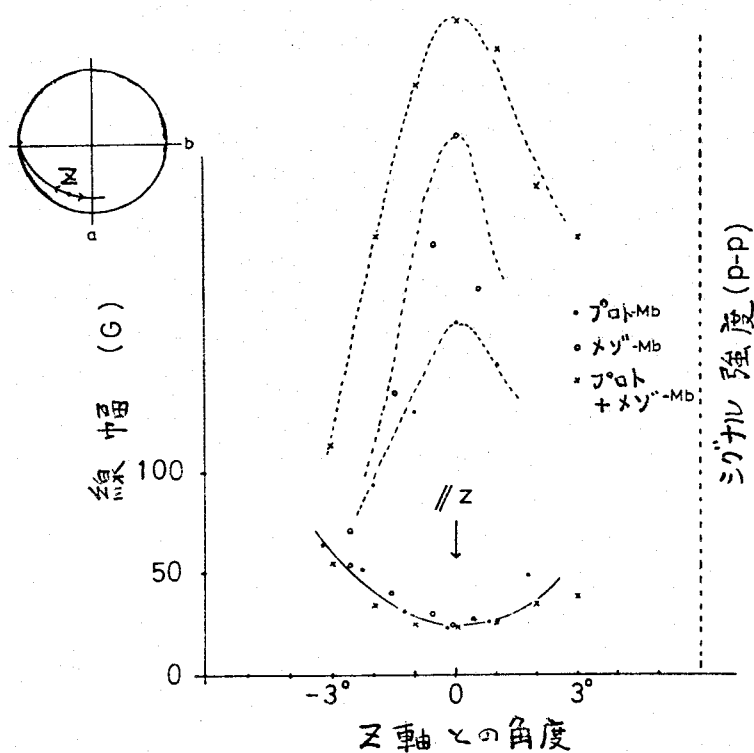


図-13-B

ステレオ投影図に示した
方向に磁場を回転させ
た。

1° の角度変化に対して、EPR シグナルの線幅の変化は、はっきりあらわれている。その変化をよりはっきりさせる為に、角度変化に対する EPR シグナルの強度変化も示した (-----線)。ラム法線から少しでもずれると、シグナル強度が大きく変化することがわかる。

以上より、プロト-Mb、R-メソ-Mb、プロト+メソ-Mb の三者について、 $g_{||} = 2.0$ 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、プロト-Mb と R-メソ-Mb のラム面方位が $\pm 0.5^\circ$ 以下で一致していることによる。この実験は、溶液の EPR シグナルより得た g 値は、プロト-Mb と R-メソ-Mb に於て、完全に一致している事の証明にもなる。

同様の結果をプロト-Mb と R-フェーテロ-Mb の場合からも得た。

$\gamma = 32^\circ$ 。1つの単結晶中にプロト-Mb と R-メソ-Mb あるいは、プロト-Mb と R-フェーテロ-Mb が、本当に両者とも含まれているかを調べる為に、 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-メソ-Mb (Fe^{3+})

高スピンの)では 394 nm , プロト-Mb (Fe^{3+} , 高スピン)では 409 nm であるので, R-メゾ-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-デューテロ-Mbの混晶に
ついても同様に確かめられた。

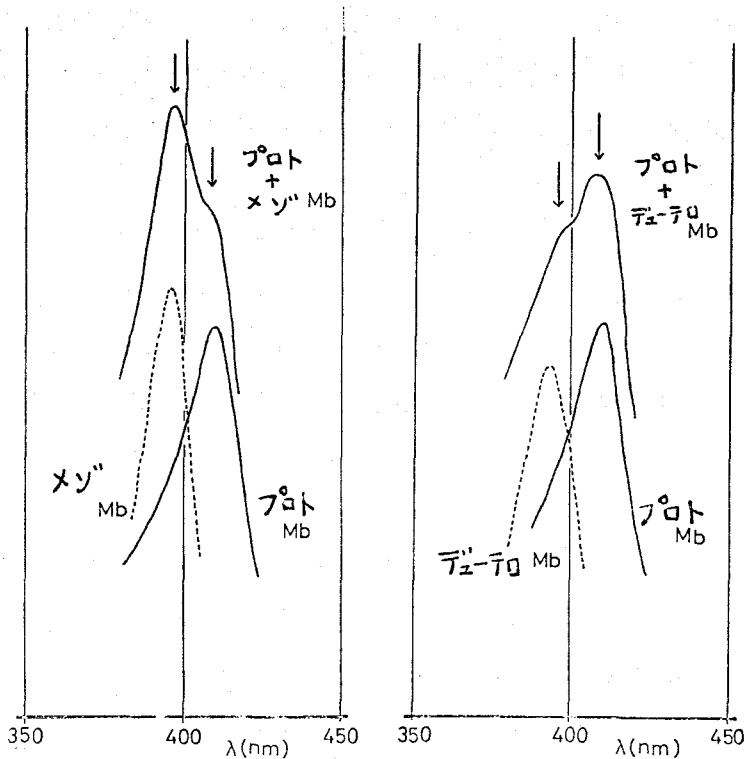


図-14

混晶を $\text{pH } 7.0$
 0.5 M リン酸緩衝
液に溶かしたとき
の Soret 帯の
スペクトル。

以上は, プロト-Mb, R-メゾ-Mb 及び R-デューテロ-Mb に於て,
 Λ_4 面の法線方位が一致している事を示したものであるが, Λ_4 の 3, 4
側鎖を化学修飾した場合, たとえ, Λ_4 面の法線方位は変わらない
としても, Λ_4 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-メゾ-Mb 及び プロト+メゾ-Mb に N_3^- を
配位させて, 低スピン状態での θ 値の角度変化と比較した。
低スピン状態を使用するのは, Λ_4 面内の異方性が大きくて, x 軸, あ
るいは, y 軸のずれと比較する為には好都合だからである。

図-15 に, 各々の ab 面内での θ 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 及び y 軸のずれは
認められなかった。

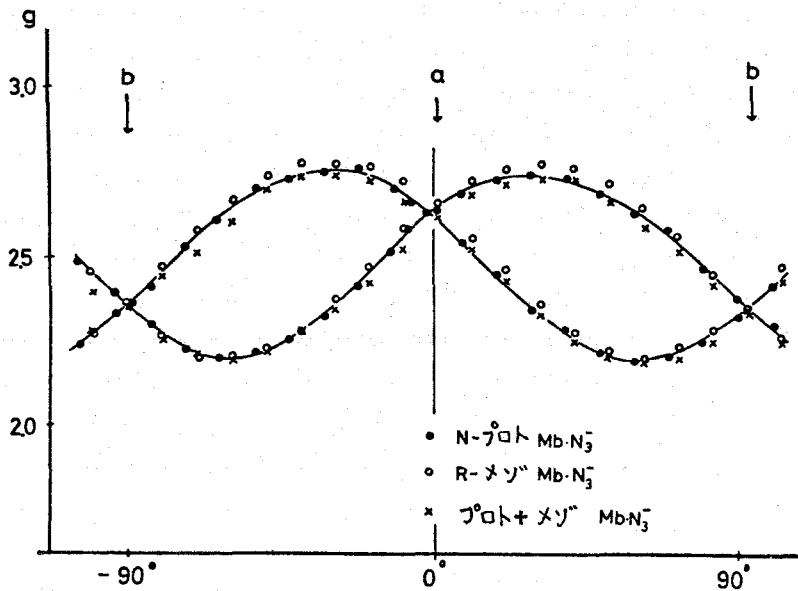


図-15

MbN_3 (プロト+メツ)
の g 値の角度変化
(ab 面)

B) 6, 7 位のプロピオン酸基の影響

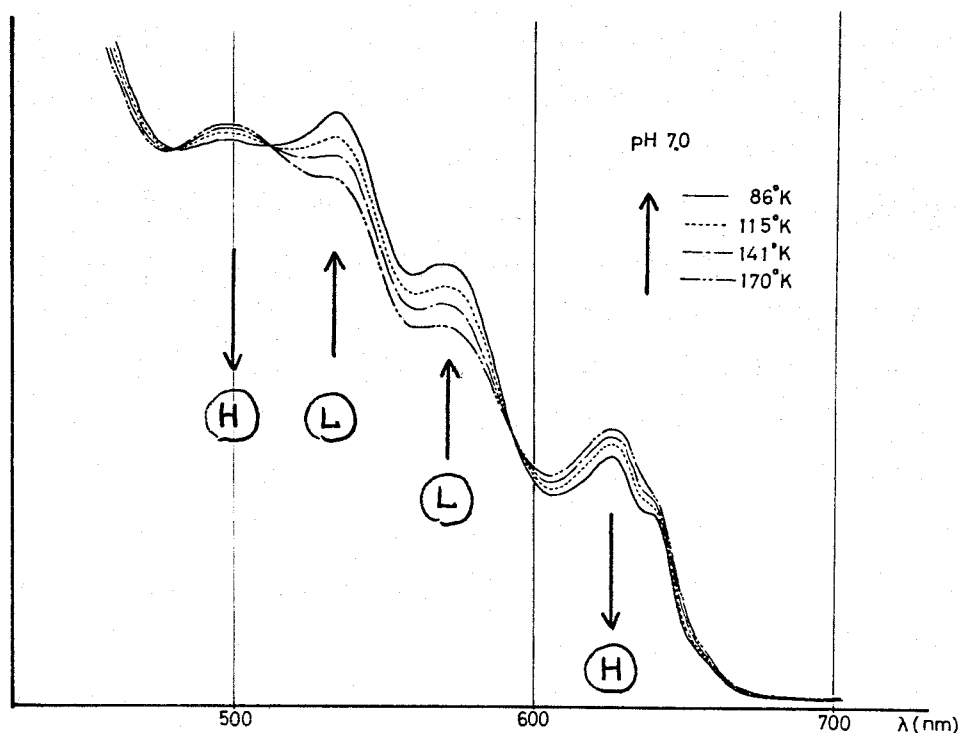
分子表面に近い $\Lambda 4$ の 6, 7 側鎖を変化させた場合、Mb 分子中で $\Lambda 4$ 面がどのように影響を受けるかを調べる為に、R-ジエステル-Mb について調べた。

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 に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, 0.1 M リン酸緩衝液で測定しても同じ結果であった。

図-17 に、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 で行ったが、 $g_{\perp} = 6.0$, $g_{\parallel} = 2.0$ 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

低スピンの成分に対応している。



(H) 高スピン

(L) 低スピン

↑印は、温度変化による吸収帯の変化の方向を示す。

図-16 ジエチル-Mb の低温スペクトル
(pH 7.0 , 0.5 M リン酸緩衝液)

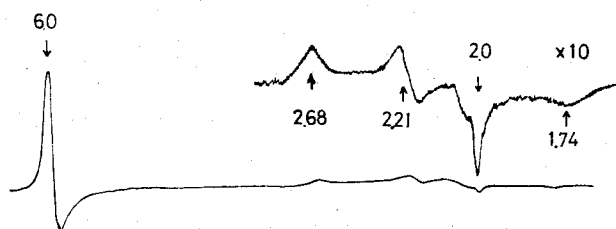


図-17

ジエチル-Mb の EPR
(20°K)

そこで、この試料の EPR シグナルの pH 変化を測定した。
pH を高くするに従って、高スピンの $g_z = 6.0$ 及び低スピンの $g_z = 2.68$ の EPR 吸収線の強度が共に減少し、pH ~ 8 付近より、新しく低スピン型のシグナル ($g_x = 1.83, g_y = 2.12, g_z = 2.60$) が現われる。この pH の高い領域で現われる低スピンは、 $Mb(Fe^{3+}) \cdot OH^-$ に帰因するものである。

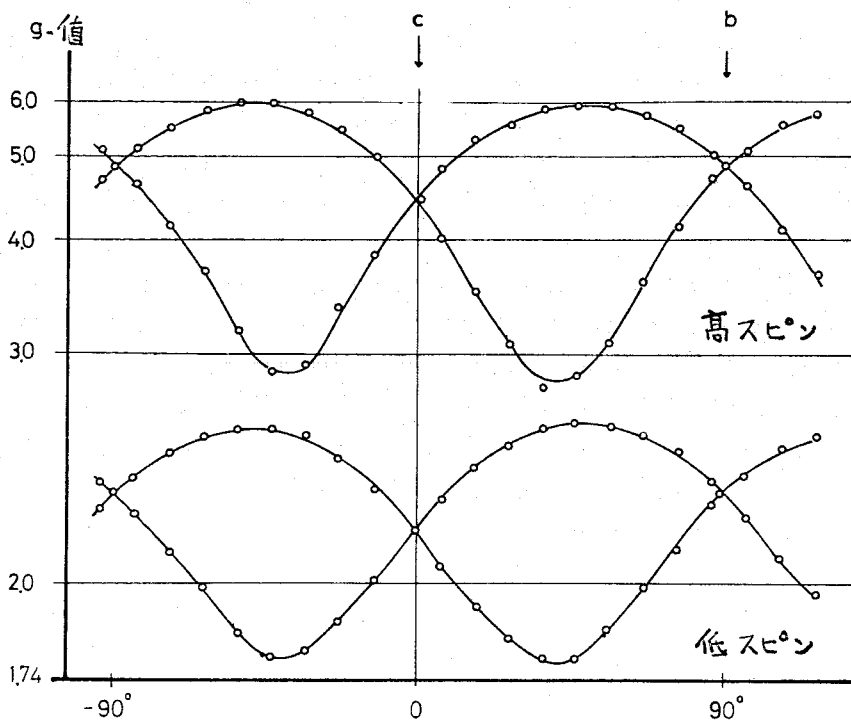


図-18

R-ジエチレン-Mb

単結晶の
g値の角度変化

図-18に、R-ジエチレン-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-ジエチレン-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%飽和硫酸中で、プロト-Mbと、R-ジエチレン-Mbを同時に投入して結晶化させても、各々が、別々の晶系で析出して来る)、プロト-Mbとの直接の比較は出来ない。

そこで、R-ジエチレン-Mb単結晶中の Λ 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	70°	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いる第5配位子のヒスジン及び第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ずる。

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

EPR 分裂の解析より、低スピン型化合物の g_z の方向は単結晶中で大体同じ方向を示しており、高スピン型化合物の g_z の方向は約 7° の違いをもっている事が判った。さて、高スピン型化合物に (3) 低スピン型化合物に (3) 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° 違うとは、八面体周辺で約 0.6 \AA ずれていなければならないことになる。これは、Stryer⁽²⁰⁾ による $Mb(Fe^{3+}) \cdot H_2O$ 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だされなかった。一方、Ingram⁽⁶⁾ の EPR, Kendrew⁽¹⁾, 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っている。したがって、低スピン型化合物の g_z の方向は、八面体に垂直な方向から約 7° ずれていると推論される。

次に、 Fe^{3+} 低スピン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っているにもかかわらず、八面体内の x, y 軸 (g_x, g_y 方向) は、配位子の種類にほとんど依っていないことが判った。図-19に第5配位座の8F(93)ヒスジンのイミダゾール環の2個の炭素 (C_1, C_2 で示す) の八面体への投影^(1, 21) 及び各低スピン型化合物の x 軸

(g_x 方向) の \wedge 4 面への投影図を示す。

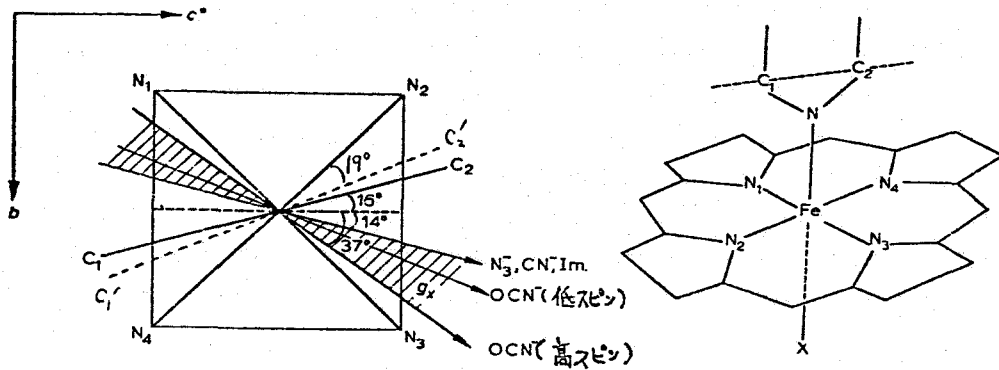


図-19 g_x の方向. ($C_1' \dots C_2'$ は最近の Takano⁽²¹⁾ の結果である)

