The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの研究 : Ni(II)プロトポルフィリン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	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2853
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの研究

「 Ni(II) プロトポルフィリン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 」

大阪大学基礎工学研究科　　博士論文

柴山　修哉

目次

ページ

はじめに　. 1

第１章　序論

ヘモグロビンの機能

（i）ホモトロピック効果　. 3

（ii）ヘテロトロピック効果　. 8

ヘモグロビンの構造

（i）X 線結晶解析からわかる結晶構造の概略　. 10

（ii）ヘムとその周辺の構造　. 12

（iii）リガンド結合に伴う構造変化の道筋と

サブユニット界面の変化　. 13

（iv）アロステリックエフェクターの結合部位　. 18

ヘモグロビンの性質を説明するための

アロステリックモデル　. 19

（i）２状態一斉転移モデル（MWCモデル）　. 19

（ii）逐次モデル（KNFモデル）　. 21

金属置換混成ヘモグロビン　. 22

（i）シアノメト混成ヘモグロビン　. 23

（ii）Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン　. 24

（iii）Mn(II)-Fe(II) と Mn(III)-Fe(II)

混成ヘモグロビン　. 25

(iv) Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン 26
(v) その他 27

第２章　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線と光吸収スペクトル

概要 29

序論 30

実験方法
Ni-PP の調製 31
ヘモグロビンとその単離鎖の調製 32
Ni(II)置換単離鎖ヘモグロビンの調製 33
Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと
Ni(II)ヘモグロビンの調製 33
酸素平衡曲線の測定 34
吸収スペクトルの測定と吸収係数の決定 34

結果 35

考察 43

第３章　αあるいはβヘムの分光学的パラメーターとその酸素親和性との関係

概要 47

序論 48

実験方法

化学修飾された Ni(II)-Fe(II) 混成
ヘモグロビンの調製 49
酸素平衡曲線の測定 50
共鳴ラマンスペクトルの測定 50
光吸収スペクトルの測定 50

結果

酸素平衡機能. 51
Fe-Nε伸縮振動の共鳴ラマン線 53
化学修飾されたα_2(Ni)β_2(Fe)
の光吸収スペクトル 57

考察 59

第４章　プロトン核磁気共鳴法による Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの研究

概要 63

序論 64

実験方法 68

結果

水素結合プロトン 70
光吸収スペクトル 74
常磁性シフトを受けたプロトンシグナル 75
リングカレントシフトを受けたプロトンシグナル . . 78

考察

Ni(II)ヘモグロビンの特徴 82

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中 Ni-PP の
配位数とスピン状態の関係 82

リングカレントシフト領域のスペクトルの解釈 . . . 83

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの構造変化 86

付録

温度変化の実験 90

11 ppm のプロトンシグナルの起源 93

Fe(II) にリガンドが結合した Ni(II)-Fe(II)
混成ヘモグロビンの X 線結晶解析 96

第５章 Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合の速度論的解析

概要 98

序論 99

実験方法

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合
過程の速度論的解析 104

酸素平衡曲線 105

光吸収スペクトルの濃度変化 105

結果と考察

CO 再結合の速度論的解析（１）
「４量体２量体平衡について」 106

CO 再結合の速度論的解析（２）
「部分光解離の実験」 110
酸素平衡曲線のヘモグロビン濃度依存性 113
Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの光吸収
スペクトルの濃度依存性 116
結論 118

第６章 Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合の速度論的解析

概要 120

序論 121

実験方法 122

結果と考察 123
酸素結合による Ni(II)-Fe(II) 混成
ヘモグロビンの構造変化 125
酸素の結合速度定数と解離速度定数 127

第７章 まとめ 132

謝辞 141

参考文献 142

はじめに

ヘモグロビンは、呼吸ガスの運搬を担うアロステリックタンパクで赤血球中に存在する。 ヒト成人のヘモグロビン（HbA）は、２本のα鎖と２本のβ鎖からなる４量体で　それぞれのポリペプチドは直接の酸素結合部位であるヘムを１個ずつ巻き込んでいる。 したがって、ヘモグロビンは合計４個の酸素分子と可逆的に結合できるわけであるが、その４段階酸素結合過程は一様ではなくて　初めの方の酸素結合がヘモグロビンの構造変化を引き起こし最後の方の酸素結合を著しく促進する現象がみられる。これがヘモグロビンの協同効果である。

こういった協同的酸素結合の仕組みを研究するには、いろいろな酸素結合状態にあるヘモグロビンの構造と機能の関係を調べなければならない。しかしながらその中で、酸素が１個も結合していないデオキシヘモグロビンと酸素が４個結合したオキシヘモグロビンの構造と機能に関するデーターは莫大な蓄積を見るが[(1)-(4)]、酸素が１個、２個、あるいは３個結合したような酸素結合における中間状態についての知見はほとんど得られていないのが現状である。これは強い協同効果のため酸素結合の中間状態が不安定となり、平衡溶液中では低濃度しか存在しないことが研究の大きな障害となっているからである。

そういった状況下で現在までのところ２状態モデル[(5)]がヘモグロビンの協同効果と構造変化の関係を記述するもっとも有力な手段とされてきた。２状態モデルは、デオキシヘモグロビン型の４次構造をした酸素親和性の低い状態（T 状態）とオキシヘモグロビン型の４次構造をした酸素親和性の高い状態（R 状態）とを仮定し 各々の状態の中では１個目から４個目までの酸素が同じ親和性で結合するとする。そして、それら２状態の平衡からヘモグロビンの持ついろいろな性質を説明しようというモデルである。さて実際、２状態モデルはヘモグロビンの持つ性質を定性的にはよく説明するが定量的なデーターとなるとうまく説明できないものが多い。そこで、パラメーターの数を増やしたりオリジナルのモデルにはない自由度を取り入れたりして様々な修正が試みられているが［例えば、Minton と Imai の３状態モデル[(6)]等］、実際のところ２状態モデルのどこが悪いのかはっきりつかめていないため、ヘモグロビンの性質の統一的な理解につながっていな

いものがほとんどである。そこで、今までに得られてきたヘモグロビンの様々な物理量に関する２状態モデルからのズレをいま一度、統一的に見直してみる必要がある。

酸素結合における中間状態のモデルとして金属置換した混成ヘモグロビンを用いる方法がある[7]-[10]。この様な方法で用いられる金属プロトポルフィリンは、ヘモグロビン中でちょうど酸素の結合したオキシヘムの様に振舞うか、あるいは酸素の結合していないデオキシヘムの様に振舞うかのいずれかでなければモデルとしての良さは失われる。現在までのところオキシヘムのモデルとしては、一般に Fe(III)CN を中心金属として持つヘムが用いられてきた[7][11]-[14]。しかし、デオキシヘムのモデルを使った研究はまだ着手されてから日が浅く、ヘモグロビンの構造と機能を関係づけるデーターとしてはまだまだ不完全なものが多い。この研究でとりあげる Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは比較的多くの測定手段から、そのモデルとしての妥当性が検討されている金属置換混成ヘモグロビンである[15]-[17]。

この論文は、全部で７つの章から構成されている。第１章では、序論としてヘモグロビンの機能と構造について概説し、第２章で Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製方法とこれら混成ヘモグロビンの酸素平衡機能、及び、光吸収スペクトルの特徴について述べる。 第３章では、化学修飾法により酸素親和性をいろいろ変えた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを用いた実験、特に、ヘムに関する測定量とそのヘムの酸素親和性の関係についてαサブユニット、βサブユニット別々に分けて調べたので、その結果を述べる。第４章では、プロトン核磁気共鳴で見た混成ヘモグロビンの構造から、ヘモグロビンのリガンド結合に伴う構造変化の起こり方について考えてみる。第５章では、混成ヘモグロビンの CO 再結合の速度論的解析と４量体２量体平衡について議論する。そして第６章で、混成ヘモグロビンのレーザーフォトリシスによる酸素再結合の速度論的解析からデオキシヘモグロビン中αサブユニットとβサブユニットの違いを検討し、最後に第７章でこの論文のまとめを行う。

第１章　序論

ヘモグロビンの機能

（i）ホモトロピック効果

ヘモグロビンは、酸素運搬機能を持つタンパク質で、比較的酸素分圧の高い肺で酸素と結合し、比較的酸素分圧の低い状態にある組織でその酸素を離す。 ヘモグロビンとミオグロビンの酸素結合能の違いを図１に示した。横軸は酸素分圧、縦軸は酸素の結合したヘムの割合でプロットしてある。図１から解るように、ヘモグロビンの酸素平衡曲線はシグモイド型で、ミオグロビンのそれは直角双曲線型となっている。

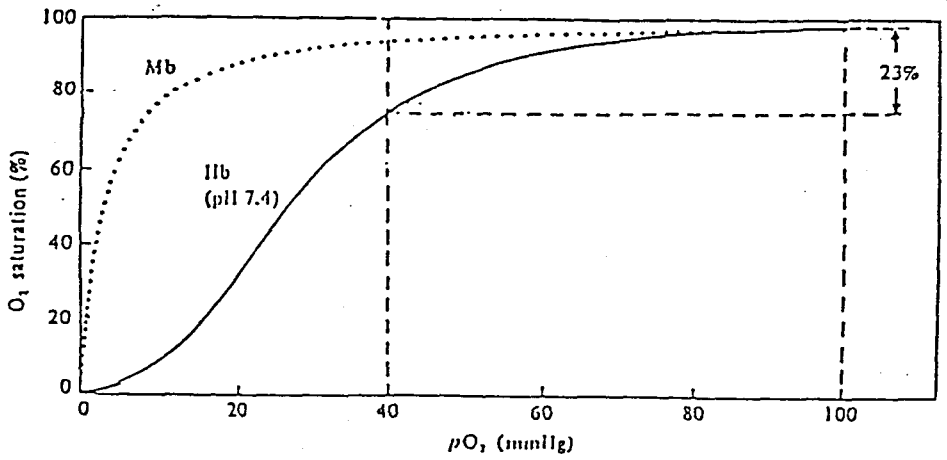


図１　生理条件下にあるヘモグロビンとミオグロビンの酸素結合能の違い

実線はヘモグロビンの酸素平衡曲線、点線はミオグロビンの酸素平衡曲線を表す。 pO_2 は酸素分圧を mmHg（1 mmHg = 133.3 Pa）で表したもの。

このシグモイド型の酸素平衡曲線はヘモグロビンの協同効果によるものである。さて、次にこの協同効果の生理的意味について考えてみる。肺の静脈血の酸素分圧は約１００ mmHg、そして組織の静脈血の酸素分圧は安静時で約４０ mmHgと言われている。したがって、図１から解る様に、ヘモグロビンは全結合能の約２３％に及ぶ酸素を組織で離すことが出来る。一方、もしミオグロビンが同様な条件で酸素運搬を行う場合を考えると、全結合能のうち、わずか２％余りの酸素しか組織で離すことは出来ない。しかし、ミオグロビンは組織中においてヘモグロビンの離した酸素と速やかに結合することが可能である。こういった酸素結合特性の違いは、ヘモグロビンとミオグロビンの生理的役割の違いによって説明することが出来る。つまり、ヘモグロビンは酸素運搬、ミオグロビンは酸素貯蔵を担うのに有利にできている。

Adair 解析

ヘモグロビンの４段階酸素結合過程は、次のような一連の反応式で表現される。

$$Hb + 4O_2 \overset{K_1}{\rightleftharpoons} Hb(O_2) + 3O_2 \overset{K_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_2 + 2O_2 \overset{K_3}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_3 + O_2 \overset{K_4}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_4$$

ここで定義される４個の平衡定数を Adair定数[18]と言う。そして、これら４個の平衡定数を用いれば、４量体ヘモグロビン（２量体、あるいは、単量体への解離のない系）の４段階酸素結合過程を完全に表現することが可能である。今、酸素分圧が p で、i 個目の酸素が結合する時の平衡定数は、

$$K_i = [i/4-(i-1)][Hb(O_2)_i]/[Hb(O_2)_{i-1}]p \qquad (i = 1,2,3, \text{ or } 4)$$

と表される。ここで、係数になっている [i/4-(i-1)] は、ヘモグロビン中にヘムが４個あるので i 段階目の酸素解離のしかたに i 通り、そして、酸素結合のしかたに 4-(i-1) 通りあることに対する補正である。以下、これらの Adair 定数

を用いて、ヘモグロビンの性質に関連した基本的な量をいくつか定義することにする。

ヘモグロビンの酸素飽和度 Y は、酸素分圧 p の関数として次のように書くことができる。

$$Y(p) = \frac{[Hb(O_2)] + 2[Hb(O_2)] + 3[Hb(O_2)_3] + 4[Hb(O_2)_4]}{4\{[Hb] + [Hb(O_2)] + [Hb(O_2)_2] + [Hb(O_2)_3] + [Hb(O_2)_4]\}}$$

$$= \frac{K_1 p + 3K_1K_2p^2 + 3K_1K_2K_3p^3 + K_1K_2K_3K_4p^4}{1 + 4K_1p + 6K_1K_2p^2 + 4K_1K_2K_3p^3 + K_1K_2K_3K_4p^4}$$

さて、４段階ある酸素結合全体の酸素親和性を表す尺度として $Y(p) = 0.5$ の時の酸素分圧 P_{50} がよく用いられる。また、４つ酸素の結合したオキシヘモグロビンと酸素と結合していないデオキシヘモグロビンの濃度が等しくなるような酸素分圧 P_m （メジアン酸素分圧）で表す場合もしばしばある。今、酸素分圧が p の時

$$K_1K_2K_3K_4 = \frac{[Hb(O_2)_4]}{[Hb]p^4}$$

なる関係があるので、$p = P_m$ ならば上式の右辺は $1/P_m{}^4$ となり、結局

$$P_m = (K_1K_2K_3K_4)^{-1/4}$$

と書ける。また、それぞれの酸素結合段階で変化する自由エネルギーは

$$\Delta F_i = -RT\ln K_i \qquad (i = 1,2,3, \text{ or } 4)$$

と表されるので、その平均 $\overline{\Delta F}$ は上で述べたメジアン酸素分圧をもちいて簡単に書くことができて

$$\overline{\Delta F} = 1/4\sum_{i=1}^{4}(-RT\ln K_i) = RT\ln(K_1K_2K_3K_4)^{-1/4} = RT\ln P_m$$

となる。したがって、自由エネルギーとの関係を議論する場合メジアン酸素分圧を用いると便利である。

ヒルプロット (Hill plot)

ヘモグロビンの酸素平衡曲線を表現するもっとも一般的な方法としてヒルプロットがよく用いられる。これは、酸素の結合しているヘムと酸素の結合していないヘムの比の対数を酸素分圧の対数でプロットするやり方である［即ち、logp と log(Y/1-Y) のプロット］。先に、述べた酸素飽和度の式を用いると、

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{K_1p + 3K_1K_2p^2 + 3K_1K_2K_3p^3 + K_1K_2K_3K_4p^4}{1 + 3K_1p + 3K_1K_2p^2 + K_1K_2K_3p^3}$$

したがって、非常に小さな p の時

$$\frac{Y}{1-Y} \rightarrow K_1p \quad \text{よって} \quad \log\frac{Y}{1-Y} \rightarrow \log K_1 + \log p$$

同様に、非常に大きな p の時

$$\frac{Y}{1-Y} \rightarrow K_4 p \quad よって \quad \log \frac{Y}{1-Y} \rightarrow \log K_4 + \log p$$

ここで、$\log K_1$ と $\log K_4$ は定数なので、 ヒルプロットは、傾き１で切片がそれぞれ $\log K_1$ と $\log K_4$ の２本の漸近線から成ることがわかる。一般に、ヒルプロットを特徴づける簡便なパラメーターとしてヒル定数 n_{max} と前述の P_{50} がよく用いられる。ヒルプロットの場合、P_{50} は logp 軸上の切片から求まり、n_{max} はグラフの最大勾配、即ち

$$n = \frac{d \log(Y/1-Y)}{d \log p}$$

の最大値から求まる。もしヘモグロビンにヘム間相互作用がないと仮定すると、$K_1 = K_2 = K_3 = K_4$ なので、酸素平衡曲線のヒルプロットは傾き１の直線となる。しかし、生理条件下にある通常のヘモグロビンの酸素平衡曲線のヒルプロットは図２に示した様な形になっており、n_{max} は約３で、強いヘム間相互作用が有ることが解る。

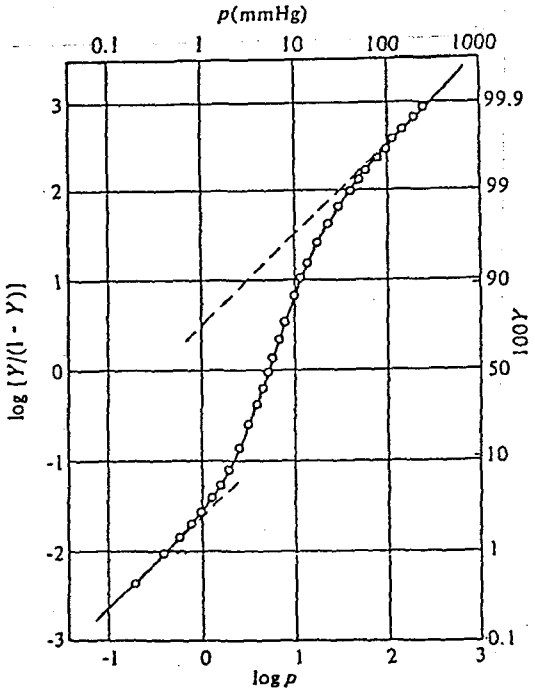


図２　ヒト成人ヘモグロビンの酸素平衡曲線のヒルプロット[19]

0.1 M Cl を含む pH 7.4 の 50 mM Bistris/HCl 緩衝液中、２５℃での測定。ただし、ヘモグロビンの濃度は 600 μM（ヘム当り）。破線で示したのは、下方と上方の漸近線である。

（ii）ヘテロトロッピック効果

ボーア効果

ヘモグロビンの酸素親和性が、溶液中の CO_2 濃度によって影響を受けることは今世紀の初頭から既に知られていた[20]。その後の研究から、この現象は主として pH 減少に伴う酸素親和性の低下であることがわかってきた。ここで、赤血球中には炭酸脱水素酵素があり、次の様な平衡系の触媒として働いている。

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

こうやって生じたプロトンがヘモグロビンに作用して、ヘモグロビンの酸素親和性を下げ、活動の盛んな組織で酸素の放出を促すことになる。この様なプロトンの効果をボーア効果と呼ぶ。また逆に、ヘモグロビンには CO_2 を直接運搬する機能もあり、CO_2 はヘモグロビンの４個のサブユニットの N 末端にカルバミノ化合物を形成して組織から肺へと運ばれる。

ボーア効果を定量的に考える上で、次に書くような Wyman[21]の連関方程式を使うと分かりやすい。

$$(\partial H^+/\partial \log p)_{pH} = (\partial Y/\partial pH)_Y \quad \text{あるいは} \quad (\partial H^+/\partial Y)_{pH} = (\partial \log p/\partial pH)_Y$$

ここで、H^+ はサブユニット当りの結合するプロトンの個数、Y は酸素飽和度である。 したがって、ヘモグロビンの酸素結合に伴うプロトン放出量の平均 ΔH^+ は（４段階酸素結合の平均という意味）

$$\Delta H^+ = d \log P_m / d\, pH$$

と表すことができる。したがって、酸素平衡曲線の pH 依存性からこの値は比較的容易に求めることができる。実際、0.1 M Cl 存在下、pH 7.4、２５℃の標準的な測定条件でデオキシヘモグロビンに酸素が結合する場合、酸素１個当り約 0.6 個のプロトンが放出されることが知られている[19]。

有機リン酸効果

ヘモグロビンの酸素親和性を調節する重要なアロステリックエフェクターの一つにDPG (2,3,-diphosphoglycerate) がある。DPG は、赤血球内に存在する有機リン酸で、デオキシヘモグロビンにのみ結合し、酸素親和性の低いデオキシ構造を安定化させる働きがある[22]-[24]。 DPG より強いエフェクターとして IHP (inositol hexaphosphate) がある[24]。IHP は、赤血球内には存在しないが、有機リン酸効果を見る実験やデオキシ構造を安定化させる目的で非常によく用いられる試薬である。また、一般に陰イオンは、デオキシ型構造を安定化させる働きがあることが知られている。

ヘモグロビンの構造

（i）X 線結晶解析からわかる結晶構造の概略[1][25]-[28]

ヘモグロビンは、２本のα鎖と２本のβ鎖から成る４量体で、分子量約６４５００の球状タンパクである。α鎖は１４１個の、またβ鎖は１４６個のアミノ酸から成り、それぞれのサブユニットはヘムを１個ずつ巻き込んでいる。β鎖は、合計８部分のαヘリックス構造を持ち、その他の部分は非ヘリックス構造をとる。これらのヘリックス部分は、N 末端から順に A, B, C, ..., H と名づけられ、それらの間にある非ヘリックス部分は NA, AB, BC, ..., HC と命名される。α鎖のヘリックス構造も、D ヘリックスの大部分を欠如している点を除けばβ鎖のそれと同じである。それぞれのサブユニットは非ヘリックス部分を屈曲点として非常によく似た折りたたみ構造をとる。また、この折りたたみ構造は、１５３個のアミノ酸から成る単量体のミオグロビンにも共通である。

さて、２本のα鎖と２本のβ鎖は、それぞれ正四面体の頂点に位置するよう配列し、１個の球状分子を形成する（図３参照）。そして、ヘモグロビン分子中には１つのα鎖をもう１つのα鎖に、そして１つのβ鎖をもう１つのβ鎖に移すような２回転対称軸が存在する。

同種のサブユニットを区別するため、４個のサブユニットには普通、図３に示すような添え字が付けられる。αサブユニットとβサブユニットとの接触には２通りあり、α1β1（α2β2)型の接触と、α1β2（α2β1)型の接触が考えられる。ヘモグロビンが酸素親和性の高い構造から酸素親和性の低い構造へと変わる時、前者の接触に目だった変化はないが、後者の接触に顕著な変化が起こり、結果として２量体α1β1と２量体α2β2との相対的位置関係が変わる（図３参照）。

