

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの研究 : Ni(II)プロトボルフィリンIXをデオキシヘムのモデルとして用いたヘモグロビンの酸素結合における中間状態の研究 |
| Author(s)    | 柴山, 修哉   |
| Citation     |  |
| Issue Date   |  |
| Text Version | ETD  |
| URL          | <a href="http://hdl.handle.net/11094/2853">http://hdl.handle.net/11094/2853</a>      |
| DOI          |  |
| rights       |  |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 柴 山 修 哉   |
| 学位の種類   | 工 学 博 士   |
| 学位記番号   | 第 8 2 9 4 号   |
| 学位授与の日付 | 昭 和 63 年 6 月 16 日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 2 項該当  |
| 学位論文題目  | Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの研究<br>「Ni(II)プロトボルフィリンIXをデオキシヘムのモデルとして用いた<br>ヘモグロビンの酸素結合における中間状態の研究」 |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教 授 葛西 道生<br>(副査)<br>教 授 三井 利夫 教 授 柳田 敏雄 教 授 堀尾 武一<br>助教授 森本 英樹                     |

### 論 文 内 容 の 要 旨

ヘモグロビン (Hb) は、最もよく研究されているアロステリックタンパク質の一つであるが、その機能調節の仕組みについてはまだ解っていないことが多い。現在のところ、Hbの機能である協同性と構造変化との関係を記述する場合、2状態モデルを用いるのが最も一般的な方法となっている。2状態モデルは酸素結合に伴う構造変化がHb分子内で一斉に起こることを予想する。このことの当否をはっきりさせるためには、通常の平衡溶液中に低濃度でしか存在しない酸素結合における中間状態分子(酸素分子が1個、2個、あるいは3個結合したHb)の構造と機能を調べるのが重要である。そこで、本研究では、Hbの $\alpha$ 、あるいは $\beta$ サブユニットいずれか一方のヘムを酸素と結合しないNi(II)プロトボルフィリンIX(Ni-PP)で置き換えた混成Hbを調製し、中間状態分子をモデルで表現してみた。今回行った色々な測定から、Hb中にあるNi-PPがHbの酸素結合機能やHbの構造に与える影響は、通常のデオキシヘムと非常に似ていることが解った。したがって、Fe(II)を含むサブユニットに酸素あるいは、一酸化炭素の結合したNi(II)-Fe(II)混成Hbは、酸素結合における中間状態のモデルとして意味を持つことになる。

Ni(II)-Fe(II)混成Hbで表現した中間状態が2状態モデルの予想と合うか否か、色々な測定法から検討してみた。その結果は、(1)Fe(II)を含むサブユニットの酸素結合に協同性は見られないのに( $n=1$ )、Hbのサブユニット界面では大きな変化が起きている場合があること、(2)1個の $\beta$ (Fe)サブユニットへの酸素結合はもう1個の $\beta$ (Fe)サブユニットの酸素親和性を変化させないが、 $\alpha$ サブユニットのボルフィリン近傍には大きな構造変化を起こしている場合があること、(3)ヘムと近位ヒスチジンの結合の強さと、そのヘムの酸素親和性との関係は2状態モデルで記述できないこと、等の2状態モデル

との具体的なズレが見つかった。これらの結果は、Hb中の個々の部位間の相互作用が、2状態モデルの要求する程大きくないことを示唆している。

### 論文の審査結果の要旨

この論文は、ヘモグロビンの4つのヘムのうち、2つを $\text{Ni}^{2+}$ プロトポルフィリンでおきかえたハイブリッドヘモグロビンを使って、アロステリック効果の研究をしたものである。アロステリックタンパク質分子は、構造変化を通して、複数の活性部位間の相互作用をもち、環境の変化に対応して、機能を調節している。ヘモグロビンは、ヘムへの $\text{O}_2$ の結合が協同的であり、いくつかのエフェクターが、 $\text{O}_2$ の結合を阻害する性質があり、最も研究の進んだアロステリック蛋白質である。ヘモグロビンでアロステリック効果の機構を解明するには、 $\text{O}_2$ の4つ結合する過程の中間段階のヘモグロビン分子が、相対的に不安定であることを示さねばならない。しかし、中間段階の分子が不安定であるそのことのため、通常の試料では、中間段階の分子は、混合物としてしか得られない上、存在比が低い。そこで、均一な中間状態を、モデルで実現しようというのが1つの重要な方法となる。その目的のため、 $\text{O}_2$ の結合していないヘムであるデオキシヘムの状態を凍結したモデルヘムが必要となる。この論文では、まず、ハイブリッドヘモグロビンの $\text{O}_2$ とCOの結合解離を平衡とカイネティックスの面から、また、その構造と光吸収、共鳴ラマン、NMR等に表示される性質から詳しく調べ、それらを通常のデオキシヘモグロビンと比較することにより、 $\text{Ni}^{2+}$ プロトポルフィリンが、デオキシヘムの非常によいモデルであることを示した。次に中間段階のモデルとなっているハイブリッドヘモグロビンの2つのヘムに $\text{O}_2$ やCOの結合した状態に注目して、これの示す状態が、ヘモグロビンのアロステリック効果のモデルとして広く受け入れられている2状態モデルでは表現できないような状態であることを示した。

$\text{Ni}^{2+}$ プロトポルフィリンはよく検討された初めてのデオキシヘムのモデルであり、今後のヘモグロビンの研究に重要な手段を提供したこと、 $\text{Ni}^{2+}$ プロトポルフィリンを使った中間段階のモデルから2状態モデルに大きな疑問を投げかけたことにより、この論文は、博士論文として価値あるものと認める。