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} 軌道がその上に乗っている事は, 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 軸方向に伸びている)とするのが一番良いと説明した。

一方, Helcké ら⁽²³⁾ によると $Mb(Fe^{3+}) \cdot N_3^-$ の \wedge 4 面内の最小の g 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見えるが, 我々のデータと全く異なる結果を示している。この喰違いであるが, 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り, Helcké らは解析を誤ったと思われる。さらに, \wedge 4 面内の x, y 軸は配位子の種類にほとんど依っていない事, 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(近位ヒスタジンのイミダゾール)だけを \wedge 4 面内の g 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 \wedge 4 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 原子は直線上に並び \wedge 4 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、 $\wedge 4$ 面を二等分する面内 即ち、図-19 の $\pi\sigma$ -1V 2と3 (あるいは1と4) に二等分する面内にある。

一方、 $Mb(Fe^{2+}) \cdot CN^-$ では、配位子は、 $\wedge 4$ 面にほぼ垂直であると想像されていたが、 $\wedge 4$ 面に垂直な方向から $\pi\sigma$ -1V 2と3 の間の方へわずかにまげられているようにある⁽²⁴⁾。他の配位子についても同様の傾向をもつようであるが、はきはしっていない。

そこで、 g 値の異方性の向き (g_x あるいは g_y の方向) は、配位子が $\wedge 4$ 面に垂直な方向から、 $\wedge 4$ 面のどの方向にまげられているのかが一つの要因になると推論される。

又、 g 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、及 n 結合方向の $\wedge 4$ 法線からのずれの違いによっており、 d_{yz} 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) が小さいもの程、 $\wedge 4$ 面内へ対称性が良いとされている。事実、 R は、 $Mb(Fe^{2+}) \cdot CN^-$ では小さく、 $Mb(Fe^{2+}) \cdot N_3^-$ では大きくなっている (表-II)。これは、 $Mb(Fe^{2+}) \cdot CN^-$ では配位子が $\wedge 4$ 面にほぼ垂直に配位して、面内の対称性も良く、 $Mb(Fe^{2+}) \cdot N_3^-$ 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 $\wedge 4$ 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_ϵ は $\wedge 4$ 鉄のほぼ真上約 3.8\AA のところに位置し、 $1CD(43)$ phe. のフェニル環は $\wedge 4$ 面に対して 25° の傾きを持つホルフィリン環の3,4の $\pi\sigma$ -1V 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る状態である。したがって、配位子は蛋白質の中で、ある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ろう。この様に配位子がどの方向性をもって配位する事、及 n $8F(93)$ 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 $\wedge 4$ 面内の異方性の方向 (g_x あるいは g_y の方向) を決定しているものと推論される。

1-6-2 h4 側鎖の影響

前節では、h4の Fe イオン と配位結合している 第5配位子のヒスジン及び 第6配位子の 種々の配位子が h4面方位、面内の異方性におよぼす 影響について 論じたが、本節では、h4の側鎖が h4方位、h4の電子状態にどのような様に影響しているかを論ずる。Hb, Mb 及び その他の h4蛋白質において、Fe³⁺ の 高スピン ⇌ 低スピンの熱平衡現象においては^(25~27)、ホ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されている。したがって、h4の側鎖を化学修飾した場合、結晶中の h4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、その事から、h4とアポ蛋白の結合の安定性に何か寄与しているかも知る事も出来る。

A) ホルフィリン環の 2,4 側鎖の ヴィニル基の影響

X線結晶解析によると、h4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触をしている (図-20)。

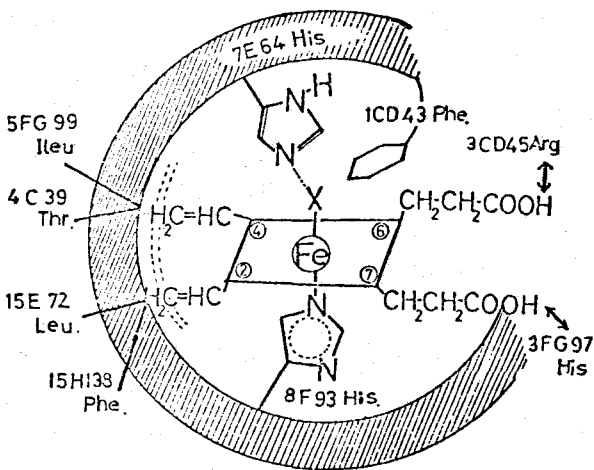


図-20 h4周囲

Yonetani ら⁽²⁸⁾ は、メゾ-h4蛋白質 (Fe³⁺) の磁化率、低温スペクトルの測定から、ホ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、スピン状態 (高スピン ⇌ 低スピン) 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、

ホ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、ホ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ものである。しかし本実験に於て

R-メツ-Mb, R-テュ-テロ-Mb の結晶中の Λ_4 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、 Λ_4 面の変動は見い出されなかった。ちなみに、 0.5° の Λ_4 面の傾きがあるとするは、約 0.1 \AA 程度の変動に相当すると考えられる。

Λ_4 の 2, 4 側鎖の ヲイ=ル基と Λ_4 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も、例えば、15 E (72) Leu. (ロイシン) は Λ_4 の第 2 側鎖の ヲイ=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 Λ_4 の第 4 側鎖の ヲイ=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- Λ_4 の 2, 4 側鎖の $-\text{CH}=\text{CH}_2$ の 2 重結合を各々 2 個の標原子で飽和させて、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ にした R-メツ-Mb も、2, 4 側鎖の $-\text{CH}=\text{CH}_2$ を各々 1 個の水素原子で置き換えた R-テュ-テロ-Mb も単結晶中で、 Λ_4 面の方位に何ら変動がみられなかった。この事は、 Λ_4 の 2, 4 側鎖の ヲイ=ル基と、 Λ_4 周辺の アミノ酸残基との間のいくつかの ファンデルワールス接触は、 Λ_4 を蛋白質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、 Λ_4 面と平行に近く (1 CD (43) フェニラミン, 15 H (138) フェニラミン等)、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ったが、例えば、 Λ_4 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える必要がある。14 E (71) Ala. (アラニン) のメチル基は Λ_4 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_β メチル基は Λ_4 の第 3 側鎖のメチル基と 4.3 \AA の距離で接触している。 Λ_4 の 1, 3 側鎖を化学修飾したとしても、 Λ_4 の 2, 4 側鎖を化学修飾した場合と同様に、蛋白質分子中の Λ_4 の方位には変動は見い出されない事も充分予想される。

ところで、プロト Λ_4 の 2, 4 側鎖を化学修飾した R-メツ-Mb, R-テュ-テロ-Mb は磁化率⁽²⁸⁾, EPR⁽³⁰⁾ 及び X 線スバウアー効果⁽³¹⁾

の測定から、 $\Lambda 4$ 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。一先、 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。 $\Lambda 4$ 鉄の原子価の違いと側鎖の電子吸引性の強さで説明がつかないのであろうか、大変興味深い問題である。

B) ホルフィリン環の 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おり、その内部では、側鎖は原子団のファンデルワールスポ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、三次構造に、それらが置かれる場所に強い影響を持っている。ほとんどの極性基(親水性)は、水と接する分子表面にあり、水と結合している($\Lambda 4$ 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- $\Lambda 4$ 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 分子の表面に向いている。 $\Lambda 4$ の第 6 側鎖のプロピオン酸基は 3CD (45) Arg. (アルギニン) と、又、第 7 側鎖のプロピオン酸基は 3FG (97) ヒスチジンと各々塩結合をなしている。本節では、プロピオン酸基のカルボキシル基が $\Lambda 4$ 面の方位に与える影響及び n $\Lambda 4$ の電子状態への影響について検討する。

O'Hagan は⁽³⁴⁾ は、カルボキシル基の欠落した $\Lambda 4$ を持つ Mb を合成し、このカルボキシル基は $\Lambda 4$ とアポ蛋白の結合の安定性に極めて重要な役目を果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 n 低温スペクトル測定に於て、低スピンシグナルが現われた事は、かなり、 $\Lambda 4$ 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ひき起すと思われる。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、別々に分かれて析出してくる事は、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 シグナル及び低温スペクトルで低スピンシグナルが現われる事は、蛋白のコンホーメーション変化の結果、 h4 鉄の第6配位座に「何らかの配位子」が近づき、 h4 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) ヒスタジン(遠位ヒスタジン) のイミダゾールで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る。カルボキシル基とアミノ酸残基(例えば 3CD(45) アルギニン、 3FG(97) ヒスタジン等) との間の塩結合が切れて、 h4 自身がアポ蛋白の中で比較的動きやすくなっ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、熱平衡の低スピンシグナルが観測されているが^(35, 36) Hb や HRP では元来、 h4 がアポ蛋白の中で比較的動きやすいのではないが、それに対して、Mb の場合は、比較的しっかりと h4 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 h4 がアポ蛋白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、高スピンと低スピンの量比が異なっている事が判ったが、これはジエステル- h4 の中に、モノエステル- h4 が分離できずに入った為と考えられる。モノエステル h4 の場合、プロト- h4 の6,7側鎖のどちらかがエステル化されて

いる記述だから、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、 $\Lambda 4$ は、アポ蛋白中で、R-ジエステリル-Mb の場合ほど動きやすくはなく、したがってコンホーメーション変化も少なく、低スピン状態も減るであろうと考えられる。この様な例は Asakura 氏⁽³⁷⁾ によって、4-クロロ-4'-ヒドロキシベンゾイル-C.C.P と略記する) においても見い出されておる。 $\Lambda 4$ の 6,7 側鎖のカルボキシル基のうち 1 個が残っている事は、 $\Lambda 4$ とアポ CCP との結合の安定化に重要な役割をえていると報告している。又、 Tamura 氏⁽³⁸⁾ は、HRP において、6,7 側鎖のカルボキシル基のうち 1 個が残っている事は、HRP の酵素活性に重要で、R-ジエステリル-HRP では、本来ある酵素の種々の性質が失われる事を報告している。

本実験に於ては、モノ-エステリル- $\Lambda 4$ と ジ-エステリル- $\Lambda 4$ の分離、精製は、 $\Lambda 4$ の 6,7 側鎖のいずれかが、 $\Lambda 4$ -アポ蛋白の安定化により、重要な役割を比較検討することはしてないが、いずれにせよ、Hb, Mb, CCP, HRP 等に於て、プロト $\Lambda 4$ の側鎖のプロピオン酸基のカルボキシル基は、 $\Lambda 4$ とアポ蛋白との結合の安定化に極めて重要な役割をえていることが判った。

ところで、 $\Lambda 4$ の 2,4 側鎖を化学修飾した R-Xyl-Mb, R-Derol-Mb の Fe^{3+} の状態では、鉄の電子状態には何の影響もなく、 Fe^{2+} 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、 $\Lambda 4$ の 6,7 側鎖をエステル化した場合、本節で述べた様に、 Fe^{3+} の状態では、鉄の電子状態に大きな変化がみられたが、 Fe^{2+} 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 とほとんど変れらな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 Fe^{2+} の状態で、 $\Lambda 4$ とアポ蛋白とのファンデルワールス接触及び $\Lambda 4$ の 2,4 側鎖のグアニル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、分子表面をいくら化学修飾しても(分子の構造変化が生ずるか)酸素分子の反応性には大きな影響を与えないの

ではないかと考えられる。

本章においては、一つのサブユニット 即ち Mb の様な単量体状態の蛋白質の中で、 $\Lambda 4$ がどのようにアポタンパクと相互作用しているのかをみてきた。

ところが、Hb では、分子が α 鎖 2 個と 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、一つのサブユニットにおこった変化が、他のサブユニットの $\Lambda 4$ の電子状態の変化としてとらえられるのかを主に EPR 測定を中心に次章で論ずる。

第二章 ヘモグロビン(Hb)の四次構造と Λ_4 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古くから研究されている。その理解に関して 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 は⁽⁴¹⁾ X線構造解析で、オキシ型(高親和性:R)及び π デオキシ型(低親和性:T)の2つの4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きな差異を見出し、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 Λ_4 間相互作用は、このような4次構造の変化が酸素化に伴っておこることによって生じる。我々は、そのメカニズムを電子状態のレベルで理解する為、分子の4次構造を色々に変化させて、Hb の α 鎖及び β 鎖の Λ_4 鉄の状態がどのように変化するかを研究した。

Fe^{2+} 高スピン状態、即ち酸素分子の配位していないデオキシHbでは、EPRは観測されておらず、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。ここでは、2つの方法で4次構造変化と活性中心の電子状態の変化のむすびつきを研究した。

1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に不対電子が存在する事を利用して、 Fe^{2+} (低スピン)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ことができる。

もう1つの方法は、 Fe^{3+} では、EPR観測が可能である事より、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 デオキシ化することによって、パートナーの Fe^{3+} のサブユニットの Λ_4 鉄のEPRがどのように影響するかをみる方法である。

本章においては、一酸化窒素-Hb の 42°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 α 鎖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 にプ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) を加えると、4次構造が T 状態に在り事が知られている。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-O の伸縮振動が現われる事、そして、それらは 5配位の NO- α 鎖と 6配位の NO- α 鎖の伸縮振動に対応する事、又、IHP が無いときには、6配位の NO- α 鎖の伸縮振動スペクトルだけが現われることを示した。これらの実験事実より、IHP 存在下では、 α 鎖の NO- α 鎖は恐らく 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- α 鎖化合物の 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- α 鎖化合物の 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+}) に結合させた NO を結合させたハイブリッド-Hb で NO の EPR に対する β 鎖の影響を調べ、 β 鎖が低スピン状態のときは、 α^{NO} は単離鎖の α^{NO} と同じスペクトルを示し、 β 鎖が高スピン状態のときは、単離鎖の α^{NO} と異なる形の EPR スペクトルを与える事を示した。実験は室温及び低温で行われた。そこで、彼らの実験を更に押し進めて、種々のハイブリッド-Hb 中の α^{NO} 又は β^{NO} 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ターである IHP の影響を問題とするので、脱塩カラムを通じ、有機リン酸塩を除去した。いわゆる脱塩 Hb 誘導体を出発物質とする。オキシ Hb (O_2 -Hb) 又はオキシ型単離鎖 (1/4 当りの濃度 ~ 1 mM) の溶液は 5 ml ビン中で脱気 $\rightarrow N_2$ ガス注入……を繰り返すことにより、デオキシ Hb 又はデ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と、直ちに褐色の一酸化窒素 (NO_2) になる。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 溶液に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 ガスをデオキシ 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と直ちに変性し、沈殿が生ずるので、取扱いは N_2 ガス雰囲気で行われなければならない。

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 -デオキシ・ハグバッド Hb ($d_2^{NO} \text{ } d_3^{デオキシ}$ 又は $d_2^{デオキシ} \text{ } d_3^{NO}$) については、1つの単離鎖をデ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る訳であるが、 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ぬばならない。そこで、溶液中のフリーの NO は脱気 $\rightarrow N_2$ ガス注入……を繰り返す事により除去する。

又、 NO -デオキシ・ハグバッド Hb の合成は、 N_2 ガス雰囲気下、氷中で行い、四量体形成、 NO がデオキシ鎖へ再結合する状態をキープする為に、混合した時点から、必ず時間毎に EPR 試料管

に試料を注入し (N_2 加圧雰囲気) 、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 -酸化窒素- Λ_4 ($NO-\Lambda_4$) 化合物