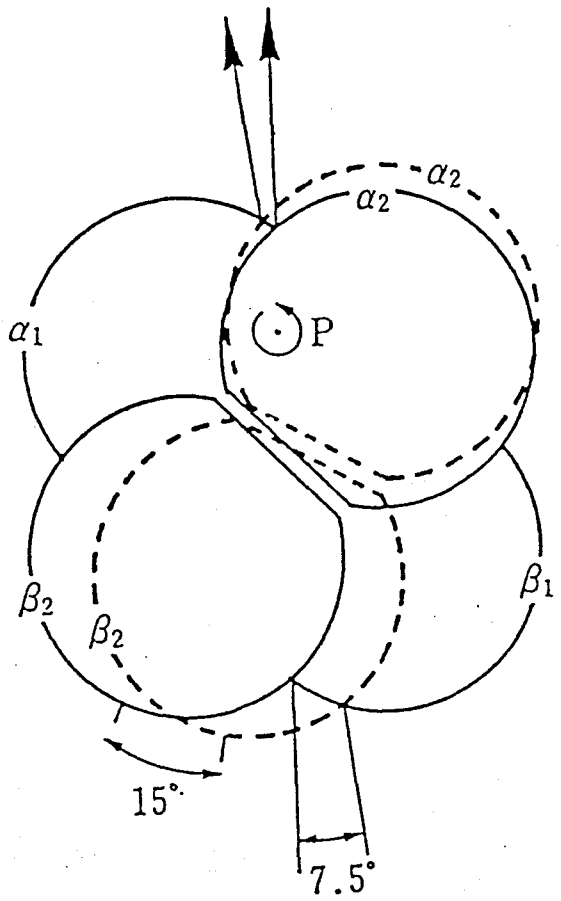


図３　CO 結合に伴うヘモグロビンの４次構造変化[25]

実線で示したのが、デオキシヘモグロビンのサブユニット配置。CO が結合した時のヘモグロビンは、α1β1サブユニットをデオキシヘモグロビンの場合と重ねて、α2β2サブユニットを破線で描いた。ヘモグロビンに CO が４個結合すると、α2β2 ２量体は、２回回転対称軸に直交する軸 P の回りに約１５°回転し、更に、この軸に沿って紙面の奥へ約 0.8 A 移動し２個の２量体は近づくことになる。

（ii）ヘムとその周辺の構造

ヘモグロビンやミオグロビンに含まれるヘムは、図４に示すような鉄プロトポルフィリンIXである。ヘム鉄はポルフィリン環の４個の窒素原子と配位結合している。さらに、このヘムはヘモグロビン中で、それぞれのサブユニットの F ヘリックス８番目に位置するヒスチジン（近位ヒスチジン）のイミダゾール窒素原子（Nε）と配位結合しグロビン部分につなぎ止められ、ちょうどそのヒスチジン窒素のトランスの位置にあたる鉄第６配位座に酸素が脱着する仕組みになっている。また、ヘムはタンパク内で疎水性アミノ酸残基に取り囲まれていて、いくつかの残基と水素結合あるいはファンデアワールス接触がみられる。そして、親水性のプロピオン酸は溶液側に飛び出してエネルギー的に安定な状態でヘムポケットに収まっている。

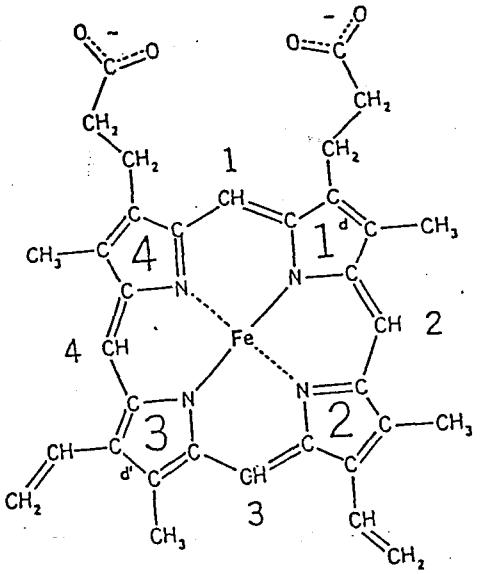


図４　ヘム（鉄プロトポルフィリン IX）の図

ヘモグロビン中では中心金属の Fe に、紙面の下側から近位ヒスチジンが配位し、紙面の上側から酸素が可逆的に脱着する。

ヘムが、生体内で活性中心として用いられるのは、それがとりうる電子状態の多様性によるところが大きい。デオキシヘモグロビン中のヘムは、高スピン型電子配置をしていて６個の 3d 電子のうちの２個が、dγ 軌道（dz^2 と dx^2-y^2）を占めている。これらの電子の存在は、配位している窒素原子の電子対を押し退けることになり、この結果、鉄原子はポルフィリン面から近位ヒスチジン側の軸方向に少し飛び出した状態となる（図５参照）。

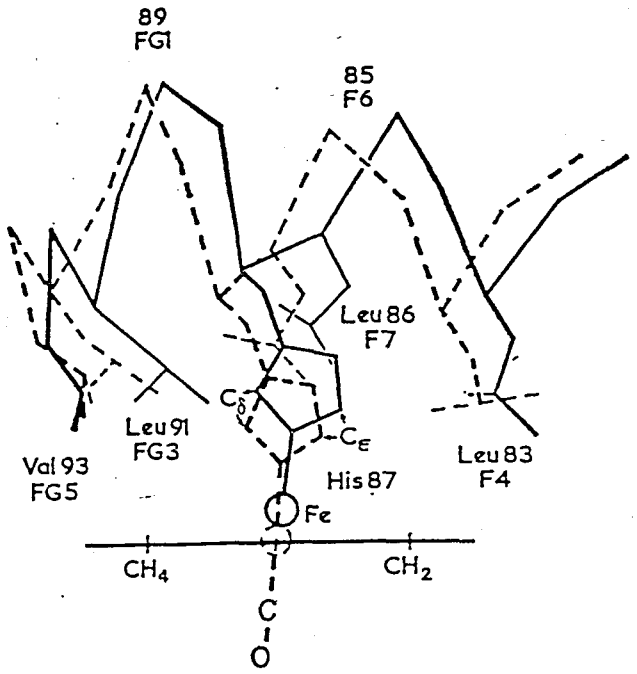


図５　デオキシヘモグロビンと CO の結合したヘモグロビンのαヘム近傍の違いを描いた図[25]

太い線はデオキシヘモグロビン、細い線は CO の結合したヘモグロビンを表す。（注１）ヘム面は、鉄の変位に合わせて少し変形することが知られているが、ここでは、ヘム面の変形を書いていない。

次に、酸素あるいは一酸化炭素が結合したヘムを考えてみる。この場合、鉄は6配位となり配位子場の対称性が上がり、その結果、鉄の6個の 3d 電子が全て dε 軌道（dxy と dyz と dzx）に入った低スピン状態となる。また、dε 軌道は、配位子の電子分布と比較的重なりが少ないので、鉄の有効原子半径は先に述べた高スピンの場合より減少し、鉄はポルフィリン面内に収まった格好となる。

最近発表された高分解能の回折データーは[28]、αサブユニット中のヘムとβサブユニット中のヘムの微妙な違いについて述べているので、以下、その違いについて概説することにする。まず、デオキシヘモグロビンの場合、ヘム鉄はポルフィリンの平均平面から、αサブユニットで 0.58 A、βサブユニットで 0.50 A 近位ヒスチジン側に飛び出している。一方、鉄とピロール窒素との距離は両サブユニットでほぼ同じとされているので、αサブユニットのヘムの方が、βのヘムよりドーム型に反り曲がる傾向が少し強いと言えるであろう。また、鉄と近位ヒスチジン窒素との距離は、αサブユニットの方がβサブユニットのそれより少し長くなっていて、近位ヒスチジンのイミダゾール基のヘム面に対する傾きもαサブユニットの方がわずかに大きくなっている。

さて次に、鉄に酸素が結合した場合を考える。鉄は酸素結合されたことによりポルフィリン平面内に引き込まれ、鉄のポルフィリン平均平面からの距離はαサブユニットで 0.16 A、βサブユニットで 0.00 A となりヘムは、ほぼ平面型の構造になる。またこの時、ヒスチジンイミダゾールの Cε に結合している水素がヘムと近付き過ぎるため生ずる立体反発の影響で、ヒスチジンの傾きはデオキシヘムの場合より緩和される。

ヘモグロビンの構造

（i）X 線結晶解析からわかる結晶構造の概略[1][25]-[28]

ヘモグロビンは、２本のα鎖と２本のβ鎖から成る４量体で、分子量約６４５００の球状タンパクである。α鎖は１４１個の、またβ鎖は１４６個のアミノ酸から成り、それぞれのサブユニットはヘムを１個ずつ巻き込んでいる。β鎖は、合計８部分のαヘリックス構造を持ち、その他の部分は非ヘリックス構造をとる。これらのヘリックス部分は、N 末端から順に A, B, C, ..., H と名づけられ、それらの間にある非ヘリックス部分は NA, AB, BC, ..., HC と命名される。α鎖のヘリックス構造も、D ヘリックスの大部分を欠如している点を除けばβ鎖のそれと同じである。それぞれのサブユニットは非ヘリックス部分を屈曲点として非常によく似た折りたたみ構造をとる。また、この折りたたみ構造は、１５３個のアミノ酸から成る単量体のミオグロビンにも共通である。

さて、２本のα鎖と２本のβ鎖は、それぞれ正四面体の頂点に位置するよう配列し、１個の球状分子を形成する（図３参照）。そして、ヘモグロビン分子中には１つのα鎖をもう１つのα鎖に、そして１つのβ鎖をもう１つのβ鎖に移すような２回転対称軸が存在する。

同種のサブユニットを区別するため、４個のサブユニットには普通、図３に示すような添え字が付けられる。αサブユニットとβサブユニットとの接触には２通りあり、α1β1（α2β2)型の接触と、α1β2（α2β1)型の接触が考えられる。ヘモグロビンが酸素親和性の高い構造から酸素親和性の低い構造へと変わる時、前者の接触に目だった変化はないが、後者の接触に顕著な変化が起こり、結果として２量体α1β1と２量体α2β2との相対的位置関係が変わる（図３参照）。

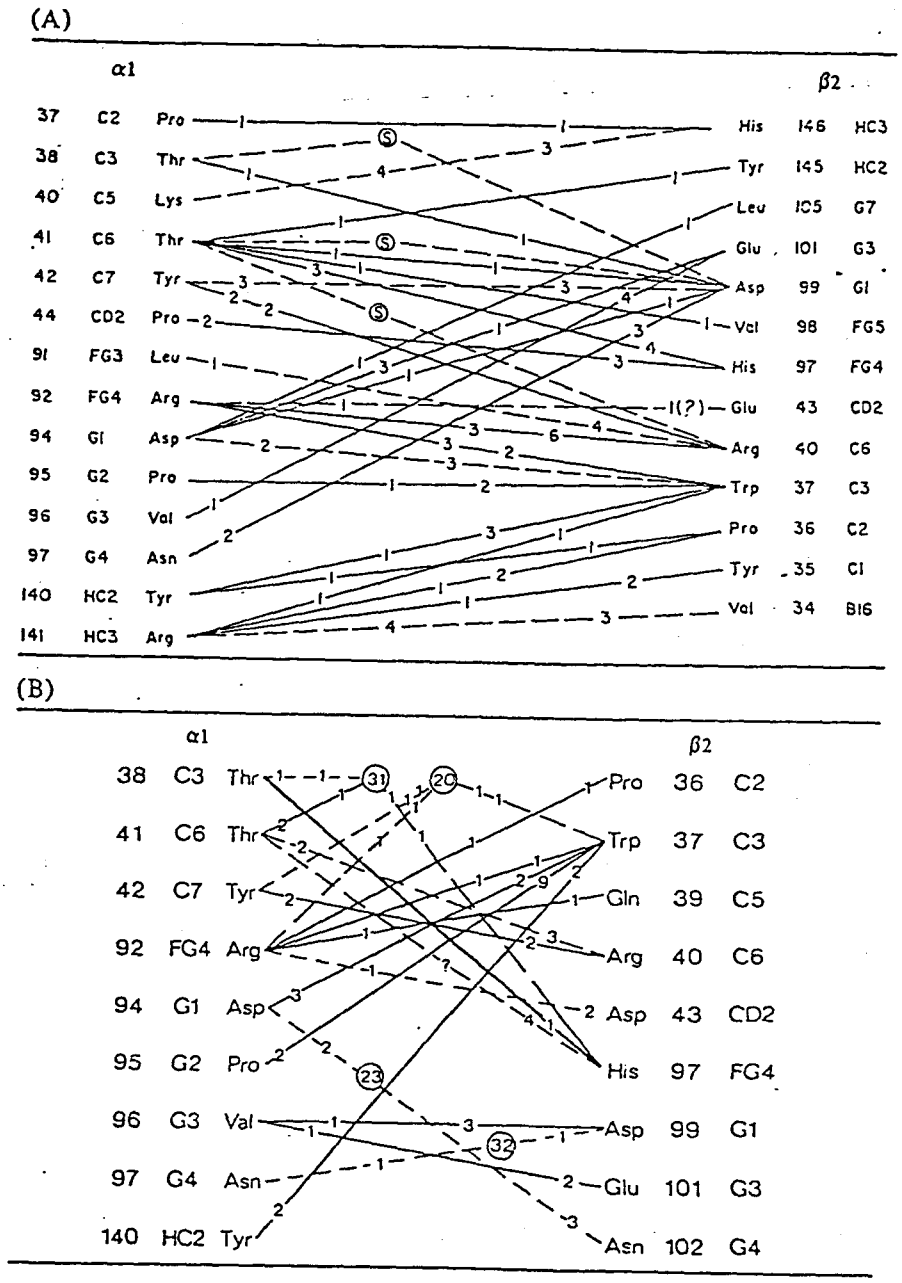


図6　デオキシヘモグロビン（A）とメトヘモグロビン（B）とのα1β2界面接触の違い[1][30]

デオキシヒトヘモグロビンの X 線結晶解析の結果[1]と、ウマメトヘモグロビン（この場合、リガンドは水）の X 線結晶解析の結果[30]に基づく。実線はファンデアワールス接触で、破線は水素結合である。また、丸で囲んだ S または数字は、水素結合ネットワークに含まれる水の個数である。

デオキシヘモグロビン中での両サブユニット C 末端は、デオキシ型構造を安定化させるサブユニット間あるいはサブユニット内の水素結合形成に関与していて、これら水素結合は図7に書いたような複雑なネットワークを形成している。したがって、化学修飾により C 末端アミノ酸をいろいろな程度で切除したヘモグロビンは通常のヘモグロビンと比較して、そのアミノ酸切除の度合に応じた、高い酸素親和性を示すことが知られている[33][34]。

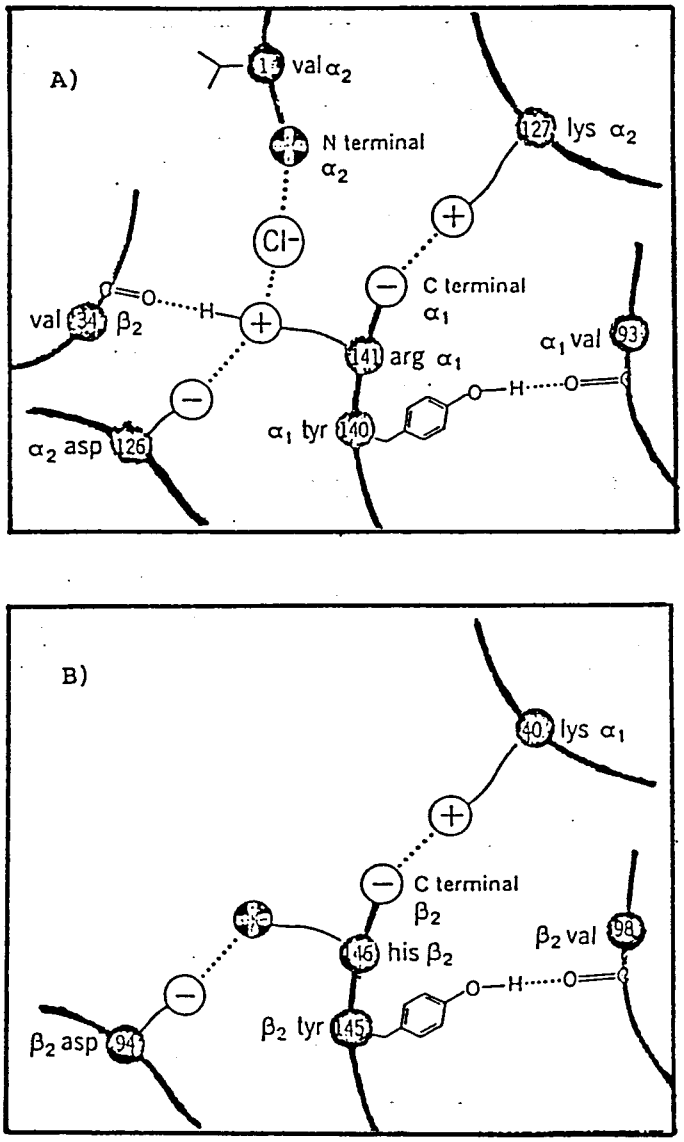


図7　ヘモグロビン中αサブユニットの C 末端（A）と、βサブユニットの C 末端（B）の関与する水素結合ネットワーク[13][32]

(iv) アロステリックエフェクターの結合部位

DPG の結合したデオキシヘモグロビンの X 線結晶解析の結果から、有機リン酸効果を生み出す DPG の結合は、２個のβサブユニット間の中心空洞入口付近であることが明かになった[35]。この空洞内には、正電荷を持ったアミノ酸残基がいくつかあって、負電荷を持つ DPG はちょうど橋渡しをするような格好ではまり込みデオキシ型構造を安定化させる。また一方、オキシヘモグロビンでは、βサブユニット間の距離は縮まり DPG は入り込むことができなくなる。

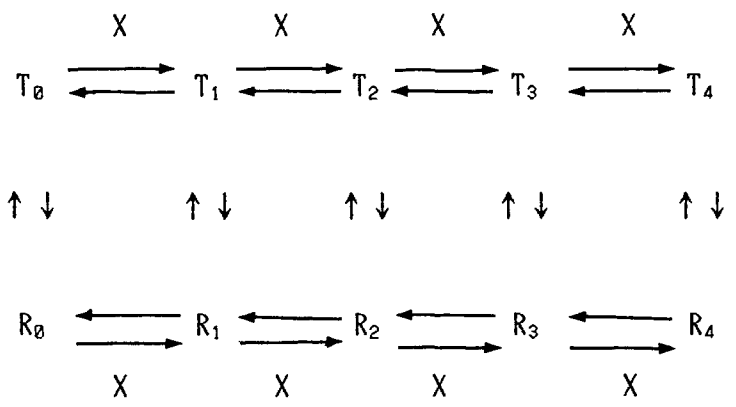
ボーア効果に関与するプロトンの結合部位は、X 線結晶解析の結果からある程度の推測が可能である。Perutz ら[36]は、ヘムにリガンドが結合している場合と、結合していない場合との X 線結晶解析の違いから、ボーアプロトンは両サブユニットの N 末端にあるバリンのαアミノ基と、βサブユニットの C 末端にあるヒスチジンのイミダゾール基から来ると推定した。その後行われた、化学修飾と NMR 法による研究、あるいはヒスチジンイミダゾールの重水置換法等の研究から、この推定の正さは確かめられている[37]-[39] (Ho らのグループは、Perutz らの推定に対して否定的な見解を持っている。現在のところ、両者の間で議論は続行されており、決着はまだついていない)。 しかしながら、これら３つの残基の pK 変化からだけではボーア効果を定量的に説明することができなくて、他のアミノ酸残基からの寄与も考えなければならない[38][39]。

ヘモグロビンの性質を説明するためのアロステリックモデル

ヘモグロビンの協同的酸素結合は、ヘムとヘムとの間の相互作用（ヘム間相互作用）が、タンパク部分の構造変化を介して伝わることで生み出される。このような構造変化と協同作用との関係を結び付けるモデルのことをアロステリックモデルと言う。現在のところ、４量体分子全体の構造変化が同時に起こる２状態一斉転移モデル[5]と、サブユニット内で構造変化が同時に起こり、隣接するサブユニット間で構造変化が伝わっていく逐次モデル[40]とが有名である。

（i）２状態一斉転移モデル（MWC モデル[5]）

２状態一斉転移モデルで重要なのは、ヘモグロビン分子の状態がデオキシヘモグロビン型４次構造を持つ酸素親和性の低い状態（T 状態）と、オキシヘモグロビン型４次構造を持つ酸素親和性の高い状態（R 状態）との２種類のみに限定されていることである。そして、T 状態でも R 状態でも１個目から４個目までのリガンドに対する親和性が同じであることが要求される。ヘモグロビンの協同性はこれら２種類の分子種の平衡で説明され、次に示す様な系で記述することができる。



ここで、X はリガンド、添え字はヘモグロビンに結合しているリガンドの個数を表している。この平衡系は３個のパラメーターで完全に記述することができる。習慣として、T_0 と R_0 の間の平衡定数を $L = [T_0]/[R_0]$、T 状態での X の結合平衡定数を K_T、R 状態での X の結合平衡定数を K_R と表して用いることが多い。また、T 状態と R 状態の相対的なリガンド親和性の比率を $c = K_T/K_R$ として用いることもよくある。

これらのパラメターをうまく選べば、いろいろな条件下にあるヘモグロビンの酸素平衡曲線を精度よく再現することが可能である。また、ある種の異常ヘモグロビンや化学修飾されたヘモグロビンでは、ヘムにリガンドが１個も付いていないのに酸素親和性の高いオキシ型４次構造をしているものや［例えば、デオキシ des-Arg(α141)-His(β146) ヘモグロビン[41]］、あるいはその逆に、ヘムにリガンドが４個付いているにも関わらず酸素親和性の低いデオキシ型４次構造をとるものもある［例えば、IHP 存在下で CO の４個結合した異常ヘモグロビン Kansas[42]］。こういった分子種の存在は、２状態モデルから予想される R_0 や T_4 に対応するので、２状態モデルを支持しているように見える。

しかしながら、２状態モデルのパラメーターを使った酸素平衡曲線の定量的な解釈となると、いろいろな問題が生じてくる。まず第一に、溶液条件を変えると L の値のみでなく c の値が大幅に変わること、具体的には K_T が pH 変化とか有機リン酸の有無で容易に変わってしまうことが 一番の問題点として挙げられる[19]。さらに最近行われたいくつかの実験として、ヘモグロビンの構造標識を色々な酸素飽和度で測定したり、いくつかの異なる構造標識間での相関をとったりしたものがある[43][44]。そして、これらの結果はヘモグロビン分子中の個々の部位の構造変化が同時に起こっていないことを示唆するものが多い（この論文の中にもそういった例がいくつかでてくる）。こういったことは、２状態モデルから予想される分子内一斉転移のイメージに反するものである。