Fe^{2+} ・プロト Λ_4 ・ジメチルエステル- NO については、 2.4 mgr の Fe^{3+} ・プロト Λ_4 ・ジメチルエステル- Cl^- を 2 ml のトルエン及び 3 ml のメチル- NO に溶かし、脱気して、溶存酸素を除去し、 $1N-KOH$ 溶液に通じた NO 加圧を注入し、約 1 時間反応させると、 Fe^{3+} ・ Λ_4 から NO による還元されて Fe^{2+} ・ Λ_4 になる。^(49, 50) ローターエバポレーターで溶液をとり出し、1 晩真空ポンプで置いて乾燥させる。

Fe^{2+} ・プロト Λ_4 ・ジメチルエステル- NO の粉末を脱気したトルエンに溶かし、EPR 等の測定に使用する。

6 配位の $NO-\Lambda_4$ 化合物については、上記溶液に、脱気した 1-メチルイミダゾール ($1-MeIm$ 又は $N-MeIm$ と略記) を加えると、6 配位の Fe^{2+} ・プロト Λ_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 Λ_4 を 3% SDS (Sodium dodecyl sulfate の略) に溶かし、凍結乾燥させ、粉末を脱気した水に再び溶かし、 $1\text{ mM}/\Lambda_4$ 溶液にして、SDS 中の NO -プロト Λ_4 試料とした。

又、SDS 中では、6 配位の $NO-\Lambda_4$ 化合物は出来なかった。

4 配位の $\Lambda_4(Fe^{2+})$ については、トルエン中の Fe^{2+} -プロト Λ_4 ・ジメチルエステルは、 Fe^{3+} ・プロト Λ_4 ・ジメチルエステル- Cl^- を $[Cr(acac)_2]_2$ ($[Cr(acac)_2]_2$ とは、bis(2,4-pentanedionato)・chromium (II) という価値の銻 Ocone の方法⁽⁵¹⁾ により合成した。) で還元したものを使用した。

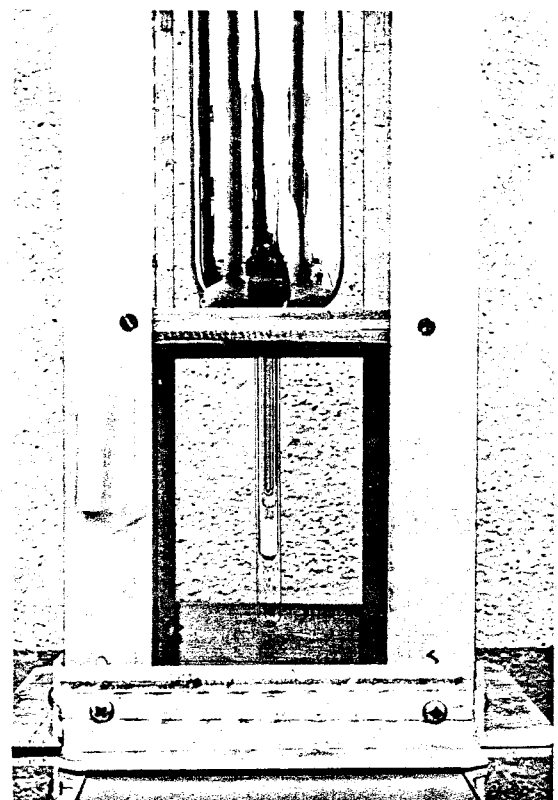
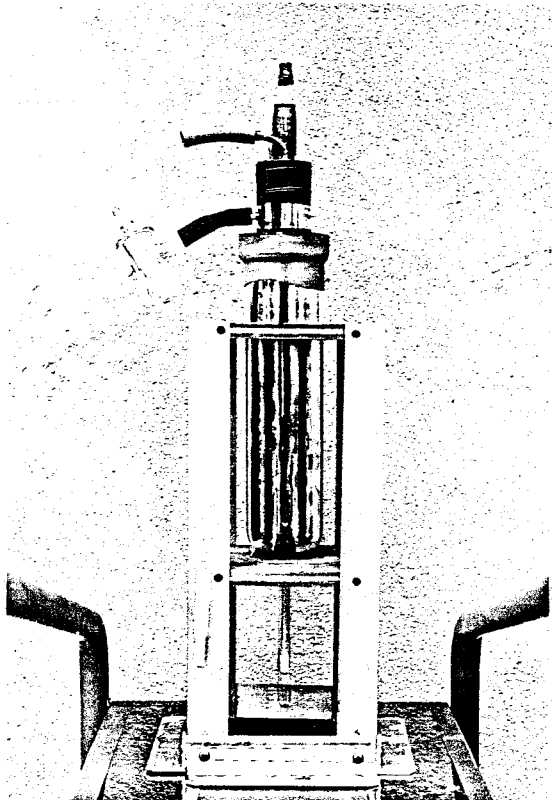
又、3% SDS 中でのプロト $\Lambda_4(Fe^{2+})$ は、プロト Λ_4 ・ Fe^{3+} を 11-ドクロム酸 ($Na_2S_2O_8$) で還元したものを使用した。

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 Gauss, 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 で示した挿入型テラワ- (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テラワ- を設計、作製した。



このテラワ- は、使用液体ヘリウムが、わずか 150ml 程度では
 足り、試料管のさしかえをしながら、約 5 時間の使用に耐える。
 試料管は 0.1ml 以下の量でよく、又、マイクロ波の立体回路の再調整を
 ことなく、試料管をとりかえる事が可能で、比較実験ができる。

光解離実験用の光源は、スライドプロジェクターの300ワット・タングステン・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(光解離しない試料について)事より認められなかった。

2-4 結果 及び 考察

2-4-1 単離鎖 (α^{NO} , β^{NO}) の EPR

図-21 に単離した α^{NO} 及び β^{NO} の EPR を示す。測定は、 $77^{\circ}K$ 及び $42^{\circ}K$ で行った。

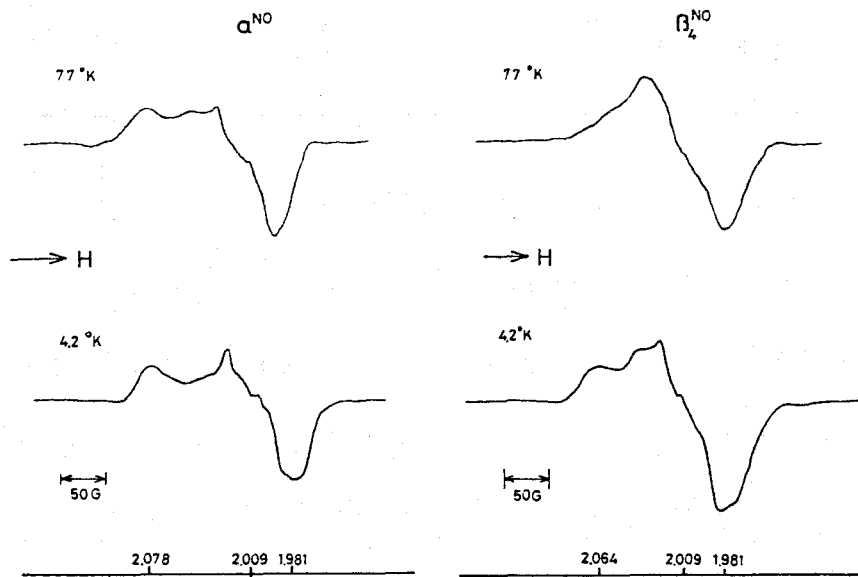


図-21 単離鎖 NO の EPR 温度変化

単離 α^{NO} の EPR スペクトルは、 g 値の異质性が大きく、 $77^{\circ}K$ と $42^{\circ}K$ で、その差異は認められない。一方、単離 β^{NO} の EPR スペクトルでは $42^{\circ}K$ の方が g の異质性が大きくなっていることが判る。このことは、 α に配位している NO の動きが、 α 鎖と β 鎖で異なる事を示している。即ち、 α 鎖では、すでに $77^{\circ}K$ で NO の動きが、ゴッピンにより束縛されてしまっているのに対し、 β 鎖では $77^{\circ}K$ でも

また NO はある程度動き得る様に、 α 周辺のグロビンの構造が出来て いると推論される。

$\gamma = 32^\circ$ 。IHP の存在 (ない状態) で、NO-Hb の EPR スペクトル は α^{NO} と β^{NO} を 1:1 に混ぜ合わせた時のスペクトルに等しい。既に常温、 29°K で示されている (52)。

そこで、同じ実験を 2°K で行った。図-22 に示す。

測定条件は、試料濃度 $1\text{mM}/\mu\text{M}$, 0.1M ビス・トリス, pH 6.5 で

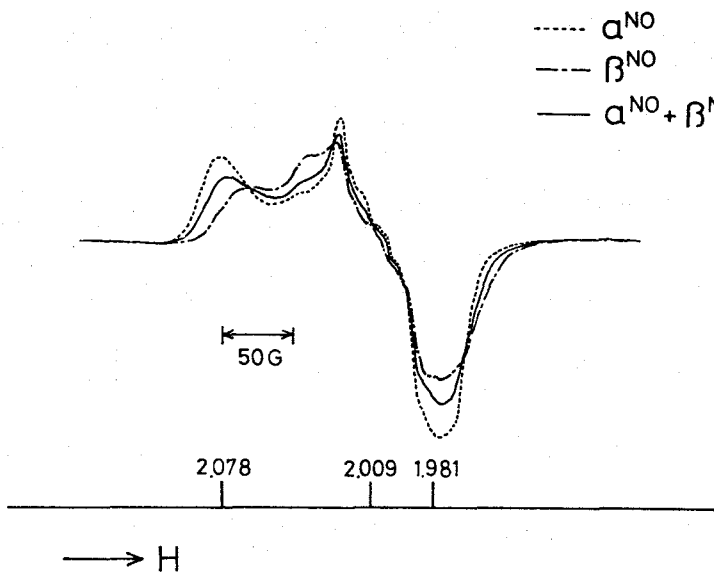


図-22

$\alpha^{NO} + \beta^{NO}$ の EPR

ある (ビス・トリス: 2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitriolethanol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 スペクトルに一致する。

したがって、 2°K 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} の和スペクトルになる。

2-4-2 種々の NO-ヘムグロビン-Hb の EPR

図-23 に 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 に特徴的なことは、 $\gamma = 2.009$ を中心に、すなわち 3本の超微細構造(hfsと略記)を示すことである。(53)

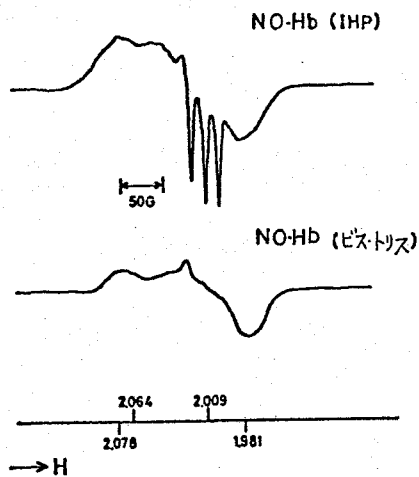


図-23 NO-Hb ± IHP の EPR

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り、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。

それでは、この 3本のずらした hfs をもつ EPR スペクトルは α 鎖からきているものであろうか、 β 鎖からきているものであろうか。

(41, 43)

そこで、次に種々の NO-ハグワッド Hb の EPR を測定した。Perutz によれば種々のハグワッド Hb を考える場合、スピン状態が「高スピンのものほど」、又、IHP が入っているものの方が「入っていないものより構造がより T 状態になる」とみている。したがって、 α 鎖に NO が配位している場合、 $\alpha_2 \beta_2^{NO}$ + IHP の方が $\alpha_2 \beta_2^{NO}$ (IHPなし) より構造が T 状態で、 $\alpha_2 \beta_2^{NO+CN}$ でも IHP が入っていると T 状態になる。又、 β 鎖に NO が配位している場合は、 $\alpha_2 \beta_2^{NO} + IHP$ が T 状態であると考えられている。

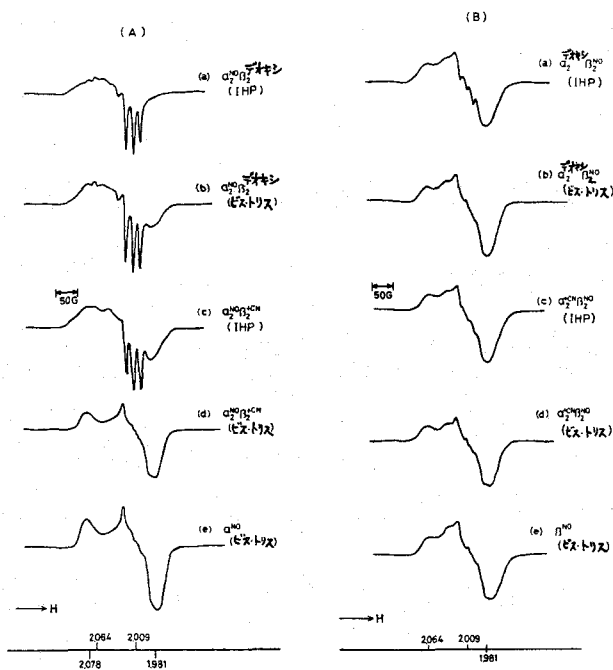


図-24 種々の NO ハグワッド Hb の EPR

種々の NO-ハグワッド 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 $\alpha_2 \beta_2^{NO}$ は最も強く T 状態の構造をとり、 $g = 2.009$ を中心に 3本のずらした hfs を示し、NO-Hb (+IHP) のときに見られた $g = 1.981$ の谷は全くみられない。

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

一方、 β 鎖に NO が配位した場合、 α 鎖に NO が配位した場合のようには、パートナーの Λ_4 の状態を変化させても、EPR スペクトルの変化が小さいことが判った。 IHP 存在下の $\alpha_2^{テオキ} \beta_2^{NO}$ のみ、 $g=2.009$ を中心に、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。

$\tau=3$ で、Kon⁽⁵⁴⁾ 及び Wayland と Olson⁽⁴⁹⁾ は、5配位の NO- Λ_4 モデル化合物の EPR を測定し、 $g=2.009$ を中心に、3本の $\tau=3$ の hfs をもつスペクトルを得た。又、彼らは、6配位の NO- Λ_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- Λ_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/Hg²⁺・Hb の EPR スペクトルとの比較であるが、IHP 存在下の $\alpha_2^{NO} \beta_2^{テオキ}$ の EPR と 5配位 NO- Λ_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 構造をとる Hg²⁺・Hb の α 鎖の NO- Λ_4 は、5配位であると推定される。又、6配位 NO- Λ_4 モデルの EPR スペクトルとの比較より、ビス・トリス中での $\alpha_2^{NO} \beta_2^{+CN}$ の様な R 構造をとると思われる Hg²⁺・Hb では 6配位構造をとると思われる。

又、ビス・トリス中での $\alpha_2^{NO} \beta_2^{テオキ}$ や IHP 存在下での $\alpha_2^{NO} \beta_2^{+CN}$ は 5配位と 6配位の Λ_4 の混りとして考える。これに対して、 β 鎖に NO が配位したものは、たとえ T 構造をとったとしても、 Λ_4 は 6配位であろうと考える。

2-4-3 種々の NO-Hg²⁺・Hb の光解離

液体ヘリウム温度 (4.2°K) において、NO-Hb では、配位上の

NO が光照射により、 Fe^{2+} から解離し、 42°K に保つ限り、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って、どの様に変化を遂げるか、それが又、R₁ ⇌ 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 に NO-Hb の EPR と近赤外の低温スペクトルの光照射に伴う変化を示す。測定は、 42°K で、0.1M ビス・トリス、pH 6.5 で IHP は 2mM である。

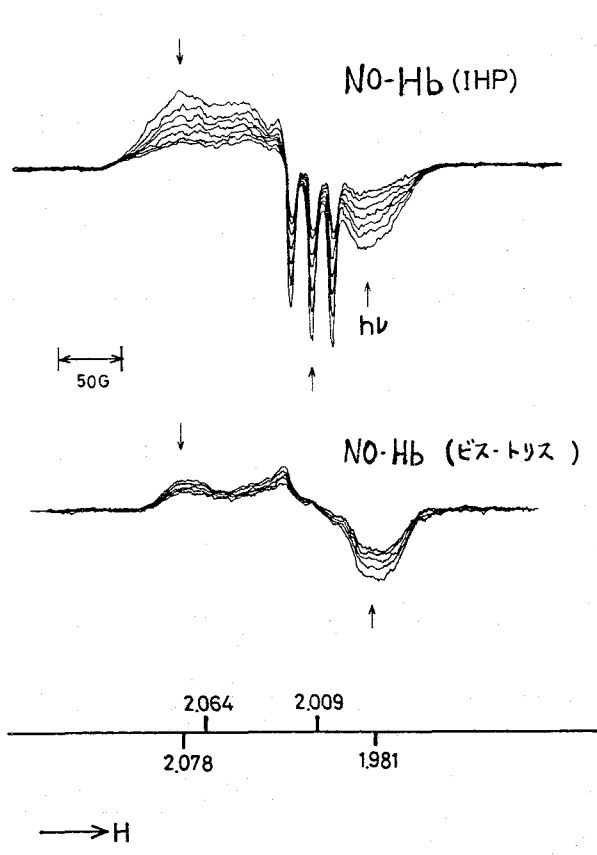
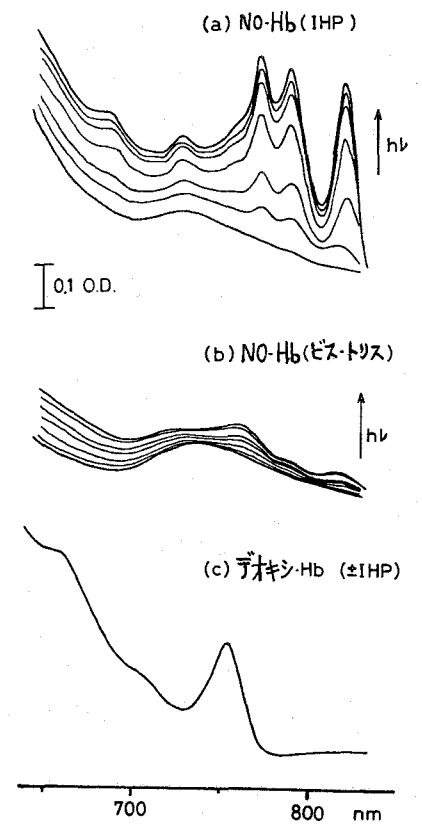


図-25 光解離 EPR スペクトル



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り、近赤外領域の 774, 790 及び 820 nm に 3つのピークが現われる。

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

一系 EPR では、光照射によって、強度が減少してゆく。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 4°K で測定すると強度は元に戻る。このことは、4°K に保たれていいる限り、NO の再結合は行なわれていいる事を示す。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 $\Lambda 4$ から解離し、蛋白質部分の π 軌道にトラップされるが、光照射していいる間は、 $\Lambda 4$ に再結合してくるものもあり、NO の解離と再結合の平衡をみていいることになる。光照射をやめると再結合はおこらず、蛋白質部分にトラップされた分だけ EPR 強度が小さくなると思われる。

又、光解離した NO ラジカルの EPR を 0 ~ 5000 ガウスの間で見出す事は出来なかった。

一系、NO ガスを水に溶かし、低温の EPR を試みたが、EPR シグナル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 構造をとる事が知られているが、近赤外領域に現われた光解離型吸収スペクトルといかなる関係があるのか、種々の NO-11βグロブリン-Hb について比較検討する。図-26 は種々の NO-11βグロブリン-Hb の NO を光で解離した時の近赤外領域

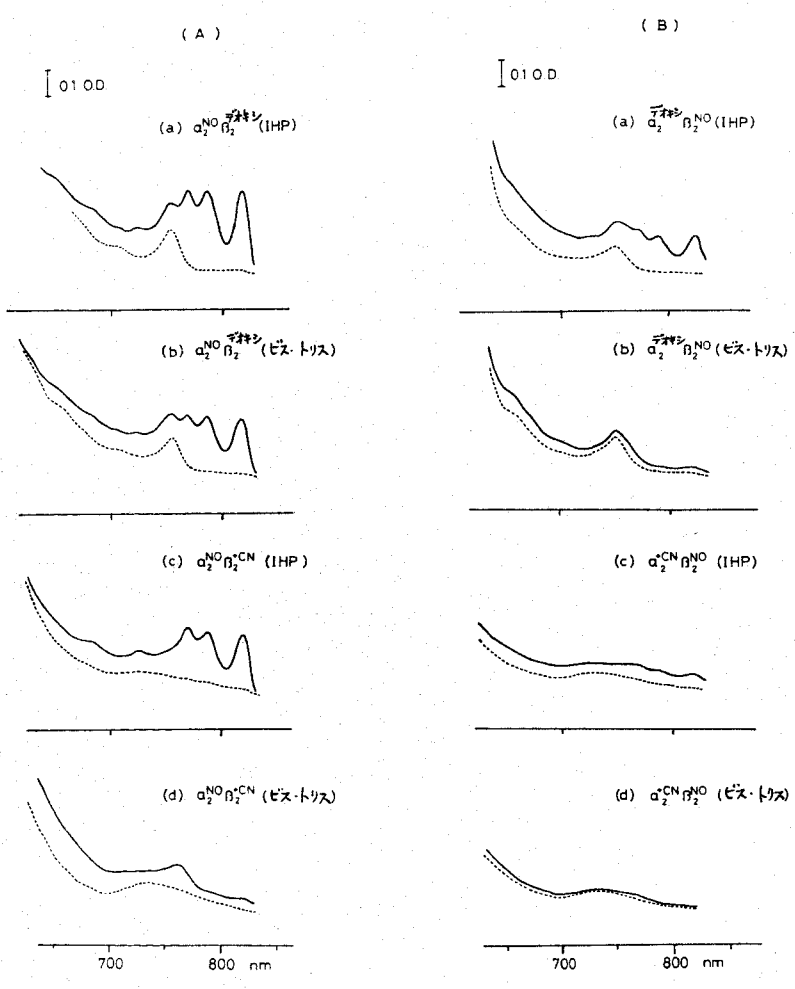


図-26 種々の NO-11βグロブリン-Hb の低温スペクトル (実線は光照射した後のスペクトルを示す)

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 があっても、なくても、 $\alpha_2^{NO} \beta_2^{トキシ}$ の光解離吸収スペクトル及び 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。これらの 3 種のハイグッド-Hb は EPR 測定では、それぞれ 3 本の hfs を示したものである。

一、IHP 存在下の $\alpha_2^{トキシ} \beta_2^{NO}$ 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} -ハイグ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。

その他の NO-Hyグッド-Hb の光解離吸収スペクトルの変化は非常に小さかった。しかし、近赤外の吸収スペクトルが変化しないのは、光解離がおこっていないからではない。実際に、EPR 測定から、これらの NO-Hyグッド-Hb は光照射によって、50~70% の光解離がおこることが確認された。

以上の結果をまとめると、NO-Hyグッド-Hb の四次構造が T 状態になると、EPR スペクトルでは、3 本のそれぞれ hfs を示す事、又、これらの NO-Hyグッド-Hb に光照射すると、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、これらの特徴は鎖の NO-H4 に特に強く現われる事が判った。

2-4-4

5配位 NO-H4 モデル物質の光解離

NO-H4 モデル物質について、EPR, 低温スペクトルの光解離実験を行った。

図-27 に IHP 存在下の $\alpha_2^{NO} \beta_2^{トキシ}$ と、NO-プロトH4 を 3% SDS 溶液に溶かしたものの EPR の光解離を示した。

前述したように、NO-ハグリッド・Hb では、 42°K に保つ限り、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おこらない。

と3か、3% SDS 中の NO-プロトハ4 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 EPR スペクトルに戻ってしまう。しかも、照射光を強くすれば、すこし程 NO の解離が増大することが判った。

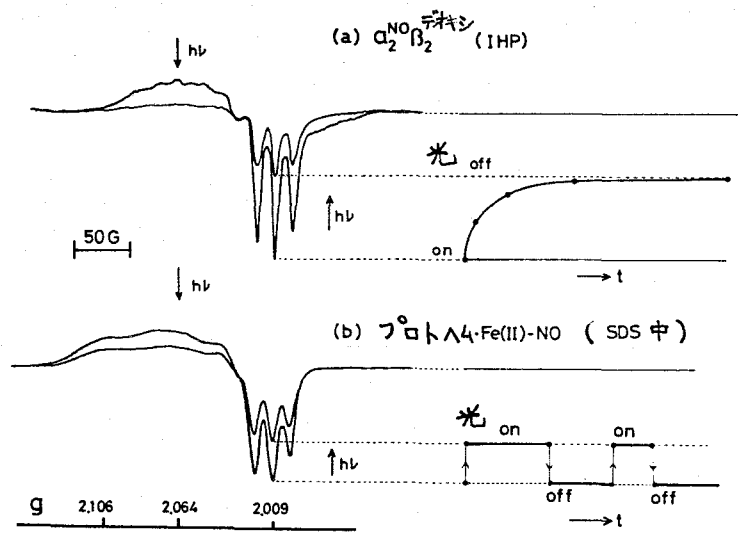


図-27. NO-ハ4 モデルの光解離 (EPR)
(NO-ハグリッドHb 光解離と比較して示した)

この結果は、蛋白部分が、ハ4 から解離した配位子をトラップする役割をしていいることを示唆している。

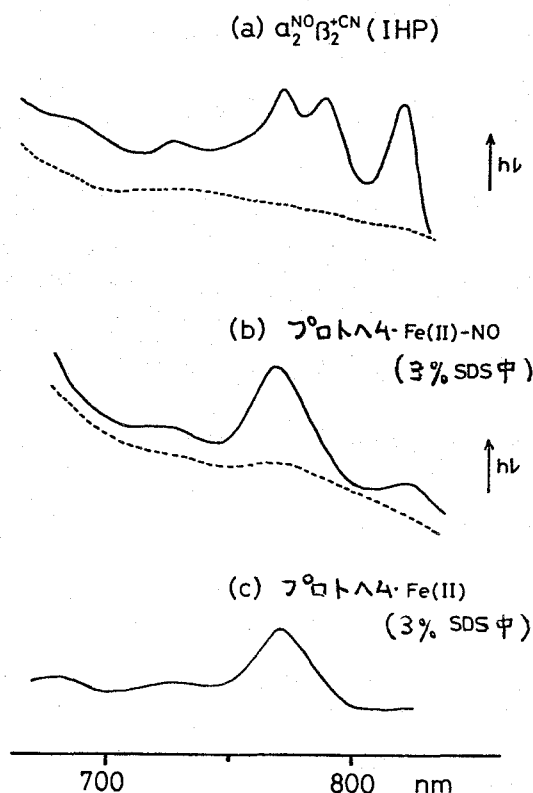
さて、5配位のハ4 から NO が解離したとすれば、ハ4 は4配位になると考えるのが自然であるか、はたして、光解離型は4配位なのであろうか。4配位のハ4モデル化合物の近赤外領域のスペクトルと比較検討した。

図-28 に、IHP 存在下の $\alpha_2 \text{NO} \beta_2 + \text{CN}$ と 3% SDS 中の NO-プロトハ4 の光解離型及び 3% SDS 中のプロトハ4 (Fe^{2+}) の吸収

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 Hb の光解離型は 770 nm に吸収が現われるが、この吸収は光照射を止めても、 42°K 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かどうかは疑わしい。

光照射しなから、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 Hb (Fe^{2+}) は 4 配位の Hb であると思われるが、T 状態の NO-11グッド-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 本のピークを示さな。一応、ベンゼン中の Fe^{2+} -テトラフェニルポルフィリン (Fe^{2+} -TPP と略記) 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+} -TPP とプロト Hb 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 α 鎖の NO- Hb は 5 配位と思われるが、NO が光解離したとき α 鎖の 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、はっきりさせる事が出来なかった。

第三章 Λ ヘモグロビン(Hb)の四次構造と Λ 4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 Λ 4間相互作用は、配位子の親和性の高い様シ型の構造をとる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 Λ 4間相互作用と理解されている。

Perutzは⁽⁵⁷⁾ これらの2つの四次構造の間の構造変化の Λ 4間相互作用は、主に、 Λ 4のポルフィリン環から鉄原子がどれだけ Λ 4間相互作用を出しているかによって支配されると説明した。即ち、配位子の結合した Λ 4では、 Fe^{2+} 低スピン状態で、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おさまらず、近位ヒスチジン側へ 0.75 \AA ずれている。

酸化型Hbでも、 Fe^{2+} 低スピン状態では鉄原子は面内にあり、高スピン状態では 0.4 \AA 近位ヒスチジン側へ Λ 4間相互作用を出している。

デオキシ型に酸素が結合すると、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 Λ 4間相互作用と考えられる。

又、Perutzら^(58,59)は紫外吸収、CD、 $\beta 93$ SH基の反応性等の実験から、高スピン状態の酸化型Hbに、アロステリックエフェクターである1HP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ある中心となっている Λ 4間相互作用は、四量体のサブユニットのいくつかには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 Λ 4間相互作用として理解されている。 Λ 4間相互作用が他のサブユニットから受ける影響を検出する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-11ゲリッド-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、 $\alpha_2^+\beta_2$ の方が少し親和性が高いことを示した。彼らは、さらに 77°K での EPR 測定を行い ⁽⁶¹⁾、高い pH で酸化型が低スピンになり易い条件 (~ pH 10) では、 $\alpha_2^+\beta_2$ の β へ 4 がデキシ型 (高スピン状態) だと $g = 6$ 附近にブロードな吸収があらわれる事。又、 β へ 4 がオキシ型 (低スピン状態) だとブロードな吸収はあらわれない事。逆に、 $\alpha_2\beta_2^+$ では α へ 4 がデキシ型、オキシ型いずれの場合でもブ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、高い pH においても、ごく少量残った H_2O の配位した α へ 4 からのシグナルのみをみており、還元鎖 (Fe^{2+}) のスピン状態に対する可逆性が明確には示されてはいない等、難点が多い。

そこで、 α へ 4 間相互作用のメカニズムを電子状態のレベルで理解する為に、Banerjee と同様に、酸化型高スピンの EPR に着目して、酸化型 Hb 及び バレンシー-11ゲリッド-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ってどのような変化をするか、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-11ゲリッド-Hb、いわゆる異常 HbM についても議論する。

3-2 バレンシー-11ゲリッド-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-11ゲリッド-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 1.74 であった。 n が大きいことから、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

造をとリ、 $\alpha_2^+ \beta_2^-$ オキシ、 $\alpha_2^- \beta_2^+$ オキシ 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+} 高スピンの EPR スペクトル

本章では、 Fe^{3+} 高スピんに特有な $g \sim 6$ の EPR スペクトルに着目する。図-29 に 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。

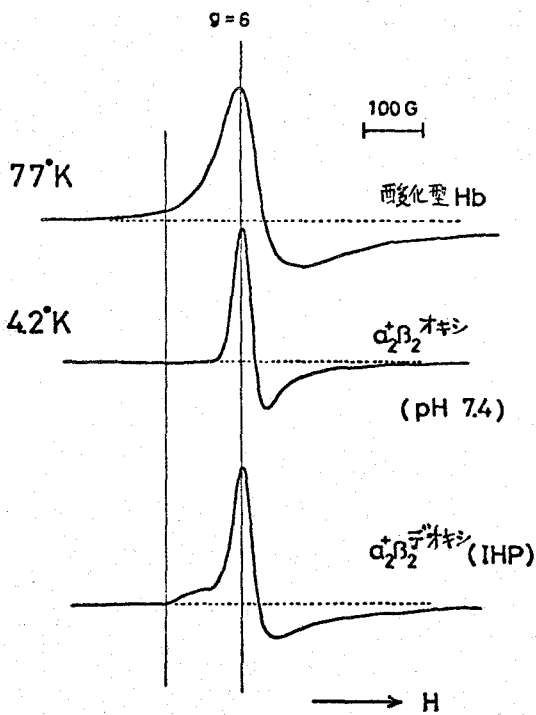


図-29 線幅の温度変化

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 と同じと考えてよい) 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くる。