（ii）逐次モデル（KNF モデル[40]）

逐次モデルの特徴は、先述の２状態モデルと異なり、ヘモグロビンの酸素親和性がサブユニット単位の状態で決まる点にある。各サブユニットは酸素親和性の低い状態と高い状態の２種類の状態がとりえて、その状態を決めるのは隣接するサブユニットのリガンド結合の状態とする。したがって、リガンド結合があるサブユニットで起こると、構造変化がサブユニット界面を通して伝わり、そのサブユニットに隣接するサブユニットの状態を変える。こうやってサブユニット単位で逐次、構造変化が伝わっていくとする（論文中[40]には、サブユニット間相互作用の及ぶ様式によって、正方形型、正四面体型、直線型、そして、一斉転移型によるモデル計算も行われているが、ヘモグロビンの酸素平衡曲線を表現するには、正方形型か正四面体型が良いとされている）。

このモデルは、シグモイド型の酸素平衡曲線を再現することができるが、実際のデーターとのずれが比較的大きい[19]。このずれの一番の原因は、逐次モデルが酸素平衡曲線のヒルプロットの形状の P_{50} の点に関する対称性を要求するのに反して、現実の酸素平衡曲線のヒルプロットは非対称な形をしていることによる。また、酸素の解離したオキシ構造のヘモグロビンや酸素結合したデオキシ構造のヘモグロビンの存在もうまく説明できない。ただ、逐次モデルでは、現実の酸素平衡曲線で時々見られる負の協同性（通常のヘモグロビンで $K_1 > K_2$ となる場合がある）を説明できる利点がある[19]。

金属置換混成ヘモグロビン

ヘモグロビンは強い協同性を示すから、通常の平衡溶液中で１～３個酸素の結合した中間状態分子の性質を引き出すのは極めて難しい。そこで、安定なモデルを使ってこれら酸素結合における中間状態を調べようということになる。そういった目的で、ヘモグロビンの４個のヘム鉄のうちいくつかを、鉄以外の金属イオンで置き換えた金属置換混成ヘモグロビンの研究は始まった。

金属置換混成ヘモグロビンを用いた研究を行う際、まず問題となるのは、何を基準にモデルとしての善し悪しを決めるか、ということである。ここで、通常のヘムの配位状態にはオキシヘムとデオキシヘムの２種類があり、両者のタンパク部分に与える影響は大きく異なっている。したがって、置換に用いる金属ポルフィリンがどちらのタイプのヘムをモデルするかによって、次の２通りの基本的要求が考えられる。

（i）Fe を含むサブユニットに酸素の結合した混成ヘモグロビンの諸性質が、構造的に、また、機能的に見ても通常のオキシヘモグロビンと同じであること。この場合、用いた金属ポルフィリンはヘモグロビン中でオキシヘムのモデルになる。

（ii）酸素の完全に解離した混成ヘモグロビンの諸性質が構造的に、また、機能的に見ても通常のデオキシヘモグロビンと同じであること。この場合、用いた金属ポルフィリンはヘモグロビン中で、デオキシヘムのモデルになる。

今まで研究されてきた金属置換混成ヘモグロビンの中には、上記の要請（i）あるいは（ii）を満たしているように見えるもの、またどちらの枠組みにも入りそうにないものもあるので、ここでは、こういった視点から金属置換混成ヘモグロビンの性質を簡単にまとめてみることにする。

(i) シアノメト混成ヘモグロビン

Fe(III)CN^- を持つヘムは、古くからオキシヘムのモデルとしてしばしば用いられてきた[7][11]-[14]。オキシヘムの鉄の電子状態は、むしろ Fe(III)O_2^- に近いことが X 線吸収端の位置等から示されているので[45]、電子状態の類似性という観点からも Fe(III)CN^- を用いることは良さそうに思える。また、対称な混成ヘモグロビン（α_2[Fe(II)]β_2[Fe(III)CN^-]やα_2[Fe(III)CN^-]β_2[Fe(II)]）に２個目の酸素が結合する時の平衡定数、いわゆる K_2 の値が、通常のヘモグロビンに４個目の酸素が結合するときの平衡定数、いわゆる K_4 の値に近いことから、シアノメトサブユニットが対になる２価鉄サブユニットの酸素結合機能に与える影響も、通常のオキシヘムに似ていることが予想される[12][14]。

シアノメトヘムをヘモグロビン中のオキシヘムと見立てるなら、α_2[Fe(III)-CN^-]β_2[Fe(II)]とα_2[Fe(II)]β_2[Fe(III)CN^-]は、ヘモグロビンに２個酸素が結合した中間状態を表現することになる。 Ogawa と Shulman[46]は両混成ヘモグロビンのプロトン NMR を測定して、これら混成ヘモグロビンは IHP の導入により、ヘムのメチル基由来のシグナルがオキシ型からデオキシ型へと変化すること示した。この変化は、同一分子中のαヘムとβヘムとで同時に起きているように見えたので、２状態モデルでいうところの $R_2 \rightarrow T_2$ 変化が起きていると推論された。つまり、リガンドが２個結合したことにより R と T の平衡が微妙な位置にきていて、溶液条件で両者の相対的な安定性が変化したと解釈した訳である。また、Cassory ら[47]が行った CO 再結合速度の測定も、IHP の有る無しでデオキシ型からオキシ型への大きな変化を示したので、NMR シグナルの２状態的な変化と対応づけられた。

しかしながら、２状態モデルの予想に反する報告もいくつかある。 例えば、α1β2 界面でデオキシ型構造の時のみ存在する水素結合の１つ、Tyr(α42)-Asp(β99) から来る 14 ppm のプロトン NMR シグナルは IHP を加えた両混成ヘモグロビンで観測されないと報告されている[48]。 Miura と Ho[48]は、βサブユニット間に架橋して２量体への解離を止めた非対称シアノメト混成ヘモグロビンを調製し、その NMR シグナルを調べたが、 α[Fe(III)CN^-]β[Fe(II)]α[Fe(II)]β[Fe(II)] 中シアノヘムのメチル基シグナルはデオキシ型なのに、界面の 14

ppm シグナルは通常のデオキシ構造の約半分の強度しか得られなかったと報告している。これらの観測は、界面の水素結合で見た構造変化とヘムで見た構造変化とが同期していないことを示しており、２状態モデルがいうところの一斉転移のイメージとは相反するものである。

最近発表された、１個だけシアノメトヘムを含む非対称シアノメト混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の結果は、αサブユニットに１個シアノメトヘムを持つヘモグロビンの K_1, K_2, K_3 は、通常の架橋ヘモグロビンの K_2, K_3, K_4 と似た挙動を示すが、βサブユニットに１個シアノメトヘムを持つヘモグロビンの場合、通常のヘモグロビンの Adair 定数とよい相関は見られなかった[49]。この結果は、デオキシヘモグロビンの酸素結合が、αサブユニットから起こる可能性が高いことを示唆している。

(ii) Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン

ヘモグロビン中で Co(II) プロトポルフィリンは、CO とほとんど結合しないが、酸素とは可逆的に結合することが知られている[50]。そして、全てのサブユニットの鉄を Co(II) で置き換えた Co(II) ヘモグロビンは、通常のヘモグロビンより酸素親和性が P_{50} にして約１０倍低く、協同効果の大きさもかなり減少して n_{max} にして約２程度の値を示す[51]。したがって、Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンでは、酸素は鉄サブユニットから先に付き始めると予想されるので、酸素平衡曲線の下の漸近線から鉄サブユニットに１個目の酸素が付く時の平衡定数、即ち K_1、が求まる。

もし、デオキシ Co(II) プロトポルフィリンが、デオキシヘムのよいモデルならば、こうやって求まる K_1 は、通常のヘモグロビンの K_1 と同程度の値になるはずである。$\alpha_2(Fe)\beta_2(Co)$ は、この条件を大体満足しているように見えるが、$\alpha_2(Co)\beta_2(Fe)$ の K_1 は、通常のヘモグロビンのそれより１０倍位酸素が結合し易くなっていて[52]、αサブユニットに入った Co(II) プロトポルフィリンはデオキシヘムのよいモデルとは言い難い。また、デオキシ４次構造の重要な指標となる14 ppm の NMR シグナルについて見てみると、$\alpha_2(Fe)\beta_2(Co)$ では通常のヘ

モグロビン同様 pH によらず出現するが、α_2(Co)β_2(Fe) や α_2(Co)β_2(Co) の場合、pH 8.5 では極めて強度の弱いシグナルしか観測されない[53]。これらの結果もまた、αサブユニットに入った Co(II) プロトポルフィリンが、通常のデオキシヘムとは違う影響をタンパク構造に与えていることを示唆している。したがって、αサブユニットに Co(II) プロトポルフィリンを含むヘモグロビンを用いる場合、常にこの影響を考えながら実験結果を評価する必要がある。

最近、Co(II) プロトポルフィリンをデオキシヘムのモデルと見立てて、いくつかの中間状態分子について、Co(II) の電子スピン共鳴 (EPR)、NMR、酸素平衡曲線等の測定を行った例があるが[54]、この場合でも、やはりα(Co)はオキシ型構造を安定化する傾向が、随所にうかがえる。したがって、ヘモグロビン中αサブユニットとβサブユニットとの性質を定量的に調べる研究には、 Co(II)-Fe(II) の系は向いていないと言えよう。

(iii) Mn(II)-Fe(II) と Mn(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビン

Mn(II) プロトポルフィリンはデオキシヘムのモデルとして、また Mn(III) プロトポルフィリンはオキシヘムのモデルとして実験に使われている[9][55][56]。Mn(II) は CO とは反応しないが、酸素存在下では容易に酸化され Mn(III) となってしまうので鉄サブユニットの酸素平衡曲線が測定できるのは、Mn(III) を用いた混成ヘモグロビンに限られる。

Mn(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線で特徴的なのは、非常に強い協同効果 (n_{max} > 1.7) が観察されることである[57][58]。また、この強い協同効果があるため、現在までに報告されている限られたデーターから正確な K_2 の値を決めるのは難しい。しかし、定性的に言うなら、通常のヘモグロビンの K_4 と同等か、もしくは、少し親和性の低い値が予想される。一方、同混成ヘモグロビンの CO 結合の K_2 は、速度論的解析から求められていて、通常のヘモグロビンの K_4 とよく一致したと報告されている[9]。この結果は、Mn(III) プロトポルフィリンのタンパクに及ぼす影響がオキシヘムのそれと似ていることを示唆する

が、先に述べたシアノメト混成ヘモグロビンとは協同性の強さという点で大きく異なる。

Mn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは、CO 結合の平衡定数及び速度が測定されている[9][55]。1個目の CO が結合する時の平衡定数は、その pH 依存性を含めて、通常のヘモグロビンのそれと似た値を示すので、Mn(II) プロトポルフィリンはデオキシヘムのモデルとして良さそうである。2種類の Mn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 平衡機能を比較すると、CO がα-αと結合する場合の方がβ-βの場合に比べて、P_{50} の値にして2倍ほど親和性が高く協同効果も少し大きいと報告されている。この結果は、後の章で述べる Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の結果と定性的には一致する。

α(Fe)サブユニットに CO の結合した Mn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン、即ち α_2(Fe-CO)β_2(Mn)、は X 線結晶解析が行われていて、通常のデオキシヘモグロビンと同型に結晶している[59]。また、サブユニット内の構造を通常のデオキシヘモグロビンと比較してみると、CO の結合したαサブユニットでは鉄のポルフィリン面内移動に伴う F ヘリックスの動きがでているが、この変化は、通常の CO 型ヘモグロビンと比較すると小さい。また一方、βサブユニットには目だった変化は見つかっていない。

(iv) Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン

Zn(II) プロトポルフィリンは酸素や CO と結合しない。そして、酸素平衡曲線から決まる Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの Fe(II) サブユニットの K_1 は、いろいろな溶液条件で、通常のヘモグロビンのそれとよく合う[60]。したがって、Zn(II) プロトポルフィリンはヘモグロビン中で、ちょうどデオキシヘムの様に振舞う。

Simolo ら[10]は、種々の測定手段を用いて Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの性質を調べ、CO の2個付いた中間状態は、2状態モデルでいうところの T とも R とも違う構造をしていると結論した（彼らの用いた溶液条件は、測定手段によって多少異なるので、微妙な状態にあると予想される中間状態の構造を測定手

段別に比較する場合多少の危険があるかもしれない）。例えば、CO の解離速度と 285 nm 付近の CD（円偏光２色性）はα_2(Fe-CO)β_2(Zn)とα_2(Zn)β_2(Fe-CO)ともに、デオキシ型構造の特徴を示すのに、デオキシ型構造を支える重要な水素結合、Tyr(α42)-Asp(β99) の NMR シグナルは同じヘモグロビンで観測されない。また、Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線を見ると pH 7 付近では、両混成ヘモグロビン共ほとんど協同性が見られず、リガンドが結合してもデオキシ型構造を保っていると予想されるが、CO の結合した混成ヘモグロビンにおけるβ93 Cys-SH の反応性は CO 型ヘモグロビンのそれと同等か、あるいは、それ以上になっている[60]。これらの結果は、２状態モデルの予想と合わない。

（v）その他

今までに紹介した金属イオン以外にも、Cu(II)[61],Co(III)[62],Cr(III)[63], V(II)O[64], Ru(II)CO[65] とかを用いた金属置換混成ヘモグロビンが調製されている。

これらの金属イオンの中で、Cu(II) プロトポルフィリンは、酸素や CO と結合せず、なおかつデオキシヘムのモデルとなることが酸素平衡曲線等の結果から解っている[61]。また、Cu(II)-Fe(II) と Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは非常によく似た性質を示し、置換金属の配位数がサブユニットの種類やヘモグロビンの構造によって変わること等、多数の類似性がある。また、Cu(II) は、3d 電子を９個持ち S = 1/2 であるから、電子スピン共鳴が（室温、溶液状態でも）観測され、その点では Ni(II) より有利である。しかし、 NMR 測定の場合、このスピンがポルフィリン近傍のプロトンシグナルを著しくブロードにするため、NMR 測定に関しては、デオキシヘモグロビンのモデルとして Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンや Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを用いる方が賢明であろう。

一方、Co(III), Cr(III), V(II)O, Ru(II)CO を含むプロトポルフィリンは、オキシヘムのモデルとなる可能性があると報告されているが、もうしばらくの間、実験の成行きを見てから結論した方が良さそうである。

さてここで、置換に使った鉄属遷移金属の電子状態と、その混成ヘモグロビン

の酸素親和性との関係を見てみると、3d 電子の数が増えると酸素親和性が下がる傾向がうかがえる。また、Fe(III) の場合について見ると、配位子の種類でスピン状態が変わり酸素親和性も変わることが知られている[7][13]。したがって、リガンドの持つ電子対と比較的重なりの多い dγ 軌道に金属イオンの 3d 電子が入っているか、あるいは、入っていないかが、酸素親和性を決める大きな分かれ目になるようである。また最近、（中心金属を持たない）プロトポルフィリン IX を用いた混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線が測定されていて、αサブユニットのヘムをプロトポルフィリンで置換した混成ヘモグロビンの（βサブユニットの）酸素親和性は非常に低いと報告されている[66]。この結果は、αサブユニットでポルフィリンと近位ヒスチジンの結合が全く無い場合（近位ヒスチジンとヘム面との距離が大きい場合）、βサブユニットの酸素親和性が低下することを示唆している。

第２章　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線と光吸収スペクトルによる研究

(i) 概要

ヒト成人ヘモグロビン (hemoglobin A) のαサブユニット、あるいはβサブユニットいずれか一方のヘムを Ni(II) プロトポルフィリンIX (以下、Ni-PPと書く) で置き換えた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを調製しその性質を調べた。ここで、Ni-PP は、酸素や一酸化炭素と結合しないので、混成ヘモグロビン中の鉄サブユニットの酸素平衡機能を特異的に決めることができた。その結果、これらの混成ヘモグロビンに１個目の酸素が結合する時の平衡定数、即ち K_1 は、通常のヘモグロビンの K_1 と種々の溶液条件で非常によい一致を示した。このことは、ヘモグロビン中の Ni-PP がデオキシ状態で固定されたヘムと等価な働きをしていることを示唆している。さて、両混成ヘモグロビンの２段階酸素結合の様子を調べてみると、酸性 pH の時、両混成ヘモグロビンで酸素結合に協同性は見られなかった。また、pH を上げていくと α_2(Fe)β_2(Ni) では協同性が出てくるが、α_2(Ni)β_2(Fe) の場合 pH 8.5 でも酸素結合の協同性は消失したままであった。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの光吸収スペクトルは、Ni-PP の配位数変化によって大きく変わることが解った。デオキシ型構造にあるα(Ni)サブユニットでは、４配位の Ni-PP がほとんどであるが、オキシ型構造を安定化させる溶液条件では、５配位の Ni-PP がかなり増えてくる。一方、β(Ni)サブユニットでは、溶液条件やα(Fe)のリガンドの有無に依らず、近位ヒスチジンが結合した５配位型の Ni-PP がほとんどである。この場合でも、ヘモグロビンの構造変化に伴うわずかな吸収スペクトル変化が観測されるが、これは、Ni-PP の配位数の変化によるものではないようである。

α_2(Ni)β_2(Fe)のβ(Fe)サブユニットに酸素が結合する場合、協同性は観測されないが、この酸素結合に伴いα(Ni)サブユニットの吸収スペクトルは変化することが解った。このことは、４量体中のサブユニット間相互作用を比較したとき、α-βとβ-βとでは差があることを意味する。

（ii）序論

第１章で既に述べた様に、酸素結合における中間状態の研究には金属置換混成ヘモグロビンをモデルとして使う方法が有効である。オキシヘムのモデルとしては一般に、シアノメトヘムがよく用いられ、比較的多くの測定手段でその性質が検討されている[7][11]-[14]。一方、デオキシヘムのモデルとなると、その研究の歴史は浅く、モデルとしての妥当性から検討されたものは少ない。Blough と Hoffman[9]は、Mn(II)プロトポルフィリンをデオキシヘムのモデルとして使っているが、 Mn(II) は酸素存在下では酸化され Mn(III) になるので、ヘモグロビンの機能として最も重要と思われる酸素平衡機能を測定することができない欠点がある。

最近、Morimoto ら[15][16][58][60]-[64]によって測定された、一連の鉄属金属イオンを用いた金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の結果から見て、Zn(II)-Fe(II)[60]、Cu(II)-Fe(II)[61]、及び Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビン（この研究）はデオキシヘモグロビンとよく似た性質を示すようである。ここでは、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製法とこれら混成ヘモグロビンの性質について述べる。

（iii）実験方法

Ni-PP の調製

Ni-PP は、Adler ら[67]の方法に添って調製した。先ず、プロトポルフィリン IX の２ナトリウム塩を蟻酸に溶かし、この溶液をアンモニア水で中和する。アンモニウム塩となったプロトポルフィリンが沈澱するので、これを遠心して集め脱イオン水で数回洗った後、減圧乾燥させる。このプロトポルフィリン 1 g を 200 ml の DMF (N',N-dimethylformamide) に溶かし、窒素雰囲気下で還流する。この溶液に、予め用意しておいた塩化ニッケル 2 g を DMF 10 ml に溶かし窒素雰囲気下においたものを加えてゆっくりかくはんする。反応は、可視部の吸収スペクトルに金属の入っていないプロトポルフィリンのピークが無くなるまで行う。大体の目安としては、110 ℃ で約 20 分間置けばよい。これ以上温度を上げると、ポルフィリンが壊れるので高収率は難しくなる。反応が終了したなら、この溶液に等量の脱イオン水 (4 ℃) を加え反応を止め、溶液は氷中で冷やす。Ni-PP は沈澱するので、遠心して集め、一度、酢酸で洗った後、脱イオン水で数回洗って減圧乾燥させる。

こうやって得られた Ni-PP は、ポルフィリン側鎖に損傷を持つものが含まれているので、精製することが必要である。そこで、ピリジン、水、クロロホルム、イソオクタン、をそれぞれ体積比にして、20:10:10:1 の割合に混ぜたものの下層液に試料を溶かし、Caughey ら[68]の方法に従い充塡した Celite 545 のカラムにのせ、下層液で展開する。純度の高い Ni-PP はカラムから出てくる主要な部分に含まれているので、この部分を集め、ロータリーエバポレーターで溶媒を除き乾燥させる。こうして精製された Ni-PP は、一度アンモニア水に溶かした後、酢酸で中和し沈澱させる。沈澱は数回脱イオン水で洗ってから減圧乾燥させる（収量は 490 mg）。最後に、Ni-PP の純度は可視部の吸収スペクトルと DMF によるシリカゲル薄層クロマトグラフィーで確認する。

ヘモグロビンとその単離鎖の調製

クエン酸ナトリウム等の血液凝固防止剤の入った血液を 5000 rpm で１０分間遠心分離し、上澄みの血しょう成分を捨てる。血沈は、生理食塩水で洗い 3000 rpm で１０分間遠心して、上澄みが透明になるまで、この操作を３、４回繰り返す。次に、血球の等量（容積）の脱イオン水を加え約３０分間、０℃、CO 雰囲気下におき、溶血させる。溶血液の３０％（容積）程度のトルエンを加え、激しく混ぜ分液ロートでトルエン層を除く。この操作でトルエンに可溶な膜脂質成分が除かれる。さらに、赤血球膜（ゴースト）は、10000 rpm で１時間程、遠心分離して除く。こうやって得られたヘモリセイトは、1 mM Na_2HPO_4 の Sephadex G25 fine (Pharmacia) のカラムを通して、低分子の不純物を除きイオン強度を下げる。

ヘモリセイトは、イオン交換樹脂（Amberlite MB-1, MB-3 等）を用いて脱塩する。そして、あらかじめ 5 mM Na、2.8 mM Phosphate、pH 7.5 の緩衝液で平衡をとっておいた CM52 セルロース（Whatman）のカラムに、脱塩したヘモリセイトをそのままのせる（カラムの大きさは、ヘモグロビン 1 g 当り 1.5 ml とする）。そして、この時、カラムを抜けるものを集める。また、試料をのせ終った後、カラム容積の緩衝液（カラムの平衡をとったのと同じ緩衝液）でカラムを洗い、この時抜けるものも一緒に集める。こうやって、ヘモグロビン A_2 が、除去されたヘモグロビンが得られる。次に、このヘモグロビン溶液に 10 mM となるよう Tris (Tris-hydroxymethyl aminomethane) を加えてから、あらかじめ 5 mM Na、1.5 mM Tris、 2.8 mM Phos、 pH 8.4 の緩衝液で平衡をとった DE52 セルロース（Whatman）のカラムにのせる（カラム容積は、ヘモグロビン 1 g 当り 3 ml とする）。この時、カラムを抜けるものと、試料をのせ終った後、カラム容積の２倍量（容積）の同緩衝液でカラムを洗う際、流れ出すものをひとまとめにして集める。この操作で、ヘモグロビン A_1 は、ほとんど除去され、ほぼ純粋なヘモグロビン A が得られる。

単離α鎖とβ鎖は、上述の操作により得られたヘモグロビン A を用いて、Kilmartin ら[69]の方法に基づき調製する。得られた単離鎖は、20 mM Tris/HCl、pH 8.2 の緩衝液中、CO 雰囲気下、４℃で保存する。

Ni(II) 置換単離鎖ヘモグロビンの調製

アポα鎖（α鎖からヘムを抜いたもの）とアポβ鎖は、塩酸アセトン法[70]により以下の手順で調製する。オキシ型としたα鎖あるいは、β鎖 100 mg を 100 ml の塩酸アセトン（35% HCl：アセトンが容積にして 0.04% となるように混ぜ、それを - １５℃以下に冷やしたもの）に滴下かくはんする（約２０分）。この後、かくはんを止めて約２０分間放置してアポを沈澱させる。アポは、濾紙上に吸引濾過法で集め、冷やしたアセトンで洗う。この後、アセトンが完全に無くなるまで吸引を続け、得られたアポは 60 ml の 20 mM Borate/NaOH、pH 12 緩衝液に溶かす。

アポ溶液を DMF に溶かした Ni-PP で、分光滴定する（普通 400 nm の吸収変化を用いて滴定する）。この時、およそ 1:1 のモル比で反応していることを確認して、アポの 1.2 倍量の Ni-PP を少量の DMF に溶かし、これをアポ溶液に加える。約２時間、温度０℃で、ゆっくりかくはんした後、試料を濃縮して、20 mM Borate/NaOH、pH 10.5 緩衝液の Sephadex G25 fine のカラムを通し過剰に加えた Ni-PP を除く。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと Ni(II) ヘモグロビンの調製

Ni 置換された単離鎖に、これと対になる通常の（鉄を含む）単離鎖を CO 雰囲気、32 mM DL-dithiothreitol 存在下で等量混ぜ、０℃で１時間程置く。再構成された混成ヘモグロビンは、20 mM Tris/HCl、pH 7.4 の緩衝液の Sephadex G25 fine のカラムを通し、続いて、同緩衝液で平衡をとった DE23 セルロース（Whatman）のカラムと CM23 セルロース（Whatman）のカラムを通し精製する。両カラムを抜ける成分を集め濃縮して、液体窒素温度で保存する。

Ni(II) ヘモグロビンの調製は、単離鎖の場合と同様の手順でヘモグロビン A からヘムを抜き、Ni-PP を加えて、上述の方法で精製する。

全ての試料は、ポリアクリルアミドの等電点電気泳動（Pharmalyte pH 6.5-9）で、チェックする。

酸素平衡曲線の測定

混成ヘモグロビンに結合している CO は、Kilmartin と Rossi-Bernardi[71]の方法ではずし、酸素平衡曲線は、Imai ら[72]の方法で測定する。緩衝液は、50 mM Tris あるいは 50 mM Bistris (2,2-bis-hydroxymethyl-2,2',2"-nitrilo - triethanol) に 100 mM Cl を含むものを用いて、２５℃で測定する。試料の濃度は約 4 μM （４量体ヘモグロビン）とし、酸素分圧と 430 nm の光吸収の変化から酸素平衡曲線を求める。

吸収スペクトルの測定と吸収係数の決定

吸収スペクトルは、Shimazu UV 240 Spectrophotometer で測定する。吸収係数は、Lowry 法[73]により求まるタンパク濃度を使って計算する。

(iv) 結果

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素親和性は非常に低いので、酸素１気圧の条件下でも完全飽和は達成されない。一方、酸素よりはるかに親和性の高いリガンドである CO を用いれば、たとえ IHP 存在下でも完全飽和が達成される。そこで、混成ヘモグロビンの鉄サブユニットにリガンドが結合する時の吸収スペクトルを観察する場合、リガンドとしては CO を用いて実験した。まず、図１に、α_2(Ni)β_2(Fe-CO) の吸収スペクトルを示した。ソーレー帯には、この試料に特徴的な２つの吸収極大が存在し、pH によってこれら吸収極大の吸収係数は大きく変化することが解る。また、スペクトルをよく見てみると、この変化は等吸収点を結ぶスペクトル全体の変化なので、pH 依存性のある２成分系の平衡のように見える。ここで、CO をリガンドとして持つヘモグロビンの吸収スペクトルは、ヘモグロビンの構造に依存せずほぼ同じと言われているので（非常に小さな変化は起こるかも知れないが、今問題となる変化量と比較すれば完全に無視してよい）、観測されたこの大きな吸収スペクトル変化はα(Ni)サブユニット由来のものと断言できる。そこで先ず、この様な Ni-PP の吸収スペクトル変化の起源を調べる手がかりとして、モデル物質の吸収スペクトルと比較してみた。図２には、Ni-PP を DMF に溶かしたものと、ピペリジンに溶かしたものとの吸収スペクトルの違いを示した。前者は、軸性配位子を有しない典型的な４配位錯体、後者は、ピペリジンが２個軸配位子として結合した典型的な６配位錯体である[(74)-(76)]。ここで、α_2(Ni)β_2(Fe-CO) の吸収スペクトルとこれらモデルの吸収スペクトルを比較してみると、α_2(Ni)β_2(Fe-CO) に見られる 398 nm と 558 nm の吸収極大は４配位型 Ni-PP 由来のもの、そして、420 nm の吸収極大は軸配位子を有する Ni-PP 由来のものと同定される（今の場合、β(Fe-CO) の吸収極大も 420 nm に重なっているので注意）。また、Ni(II)ヘモグロビンの共鳴ラマンの測定結果を見ると、420 nm 付近の励起光で Ni と近位ヒスチジン Nε との間の伸縮振動に帰属されるラマン線が観測されていて、420 nm の吸収極大は軸配位子１個を有する５配位型 Ni-PP から来ることを強く示唆している[(76)]。

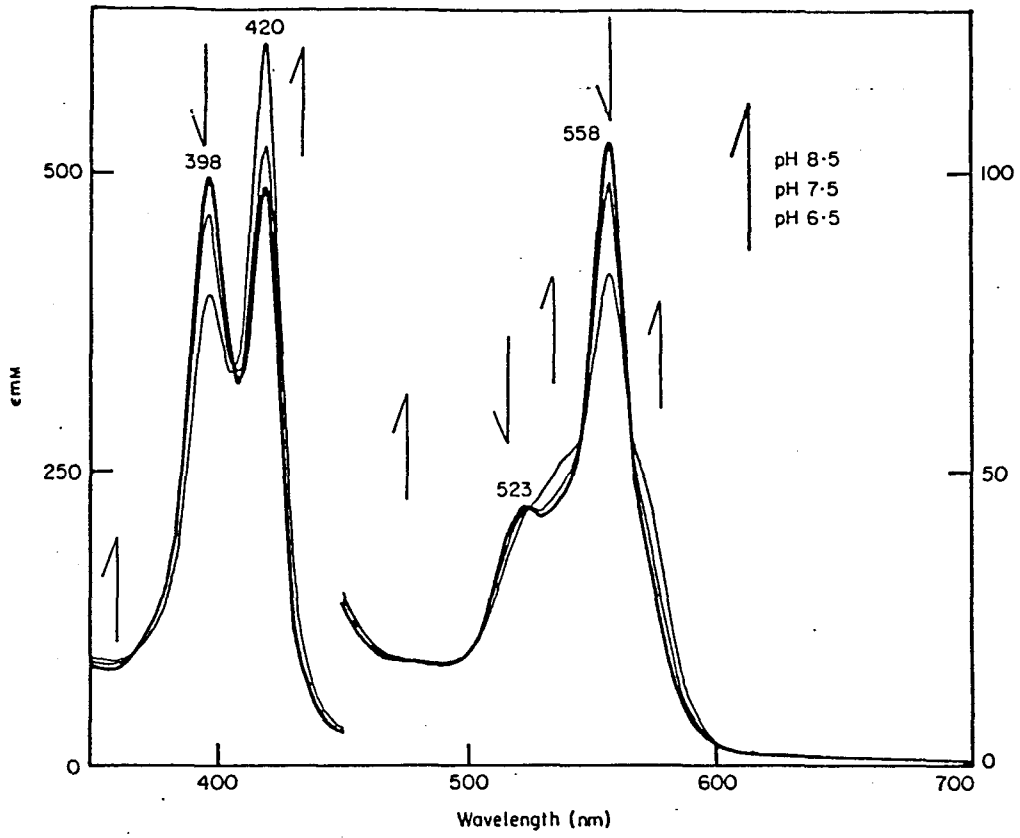


図１　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光吸収スペクトルの pH 依存性

測定は、0.1 M Cl を含む 50 mM Tris/HCl、あるいは、Bistris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。矢印は、pH 増加［ pH 6.5 （太線）、pH 7.5、pH 8.5 ］に伴う吸収変化の方向を表す。また、εmM は４量体ヘモグロビン当りのミリモル吸光係数を表す。

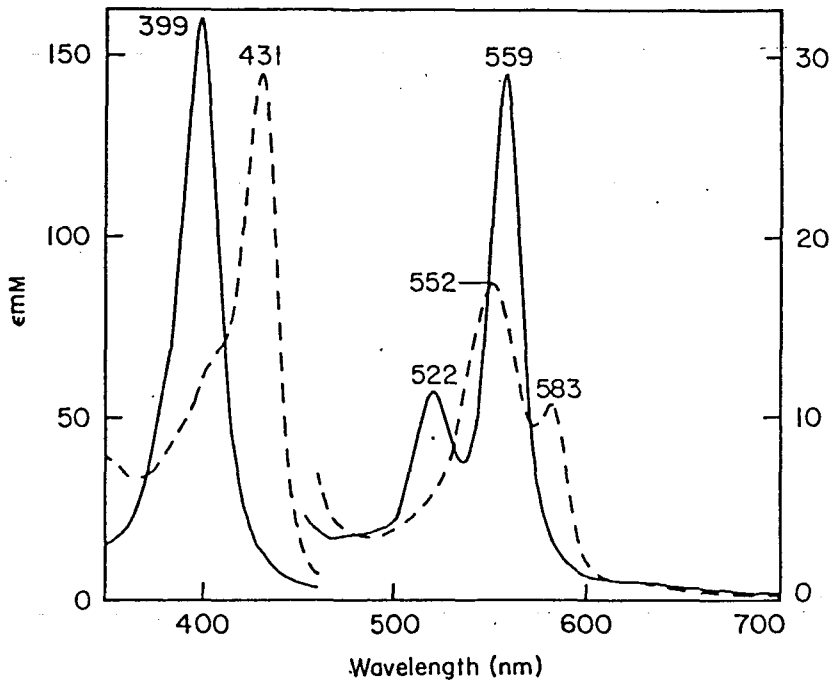


図２　有機溶媒中の Ni-PP の光吸収スペクトル

実線は DMF 中 Ni-PP （４配位状態）、破線はピペリジン中 Ni-PP （ピペリジンが２個結合した６配位状態）の吸収スペクトルを表す。εmM はミリモル吸光係数を表す。

以上の結果をまとめてみると、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の吸収スペクトル変化はαサブユニットにある Ni-PP の配位数変化に対応しており、 pH 6.5 の時は4配位がほとんどであるが、pH が上がるにつれて5配位の占める割合が徐々に増えてゆく。

また、これらの試料に IHP を加えた時の変化を見てみると、pH 7.5 の試料では他の pH の試料に比べて変化が大きく、4配位が顕著に増加することが解る（これらの吸収スペクトル変化は、表1A にまとめた）。

A. $\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe\text{-}CO)$

pH	IHP†	398 nm	ε mM/Hb (tetramer) 420 nm	523 nm	558 nm
6·5	−	498	489	44·0	104
	+	508	477	44·8	107
7·5	−	466	521	43·5	98·2
	+	508	481	45·1	107
8·5	−	388	587	40·6	81·5
	+	393	581	41·2	83·0

B. $\alpha_2(Fe\text{-}CO)\beta_2(Ni)$

pH	IHP	420 nm	ε mM/Hb (tetramer) 539 nm	572 nm
6·5	−	716	56·3	59·9
	+	738	56·3	63·0
7·5	−	718	57·9	60·4
	+	736	57·9	63·9
8·5	−	716	58·2	60·9
	+	710	57·8	60·9

C. Deoxy $\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$

pH	IHP	398 nm	ε mM/Hb (tetramer) 420 nm	558 nm
7·5	−	528	280	112

D. Deoxy $\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$

pH	IHP	420 nm	ε mM/Hb (tetramer) 540 nm	574 nm
7·5	−	556	54·1	61·8

E. NiHb

pH	IHP	398 nm	ε mM/Hb (tetramer) 420 nm	558 nm
7·5	−	539	438	98·0

表1　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと Ni(II) ヘモグロビンのミリモル吸光係数（ε mM）

測定は、0.1 M Cl を含む、50 mM Tris/HCl、あるいは、Bistris/HCl 緩衝液中、25℃で行った。

（注1）表中の + は IHP が 330 μM 存在する条件での測定を表し、- は IHP の存在しない条件での測定を表す。

（注2）デオキシ Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと Ni(II) ヘモグロビンの吸収スペクトルは pH や IHP の有無に依らず一定である。

デオキシ状態にあるα_2(Ni)β_2(Fe) の吸収スペクトルは、CO 結合型のそれと異なり、pH とか IHP に依らず一定で、Ni-PP はほとんど４配位型となっている（表１C 参照）。このことは、α_2(Ni)β_2(Fe)に CO が結合する過程でのα(Ni)サブユニットの吸収スペクトル変化が、pH 8.5 では非常に大きく、pH 6.5 ではほとんど起きていないことに対応する。同様な変化が酸素結合過程でも観測されているので詳しい議論は、また後で行う。

さて、もう一方の混成ヘモグロビン、α_2(Fe)β_2(Ni)では溶液条件とか鉄のリガンドの有無に依らず、５配位型 Ni-PP のみが観測される（図３参照）。また混成ヘモグロビンに IHP を加えた時、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)では小さな吸収スペクトル変化が起きるが、これは Ni-PP の配位数変化とは違う類のものである（表１B、D 参照）。

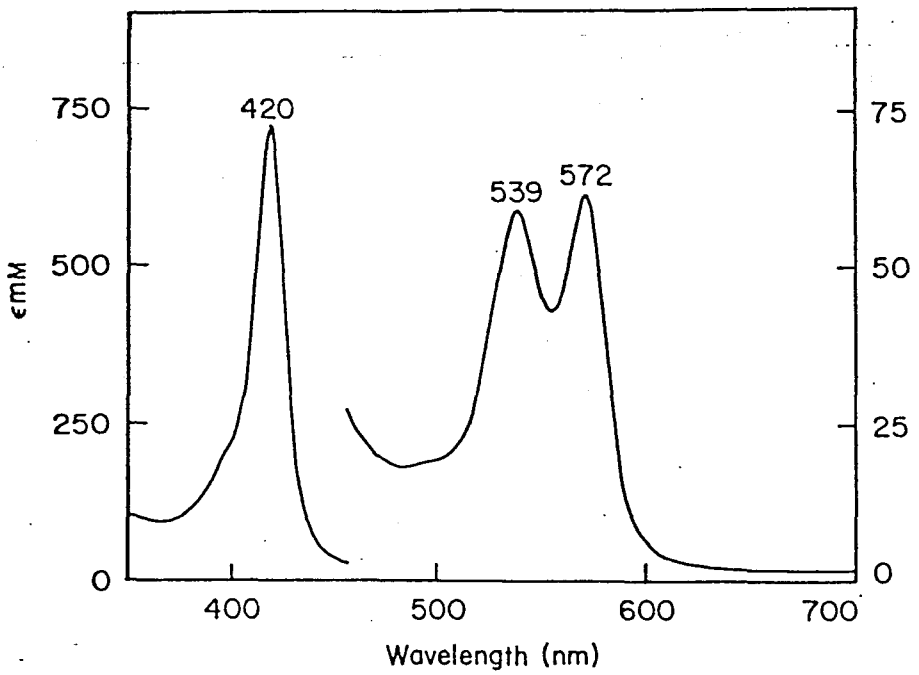


図３　α_2(Fe-CO)β_2(Ni)の光吸収スペクトル

測定は、0.1 M Cl を含む、pH 7.5 の Bistris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。
ε mM は４量体ヘモグロビン当りのミリモル吸光係数を表す。

図４に、Ni(II) ヘモグロビンの吸収スペクトルを示した。このスペクトルは、ちょうどデオキシα_2(Ni)β_2(Fe)中にあるα(Ni)サブユニットのスペクトルと、デオキシα_2(Fe)β_2(Ni)中にあるβ(Ni)サブユニットのスペクトルとの足し算と考えてよく、溶液条件に依らず Ni-PP は、αサブユニットでほぼ４配位状態、βサブユニットでは５配位状態となっている。

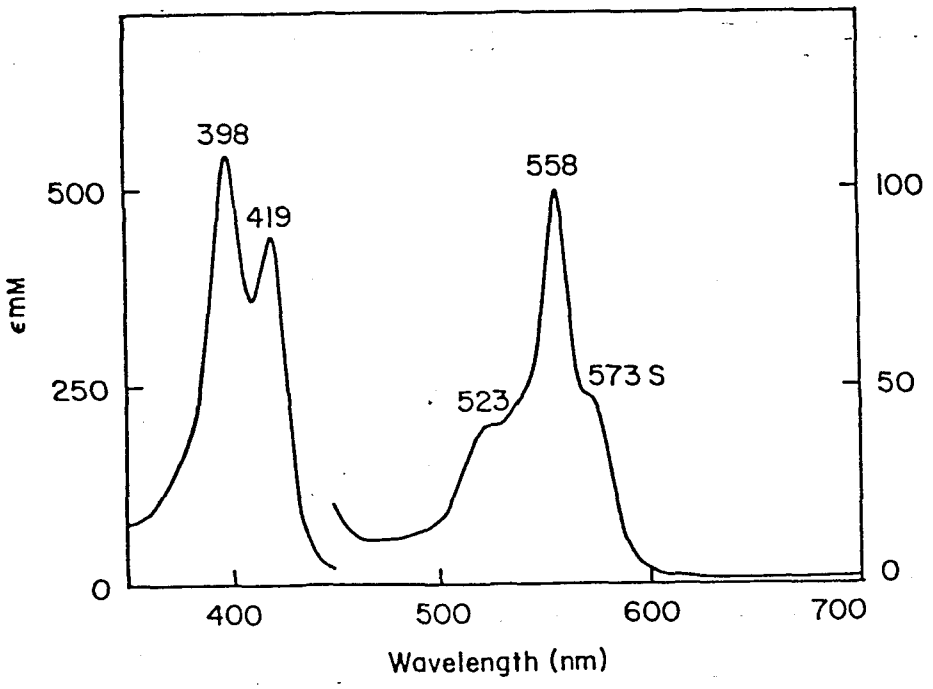


図４　Ni(II) ヘモグロビンの光吸収スペクトル

測定は、0.1 M Cl を含む、pH 7.5 の Bistris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。
ε mM は４量体ヘモグロビン当りのミリモル吸光係数を表す。

始めに書いたとうり、混成ヘモグロビンの２価鉄サブユニットを酸素で完全に飽和することは難しい。しかし、酸素１気圧の時の吸収スペクトルから予想されるα_2(Ni)β_2(Fe-O_2)中α(Ni)の吸収スペクトルは、前述のα_2(Ni)β_2(Fe-CO)中α(Ni)の吸収スペクトルと各 pH で一致するようである。したがって、pH の高い溶液でβ(Fe)サブユニットに酸素が結合する場合を考えると、β(Fe)サブユニットの酸素結合に伴いα(Ni)サブユニットの吸収スペクトルは大きく変化することになる。ここで重要なポイントとして述べなければいけないのは、いろいろな酸素分圧下で測定したα_2(Ni)β_2(Fe)の吸収スペクトルは、等吸収点を結んで変化するということである。この結果は、α(Ni)の示す［Ni(II) の配位数変化による］吸収スペクトル変化とβ(Fe)の示す［Fe(II) の酸素結合による］吸収スペクトル変化が、量的に比例して、かつ、同時に起こっていることを表している。このことは、pH 8.5 の溶液条件で、波長をいくつか変えて測定した酸素平衡曲線の結果が一致したことからも解る事実である （４配位 Ni-PP と５配位 Ni-PP との等吸収点に近い 410 nm、普通のヘモグロビンの酸素結合で観測される等吸収点である 421 nm、それと、一般にヘモグロビンの酸素平衡曲線測定でよく用いられる 430 nm で測定した）。また α_2(Fe)β_2(Ni)の場合、β(Ni)の吸収変化は小さいので、酸素平衡曲線測定にほとんど影響を及ぼさない。そう言った訳で、今回の酸素平衡曲線の測定は、デオキシヘモグロビンのソーレー帯の吸収極大である 430 nm を用いて行った。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線のヒルプロットを図５に示した。また、表２には P_{50}（５０％酸素飽和の時の酸素分圧）、n（ヒルプロットの最大勾配）、及び K_1（１個目の酸素が結合する時の解離平衡定数）の値をのせた。Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは共に酸素親和性が非常に低く、両混成ヘモグロビンの K_1 の値は通常のヘモグロビンの K_1 といろいろな溶液条件でよく一致する（図６参照）。両混成ヘモグロビンの酸素親和性を少し細かく比較してみると、α_2(Ni)β_2(Fe)の方がα_2(Fe)β_2(Ni)より全般的に酸素親和性が低くなっている。さらに協同性の違いを比較すると、α_2(Fe)β_2(Ni)では、pH 6.5 の時 $n = 1$ で協同性は見られないが、pH が上がるにつれて $n > 1$ となり少しずつ協同性が現れてくる。一方、α_2(Ni)β_2(Fe)では、今回測定した全ての溶液条件で $n = 1$ となり協同性は観測されなかった。また、１個目の酸素が結合する時、放

出されるボーアプロトンの個数（$-\Delta \log K_1/\Delta pH$）は、両混成ヘモグロビンで pH 7.5 の時、約 0.5 個となり、通常のデオキシヘモグロビンとほぼ同じ大きさのボーア効果が観測される。