特に、シグナルのたさあかり (低磁場側) が非常にすぼく存るので、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かつたと思われる。

さて、図-30 に pH 7.4, IHP 存在下での EPR スペクトルを示した。還元鎖 (Fe^{2+}) をチチシ化した場合、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
ンのEPRスペクトルを示す。

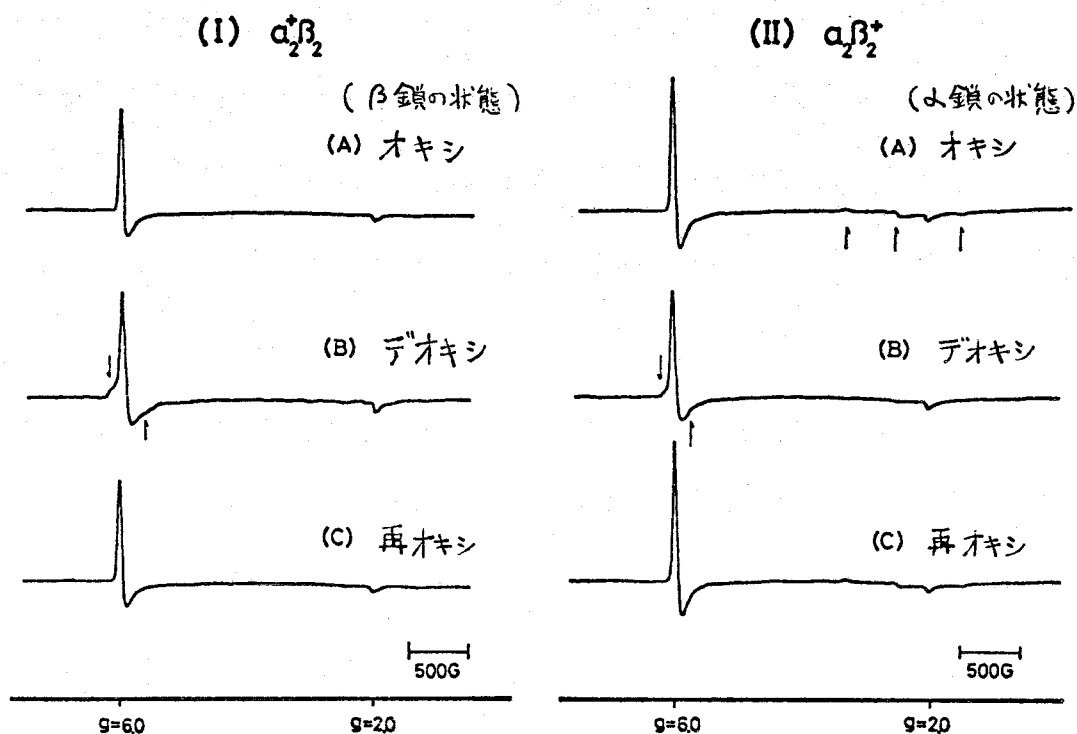


図-30 種々のバレンシー-1 MyoglobinのEPR
(PH 7.4, IHP存在下, 4.2°K)

この傾向は $\alpha_2^+\beta_2$, $\alpha_2\beta_2^+$ 両Myoglobin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
 π 4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、長線はオキシ状態
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状態へ転移すると、 Fe^{3+} π 4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、 π 4面
内の異方性の大きな、もう一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。

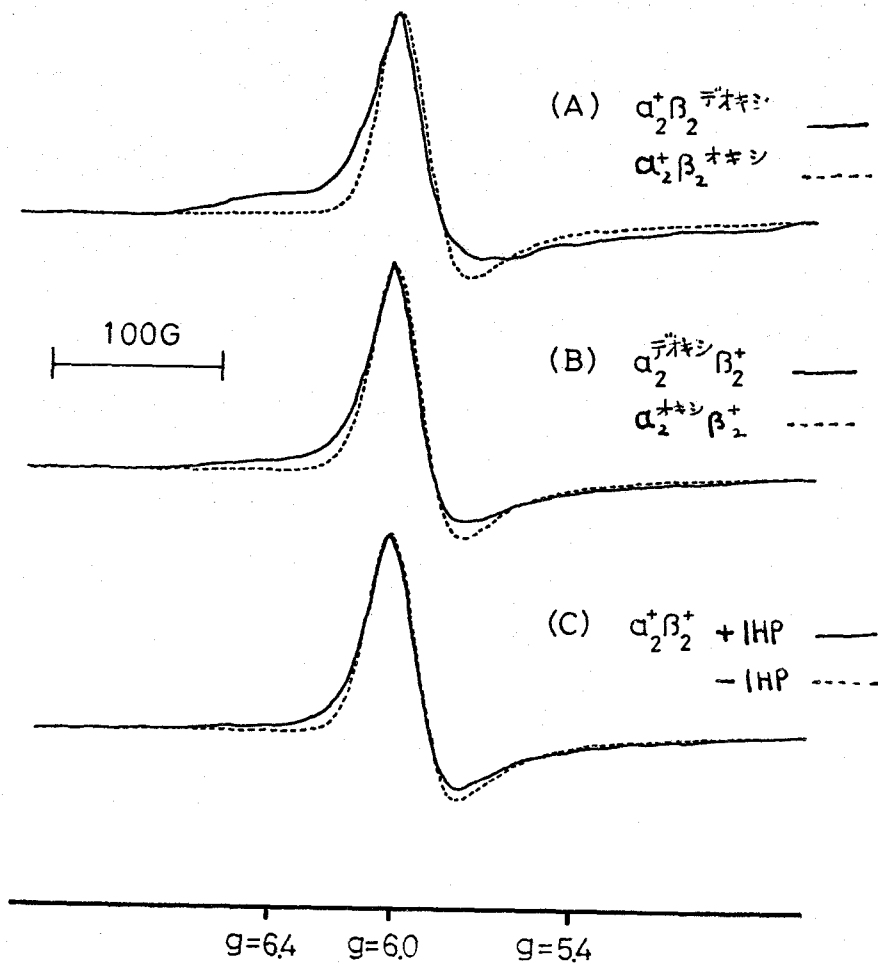


図-31

バレンジャー・ハイブリッド

Hb の EPR

(g~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~6 付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 が存在しないときにみられた OH^- 型の低スピンの 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、より高スピン状態であることを示している。以上から酸化型 Hb は、IHP が存在しないときは R 型の四次構造をとる。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 から支持した事になる。

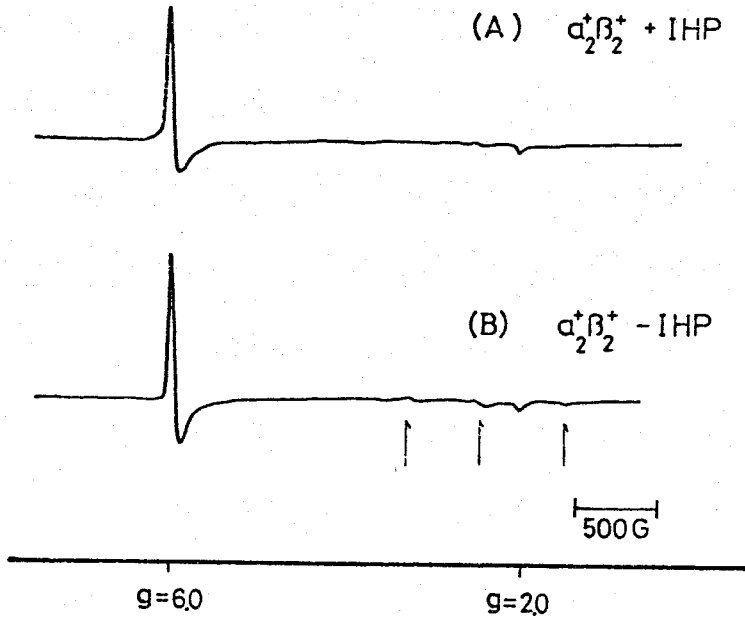


図 - 32

酸化型Hb($\alpha_2\beta_2$) \pm IHP

の EPR

PH 7.4

0.05 M ビス-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った。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 鎖か β 鎖のアミノ酸の1個が他のアミノ酸にかわったもので、異常Hbの種類によっては様々な症状を示す。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いる。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 鎖又は β 鎖の14の鉄が3価になったいわゆる天然に存在するバレンシーハグド、Hbである。

Mは現在5種類知られている。 α 鎖異常のものは遠位ヒスチジンがタイロシンになった Fe^{3+} 14になった M_{Boston} 及び近位ヒスチジンがタイロシンになった M_{Iwate} がある。 β 鎖異常のものは、遠位ヒスチジンがタイロシンになった $M_{saskatoon}$ 、近位ヒスチジンがタイロシンになった $M_{Hyde Park}$ 及び、遠位ヒスチジン近くの11E(67) Val. (バリオン) が Glu. (グルタミン酸) になった $M_{Milwaukee-1}$ がある。

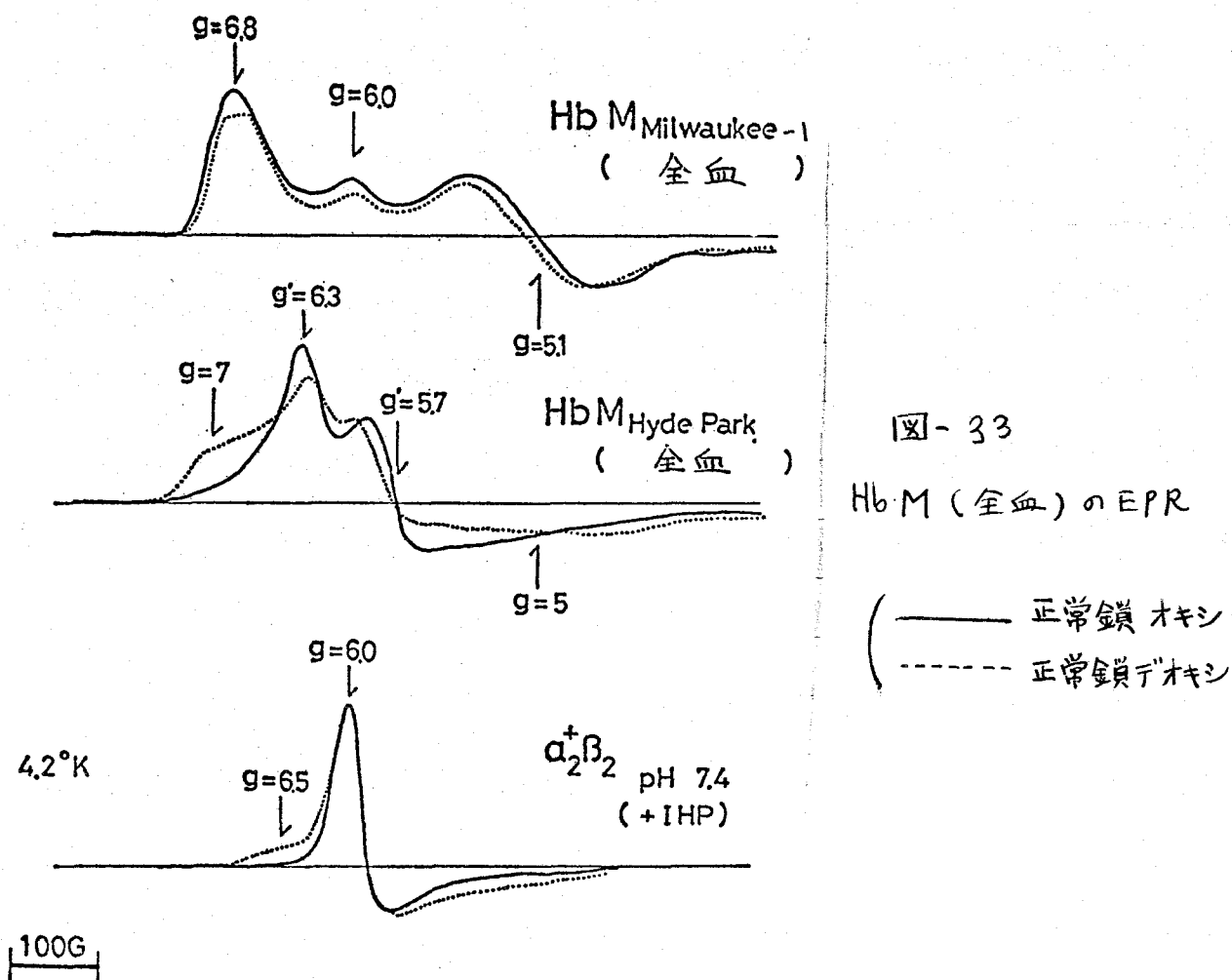


図-33

Hb M (全血) の EPR

(——— 正常鉄オキシ
 - - - - 正常鉄デオキシ

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

特に $M_{\text{Hyde Park}}$ については正常鉄 (Fe^{2+}) の α 鎖をデオキシ化すると $g \sim 6$ 付近に、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 (77°K) での測定が報告されている。⁽⁶⁴⁾ 今回、液体ヘリウム温度 (4.2°K) 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・ $M_{\text{Hyde Park}}$ の異方性の大きなシグナルの出現は、図-33 の一番下に示した IHP 存在下のバレンシー・ハグリッド Hb での変化と非常によく似ているが、この様に、正常鉄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 = の原因が何であるか明らかでない。

ところで、今までに、 $M_{Hyde Park}$ 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スペクトルが変化するという例は報告されていなかったが、 $42^{\circ}K$ で、種々の条件で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った。

本実験で使用したHbMは、 $M_{Hyde Park}$ 、 $M_{Milwaukee-1}$ 及び 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、及び $M_{Milwaukee-1}$ 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 Hb $M_{Milwaukee-1}$ (11E(P67)Val. \rightarrow Glu.)