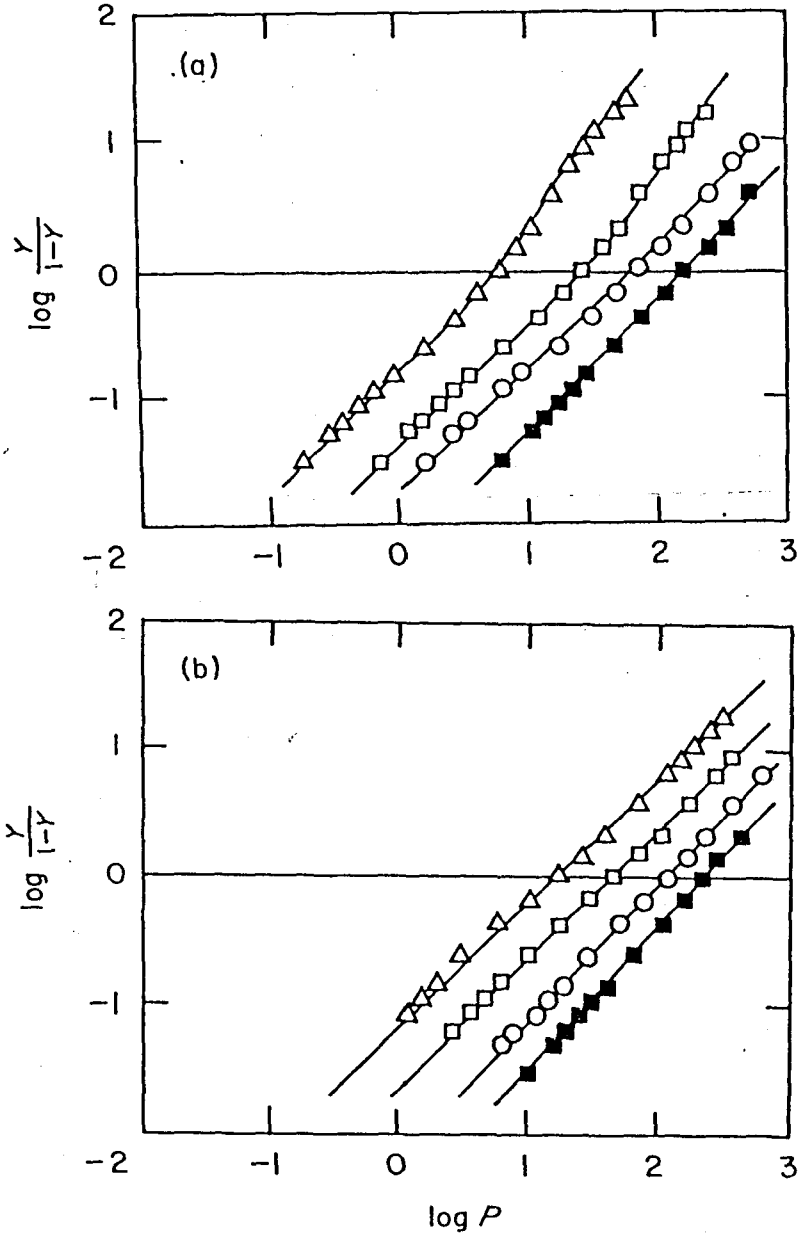


図5　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中 Fe(II)サブユニットの酸素平衡曲線のヒルプロット：(a) α_2(Fe)β_2(Ni) ；(b) α_2(Ni)β_2(Fe)　ただし、（○）pH 6.5；（□）pH 7.5；（△）pH 8.5；（■）2 mM IHP を含む pH 7.5 とする。

測定は、0.1 M Cl を含む 50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。また、ヘモグロビンの濃度は約４μM（４量体ヘモグロビン）、測定光の波長は 430 nm とした。P は酸素分圧を mmHg で表したもので、Y は酸素飽和度を表す。

pH	IHP†	$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$			$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$		
		P_{50}	n	K_1	P_{50}	n	K_1
6.5	−	73	1·0	73	106	1·0	106
	+	172	1·0	172	197	1·0	197
7·5	−	26·5	1·1	31	44	1·0	44
	+	167	1·0	167	215	1·0	215
8·5	−	5·8	1·3	8·2	16·2	1·0	16·2
	+	36	1·2	40	108	1·0	108

表２　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡機能に関するパラメーター

測定は図５と同じ条件で行った。
（注１）表中の＋は IHP が 2 mM 存在する条件での測定を表し、－は IHP が存在しない条件での測定を表す。
（注２）P_{50} は５０％酸素飽和の時の酸素分圧を mmHg（1 mmHg = 133.3 Pa）で表したもの、また、K_1 は１個目の酸素が結合する時の平衡定数を mmHg で表したものである。そして、n はヒルプロットの最大勾配を表す。

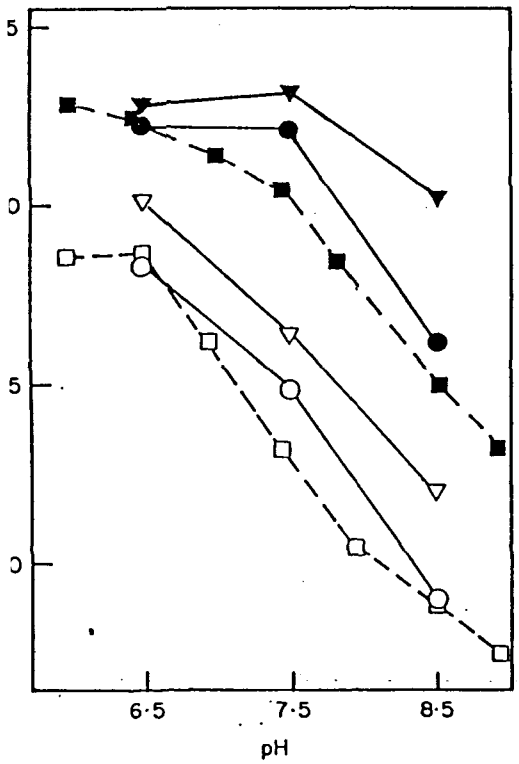


図６　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと通常のヘモグロビン（ヘモグロビンA）の K_1 の比較：（○）$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$；（△）$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$；（□）ヘモグロビンA[77]

測定条件は、図５と同じ。ただし、ヘモグロビンAの場合、測定濃度は 15 μM（４量体ヘモグロビン）である。また、K_1 は１個目の酸素が結合する時の平衡定数を mmHg で表したものする。
（注１）黒塗りの印は IHP が 2 mM 存在する条件での測定を表す。また、IHP 存在下のヘモグロビンAのデーターは、Imai と Imaizumi の未発表データーを使った。

(v) 考察

図6から解るように、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの K_1 は、通常のヘモグロビンの K_1 と種々の溶液条件でよく一致する。この結果は、ヘモグロビン中の Ni-PP が、ちょうどデオキシヘムと同じ様な影響を対になる2価鉄サブユニットに与えることを意味している。したがって、Ni-PP はデオキシヘムのモデルとして実験に使えそうである。第1章でも述べた通り、置換に用いた金属イオンの電子状態と金属置換混成ヘモグロビンの酸素親和性との間には密接な関係があり、おそらくは 3d 電子の電子配置、特にリガンド電子と重なりの多い $d\gamma$ 軌道に電子が入っているか、いないかが鉄属金属置換混成ヘモグロビンの酸素親和性を決める上で大きなポイントになっているようである。

2段階酸素結合過程の酸素平衡曲線では、ヒルプロットの P_{50} の点に関する対称性が要求されるが[78]、図5(A) に示した α_2(Fe)β_2(Ni)の酸素平衡曲線は pH 8.5、IHP なしの時、少し非対称な形になっている。さて、酸素平衡曲線を測定する場合、初めに酸素解離曲線を測定し、その後、酸素結合曲線を測定し、両者が一致することを確かめるのが通例である[79]。この試料についても、その様な手順で測定を行い酸素解離曲線と酸素結合曲線の一致は確認されているので、非対称を引き起こす原因としては、次に挙げる2つの可能性のみが考えられる。先ず、2個の α(Fe)サブユニットのうち1個がメト化した混成ヘモグロビンが測定中（酸素解離及び酸素結合過程を通して）存在し、そのメト化したサブユニットの存在がもう1個の α(Fe)サブユニットの酸素親和性を上げている可能性がある。そしてもう1つの可能性としては、混成ヘモグロビンの2量体への解離が起こり酸素親和性が上がった場合が考えられる。ここで、もし前者の可能性が正しいと仮定すると、1個目の酸素が結合する時の酸素親和性にかなり影響が出てくるはずであるが、得られた k_1 の値を見る限りそのようなことはなくて、この可能性は否定される。したがって、酸素親和性の高い2量体への解離がヒルプロットの対称性を崩していると予想される。事実、2量体解離の比較的少ないと思われる、高濃度での測定結果を見てみると酸素親和性の低下と n 値の増大、それに伴いヒルプロットの対称性の回復が観察される（第5章図5参照）。しかしながら、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)の4量体、2量体平衡は pH の低い時の方が2量体に割れ

易くなっているのに（第５章表１参照）、pH の高い時の方が酸素平衡曲線の対称性の崩れは顕著となっている。また、α_2(Ni)β_2(Fe-O_2)の場合も、酸素平衡曲線測定濃度では２量体がかなり生じているはずであるのに（第５章図６参照）酸素平衡曲線は対称性を保っている。これらの結果を統一的に解釈するには、１個、あるいは、０個リガンドの結合した混成ヘモグロビンの２量体への解離しやすさを知る必要があるが、現在までのところ、その様な測定は行われていない。今のところ、１つの可能性として、n 値の顕著な場合にのみ、１個リガンドの結合した混成ヘモグロビンの２量体解離が促進されてヒルプロットの対称性が崩れているのではないかと考えている［第５章の図８で $K_1 < K_2 = K_D$ （全て結合平衡定数）とすれば、１個リガンドの結合したヘモグロビンは、２個リガンドの結合したヘモグロビンと同じ位、２量体へ解離しやすくなる。ただし、これは n 値が極端に大きい場合である。］。

α_2(Ni)β_2(Fe)の場合、Ni-PP の配位数は、溶液の pH、IHPの有無、β(Fe)サブユニットの配位状態等の影響を受けて変化するが、α_2(Fe)β_2(Ni)場合、その様な配位数変化は観測されない。この結果は、αサブユニットのデオキシヘムの方が、βサブユニットのデオキシヘムよりもヘモグロビンの構造変化に対して敏感に変化することを示している。また、αサブユニットにある Ni-PP がデオキシ型構造では近位ヒスチジンとの結合の切れた４配位型となり、オキシ型構造では近位ヒスチジンと結合した５配位型が安定化するという結果は、現在までに発表されているデオキシヘムの物理測定のデーター[80]-[84]ともよく合い（通常のデオキシヘムの場合はデオキシ型構造中でも近位ヒスチジンとの結合が切れたりすることはないが、その結合はオキシ型構造にあるそれと比較してかなり弱められている）ヘモグロビン中デオキシヘムの示す共通の性質と言える。

α_2(Ni)β_2(Fe)は酸素結合に協同性を示さない。このことは、２つのβサブユニット間（β1-β2）の相互作用が弱いことを意味する。一方、この酸素結合に伴いα(Ni)の吸収スペクトルは変化するので、αサブユニットとβサブユニットとの間の相互作用（α1-β1、あるいは、α1-β2）は強いことが分かる。またこの時、吸収スペクトルは等吸収点を結んで変化しているから、α(Ni)サブユニットの吸収変化はβ(Fe)の酸素結合量に比例して、かつ、酸素結合と同時に変化していることになる。この現象は、４量体中のαサブユニットとβサブユニットを別

（iii）リガンド結合に伴う構造変化の道筋とサブユニット界面の変化

酸素結合に伴うヘムの構造変化は、鉄と直接結合している近位ヒスチジンを介して F ヘリックスを 1A 程度動かす。この動きは、α1β2界面の水素結合に関与する FG 部分のアミノ酸に伝わり、デオキシヘモグロビン型４次構造を保つのに必要な水素結合の安定性を下げる。こうなると、ヘモグロビン分子はデオキシ型の４次構造をとれなくなりサブユニットの再配列（４次構造変化）が起こる。また、この様なヘムのリガンド結合に伴う構造変化の伝わる道筋をエネルギー計算で解析した報告もある（現在までのところ、αサブユニットについてのみ報告されている）[29]。

ヘモグロビン中の４つのヘムは、電気的あるいは磁気的に直接相互作用できないほど空間的に離れているから、ヘム間相互作用が伝わるためには、グロビン部分の構造変化がサブユニット界面を通ってゆかなければならない。だから、ヘモグロビンの協同的酸素結合を理解する上で、サブユニット界面の状態変化を知っておくことが是非とも必要となってくる。図６は、デオキシヘモグロビンとオキシヘモグロビンとのサブユニット界面の相違を表したものである。

リガンド結合に伴う変化が比較的大きいα1β2接触には、２種類の結合形態が存在している。１つは、サブユニット間で蝶番の様な働きをするファンデアワールス接触で、α1(FG4) Arg と β2(C6) Arg との間、また、β2(C3) Trp と 両 α1(G1) Asp、α1(G2) Pro との間にある。そして、もう１つの結合形態は構造変化に伴い大きくスライドするスイッチ領域のことで、ヘモグロビンの構造に依存して安定な水素結合の組が変化する。実際、デオキシヘモグロビン中にある α1 [94 (C7)]Tyr とβ2 [99(G1)]Asp の間の水素結合はリガンド結合に伴い壊れ、β2 C ヘリックスがα1 FG に対して相対的に約 6A も移動する。また、このデオキシ構造に特有な水素結合 [Tyr(α94)-Asp(β99)] はプロトン核磁気共鳴(NMR) でも同定されており[31]、現在のところ最も信頼できる NMR の４次構造標識としてよく用いられるので重要である。

グロビン共通の性質と言ってよさそうである。

それでは、なぜ、α_2(Ni)β_2(Fe)には、全くと言ってよいほど酸素結合に協同性がないのだろうか？α_2(Cu)β_2(Fe)もα_2(Ni)β_2(Fe)と同様、酸素結合に協同性を示さないが、他の金属置換混成ヘモグロビンでは、多かれ少なかれ協同性が観測されている。ここで、α_2(Ni)β_2(Fe)とα_2(Cu)β_2(Fe)の共通の特徴として、αサブユニットにある金属ポルフィリンと近位ヒスチジンとの結合がオキシ型構造中では比較的安定なのに、デオキシ型構造中では切れてしまうことが挙げられる。この現象は、Ni(II) と Cu(II)[61]に特有なもので、他の金属置換ヘモグロビンについては報告されていない。ただ、一酸化窒素（NO）の配位したヘモグロビンでは、ヘモグロビンの構造変化に伴い αサブユニットで近位ヒスチジンとヘムとの結合が切れることが、 かなり古くから指摘されていた[82][90]。このような、αサブユニットに一酸化窒素の配位したヘムを含む系で、２個のβサブユニット間の相互作用を見る実験は今まで報告されていないが、非対称に修飾した一酸化窒素ヘモグロビンを用いた実験は行われていて、交換可能な２量体間、即ちα1β1とα2β2との間での相互作用はかなり弱いと言われている[91]。また、中心金属を含まないプロトポルフィリンでどちらかのサブユニットを置換した混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の結果を見てみると、αサブユニットに金属を含まない混成ヘモグロビンの場合、β(Fe)サブユニットの酸素親和性は非常に低くてヘム間相互作用は全く観測されていない[66]。これは、αサブユニットでヘムと近位ヒスチジンの結合が無いとβ1β2間の構造変化が伝わらないことを示す一番極端な例である。

以上の結果から、α_2(Ni)β_2(Fe)の酸素平衡曲線を説明するには次のような構造変化の道筋を考えるのが適当であろう。先ず、１個目の酸素がβ1サブユニットに結合した時起こる構造変化は、サブユニット界面を通じて２個あるαサブユニットのうちいずれか一方（α1、あるいは、α2）にまで伝わる。そして、αサブユニットのポルフィリン中心金属が、Ni(II)、あるいは、Cu(II) になっている場合、αサブユニットの構造変化は近位ヒスチジンとポルフィリン中心金属の結合が変わるくらい大きなものとなり、伝わって来た構造変化は、αサブユニットのヘム周辺が持つ柔軟な性質に吸収されてしまうのであろう。こう考えれば、構造変化が次のβサブユニットにまで伝わらないことは説明できる。

第３章　αあるいはβヘムの分光学的パラメーターとその酸素親和性との関係

(i) 概要

NES-Cys(β93)（β93 Cys-SH に N-ethylmaleimid を反応させること）、des-Arg(α141)（α141 Arg の特異的な切断）、これら両方の操作を同一分子に加えた NES-des-Arg(α141)、あるいは、des-His(β146)-Tyr(β145)（β146 His とβ145 Tyrの特異的な切断）による化学修飾を Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンに加え、これら化学修飾がそれぞれのサブユニットにどう影響するかを、酸素平衡曲線、Fe(II)-Nε［ヘム鉄と近位ヒスチジン（His F8）イミダゾール Nε間の結合］伸縮振動の共鳴ラマン線、それと光吸収スペクトルの測定で調べた。化学修飾された混成ヘモグロビンの K_1、即ち、１個目の酸素が結合する時の平衡定数は、それぞれ対応する化学修飾ヘモグロビンの K_1 と非常によく一致した。したがって、この様な化学修飾法を用いた場合でも、Ni-PP がデオキシヘムのモデルとして使えることが解った。この様な化学修飾と溶液条件の組合せで、酸素親和性を連続的に変えた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの共鳴ラマンスペクトルと光吸収スペクトルの結果を見てみると、αヘムは、その酸素親和性が K_1 の値にして約 3 mmHg の時、デオキシ型の状態からオキシ型の状態へと移り変わるようである。一方、βヘムの状態は、K_1 が 1 mmHg 以下のところで変化するが、その変化の大きさはαヘムの場合よりかなり小さい。

化学修飾されたα_2(Fe)β_2(Ni)の協同効果は、K_1 が約 4 mmHg の時に最大となり、それより酸素親和性が高く、あるいは低くなると除々に小さくなってゆくことが解った。しかし、共鳴ラマンの実験で観測されたαヘムの２状態を、２状態モデルでいう T と R に対応させて、２状態モデル的に考えてみると、協同効果が最大となる時の K_1 は、この値（4 mmHg）よりかなり大きくなるはずである。

また、化学修飾によりα_2(Ni)β_2(Fe)では、β(Fe)の酸素親和性が上がり Ni-PP の配位数にも変化が見られるが、２つのβサブユニット間の協同性は変化しなかった。このことは、第２章で述べたα_2(Ni)β_2(Fe)の非協同的酸素結合に伴う Ni-PP の配位数変化と同様に、２状態モデルでは説明しにくい現象である。

（ii）序論

化学修飾法を用いた混成ヘモグロビンの研究は、既に Co(II)-Fe(II) あるいは NO-deoxy 混成ヘモグロビンについて行われている[52][84][91]-[93]。これらの実験の主な目的は、化学修飾がそれぞれのサブユニットに対しどのように影響するかを調べることにあった。第２章で、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中の鉄サブユニットは、通常のデオキシヘモグロビン中の鉄サブユニットと非常によく似た性質を示すことを酸素親和性の類似性から結論した。そこで今回は、デオキシヘモグロビン中にある各サブユニットのヘム近傍の状態が、そのヘムの酸素親和性とどのような関係にあるかを調べる目的で des-Arg(α141)、NES-Cys(β93)、NES-des-Arg(α141)、及び、des-His(β146)-Tyr(β145)、といった化学修飾を加えた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを調製した（色々な種類のヘモグロビンが示す酸素親和性の最低値と最高値との間を、これら４種類の化学修飾法と溶液条件の組合せで、ほぼ連続的に変化させることが可能となる）。そして、これらの化学修飾を受けた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線とヘム近傍の物理量、Fe-Nε(His F8) 伸縮振動の共鳴ラマン線とソーレー帯の吸収スペクトルを調べ、これらの測定量変化と酸素親和性変化との関係をまとめた。また、こういったヘム近傍の状態を反映する測定量とそのヘムの酸素親和性の関係を記述するのに２状態モデル[5]はあまり適当でないことが解ったので、そのことについても議論する。

(iii) 実験方法

化学修飾された Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製

des-Arg(α141) α鎖は、通常のα鎖に carboxypeptidase B (diisopropyl-fluorophosphate で前処理したもの) を Kilmartin の方法[34]で酵素反応させて調製する。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製法は第２章で述べた。des-Arg(α141) Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは、des-Arg(α141) α鎖と通常のβ鎖とを、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製法に従い再構成させれば得られる。NES Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと NES-des-Arg(α141) Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは、それぞれ Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと des-Arg(α141) Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンに N-ethylmaleimide を Riggs 及び Benesch & Benesch の方法[94][95]で反応させて調製する。

des-His(β146)-Tyr(β145) Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製は、以下の手順に従い行った。先ず、通常のヘモグロビン (Hemoglobin A) に carboxy-peptidase A (diisopropylflourophosphate で前処理したもの) を Chanutin と Curnish の方法[96]で酵素反応させ、des-His(β146)-Tyr(β145) ヘモグロビンを調製する。 次に、これを通常の方法[69]で単離鎖に分離し des-His(β146)-Tyr(β145) β鎖を調製する。そして、これと通常のα鎖とを、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製法に従い再構成してやれば、des-His(β146)-Tyr(β145) Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンが得られる。

試料の純度は等電点電気泳動 (Pharmalyte pH 6.5-9) で確認した。また、以上の調製は、全て CO 存在下、４℃で行う。ただし、carboxypeptidase による酵素反応のみ２５℃で行う。

酸素平衡曲線の測定

混成ヘモグロビンに結合している CO は、Kilmartin と Rossi-Bernardi[71]の方法ではずす。酸素平衡曲線は、自動記録装置を用いて Imai らの方法[72]で測定する。使用する緩衝液は、50 mM Bistris あるいは 50 mM Tris に 100 mM Cl を含むもの、測定温度は２５℃、測定波長は 430 nm あるいは 560 nm を用いる。試料の濃度は、560 nm で測定する場合 15 μM（４量体ヘモグロビン）程度、また 430 nm で測定する場合 4 μM（４量体ヘモグロビン）程度とした。K_1 の値は、酸素平衡曲線のヒルプロットの下の漸近線から求める。

共鳴ラマンスペクトルの測定

共鳴ラマンスペクトルは、JOEL-400D Raman spectrometer を用いて、He/Cd レーザー（Kinmon CDR80SG）の 441.6 nm 励起光で測定する。測定は２０℃、緩衝液は酸素平衡曲線で使用するものと同じとする。試料の濃度は、20 から 80 μM（４量体ヘモグロビン）とし、減圧してデオキシ化する。また、CCl_4 を標準物質として波数を校正した。

光吸収スペクトルの測定

光吸収スペクトルは、Shimazu UV 240 spectrophotometer で記録する。

(iv) 結果

酸素平衡機能

化学修飾された Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと、何も化学修飾されていない混成ヘモグロビンの酸素平衡機能に関するパラメーターは表1に示した通りである。これらの混成ヘモグロビンが示す K_1、即ち、1個目の酸素がヘモグロビンに結合する時の解離平衡定数は、化学修飾の種類や溶液条件によって 200 mmHg から 0.6 mmHg まで変化しており、今までに知られているいろいろなヘモグロビンが示す K_1 の値[19]をおよそカバーすることが可能である。また表1には、α サブユニットの示す K_1 の値 ($K_1\alpha$) と、β サブユニットの示す K_1 の値 ($K_1\beta$) との平均値、$\overline{K_1}$ を載せ、この様な化学修飾をうけた通常の鉄ヘモグロビンが示す K_1 の値と比較してみた。ただし、ここで言う $\overline{K_1}$ は次の式から計算される解離平衡定数の平均値である。

$$\overline{K_1} = 2K_1\alpha K_1\beta / (K_1\alpha + K_1\beta)$$

α_2(Fe)β_2(Ni)は化学修飾を受け酸素親和性が上昇するのに伴い、協同性も強くなる。そして、K_1 が 4 mmHg 位になると協同性は最強となり ($n = 1.4$)、それ以上酸素親和性が高くなると、今度は協同性が減少してゆく。図1に、このようなαヘムの K_1 と n との関係をプロットした。一方、α_2(Ni)β_2(Fe)は化学修飾を受けて酸素親和性が上昇しても、酸素結合に協同性はほとんど見られなかった。

Introduced chemical modification	pH	IHP	$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$			$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$			$\overline{K_1}$	K_1 of HbA derivatives
			$K_{1\alpha}$ (mmHg)	P_{50} (mmHg)	n	$K_{1\beta}$ (mmHg)	P_{50} (mmHg)	n	(mmHg)	(mmHg)
unmodified	6.5	−	73	73	1.0	110	110	1.0	87	55 (pH 6.5)
		+	170	170	1.0	200	200	1.0	180	170 (pH 6.5)
	7.5	−	31	27	1.1	44	44	1.0	36	21 (pH 7.45)
		+	170	170	1.0	220	220	1.0	190	110 (pH 7.45)
	8.5	−	8.2	5.8	1.3	16	16	1.0	11	8.1 (ph 8.5)
		+	40	36	1.2	110	110	1.0	58	32 (pH 8.5)
NES-Cys(β93)	6.5	−	6.5	3.4	1.3	33	30	1.1	11	
		+	120	120	1.0	*	*	*		
	7.5	−	5.4	2.8	1.3	21	18	1.1	8.6	10 (pH 7.4)
		+	51	51	1.0	150	150	1.0	76	77 (pH 7.4)
	8.5	−	2.9	1.5	1.3	12	11	1.1	4.7	
		+	7.0	4.1	1.3	60	60	1.0	12	
des-Arg(α141)	6.5	−	4.3	1.7	1.4	5.7	5.7	1.0	4.9	
		+	19	16	1.0	11	11	1.0	14	
	7.5	−	1.4	0.9	1.2	3.2	3.2	1.0	2.0	2.2 (pH 7.4)
		+	17	13	1.1	7.5	7.5	1.0	10	18 (pH 7.4)
	8.5	−	0.7	0.57	1.1	1.1	1.0	1.1	0.86	0.49 (pH 9.0)
		+	1.3	0.72	1.3	3.1	3.1	1.0	1.8	
NES-Cys(β93)-des-Arg(α141)	6.5	−	0.96	0.74	1.1	*	*	*		
		+	7.2	3.3	1.4	*	*	*		
	7.5	−	1.2	0.83	1.1	3.0	1.7	1.3	1.7	1.26 (pH 7.4)
		+	2.0	1.6	1.1	10	10	1.0	3.4	5.05 (pH 7.4)
	8.5	−	0.62	0.62	1.0	2.0	1.6	1.1	0.95	
		+	0.75	0.65	1.1	1.8	1.8	1.0	1.1	
des-His(β146)-Tyr(β145)	6.5	−	*	*	*	0.78	0.78	1.0		
		+	*	*	*	11.8	11.8	1.0		
	7.5	−	*	*	*	0.68	0.68	1.0		
		+	*	*	*	5.0	5.0	1.0		
	8.5	−	*	*	*	0.81	0.81	1.0		
		+	*	*	*	0.85	0.85	1.0		

表１　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと化学修飾を受けた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡機能に関するパラメーター

測定は、0.1 M Cl を含む 50 mM Tris/HCl、あるいは、Bistris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。測定光の波長は、unmodified と NES-Cys(β93) の測定の場合 430 nm を用い、他の測定の場合は 560 nm を用いた。また、ヘモグロビン濃度は 430 nm で測定する場合約 4 μM（４量体ヘモグロビン）とし、560 nm で測定する場合約 15 μM（４量体ヘモグロビン）とした。

（注１）P_{50} は５０％酸素飽和の時の酸素分圧を mmHg で表したものである。また、$K_1\alpha$ と $K_1\beta$ は、それぞれ、１個目の酸素がαサブユニットに結合する時の平衡定数を mmHg で表したものと、１個目の酸素がβサブユニットに結合する時の平衡定数を mmHg で表したもののことで、これらの値の平均値 $\overline{K_1}$ は次の式から計算される値である。

$$\overline{K_1} = 2K_1\alpha K_1\beta \ / \ (K_1\alpha + K_1\beta)$$

（注２）化学修飾を受けたヘモグロビンＡのデーターは、Imai、Kilmartin、と Jones の未発表データーと文献[19]のデーターを使った。また、ヘモグロビンＡのデーターは、第２章の図６と同じものである。測定は、全て２５℃、0.1 M Cl を含む 50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液で pH の値は括弧の中に示した。

（注３）測定中、メト化の著しい試料のデーターは棄却した。

（注４）des-His(β146)-Tyr(β145) $\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$は少量しか調製しなかったため、低ヘモグロビン濃度での定性的な測定しか行えなかった。定性的には、β置換の混成ヘモグロビンより、全ての pH で酸素親和性はかなり低くなっているようである。

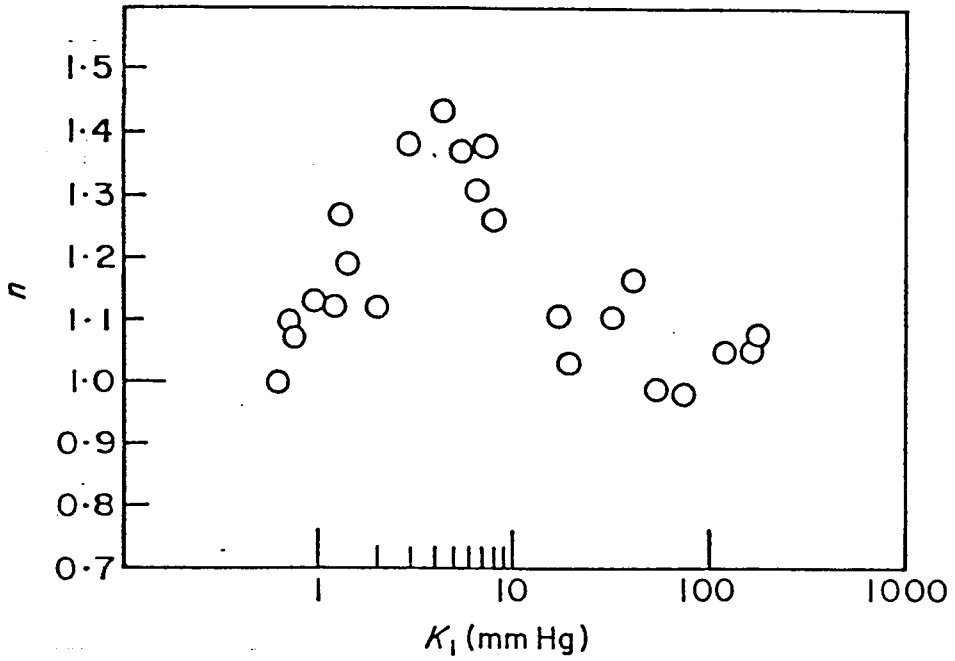


図１　α_2(Fe)β_2(Ni)と化学修飾を受けたα_2(Fe)β_2(Ni)の K_1 (mmHg) と n の関係

測定条件等は、表１と同じ

Fe-Nε伸縮振動の共鳴ラマン線

441.6 nm の励起光による共鳴ラマン散乱は、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中の鉄サブユニットを選択的に測定するのに都合がよい（デオキシ鉄サブユニットの吸収極大は 430 nm、Ni(II)サブユニットの吸収極大は４配位状態と５配位状態で、それぞれ、398 nm と 420 nm にある）。図２は、観測された Fe-Nε伸縮振動の波数と K_1 の関係をそれぞれのサブユニットについてプロットしたものである。

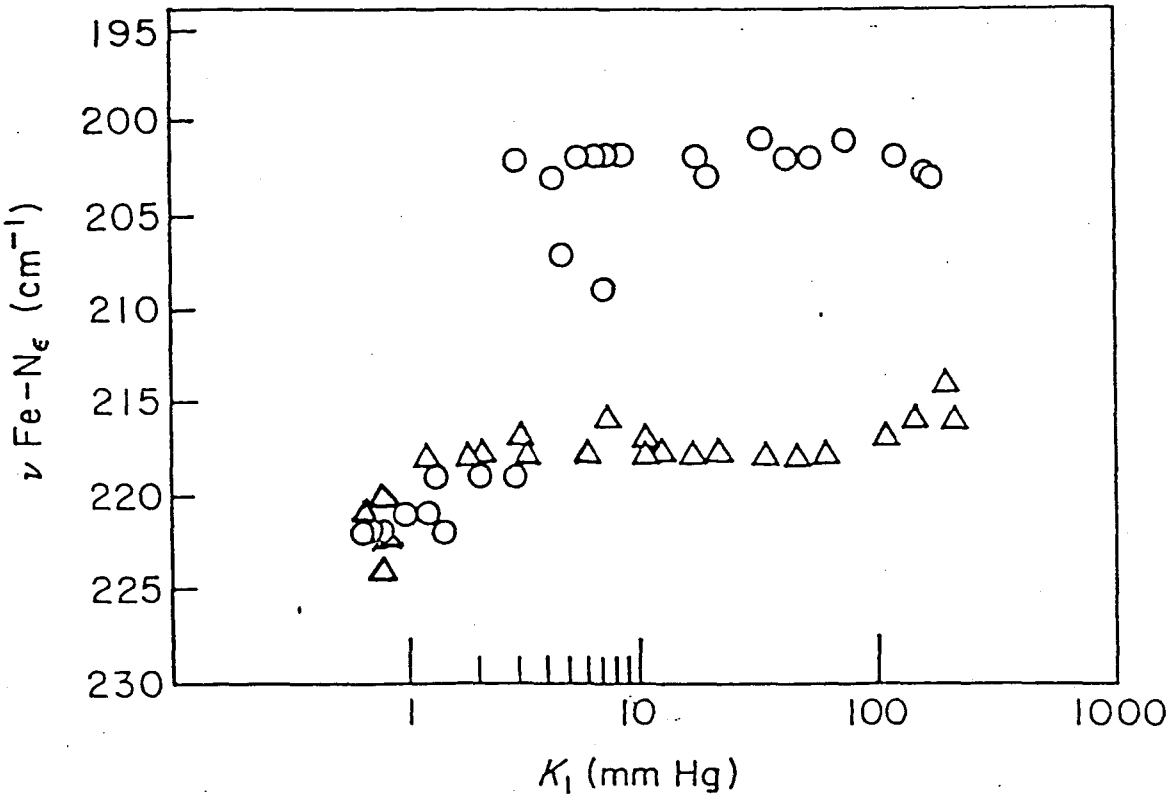


図２　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと化学修飾を受けた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの K_1 (mmHg) と ν (cm⁻¹) との関係：（○）混成ヘモグロビン中 α(Fe)サブユニット；（△）混成ヘモグロビン中 β(Fe)サブユニット

K_1 は表１の値を用いた。また、ν［ Fe-Nε(His F8) 伸縮振動のラマン線のピークの波数 (cm⁻¹) ］の測定条件は、温度が２０℃で、ヘモグロビン濃度が 20 ～ 80 μM（４量体ヘモグロビン）である点を除けば、表１の酸素平衡曲線測定と同じ。

まず、αヘムでの変化について見てみると、K_1 ＞ 5 mmHg の時 Fe-Nε伸縮振動のラマン線の波数（ν）は 201-203 cm⁻¹ となり、 K_1 ＜ 2 mmHg の時 ν = 220-221 cm⁻¹ となる。ここで、201-203 cm⁻¹ のラマン線は 220-221 cm⁻¹ のものと比較してかなり線幅が広くなっていて、210 cm⁻¹ あたりに少し肩らしきものが見えるのが特徴である。また、酸素親和性がこれらの中間的な値となる時、つまり 3 mmHg ＜ K_1 ＜ 6 mmHg の時、ラマン線は更に線幅の広いピークの位置のはっきりしない平な形になることが多い。これら、αサブユニットで観察される典型的な３種類のラマン線の形は図３(a)に示した。ここで、中間的な酸素親和性の時の平な形をしたラマン線は、単一のピークから成るラマン線と考えるには線幅が広過ぎるので、どうやら、酸素親和性の低い時現れるラマン線と酸素親和性

の高い時現れるラマン線とが、ある比率で混じり合ったものと考えるのが良さそうである。

次に、βヘムについて見てみると、K_1 ＞ 1 mmHg の時、それほど目だった変化は無くて、IHP の存在しない時 ν = 214-216 cm^{-1}、また IHP の存在する時 ν = 216-218 cm^{-1} となる。そして、K_1 ＜ 1 mmHg になると（今回、行った化学修飾法では、des-His(β146)-Tyr(β145) α_2(Ni)β_2(Fe)のみ）、ラマン線の高波数側への小さなシフトが観測され ν = 220-224 cm-1 となる。また、βサブユニットのラマン線では、上述のαサブユニットの様な形の変化は見られず、ほとんど同じ線幅をしている。βサブユニットで観察される典型的なラマン線の形は図３(b)に示した。

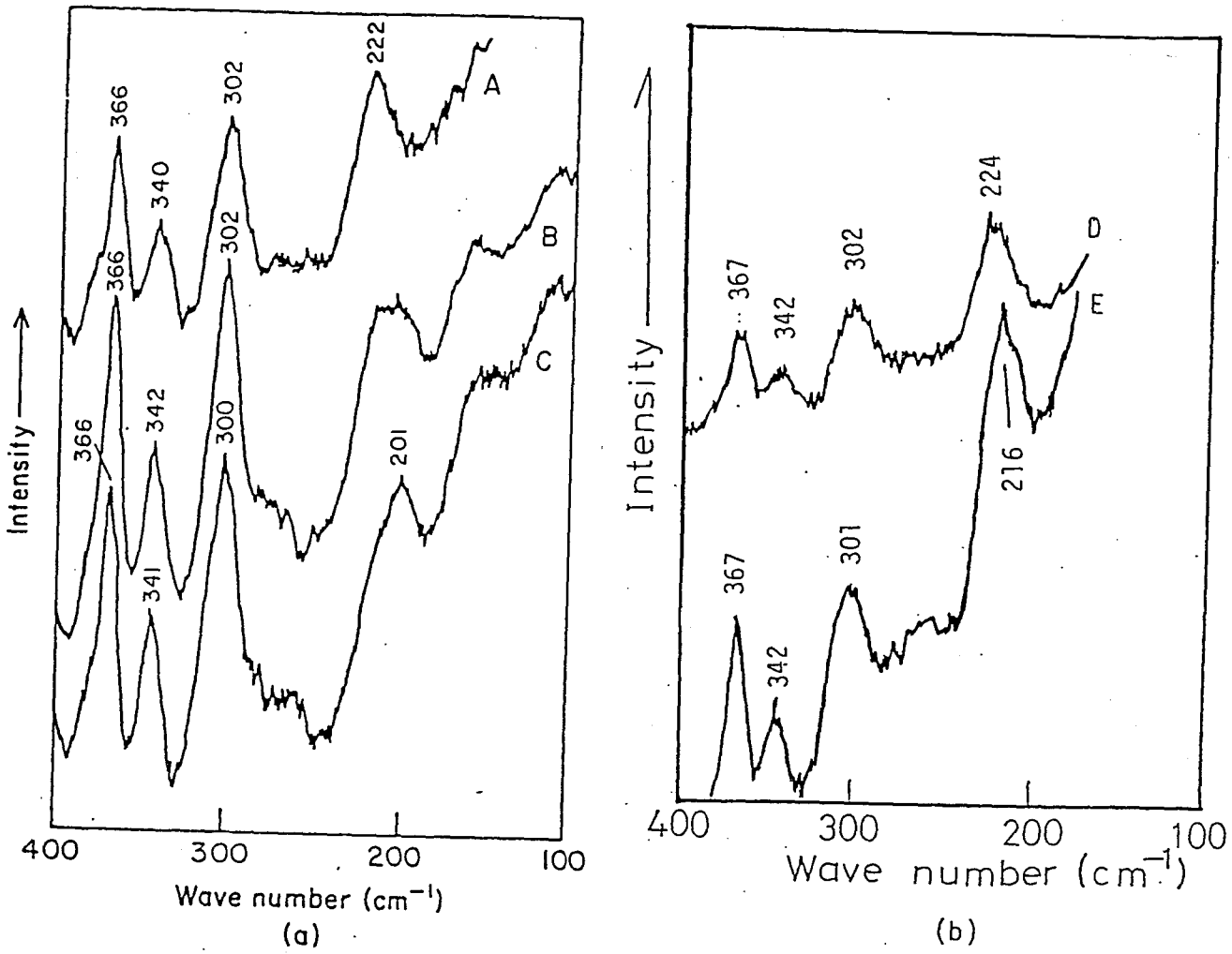


図３　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンと化学修飾を受けた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの共鳴ラマンスペクトルの典型的な例 ： (a) 混成ヘモグロビン中 α(Fe)サブユニットの共鳴ラマンスペクトル ； (b)混成ヘモグロビン中 β(Fe)サブユニットの共鳴ラマンスペクトル

A) des-Arg(α141) α_2(Fe)β_2(Ni)　pH 8.5 の条件 (K_1 = 0.7 mmHg).

B) NES-des-Arg(α141) α_2(Fe)β_2(Ni)　2 mM IHP の存在する　pH 7.5 の条件 (K_1 = 2.0 mmHg)

C) α_2(Fe)β_2(Ni)　pH 6.5 の条件 (K_1 = 73 mmHg)

D) des-His(β146)-Tyr(β145) α_2(Ni)β_2(Fe)　pH 8.5 の条件 (K_1 = 0.8 mmHg)

E) α_2(Ni)β_2(Fe)　pH 6.5 の条件 (K_1 = 106 mmHg)

測定は、0.1 M Cl を含む、50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液中、２５℃ で行った。励起用レーザーの波長は、441.6 nm とした。

化学修飾されたα_2(Ni)β_2(Fe)の光吸収スペクトル

第２章で詳しく述べたように、α_2(Ni)β_2(Fe)中のα(Ni)サブユニットはソーレー帯に２つの吸収極大を持っている。１つは、４配位型 Ni-PP 由来の 398 nm、もう１つは５配位型 Ni-PP 由来の 420 nm の吸収極大である。図４に、化学修飾によって酸素親和性が高くなった Nes-des-Arg(α141) α_2(Ni)β_2(Fe)と、何も化学修飾されていない酸素親和性の低いα_2(Ni)β_2(Fe)とを光吸収スペクトルで比較してみた。こうやってみると、酸素親和性の高いものでは、酸素親和性の低いものと比べて、５配位型の Ni-PP が増加していることが解る。

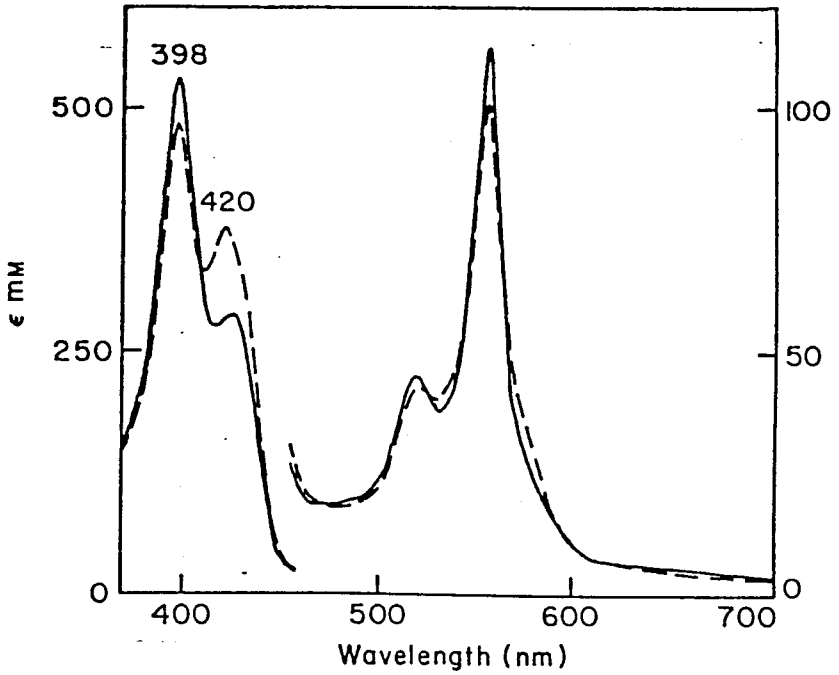


図４　デオキシα_2(Ni)β_2(Fe)（実線で表した方、pH 7.5、K_1 = 31 mmHg）とデオキシ NES-des-Arg(α141) α_2(Ni)β_2(Fe)（破線で表した方、pH 7.5、K_1 = 1.2 mmHg）の光吸収スペクトル

測定は、0.1 M Cl を含む pH 7.5 の 50 mM Bistris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。

図５では、色々な酸素親和性を持つα_2(Ni)β_2(Fe)について、398 nm と 420 nm の吸収の比と、β(Fe) の示す K_1 の値をプロットしてみた。ここで、β(Fe)サブユニットの吸収スペクトル変化は、現在問題にしているα(Ni)の吸収スペクトル変化と比べてはるかに小さいので[81]、β(Fe)の吸収変化が吸収比に及ぼす影響はこの場合無視できる。さて図から明らかに、酸素親和性が K_1 の値にして 6 mmHg 以下になると、420 nm の吸収が増加し、398 nm の吸収が減少し始めることが解る。