図-33、一番上はHb $M_{Milwaukee-1}$ 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、Hb $M_{Milwaukee-1}$ 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、Hb $M_{Hyde Park}$ とは逆の変化である(図-33の真中の図)。

そこで、次に、精製したHb $M_{Milwaukee-1}$ について種々の条件下で、EPRを測定した。図-34に示す。

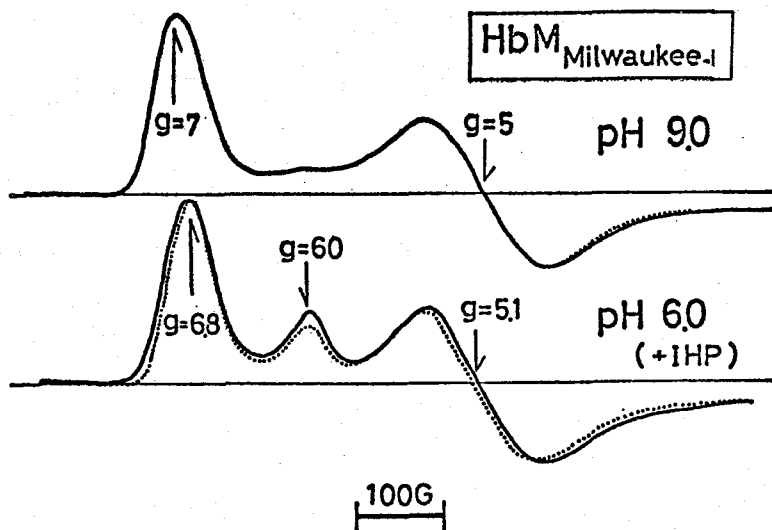


図-34

Hb $M_{Milwaukee-1}$ のEPR

(——— 正常鎖 オキシ
 (----- 正常鎖 デオキシ)

先づ、 $\text{pH } 9.0$ (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な違いは、 $g=6.0$ 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、 $\text{pH } 6.0$ (0.05M ビス-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、 $g_1=6.8$ 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とでは、 $g=6.0$ 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、 $g=6.0$ のシグナルのすそが $g_1=6.8$ の異方性の大きなシグナルにかくれてはっきりしないが、前節でのバロンシー・ハイグウッド-Hb での変化と類似した変化と思われる。又、 $\text{pH } 7.4$ で同じ測定を行ったが、 $\text{pH } 6.0$ 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。第一章でみてきたように、 Fe^{3+} ・高スピンの八面体内の g 値は、異方性の大きい場合 $g_{\perp} = 6 \pm 24 E/D$... であらわす事が出来た。HbM Milwaukee-1 の場合、 $g'_1=7$, $g'_2=5$ より異方性の大きさを示す E/D は 0.042 程度となり、 $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})\text{H}_2\text{O}$ 等と比べると異方性がずいぶん大きくなる。

さて、 E/D の値を大きくしているのは、 E の項が大きい為であろうか、それとも D の項が小さくなった為であろうか。もし、 E 項は HbM の種類によって、こ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 の値がずいぶん小さくなると思われる。

したがって、高磁場において、磁場を z 方向 (八面体垂直方向) にかければ、 $S_z = -3/2$ の状態と $S_z = -1/2$ 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 Gauss まで磁場掃引したか、シグナルをとらえる事には成功しなかった。もちろん、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。

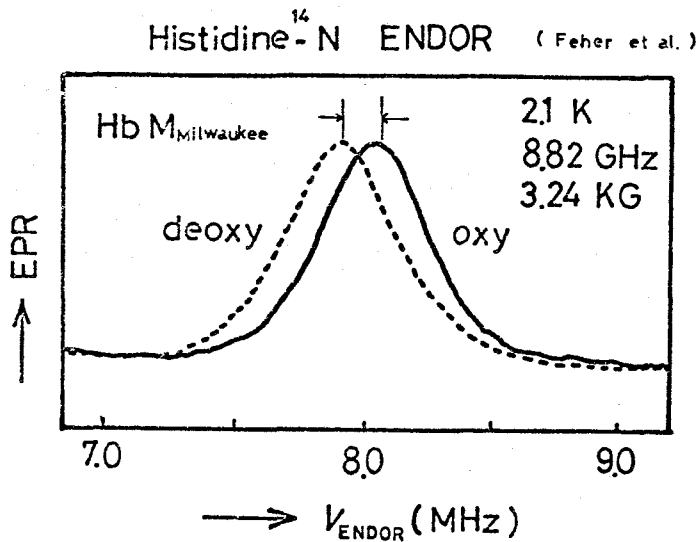


図-35 Hb M_{Milwaukee-1} の ENDOR

図-35 に Feher ら⁽⁶⁶⁾ によって行われた 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) の結果を示した。

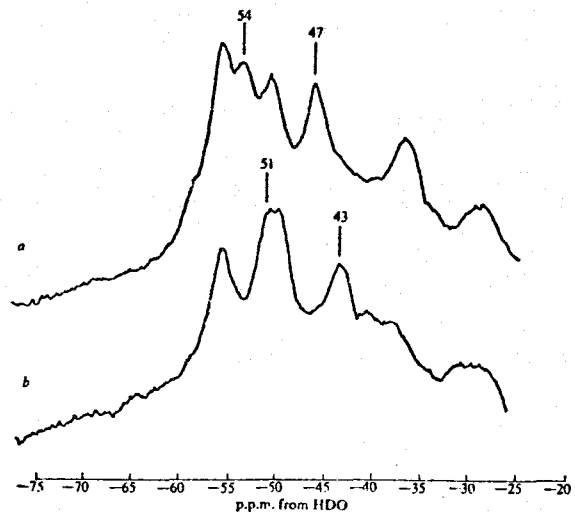
正常鎖をオキシ状態あるいはデオキシ状態にする事によって、異常鎖の鉄と近位ヒスチジンとの相互作用がわずかに変化している事を示している。

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 ら⁽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 84 プロトンの常磁性シフトが減少する事を報告している. これを図-36 に示しておく.

又. Perutz らは⁽⁶⁸⁾ 正常鎖に一酸化炭素を結合させると. 異常鎖 β 84 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 β 84 の変化が Hb の四次構造に変化を与え. その影響が. 異常鎖の β 84 に及ぼされた事を示している.

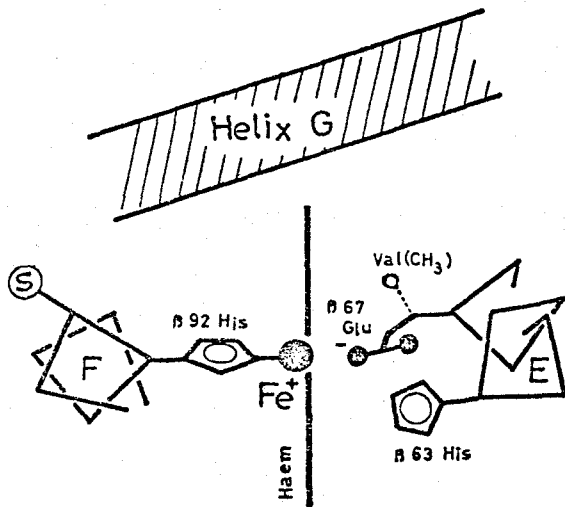


図-37 Hb M Milwaukee-1 (M.F. Perutz)

さて. 図-37 は. Hb M Milwaukee-1 の β 84 周辺をこがいたものである. X線結晶解析, ENDORの結果より. β 84 に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なければ. ^{14}N の ENDOR は観測されない(例えは. Hb M Hyde Park ではグロシンが配位しているので ^{14}N 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 $-\text{COO}^-$ が β 84 鉄の近傍にきている事わがっている.

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

そこで. $g=6$ のシグナルを与えるのは. Glu. が配位してない場合は. 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. あるいは. Fe^{3+} との相互作用が強くなった場合で. 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.

その様に考えると. 正常鎖の酸素化に伴って. g の異方性が

増大すゝ事の説明は、四次構造が R 状態へ変化し、 ϵ 3 と ϵ 2 と異常鎖の ϵ 4 周辺にもなんらかの変化が起っている訳だ。例は、鉄原子が近位ヒステジンに押されて、ホルフィリン環により近づいた為、遠位ヒステジン側にあるグルタミン酸との相互作用がより強くなり、 g の異方性の大きな ϵ 7+10 が更に異方性の大きな ϵ 7+10 に変化したと考える。

一方、 $g=6$ の ϵ 7+10 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 ϵ 7+10 が "フロント" になると、バレンシーハイブリッドの時と同様に鉄原子が近位ヒステジン側へ μ , π 配位されていると考える。

pH 9.0 で $g=6$ の ϵ 7+10 が消えたのは、 g の異方性が増加した事を考えれば遠位ヒステジン側のグルタミン酸がより強く鉄原子に配位した為と考える。pH 9.0 での ENDOR で ^{14}N の ϵ 7+10 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、1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し事を期待したい。

3-3-2 Hb M_{Boston} (ϵ 58 His. \rightarrow Tyr.)

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

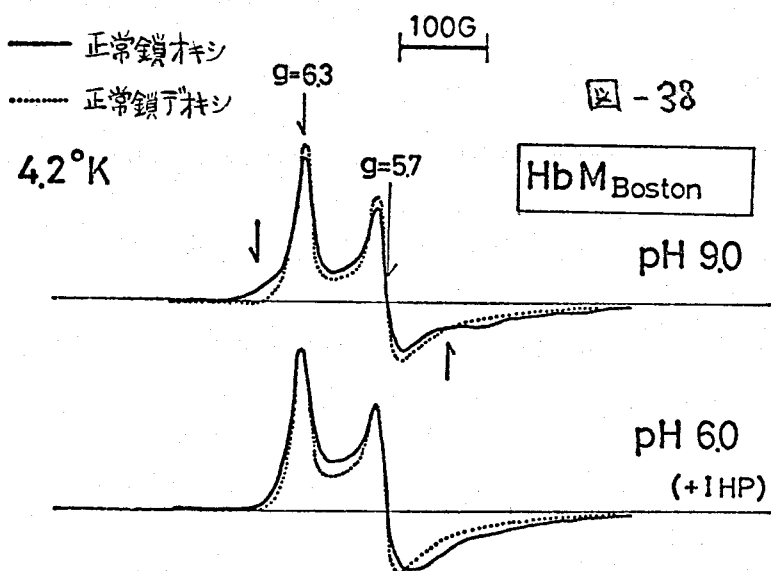


図-38

Hb M_{Boston} は α 鎖が異常鎖 (Fe^{3+}) で遠位ヒステジンがタイロシン (Tyr.) にかわったものである。
鉄 I は ϵ 7+10 が配位している事が X 線より判っている。(69)
又、酸素平衡の実験では Hill の n 値は 1.2、Nishikura's (70)

によって行なわれた EIC (ethylisocyanide) 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 $n=2.4$ であると報告している。

一方、今まで EPR スペクトルは、正常鎖を变化させても影響されない」と報告されてきた。ところが、EPR スペクトルは、pH 9.0 で β 正常鎖を酸化すると、 α 異常鎖に異方性の大きなもう一つのシフトル(実線)が現われる事が判った。又、pH 6.0 でも、正常鎖を酸化すると、スペクトル全体が「ブロード」になり傾向を示した。

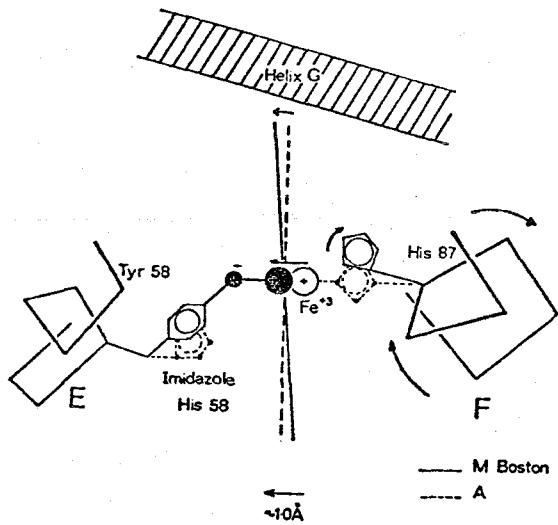


図-39

α 鎖の $\Lambda 4$ 近傍 :

HbM_{Boston} - テキシ Hb A

(特に断わらない限り ヒト Hb は Hb A を示す)

(P. D. Palsinelli et al.)

図-39 に HbM_{Boston} の α 異常鎖 $\Lambda 4$ 周辺の構造を示した。テキシ 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 リングが少し回転した構造をとる。これは T 状態がより安定になった構造であると考えられる。(HbM_{Boston} の単結晶はテキシ Hb の単結晶と同結晶構造である) ところが、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が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。ところが、pH 9 で正常鎖を酸化すると異常鎖 $\Lambda 4$ の $g_1 = 6.3$, $g_2 = 5.7$ という異方性の大きな 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、 $\alpha\gamma$ の周辺に、異方性を大きくする構造変化が起った事を示している。

そこで、pH 9.0 では、 n 値が大きくなる事が期待される。

EPR の変化の1つの解釈として、 β 正常鎖を酸素化する事で構造が $T \rightarrow R$ の変化が起るうとして、 α 鎖の F リックスの回転が元の状態に戻るうとするのではないが、その結果、近位ヒステジンは鉄原子に近づく為、 $\alpha\gamma$ 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、ブレンシー・ハグウッド・Hb の $Fe^{3+}\alpha\gamma$ の EPR に着目し、パートナーのサブユニットの $Fe^{2+}\alpha\delta$ のスピン状態を変える事により、どのような構造変化が引きおこされ、それが、どのような様にして $Fe^{3+}\alpha\gamma$ 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、 $Fe^{3+}\alpha\gamma$ 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 ($\alpha_2\beta_2^+$) にプロステリックエフェクターである IHP (イノシトール六リン酸) を加えると、 $R \rightarrow T$ の四次構造の変化が起り、 $g \sim 6$ 付近に、T 状態に特有のブロードなシグナルを示した。この事は、「高スピン状態の酸化型 Hb + IHP 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、ブレンシー・ハグウッド・Hb の EPR については、IHP の存在下で、Hill の n 値が大きくなるものは、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・11ゲリッド・Hb の様に、 n 値との関係をつける事は出来ないうようであった。

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、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} においては、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 π 4 の鉄の電子状態が変化することは、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・11ゲリッド・Hb でも、異常 HbM でもたいていの場合、鉄の電子状態の変化として伝わることを示された。

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えると、本論文で示された π 4 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 還元型デキサヘモグロビン(Fe^{2+} , 高スピン)の Λ_4 の電子状態

4-1 緒言

Mbや Hbが 酸素分子を吸着したり、解離したりする活性は、 Λ_4 の鉄が2個(Fe^{2+})の状態のときにのみみられるものである。

Λ_4 蛋白質の電子状態の研究では、 Λ_4 の鉄が3個(Fe^{3+})の状態で見つかる成果を収めていいるが、生理的に最も重要である Fe^{2+} の Λ_4 の電子状態の研究はあまり進んでいいるとは云えない。

Fe^{2+} -高スピンの EPR が観測されていいる事、又、 Fe^{2+} -低スピンの場合は磁気モーメントがなく、磁気測定が困難である事から、 Fe^{3+} の Λ_4 の鉄の研究に比べて、 Fe^{2+} Λ_4 の鉄の電子論的研究が遅らせた大きな原因と思われる。

Hbの Λ_4 間相互作用等の研究に対して、 Fe^{2+} -高スピンの EPR 測定が可能になれば、従来の Fe^{3+} Λ_4 鉄の EPR や、その他の物理化学的測定では得られなかった新しい研究手段と結果をもたらすであろう。それ故、 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、古く Pauling らの実験⁽⁷¹⁾によれば、デキサヘモグロビン(Fe^{2+})についての有効ボーア磁子数は室温で $M_{eff.} = 5.4$ を得ていいる。

これは還元型 Hb の Λ_4 鉄の3d電子が6個であると考えると合成スピン量子数は $S=2$ に対応する。デキサヘモグロビンの室温に於けるボーア磁子数が5.4で、 $S=2$ に対応するスピンのみの値 $n = 2\sqrt{S(S+1)} = 4.9$ よりかなり高いた。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、正八面体配位場又は、斜方配位場の配位子場が Fe^{3+} の場合より、かなり弱いためであろうと推測していいる。

Fe^{2+} -高スピンの基底状態は 5B と推定されていいる。

スピン軌道相互作用及びn π セ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ン

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

で表わせる。(図-40)

N. Nukano らは⁽¹²⁾ ヒトデオキシHb, マッコウクワシラ・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うパラメーターを決めた。

それによつて、 $E=0$, $g=2$ と仮定して、 $D=5 \text{ cm}^{-1}$ と分子事を報告している。更に N. Nukano 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($g_z=2.0$ として、 g_x, g_y は D, E 及びスピン軌道相互作用定数 a より求まる量で、したがって仮定がある) $D=5.3 \text{ cm}^{-1}$, $E=0.9 \text{ cm}^{-1}$ とするも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て、 $g_z=2.0$ 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、

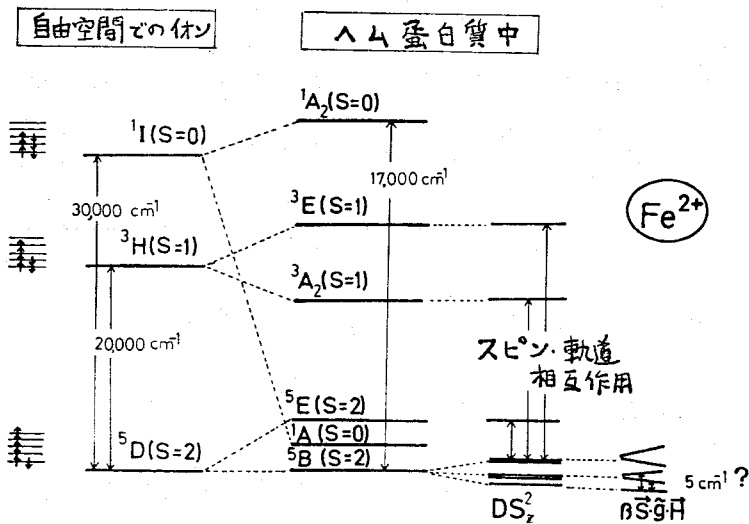


図-40 S=2 (Fe²⁺ 高スピン)のエネルギー準位。

解析のやり直しを行った。本章で議論する解析法では、 D の値しか求まらない(g_z の方向が、 Λ 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 の値を使って g_z