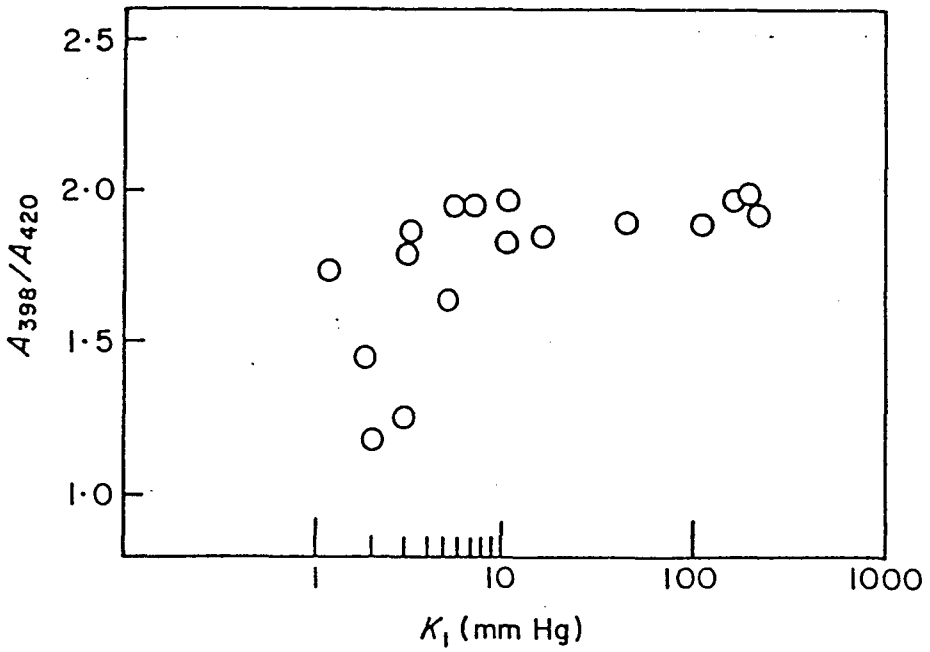


図５　デオキシα_2(Ni)β_2(Fe)、デオキシ des-Arg(α141) α_2(Ni)β_2(Fe)、とデオキシ NES-des-Arg(α141) α_2(Ni)β_2(Fe) が示すソーレー帯の２つの吸収極大の比（A_{398}/A_{420}）とβ(Fe)サブユニットの酸素親和性（K_1）とのプロット

測定条件は、表１と同じ。

（v）考察

第２章では、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の結果から、Ni-PP がデオキシヘムのモデルとして使えることを示した。また、今回の酸素平衡曲線の測定結果を見ると、$K_1\alpha$と$K_1\beta$との平均値、即ち、$\overline{K_1}$ がそれぞれ対応するヘモグロビンの K_1 の値とよく一致しているので、タンパク部分が化学修飾されたヘモグロビン中でも Ni-PP は、立派にデオキシヘムのモデルとして機能していることが解る（表１参照）。また、今回用いた化学修飾法は、ヘモグロビンの構造をデオキシ型構造からオキシ型構造へと連続的に変化させることが可能であるので、Ni-PP のデオキシヘムのモデルとしての良さは第２章で議論したデオキシ型構造中での話に留まらず、オキシ型構造中においても、また更に、デオキシ型構造とオキシ型構造との相対的安定性が微妙になっている場合についても保証されたことになる。

同様な化学修飾を用いた実験は、Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンについても行われている[52][92][93]。 第１章で紹介したように、 α_2(Fe)β_2(Co) はデオキシヘモグロビンのモデルとして使ってもよさそうなので、 des-Arg(α141) α_2(Fe)β_2(Co)[52]と des-His(β146) α_2(Fe)β_2(Co)[92]の K_1 の値は、それぞれ、des-Arg(α141) α_2(Fe)β_2(Ni)と NES α_2(Fe)β_2(Ni)の結果と比較できそうである（NES ヘモグロビン と des-His(β146) ヘモグロビンは、構造的には His(β146) - Asp(β94) の水素結合が形成できなくなっているという点で似ているし、酸素平衡機能の面から見ても、同一条件下で非常によく似た K_1 を示すことが知られている[19]）。 さて実際に K_1 の値を比較してみると、des-Arg-(α141) α_2(Fe)β_2(Co)は des-Arg(α141) α_2(Fe)β_2(Ni)より少し酸素親和性が高くなっていて、des-His(β146) α_2(Fe)β_2(Co)は NES α_2(Fe)β_2(Ni)より少し酸素親和性が低くなっているが、どちらの場合もその差はそれほど大きなものではない。一方、α_2(Co)β_2(Fe)は第１章で述べたとうり、デオキシヘモグロビンのモデルとしては無理があるので 、化学修飾を受けたα_2(Ni)β_2(Fe)と比較可能な混成ヘモグロビンのデーターは今のところない。

表１から解るように、これら化学修飾がそれぞれのサブユニットの酸素親和性に与える影響の差は、NES の場合を除いて、それ程大きくないようである。NES

は、αサブユニットの K_1 に与える影響は大きく、βサブユニットのそれに対して 2 倍から 3.5 倍の酸素親和性上昇が見られる。これは、デオキシ型構造ヘモグロビンに対する NES の影響である。一方、Kilmartin らの報告[34]によると、単離β鎖に与える NES の影響は、3.3 倍の酸素親和性低下という形で現れるらしい。これは、オキシ型構造ヘモグロビンのβサブユニットに対する NES の影響と考えられる。今、NES がオキシ型構造中のαサブユニットに与える影響が無視できるとするなら、NES がデオキシ型構造中のそれぞれのサブユニットに与える影響の比は、オキシ型構造の場合とほぼ等しくなると言える。

今回、des-His(β146)-Tyr(β145) α_2(Fe)β_2(Ni)は少量しか調製しなかったので、信頼できる高（ヘモグロビン）濃度での酸素平衡曲線が測定できなかった。しかし、低濃度の測定結果を見ると、定性的には、des-His(β146)-Tyr(β145) α_2(Ni)β_2(Fe)よりかなり酸素親和性は低くなっているようである。ここで、他の化学修飾を加えた Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンでは、全ての場合、αサブユニットの方が高い酸素親和性を示しているので、des-His(β146)-Tyr(β145)は、特にβサブユニットに与える影響が大きいと言える［このことは、第４章付録（２）で再びとりあげる］。

αサブユニットにおける Fe-Nε伸縮振動ラマン線は、デオキシ型構造のヘモグロビンでは 201-203 cm^{-1} に、オキシ型構造のヘモグロビンでは 220-221 cm^{-1} にそれぞれ観測される。また、この両者の間の転移は K_1 = 3 mmHg 位の時に起こる（図２参照）。一方、βサブユニットの Fe-Nε伸縮振動ラマン線は K_1 < 1 mmHg の時、少し変化するようである。 今までにも 、Fe(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビン（ヘモグロビン M を含めて）[83]や Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン[84]を使って Fe-Nε伸縮振動ラマン線をαサブユニット、βサブユニット別々に観測した実験報告がある。これらの試料の酸素平衡曲線は系統的に測られていないので、構造変化を起こす時の酸素親和性の比較はできないが、それぞれのサブユニットがそれぞれの構造中にある時示すラマン線の形、波数は今回の結果とよく一致している。

αヘムの Fe-Nε伸縮振動ラマン線は、およそ２種類の状態に大別できることが今回の実験から結論される。この結果は、近位ヒスチジンのイミダゾール NδH の常磁性シフト NMR が、αヘムでは２種類に大別できること[80]と対応している。

また、3 mmHg < K_1 < 5 mmHg の時、観測されるブロードな Fe-Nε伸縮振動ラマン線は両者の混ざり合ったスペクトルとして説明した（図３参照）。このことは、αヘム近傍が微妙な状態になっているヘモグロビンでは、NδH の常磁性シフトを受けた NMR シグナルも同様に、異なる化学シフトを持つ２種類のシグナルに分裂することと対応している。一方、これらの結果に矛盾する報告例もある。それは、色々な異常ヘモグロビンの酸素親和性と Fe-Nε伸縮振動ラマン線の波数を測定したところ、ラマン線の波数は酸素親和性に対し連続的に変化したという報告である[97]。しかしながら、この測定はα及びβサブユニットのスペクトルを分離せずに解析しているので、デオキシ型構造中αサブユニットのスペクトルが他の場合より線幅が広くなること、それに加えて、αサブユニットの示す波数変化がβサブユニットのそれより大きいことが、全体のスペクトルに微妙に影響して、このような誤った結果を導いたと思われる。

今回得られた結果は、αヘムの構造が２種類に大別できることなどから、一見、２状態モデル[5]を支持しているように見える。しかしながら、２状態モデルでヘムの構造変化と酸素親和性の関係を記述しようとすると、いろいろと矛盾が生じてくる。例えば、図１で出てくる極大値の位置、つまり、協同効果が最大となる時の K_1 の値は、２状態モデルからの予想より、かなり酸素親和性が高い所にきている。αサブユニットの Fe-Nε伸縮振動ラマン線は２種類に大別できたので、これらを２状態モデルで言うところの R 状態、T 状態と仮定するなら、この両者の転移が起きる時に、図１での n 値は殆ど１近くまで減少していなければならない[78]。しかし実際には、n 値がまだかなり大きい時にラマン線の波数変化が起きている。次に、Matukawa ら[98]や Imai[99] によって提唱されている、２状態モデルのパラメーターである C（ = K_R/K_T）と L（ = $[T_0]/[R_0]$）との相関関係、具体的には、C の増加は L の減少を伴うという仮定を受け入れると、n 値が最大となる K_1 の値は多少、高酸素親和性側に移動してもよいことになる。しかし、ラマン線の波数変化との対応関係から生ずる矛盾は解消される訳ではない。一番理解しやすい例を挙げると、des-Arg(α141) α_2(Fe)β_2(Ni) は、pH 8.5、IHP 無しの溶液条件で、n = 1.3 の強い協同的酸素結合を示すが、ラマン線の方は既に R 状態に近い領域、219 cm^{-1}、付近に観測されている（この時、201 cm^{-1} に小さな肩が観測されるので T 状態が全く残っていない訳ではないが、これくらい

の存在比から大きな協同性を期待するは無理がある）。

さて次に、α_2(Ni)β_2(Fe)の方を眺めてみよう。第２章で述べた様に、pH 8.5、IHP 無しの溶液条件でα_2(Ni)β_2(Fe)は酸素結合に協同性を示さないにも関わらず、αサブユニットでは Ni-PP の配位数が変わるという、２状態モデルでは説明しにくい現象が起きている。これとは対照的に、化学修飾でα_2(Ni)β_2(Fe)の酸素親和性を除々に上げていくと、初めのうちは、αサブユニット中 Ni-PP の配位数を変えずにβ(Fe)の酸素親和性を変化させることになる（図５参照）。そして、酸素親和性が上がって、 K_1 ＜ 7 mmHg 位になると Ni-PP の配位数も４配位から５配位へと変わり始める。この時、化学修飾はαサブユニットのヘム周辺に影響を与え、βサブユニット間のヘム間相互作用には全く影響を与えなかったことになる。これも、２状態モデルでは考えにくい現象である。

第４章 プロトン核磁気共鳴法による Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの研究

(i) 概要

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン、Ni(II) ヘモグロビン、及び通常のデオキシ Fe(II) ヘモグロビンは、デオキシ４次構造特有の水素結合から生ずる 11 ppm と 14 ppm [3-(trimethylsilyl)propionate という標準物質から低磁場側へ数えた化学シフトの値] のプロトンシグナルを示すことが解った。また、これらのプロトンシグナルは、pH 6.5 から 8.5 の間でほとんど変化しない。以上の結果は、ポルフィリンがタンパクの４次構造に与える影響という点から見ても、Ni-PP はデオキシヘムのモデルとして妥当であることを示唆している。

２個の CO が α_2(Fe)β_2(Ni)に結合すると、11 ppm と 14 ppm のシグナルは共に消失して、新たに、オキシ４次構造特有の水素結合シグナルが出現する。また、こういった変化は、pH 6.5 から 8.5 の間でみられる。一方、α_2(Ni)β_2(Fe)の CO 結合に伴う４次構造変化は pH 依存性が大きく、pH の低い時 CO 結合の影響はほとんど無く、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)でも 11 ppm と 14 ppm は完全な形で観測される。そして、pH が上がるにつれ構造変化は大きくなり、両シグナルの強度は次第に低下する。また、この様なリガンド結合に伴うサブユニット界面の状態変化と、第２章で述べた酸素平衡の協同性との関係は２状態モデルではうまく説明できないことが解った。

光吸収スペクトルと常磁性シフトのプロトンシグナルの関係から、先に述べた Ni-PP の配位数変化は Ni-PP のスピン変化を伴うことが示された。４配位、及び、５配位 Ni-PP は、それぞれ S = 0 の低スピン状態と S = 1 の高スピン状態に対応する。第２章の結果と合わせると、βサブユニット中の Ni-PP は、ヘモグロビンの構造に依らず５配位高スピン状態なので、常に近位ヒスチジン NδH の常磁性シフトが観測される。また、この常磁性シフトの大きさと NδH シグナルの線幅は、ヘモグロビンの構造がデオキシ型からオキシ型に変わる時変化し、同時にβ(Ni)サブユニットの光吸収スペクトルも少し変化する。一方、αサブユニ

ット中の Ni-PP は、デオキシ型構造中でほとんど全部が４配位低スピン状態、また、オキシ型構造中では５配位高スピンがかなり混ざってくる。したがって、ヘモグロビンの構造変化が引き起こすα(Ni)の常磁性シフト NδH シグナルの変化は、そのシグナル強度の変化として観測される。

ポルフィリン環によるリングカレントシフトを受けた E11-Val のプロトンシグナルの測定を Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンについて行った。ヘモグロビン４次構造変化に伴う Fe(II)-CO サブユニット中 E11-Val の動きは、βサブユニットで顕著に見られたが、αサブユニットではほとんど観測されなかった。また、Ni(II) を含むサブユニットでみられるリングカレントシフトを受けたプロトンシグナルの解析から、デオキシ型構造のヘモグロビンでは、E11-Val と他にもう１つ、メチル基を持つアミノ酸残基がポルフィリン周辺に存在することが解った。そして、このもう１つのアミノ酸残基は、オキシ４次構造中ではポルフィリン面から比較的離れた位置に存在するようである。

（ii）序論

第２、３章で、Ni-PP はデオキシヘムのモデルとして妥当であることを示した。この章ではαヘム、あるいはβヘムにリガンドが結合した時のヘモグロビンの構造変化を調べる目的で、プロトン核磁気共鳴（プロトン NMR）を用いて Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの構造を調べた。今回は、ヘモグロビンの構造を知る上で重要と思われる、いくつかのプロトンシグナルについての測定を行ったので、それぞれの測定から何が解るか簡単に説明を加えることにする。

先ず、ヘモグロビンの構造変化に伴い出現、あるいは消失するような重水交換可能な水素結合プロトンが重要である。その中でも、Tyr、Trp、Phe 等のアロマチックなアミノ酸残基の関与する水素結合プロトンは、溶液のプロトンよりわずかに低磁場側へシフトして検出されるので、圧倒的な強度を示す溶液中の水のプロトンシグナルに埋もれず、分離して観測することが可能となる。Ho らのグループは、異常ヘモグロビンと通常のヘモグロビンのスペクトルの相違から、これら

の水素結合プロトンの同定を試みている[100]-[102]。先ず、通常のデオキシヘモグロビンのスペクトルを眺めてみると、3-(trimethylsilyl)propionate (TSP) という標準物質から低磁場側へ 11 ppm、12.1 ppm、12.9 ppm、14 ppm と、約 1 ppm おきに強度の等しい４本のシグナルが観測される[100]（以下、何もただし書き無しで化学シフトを記述する場合は全て TSP からの化学シフトとする）。これらのシグナルのうち、中間の２本のシグナルはオキシヘモグロビンにも共通に見られるので[100]、ヘモグロビンの構造変化に依らない水素結合プロトンシグナルである。これら 12.1 ppm 及び 12.9 ppm シグナルは、それぞれ、α1 His(103) -β1 Asn(108)[103]と α1 Asp(126) - β1 Tyr(35)[101]由来のシグナルと同定されている。そして、14 ppm に現れるデオキシ型構造特有のプロトンシグナルはα1 Tyr(42) とβ2 Asp(99) の間に存在するサブユニット間水素結合由来のものと同定されている[100]。またこれは、ヘモグロビンの４次構造変化に伴い変化するスイッチ領域の水素結合にあたるので（第１章参照）、デオキシ型４次構造の標識として使うことができる。さらに、11 ppm に現れるデオキシ型構造特有のプロトンシグナルは、βサブユニット内のβ145 Tyr とβ98 Val の間の水素結合から来ると一応説明されているが[102]、この同定の根拠は薄い（付録２参照）。一方、オキシヘモグロビンでは、オキシ型構造に特有な水素結合シグナルが約 10.6 ppm に現れる。この 10. 6 ppm のシグナルは、α1 Asp(94)-β2 Asn(102) の水素結合プロトンと予想されているが[100]、決定的な証拠は無い。以上をまとめると、ヘモグロビンの構造変化を議論する場合、14 ppm、11 ppm、及び 10.6 ppm シグナルの挙動に注目しなければならない。

次に、ポルフィリン中心に常磁性金属イオンが入っている場合、その不対電子がポルフィリン上あるいは、ポルフィリン近傍のプロトンと相互作用することにより、もともとの化学シフトとは異なる位置にそれらのプロトンシグナルが観測されることがある。このような現象は常磁性シフト（超微細シフト）と呼ばれ、ヘモグロビンの場合、近位ヒスチジンの NδH （以下 NH と略す）とヘムメチル基のシグナルが有名である。常磁性シフトの起こるメカニズムには大きく分けて２種類ある。１つは直接的相互作用で、化学結合を介して不対電子の電子密度が移動することにより起こる。もう１つは、間接的相互作用で、空間的にスピン間の相互作用が働くことにより起こる。いずれの場合にせよ、常磁性シフトの大さ

は、絶対温度に逆比例し S(S+1)（S は、常磁性金属イオンの総スピン数）に比例するような量である。ここで、通常の Fe(II) を含むヘモグロビンは、デオキシ状態の時、高スピン常磁性となり、近位ヒスチジン NH の常磁性シフトが観測される。αサブユニットとβサブユニットの NH シグナルは、それぞれ、TSP から低磁場側に 63.6 ppm と 76.7 ppm とに分離して現れる[104]-[106]。これらのシグナルに見られる非常に大きな常磁性シフトは、Fe(II) とヒスチジンの結合を介しての直接的相互作用によるところが大きい。したがって、常磁性シフトの大きさは Fe(II) とヒスチジンの結合の強さの指標になる[104]-[107]。例えば、鉄の配位状態がデオキシになっても酸素親和性の高い構造をとる異常ヘモグロビンや化学修飾ヘモグロビンでは、αサブユニットの NH シグナルが通常のデオキシヘモグロビンと比較して低磁場側へ 10 - 14 ppm シフトする[80]。一方、この様なヘモグロビンのβサブユニットの NH シグナルには、目だった変化は観測されない[80]（ただし、例外的に des-His(β146)-Tyr(β145) ヘモグロビンでは、約 5 ppm の低磁場側へのシフトが観測されている[108]）。これは、αサブユニットの Fe(II) とヒスチジンとの結合が、ヘモグロビンの構造変化に対し敏感に変化することから説明される（４４頁参照）。

近位ヒスチジン NH よりかなり高磁場側、TSP から低磁場側へ 10 - 30 ppm あたりが、ヘムメチル基の常磁性シフトの現れる領域である。デオキシヘモグロビンのヘムメチル基の常磁性シフトシグナルは非常に複雑な形をしているが、TSP から 10 ppm 低磁場側のシグナルがαヘム由来、また、TSP から 25 ppm 低磁場側のシグナルがβヘム由来のものと言われている[106][109]。そして、この領域のスペクトルのパターンはヘモグロビンの構造変化に対応して大きく変化する。また、Fe(III) ヘムを含むヘモグロビンでもヘムメチル基の常時性シフトシグナルが観測され、オキシ型構造とデオキシ型構造とではスペクトルのパターンは異なる[46]。

一方、酸素とか一酸化炭素の結合したヘモグロビンでは、ヘム鉄が低スピンとなるので、常磁性シフトシグナルは消失する。その代わり、ポルフィリン環上のπ電子系から生じる局所磁場の影響で、ポルフィリン面に近いアミノ酸残基のプロトンが２次的なシフトを受ける[110][111]。これが、リングカレントシフトである。リングカレントシフトの大きさは、注目するプロトンとポルフィリン面と

の間の距離や角度といった空間的パラメーターに依存した量なので、ポルフィリン面との相対的な位置関係を議論するのに有効となる。特に、ヘモグロビンでは、E11-Val の γ_2メチル基がヘム面に近接しているため、高磁場側へ比較的大きなシフトを示す[112]-[114]。また、この E11-Val は、Perutz の提唱する立体化学的メカニズム[36]で重要な意味あいを持つ残基の１つで、 βサブユニットでは E11-Val の側鎖の酸素に対する立体障害がヘムの酸素親和性をコントロールしていると言われている。また、通常のデオキシヘモグロビンではヘム鉄の常磁性の影響で、この様なリングカレントシフトを受けたプロトンのシグナルを観測することができない。したがって、現在までのところ、第６配位座が空のヘモグロビンでこの様なリングカレントシフトの測定をした例は、Zn(II) ヘモグロビンを使った実験が１例[10]あるだけである。今回の測定では、Ni(II)サブユニットで観測されるリングカレントシフト領域のスペクトルを Zn(II) ヘモグロビンのそれと比較しながら説明することと、Fe(II)-CO サブユニットで観測される E11-Val のメチルシグナルの、４次構造変化に対する変化を調べることを目的にしている。

これら数種のプロトン NMR 測定を Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンに適用すれば、リガンド結合に伴うヘモグロビンの４次構造変化とローカルな構造変化との関係、あるいは、酸素平衡機能との関係が議論できる。そして、２状態モデル[5]で CO が２個結合した中間状態ヘモグロビンの構造を表現する時、生じる矛盾点について議論する。

（iii）実験方法

Ni(II) ヘモグロビンと Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製法は、第２章で述べた通り。プロトン NMR スペクトルは、ASPECT 2000A computer system で制御された Bruker WH-360 spectrometer を用いて 360.04 MHz で測定した。測定は、すべてパルスフーリエ変換法で行う。理論的には、90 ° パルスの後の自由誘導信号（FID）をフーリエ変換してやれば NMR スペクトルは得られるが[115]、そのままでは溶液中の水のプロトンシグナルが強くなり過ぎて、タンパク中に１、２個しか存在しない注目すべきプロトンシグナルは観測することが不可能となる。ただ、重水と交換しないプロトンシグナルについては、あらかじめ重水で溶液を置換しておいてやれば不必要な水のシグナルを除去することが可能である。しかし、我々の興味のある水素結合プロトンや近位ヒスチジンの NH は短時間で重水と交換してしまうので、この様な方法を用いることができない[3]。そこで、種々のパルス系列を用いて水のシグナルの相対強度を下げる工夫が必要となってくる。今回の実験では、水素結合プロトンとリングカレントシフトを受けたプロトンについては、Redfield 2-1-4 パルス系列[116]を用い測定した。この様にして得られた FID は、256 を１ブロックとして、４から８ブロック積算する。また、ラインブロードニングは 3 Hz とした。一方、常磁性シフトを受けたプロトンについては、superWEFT（WEFT は Water Eliminated Fourier Transform の略）パルス系列[117]を用いた。この様な方法で得られた FID は、1024 を１ブロックとして、３２から１２８ブロック積算する。またこの時のラインブロードニングは 20 Hz とした。