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

N. Nakano らの結果とほぼ一致するものである。

$\{=2\}$ $D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ とすれば、常磁性共鳴 (EPR) の観測が可能ではある。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っておれば、 $S_z = 0$ と $S_z = -1$ と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 $40 \sim 50 \text{ k}$ ガウスで起るとはなる。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て、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、ナイドロキソイト ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 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 の単結晶は単斜晶系で、空間群は P_2 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 α 鎖を含むことになる。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 鎖の中心と 2 つの β 鎖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 $a = 63.4 \text{ \AA}$, $b = 83.6 \text{ \AA}$, $c = 53.9 \text{ \AA}$, $\beta = 99.15'$ である⁽⁷⁵⁾。

4-2-2 トルク測定的一般原理

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。これは、その物質の磁気異方性エネルギーに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 とすると、磁化の主軸 X, Y, Z を選ぶことより

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

と表わせる。

物質が磁場の中で持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、

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

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。

$\chi_x > \chi_y$ 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乗に比例するということである。

エネルギー準位が判るときは、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 of 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らの実験では極低温領域が中心で、 $g_z = 2.0$ 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、スピンハミルトニアン(10)のE項を無視できるので、トルクを $1/T$ (T は絶対温度) に比例する項 (g の異方性に起因する) と $1/T^2$ 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以下での測定では、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以下での磁場の2乗に比例する項の温度変化とから単結晶中の \wedge 4面方位 (正しくは磁化率テンソルの主値方向) 及び g 値を知らなくても、直接 D の値を計算できる。以下にその解析法を述べる。

(10) 式のスピンハミルトニアンを

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

と書きかえる。但し、 $D = F \cos \alpha$, $E = \frac{1}{\sqrt{3}} F \sin \alpha$ (14)

二次摂動のエネルギー計算より次の様になる。

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

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

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

A) 高温近似

分配関数 Σ を求める。

$$\Sigma = e^{-E_2/kT} + e^{-E_{-1}/kT} + e^{-E_1/kT} + e^{-E_{-0}/kT} + e^{-E_0/kT} \quad (16)$$

D \gg E として計算して。

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

$$\times \left\{ 1 + 2e^{-4D/kT} \left(\frac{2g_z^2 \beta^2 H_z^2}{k^2 T^2} - \frac{(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{3D kT} \right) \right. \\ + 2e^{-D/kT} \left(\frac{g_z^2 \beta^2 H_z^2}{2k^2 T^2} - \frac{7(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{6D kT} \right) \\ \left. + \frac{3(g_x^2 H_x^2 + g_y^2 H_y^2) \beta^2}{D kT} \right\} \quad (17)$$

自由エネルギー $F = -NkT \log \Sigma$ より

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

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

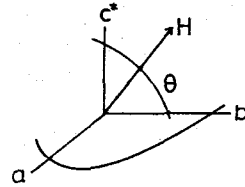
トルク L は $L \equiv -\frac{\partial F}{\partial \theta}$ より得られる。

いままでには、単位胞中に1つの Λ_4 しかないとして計算してきたが、ヒト・デオキシHbでは、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 Λ_4 を含むので、全ての Λ_4 についての総和をとらねばならない。

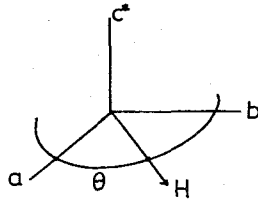
8個の Λ_4 のうち、4個は、 b 軸が結晶の対称軸であるので、対称操作で残りの4個と重ねる事が出来る。

4の磁化率の主軸をx, y, z方向として、結晶軸a, b, c* (cの代りにa, b軸に垂直なc*軸とする) 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・デッキンHbでは、各結晶軸のまわりのトルクは次のようになる。

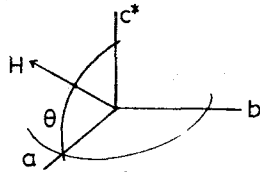
$$L^{c^*} = \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \left\{ \frac{3}{4} \left\{ g_z^2 (n_z^2 - m_z^2) + g_x^2 (n_x^2 - m_x^2) + g_y^2 (n_y^2 - m_y^2) \right\} - \frac{21D}{40kT} \left\{ 2g_z^2 (n_z^2 - m_z^2) - g_x^2 (n_x^2 - m_x^2) - g_y^2 (n_y^2 - m_y^2) \right\} \right\} \cdot \sin 2\theta$$



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



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



$$+ \frac{N\beta^2 H^2}{3kT} \left\{ \frac{3}{2} \left\{ g_z^2 n_z l_z + g_x^2 n_x l_x + g_y^2 n_y l_y \right\} - \frac{21D}{20kT} \left\{ 2g_z^2 n_z l_z - g_x^2 n_x l_x - g_y^2 n_y l_y \right\} \right\} \cdot \cos 2\theta$$

(19)

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}について、ある磁場Hでのトルク曲線の最大振幅L^{ab}_{max}の温度変化は、

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

(20)

で与えられる。

z=π/2. タテ軸にL・Tに比例した量、ヨコ軸に1/Tのグラフを書けば、その傾きは、

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

を与え、 θ 軸との切片は、

$$\frac{3}{4} \left\{ g_z^2 \sum_1^4 (m_z^2 - l_z^2) + g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\} \quad (22)$$

を与えることとなる。

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 軸のトルク測定値 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 (実際には最小二乗法により L_0, A, B が求まる)。

そこで $L - L_0$ を常磁性によるトルク L とし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きる。

今、 g テンソル主値及 n 方向余弦 (l_i, m_i, n_i) : ($i = x, y, z$) が不明であるので、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 Λ 面に垂直な方向として、X線結晶解析の結果が使えれば (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 に比例する項と H^2 に比例する項とを分離して、 H^2 に比例する項だけを考える。前と同様、先の、1個の Λ 面について (15) より分配関数を考えると、

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

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

を得る。

前と同様、自由エネルギーを求めて、8個の $\wedge 4$ を考慮して、結晶軸のまわりのトルクを計算すると、 ab 面内でのトルク L^{ab} は、

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

但し、 $A = 1 + 2 \exp\left(-\frac{D}{kT}\right) + 2 \exp\left(-\frac{4D}{kT}\right)$ 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 のとり方は、高温近似の場合と同じである。

そこで、 L^{ab} について $T \rightarrow 0$ 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でない有限の値

$$\frac{3N\beta^2 H^2}{4D} \left\{ g_x^2 \sum_1^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_1^4 (m_y^2 - l_y^2) \right\}$$

に近づく。

したがって、 T 軸に $L_{\max}^{ab} / N\beta^2 H^2$ を

とり、 Y 軸に温度 T をとると、

図-41 に示すように、 T 軸の切片が

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

を与える。

(25)

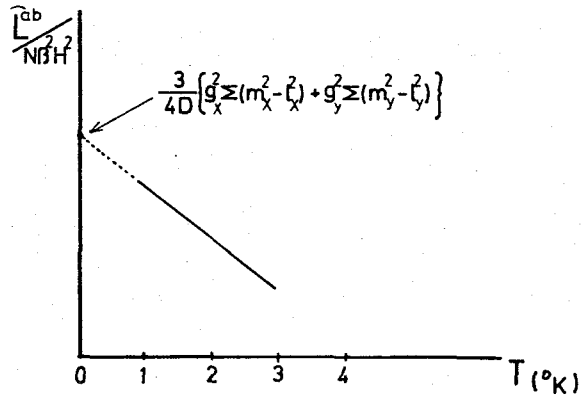


図-41 $L - T$ (極低温)

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) は実測される量で

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

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

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

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

これを (25) のもう一つの实測値

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

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

4-3 ヒト・テリジシ 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 等⁽¹⁶⁾ により、
 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 Dewar の
 中にヒーターを入れて、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
 にかき、酸化型 Hb が無い事を確かめ、セリジシヘモグロビン
 法でヘリウム濃度を定量した。

以下、ab 面内で磁場を回転させたときのトルク測定を例にとって

説明する。

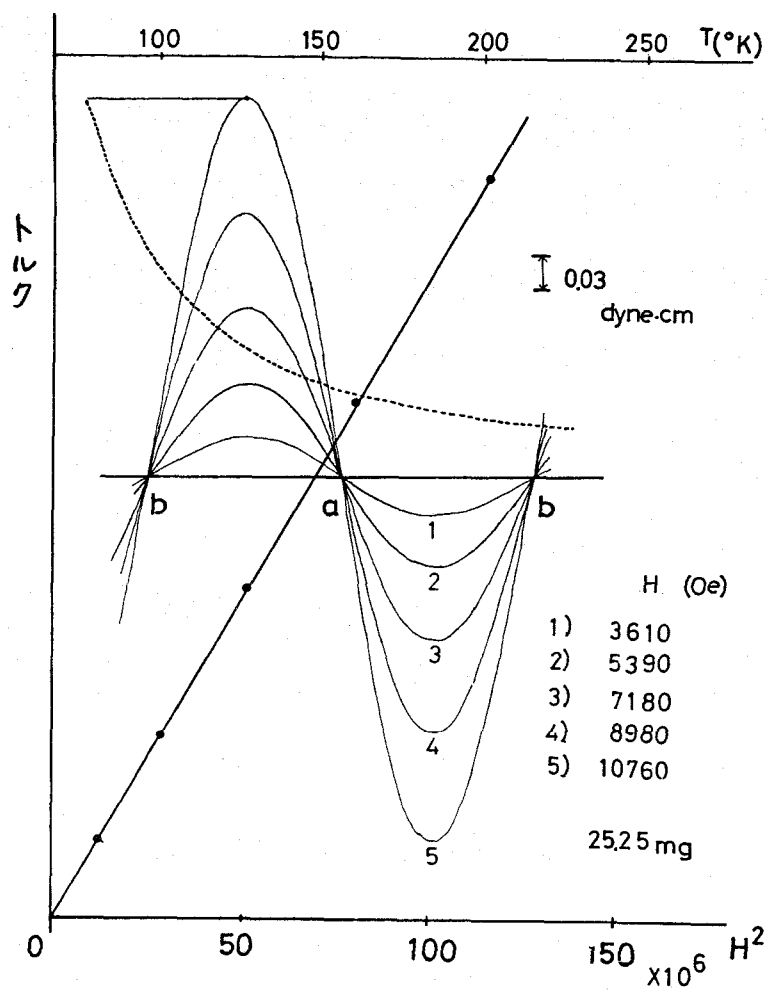


図-42

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与える。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
 事と示している。
 点線で示した曲線は、トルク最大のところに磁石を固定して、
 温度を上昇させたときに得られる曲線である。

これを $L \cdot T - \frac{1}{T}$ で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。

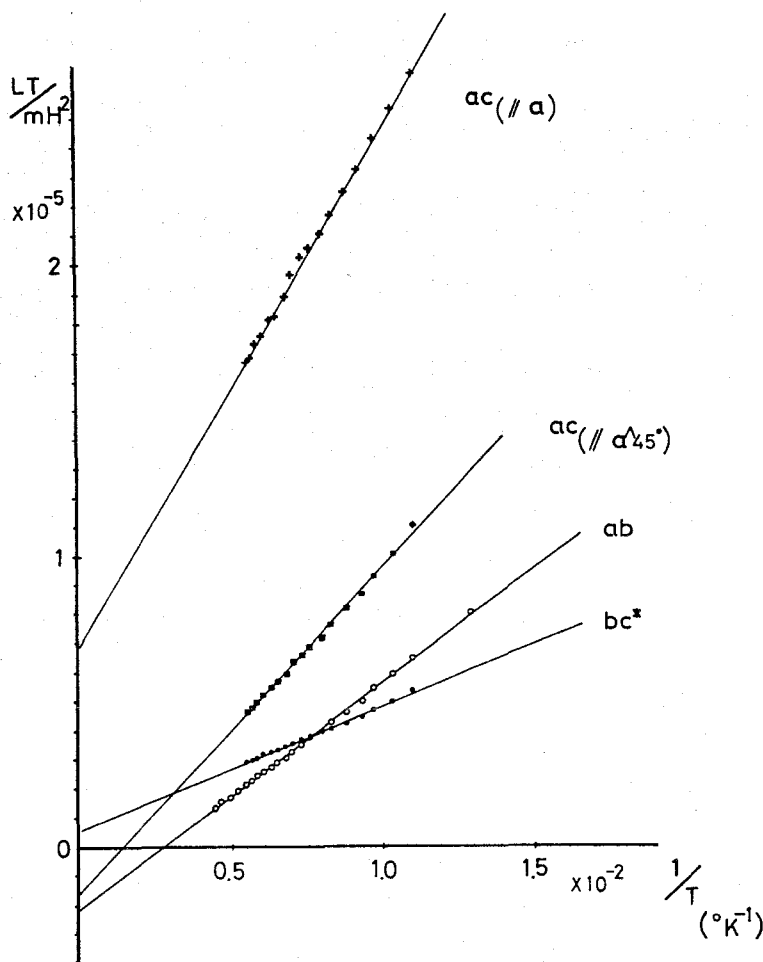


図-43

L·T — 1/T の関係
(77°K以上)

図-44 に 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 (H²) に比例しなくなる
事が よくわかる。

そこで、トルク L を
 $L = aH^2 - bH^4$ と (て
(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。

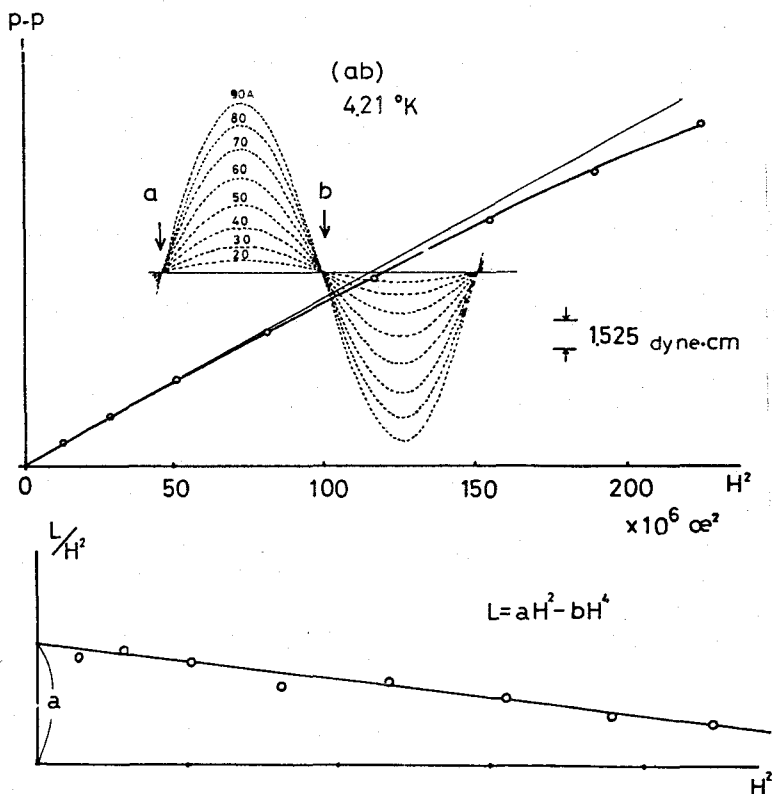


図-44 極低温でのトルク

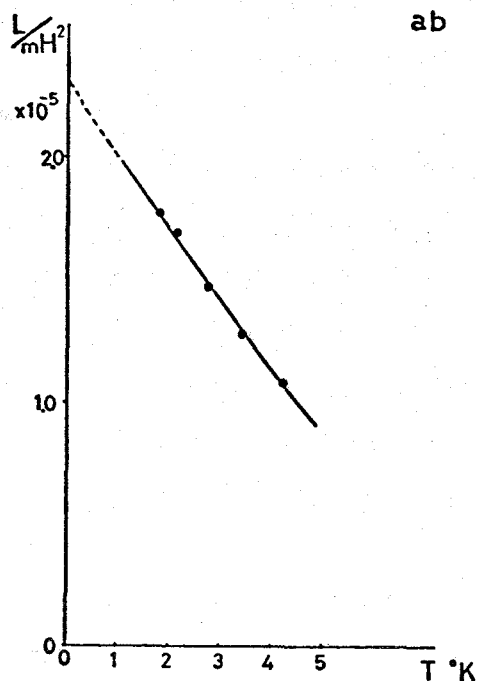


図-45 極低温でのトルクの温度変化 (ab面内)

液体ヘリウムを減圧して、測定温度を 4.2°K 以下にした。

ab面内での測定例を図-45に示す。c軸との切片より得られる値を、前述の解析に使用する。

ところで、ヒトテネシウム単結晶は、結晶b軸が対称軸になっている特殊事情より、(19)式の L^{ac} から明らかになる様に、a軸に平行に磁場がかかっているときのトルクの大きさ、及びそれから 45° だけずれた方向に磁場がかかっているときのトルクの大きさの二つの情報が一つの結晶面内の

測定より得られることになる。

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	$3.6 \sim 4.8 \text{ cm}^{-1}$
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、とんでもない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。この結晶面内の測定では、結晶が、a軸方向によく成長している為に、回転軸に平行に

a 軸がくるように結晶を試料ホルダーにてりつけ、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 ⁽⁷³⁾ が求めた結果、 $D = 5.3 \text{ cm}^{-1}$ と大きな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、 Λ 面に垂直であると仮定すれば、Perutz のヒト・テキシ 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、 Λ 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 Λ 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、式で表わすか、温度によって、トルクの位相が変わる事を示している。

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 でトルク零になる z 軸に磁石を固定して、温度を上昇させる実験を行った。温度を上昇させると、トルクがあらわれてきて、ある温度 (約 100°K) で、最大値をとり、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った。

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

や、 $g_x^2 \sum_i^4 (m_x^2 - l_x^2) + g_y^2 \sum_i^4 (m_y^2 - l_y^2)$ の値を代入して、トルクが零になるのは、結晶 a 軸から何度の $\gamma = 3$ を求めると 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、 ac 面内でトルク測定を行ったという一つの保証となる。

又、極低温領域において、磁石の4乗に比例する項から、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・デキシHb (Fe^{2+} : 高スピン) の EPR 測定

ヒト・デキシHb 単結晶のトルク測定より、 Fe^{2+} ・高スピン ($S=2$) 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・デキシHb の EPR の可能性を議論する。現在まで、 Fe^{2+} ・高スピンで 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、 Λ_4 蛋白質については、EPR は実測されていない。そこで、ヒト・デキシ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

ときは図-46 に示す様に、
既し、 $S_z = \pm 2$ のエネルギー準位が約 0.4 cm^{-1} 分離している
ことになる。

そこで、使用する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。

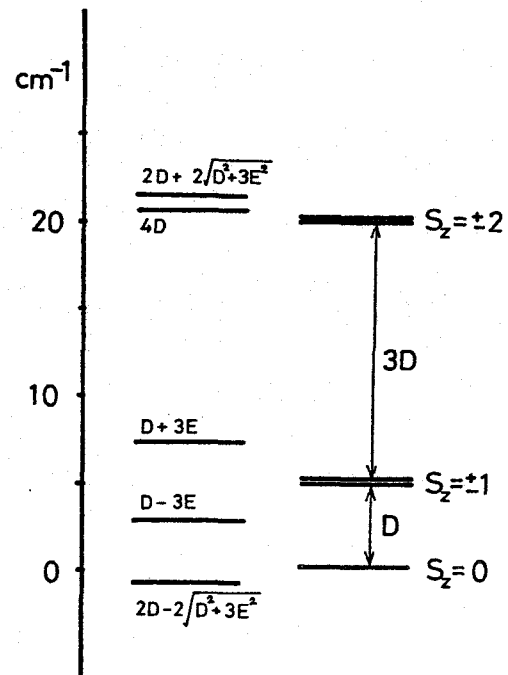
K-バンドを使った場合、約1800
ガウスで共鳴が起るはずであるが、
デキシHb, デキシMb については、

20 ~ 77°K では、EPR は観
測されなかった。もっとも、測

定周波数がK-バンド (0.8 cm^{-1})
であっても、 $D = 5.3 \text{ cm}^{-1}$ として、

$E > 1.2 \text{ cm}^{-1}$ 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る事も考えられる。



$$D = 5.3 \text{ cm}^{-1} \quad D = 5 \text{ cm}^{-1}$$

$$E = 0.9 \text{ cm}^{-1} \quad E = 0$$

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って
おれば、 $S_z = 0$ と $S_z = -1$ とのエネルギー準位間には有限
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 $40 \sim 50 \text{ k}$ ガウスで起るようになる。
そこで、超伝導磁石を使用して、高磁場での測定を試
みた。

磁場発生源としては、三菱電機 K.K. 製作のソリッド型
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、 TE_{011} 型を自作した。感度を向上させる為に、磁場変調は、100 kHz変調を使用した。

装置が正常に働いているか否か、及び磁場較正は、低磁場側では、酸化型Hb (Fe^{2+} -高スピン, $g=6.0$) や DPPH (標準試料, $g=2.003$) で、高磁場側 (~ 50 k Gauss) では、 Cr_2O_3 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 \sim 2.15°K (減圧He) の範囲で行ったが、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った。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、同じ試料管を使って、一酸化炭素Hb, 一酸化炭素Mb (反磁性に在る) の観測を行い、 Fe^{2+} 高スピンの起因するものではない事を確かめた。

Y. Alpert ⁽⁷⁹⁾ は、デオキシHbの磁化率の測定を行い、アロスリックエフェクターで2,3 DPG (2,3-diphospho glycerateの略) 又は、IHP (イノシトール六リン酸) 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、磁化率が異なることを報告している。それによると、脱塩Hbの有効ボーア磁子数 M_{eff} が、 $S=2$ に対するスピンだけ の値に近い (軌道角運動量の寄与が小さい)。したがって、Dの値も小さくなることを期待されるので、脱塩・デオキシHb溶液でEPRを測定したかシグナルは観測されなかった。

以上の測定結果から、(Fe^{2+} 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、シグナル観測を不可能にするという可能性は無視できないとしても。) デオキシHbのEPRは観測できない。

4-5 ヒトデオキシHb 及び Fe^{2+} ・高スピン・八配位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}) を使用した超伝導 EPR ($0 \sim 60 \text{ kG}$ くらい) では、ヒトデオキシHb の観測は成功しなかった。

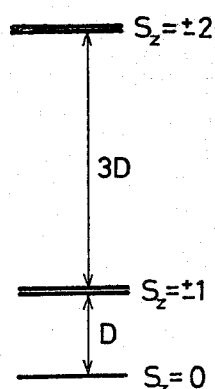


図-47 エネルギー準位
($E=0$ の場合)

さて、スピンハミルトニアンにおいて、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きさは、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に入る。

そこで、ラメラ格子型フーリエ分光装置により、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、これを逆変換することにより、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の分光器に比べ、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 比をあげる事が出来る。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発揮する。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 溶液で測定を試みた (4.2 K) が、現在使用している装置の感度では、スピン数が不足で、観測に成功

しなかった。(比較実験として、D値の判っている $Hb(Fe^{3+}) \cdot F^-$ でも観測に成功しなかった。)

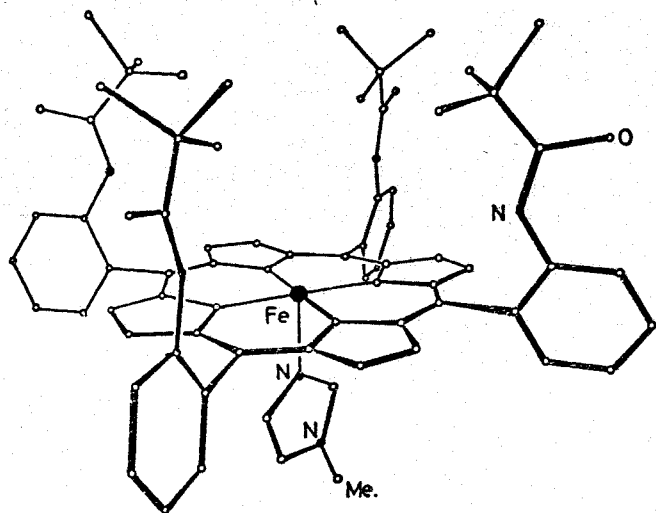


図-48
 $Fe(aaaa-TpivPP)(1-MeIm)$
 (ピケット・フェンス $\times 4$)

そこで、スピン数をかせぐためには、蛋白部分のない、 $\times 4$ 鉄だけ、しかも Fe^{2+} ・高スピンのモデル化合物が必要になる。

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

図-48に示すような、いわゆるピケット・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、

スピン数も充分にとれ、遠赤外測定の可能性もでてこようというものがあるが、遠赤外測定には通常 $100 \sim 200 \text{ mg}$ 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ぬ。

4-5-2 ピケット・フェンス $\times 4$ の合成⁽⁸¹⁾

まず、オルト・ニトロベンズアルデヒドとピロールを水酢酸中で環化するとにより、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。これを酸性条件下で $SnCl_2$ でニトロ基をアミノ基に還元するとにより、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ったものを ($\alpha\alpha\alpha\alpha$)、1つだけ逆向きのものを ($\alpha\alpha\alpha\beta$) 等と書くことにすれば、($\alpha\beta\alpha\beta$)、($\alpha\alpha\beta\beta$)、($\alpha\alpha\beta\alpha$)、($\alpha\alpha\alpha\alpha$)の異性体が1:2:4:1の統計的割合で存在するようになる。これらの異性体はシリカゲルカラム及び薄層クロマト (TLC) により簡単に分離する事が出来る。

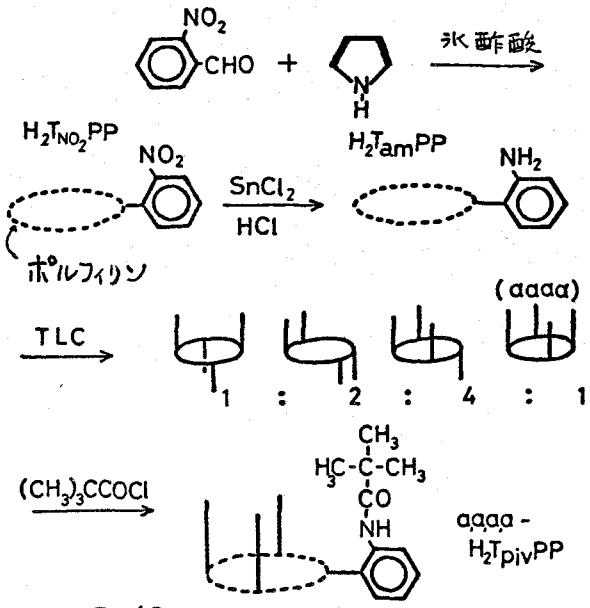


図-49 ピケット・フェンスポルフィリンの合成

(dddd) 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、(dddd)体の収量を増やし続ける事が出来る。

この(dddd)型 H₂TamPP に (CH₃)₃CCOCl を反応させて、メソ・テトラ-(dddd-オルト・pivalate) フェニル)ポルフィリン (dddd-H₂TpivPP と

略記する) が得られる。これがいわゆる ピケット・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。

このポルフィリンをテトラヒドロフラン (THF) 還元下で FeBr₂ 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 [Cr(acac)₂]₂ によって、2価鉄に還元できる。[Cr(acac)₂]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⁾ に従って、ピケット・フェンス・H₄の合成を行った。現在、Fe³⁺の還元が完全でなく、オキシ型 H₄の結晶化、更には、デキサ型 H₄の結晶化には成功していない。

デキサ型ピケット・フェンス・H₄の測定に成功していないが、ピケット・フェンス H₄の様に酸素分子を脱着する事は出来ないが、Fe²⁺ 高スピン H₄のモデル化合物として、Fe²⁺·TPP·2·MeIm·EtOH⁽⁸²⁾ 微結晶を合成し、遠赤外スペクトルを測定した。

図-50に測定結果を示す。8cm⁻¹付近に、わずかな吸収が認められる。試料が Fe²⁺ 化合物であることは、EPR測定(77K)により Fe³⁺のシグナルが認められない事、空气中にさらしておく、Fe³⁺のEPRシグナル (g=6) が現われてくる事より保証され

る。

そこで、遠赤外スペクトルのわずかな吸収が、 Fe^{2+} -高スピンによるものかどうかを調べる為に、試料を空気にさらした後、再び遠赤外測定を行い、

8 cm^{-1} 附近の吸収が消失かどうかを調べた。変化はどの程度なのか、わずかにあった。高圧下で円盤状にした試料を空気にさらした場合、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、現在のところ、この吸収が、 Fe^{2+} -高スピンによるものか、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して、 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。

4-6 結語

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

その為に、ヒト・デオキシHb 単結晶のトルク測定を液体窒素温度 (77 K) 以上、 4 K 液体ヘリウム温度 (4.2 K) 以下で精密に行い、 $g_z = 2.0$ と仮定しながらも、直接零磁場分離定数 D を求められる事が判った。

その結果、 D の値は 5 cm^{-1} 前後であること、この結果は、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に一致し、それが h_4 面に垂直であると仮定すれば、 X 線結晶

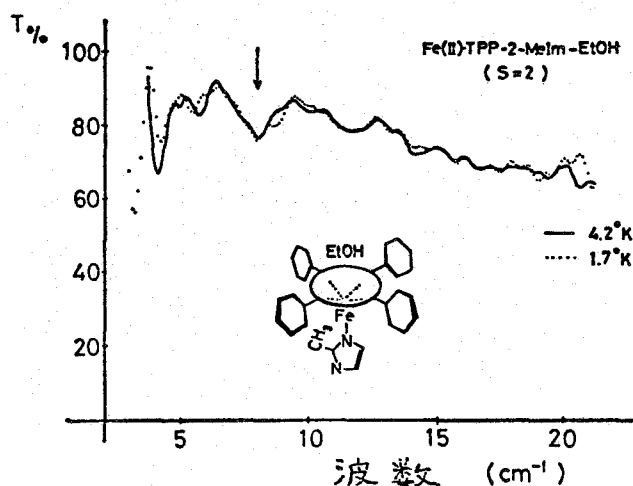


図-50 Fe^{2+} -高スピン・ h_4 の遠赤外スペクトル

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

又、 $D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ として、 g_z の方向が Λ_4 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 を求めると、各結晶面での計算の結果は $g_z = 2.2 \sim 2.5$ となった。

したがって、 $g_z = 2$ と仮定する事、あるいは、 g_z の方向が Λ_4 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はいない事が判った。

$D \sim 5 \text{ cm}^{-1}$ とすると、ヒト・デネキシ・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測定を行ったが、観測できなかった。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った。

以上、四章にわたって、常磁性共鳴を手段として、Hbを中心とする Λ_4 蛋白質の構造と機能の関係を、 Λ_4 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 Λ_4 鉄についてのEPRの観測に成功してはいないので、EPRの可能なコバルト置換の Λ_4 蛋白質、あるいはスピンラベル法によって Λ_4 蛋白質の構造と機能を知らうとする努力が重ねられている。

Fe^{2+} -高スピンの Λ_4 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+} Λ_4 鉄のEPR、その他の物理化学的測定は“けり”は得られなかった新しい研究手段と情報、結果とをもたうすである。

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
長の示唆等、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測定に関し、研究条件について色々の配慮を
して下さい、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、遠赤外測定に関し、快よ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、種々のハムの合成について助言、協力して下さい、
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・Hb、NO-Hb、HbMの実験において、全面
的に協力して下さい、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 comunication)
- 6) J.F.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.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.Beetlestone & 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. Wootton,
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. Beetlestone, 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) I. 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,
Biophys.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.Albert, R.Banerjee & J.Denis,
Nature(N.B.), 243, 80(1973)
- 80) 阪井清美 et al.,
応用物理, 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)