α_2(Ni)β_2(Fe-CO)（2 mM IHP 存在下）のリングカレントシフト領域の NOESY（２次元 NOE スペクトル ： NOE は核オーバーハウザー効果のこと）は、Dalvit と Ho の方法[114]に添って、この場合のみ 600 MHz の spectrometer で測定した。

NMR 測定に使用した緩衝液は 100 mM Cl を含む 50 mM Tris あるいは、50 mM Bistris 緩衝液で、約５％の重水を含むようあらかじめ調製したものである。ただし、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)（2 mM IHP 存在下）のリングカレントシフト領域の

NOESY には、pD 7.2 の 50 mM Phos/Na 重水緩衝液を用いた。 測定は、原則的に２０℃で行い、試料の濃度は 0.5 - 1.0 mM（４量体ヘモグロビン）とした。また、化学シフトを正確に決めるため、標準物質として p-dioxane を体積にして約 0.05 % 加えて、これとの差を TSP からの読みに換算した（TSP から見た p-dioxane の化学シフトは 3.53 ppm として計算した）。

光吸収スペクトルは Hitachi 557 spectrophotometer で測定し、差スペクトル等の解析は IBM personal computer で行った。使用した緩衝液は、100 mM Cl を含む 50 mM Tris あるいは 50 mM Bistris 緩衝液で、NMR 測定用の緩衝液と基本的には同じである（ただ、重水と p-dioxane の有無が異なる）。試料の濃度は、7.4 μM（４量体ヘモグロビン）とし、測定光路長は 5 mm とした。

(iv) 結果

水素結合プロトン

Ni(II) ヘモグロビン、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン、及び通常の Fe(II) ヘモグロビンの水素結合プロトン領域の NMR スペクトルは図1に示した。これらのヘモグロビンは全て、デオキシ型構造特有の 14 ppm と 11 ppm のシグナルを示している。また、これらの NMR スペクトルは、pH 6.5 から pH 8.5 の間の pH 変化や IHP の有無といった溶液条件の変化に対して全く影響を受けない。

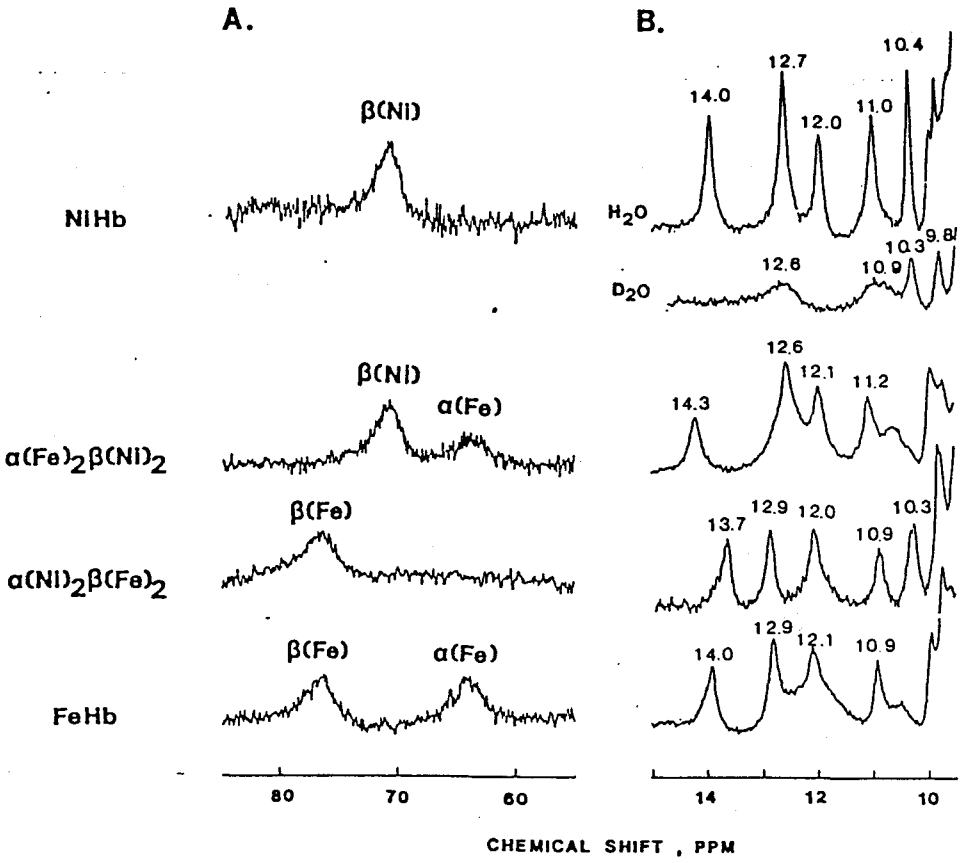


図1 Ni(II)ヘモグロビン、デオキシ α_2(Fe)β_2(Ni)、デオキシ α_2(Fe)β_2(Ni)、とデオキシ Fe(II)ヘモグロビンの示すプロトン NMR スペクトル (360.04 MHz): (A) 常磁性シフトを受けた近位ヒスチジン NδH のシグナル : (B) 水素結合領域のプロトンシグナル

測定は、0.1 M Cl を含む、pH 7.4 の 50 mM Bistris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。

また、各ヘモグロビンでスペクトルの形が多少違う様に見えるが、これは、重水交換不可能なプロトンシグナルが重なっているからである。重水中の Ni(II) ヘモグロビンのスペクトルは、12.6 ppm と 10.9 ppm に観測される比較的ブロードなシグナルと 10.3 ppm と 9.8 ppm に見られる比較的鋭いシグナルとから成る（図１参照）。このうち、２本のブロードなシグナルはβ(Ni)サブユニット由来のもので、２本の鋭いシグナルはα(Ni)サブユニット由来のものであることが、混成ヘモグロビンの重水中スペクトルとの比較から解っている。また、β(Ni)サブユニット由来のブロードなシグナルの化学シフトは顕著な温度依存性を示したが、α(Ni)サブユニット由来の鋭いシグナルは、この様な温度依存性を全く示さなかった。この結果は、これらのシグナルが Ni-PP の側鎖のプロトンから来るもので、β(Ni)サブユニットでは常磁性シフトの影響も加わって少し低磁場側へシフトしていることを示唆している。そして、β(Ni)サブユニットでのみシグナルがブロードになるのは、β(Ni)の常磁性の影響である可能性が強い。

αサブユニットに CO が結合した混成ヘモグロビン、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)、ではデオキシ型構造特有の水素結合プロトンシグナルである 14 ppm と 11 ppm が共に消失しており、オキシ型構造特有の水素結合プロトンシグナルであるところの 10.8 ppm が現れている。この時、11 ppm 付近にブロードなシグナルがある様に見えるが、これは先に述べたβ(Ni)サブユニット由来の重水と交換しないプロトンシグナルである。図２(B) に、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)の水素結合プロトン領域のスペクトルを示した。pH 6.5 から 8.5 の間の pH 変化はこのスペクトルに全く影響を及ぼさないが、IHP を添加すると 14 ppm と 11 ppm が現れ、10.8 ppm は消失する。この IHP が引き起こす大きな変化は pH 6.5 から 7.4 の間で観測されるが、それ以上 pH の高い領域では IHP はあまり効かなくなり、 pH 8.5 になるとヘモグロビンの１０倍量 IHP を加えても目だった変化は観測されない。

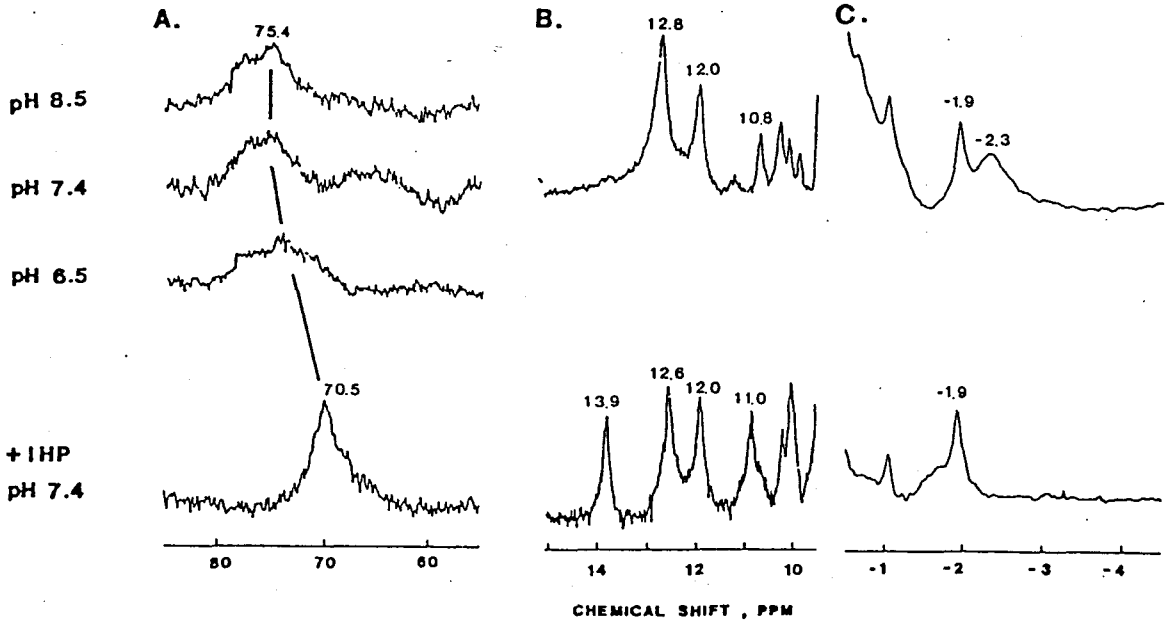


図２　α_2(Fe-CO)β_2(Ni) のプロトン NMR スペクトル (360.04 MHz)：(A) 常磁性シフトを受けた近位ヒスチジン Nδ H のシグナル ；(B) 水素結合領域のプロトンシグナル ；(C) リングカレントシフトを受けたプロトンシグナル

測定は、0.1 M Cl を含む、50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。
（注１） IHP の存在しない時、(B) と (C) のスペクトルは pH 依存性が無い。

βサブユニットに CO が結合した混成ヘモグロビン　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)　の場合は、水素結合の様相が pH によって大きく変化する（図３(A)参照）。pH 6.5 のスペクトルを見てみると、14 ppm も 11 ppm も共に完全な強度で現れている。次に、pH を除々に上げて行った場合、先ず始めに 14 ppm のシグナル強度（積分面積）が減少しだす。そして、pH 7.4 以上になると 14 ppm の強度減少に伴い顕著な線幅の広がりが観測される。また、14 ppm の線幅がかなり広がってから 11 ppm の強度が減少し始め、pH 7.9 位になるとオキシ型構造特有の 10.6 ppm が見え出してくる。また、デオキシ型構造とオキシ型構造に共通なシグナルと言われる 12.9 ppm は、pH 7.9 の時２本のシグナルに割れて見える。試料に IHP を添加すると 14 ppm と 11 ppm の強度が増し pH 7.4 でも完全な形のシグナルが

観測される。ここで、これらのシグナルの示す変化を定量的に評価するには、シグナルの強度とシグナルの線幅との両方から議論しなければならない。一般に、シグナル強度の比較をする時よく用いられる手段は、ベースラインの直線を仮定して、均一な厚さのチャート用紙に書いた各シグナルをはさみで切り離し、その重さを測定してシグナルの積分面積を求めることが多い[43]。実際、この方法を図５(A)に適応して 14 ppm と 11ppm の変化が同期しているかどうか調べてみた。その結果、pH を上げて行った際、14 ppm の変化が先行して起こることは間違いなさそうである。しかし、pH の高い時のシグナル強度の比較は両シグナルの線幅がブロードになっているため非常に難しく（ベースラインのとり方に著しく依存するので）定量的な議論はできない。

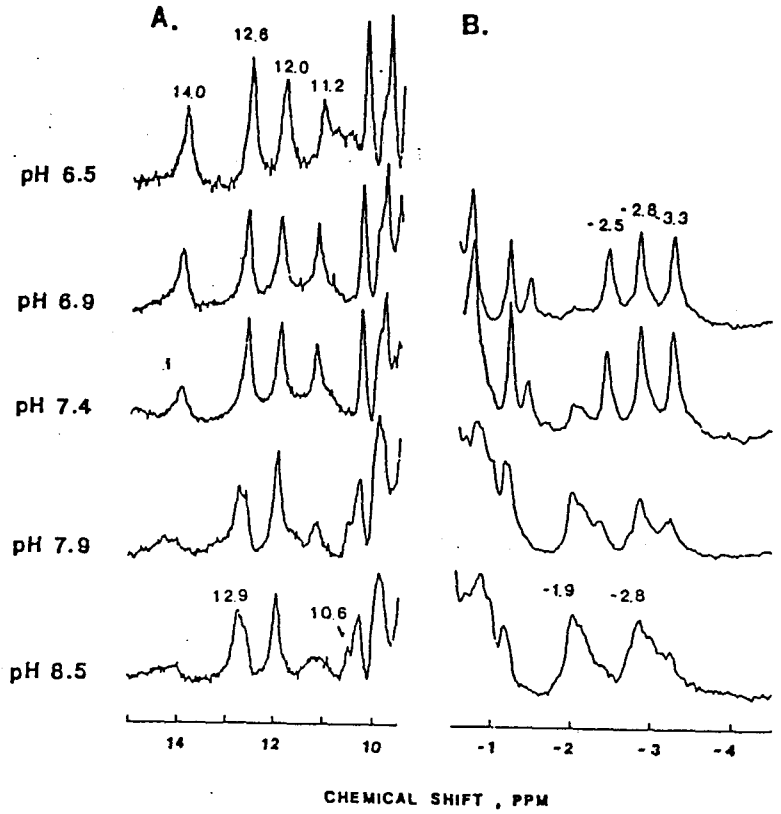


図３　α_2(Ni)β_2(Fe-CO) のプロトン NMR スペクトル (360.04 MHz) ： (A) 水素結合領域のプロトンシグナル ： (B) リングカレントシフトを受けたプロトンシグナル

測定は、0.1 M Cl を含む、50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。

光吸収スペクトル

第２章で、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンが示す光吸収スペクトルの特徴を詳しく述べたので、ここでは NMR スペクトルとの比較に重点を置いて話を進めることにする。既に述べたように、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)中では Ni-PP の配位数が、溶液の pH 変化によって変化し、これに伴い吸収スペクトルが大きく変化する。そこで、図３の NMR 測定で用いたのと同じ溶液条件で吸収スペクトルを測定して、その変化の様子を差スペクトルにして表したのが図４(A)である。これらの差スペクトルは pH 8.5 のスペクトルを基準スペクトルとして引算したものである。図４(A)の差スペクトルで、正の領域に現れるピークは４配位 Ni-PP の吸収から来るもので、負の領域のピークは５配位 Ni-PP の吸収から来るものである。本来、NMR スペクトルとの定量的な比較という目的なら、吸収スペクトルで見てデオキシ型構造のものが何％含まれているか、と言った書き表し方の方が理解しやすいであろう。しかし、現在のところ、完全にオキシ型構造になった時の吸収スペクトルが未知なので、今回の様な差スペクトルによる表現法に変えた（この問題は一見、pH 8.5 の NES-desArg(α141) α_2(Ni)β_2(Fe-CO) 等のスペクトルを持って来れば解決しそうに思われる。しかし、吸収スペクトルを測定するようなヘモグロビン濃度では、これらの試料は、ほとんど２量体に解離しているので、４量体のみのスペクトルを得るのは非常に難しい。また、２量体解離が吸収スペクトルに及ぼす影響については第５章で詳しく述べる）。

α_2(Fe)β_2(Ni)の場合、Ni-PP は pH 変化等の溶液条件や鉄のリガンドの有る無しに依らず常に５配位状態である。第２章で述べたヘモグロビンの構造変化に伴うβ(Ni)の小さな吸収スペクトル変化を差スペクトルにして表現したのが図４(B)である。これは、pH 7.4 のα_2(Fe-CO)β_2(Ni)に IHP を加えた時観測されるスペクトル変化で、ちょうど、図２の上段と下段の状態に対応する。また、この差スペクトルは一見、図４(A)に示した配位数変化による差スペクトルとよく似ているように思われるかも知れない。しかしながら、β(Ni)サブユニットで見られる吸収スペクトルの変化は、ソーレー帯の吸収極大の短波長側へのわずかなシフトとそれに伴う吸収係数のわずかな増加である。これは、配位数変化と言うよりも近位ヒスチジンと Ni-PP との相互作用が少し変化したことによる影響とみた方が良さそうである。

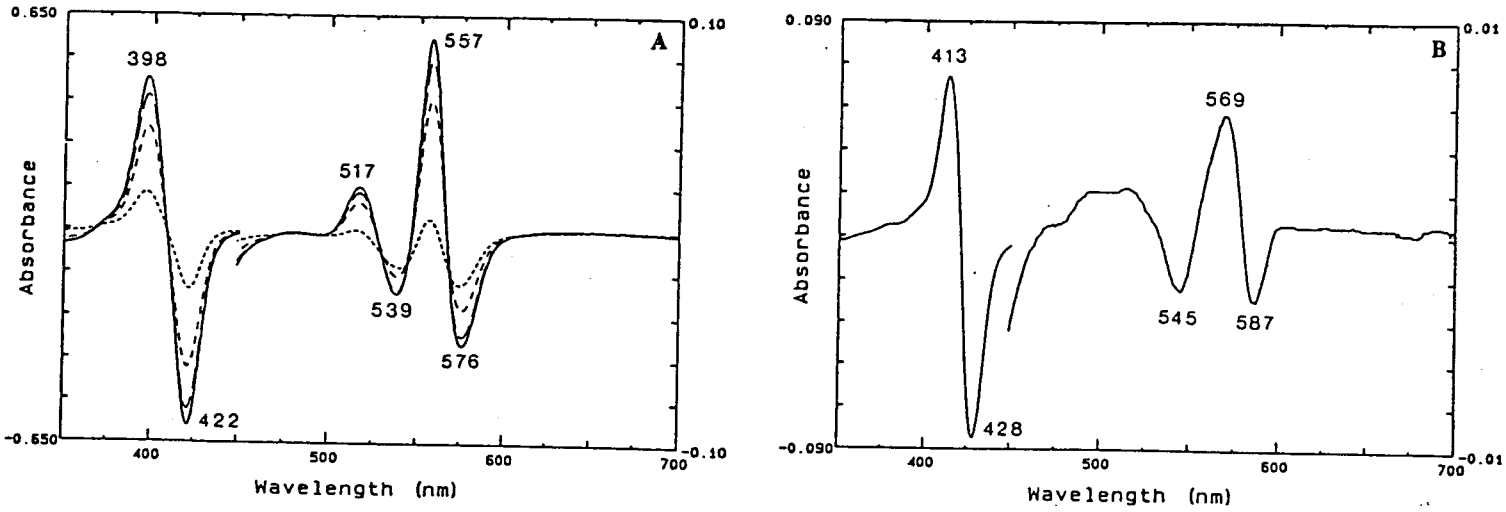


図4 (A) α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光吸収スペクトルの pH 依存性を差スペクトルで表した図 [pH 8.5 の吸収スペクトルを基準にした、pH 6.5 (——)、pH 6.9 (——)、pH 7.4 (- - -)、と pH 7.9 (-----) の吸収スペクトル] ;
(B) IHP を加えた時、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)の光吸収スペクトルに起こる変化を差スペクトルで表した図 (pH 7.4 で IHP が存在しないの時の吸収スペクトルを基準とした、330 μM IHP 存在下の吸収スペクトル)

測定は、0.1 M Cl を含む、50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。ヘモグロビンの濃度は、7.4 μM (４量体ヘモグロビン)、測定光路長は 5 mm とした。

常磁性シフトを受けたプロトンシグナル

常磁性シフトを受けた近位ヒスチジン NH のシグナルは、Ni(II) ヘモグロビン、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン、及び 通常のデオキシ Fe(II) ヘモグロビンで図１(A) のように観測される。先ず、Ni(II) ヘモグロビンとα_2(Fe)β_2(Ni)とでスペクトルを比較してみると、70.5 ppm 付近に共通のシグナルが有ることが解る。また、このシグナルはα_2(Ni)β_2(Fe)や Fe(II) ヘモグロビンでは全く見られないので、常磁性シフトを受けたβ(Ni)サブユニット近位ヒスチジンの NH である可能性が非常に高い。また、この同定をより確かにするため、このプロトンが重水交換可能なこと、そして、化学シフトが温度依存性を示すことを確認した。一方、α(Ni)の近位ヒスチジン NH の常磁性シフトによるシグナルは 25 ppm から 95 ppm の領域で観測されなかった。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中の Fe(II) サブユニットが示す近位ヒスチジン NH の常磁性シフトも、これら４種類のヘモグロビンのスペクトルを比較することにより速やかに同定される。これらの結果は、表１にまとめられている。

	pH	α(Ni)[b]	β(Ni)[b]	α(Fe)[b]	β(Fe)[b]
NiHb	7.4		70.8		
$\alpha(Fe)_2\beta(Ni)_2$	7.4		70.5	63.6	
$\alpha(Fe\text{-}CO)_2\beta(Ni)_2$	6.5		73.0		
	7.4		75.5		
	8.5		75.4		
	7.4 (+IHP)[c]		70.5		
$\alpha(Ni)_2\beta(Fe)_2$	7.4				76.1
$\alpha(Ni)_2\beta(Fe\text{-}CO)_2$	7.4	77.0[d]			
	8.5	77.3			
	7.4 (+IHP)				
FeHb	7.4			64.0	76.4

表１　Ni(II)ヘモグロビンと Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの近位ヒスチジン NδH シグナルの化学シフトの値［ 3-(trimethylsilyl)propionate からの化学シフトを ppm で表した値 ］

測定は、0.1 M Cl を含む 50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。

（注１）　+ IHP は、9 mM IHP 存在下での測定を意味する。

（注２）　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)のシグナル強度は溶液条件に依存する（図５参照）。

ここで、Fe(II) サブユニットの示す常磁性シフトの大きさは、通常のデオキシヘモグロビンと Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンで、ほとんど差がないことが解る。

同様の測定は、CO が結合した混成ヘモグロビンについても行われており、その結果も表１にまとめられている。第１章で触れたように、CO の結合した Fe(II) は低スピン状態になるので、Fe(II) サブユニットの常磁性シフトは消失する。したがって、観測される可能性があるのは高スピン Ni(II) による常磁性シフトを受けた NH シグナルのみである。α_2(Fe)β_2(Ni)に CO が結合すると、β(Ni) サブユニットの NH シグナルは約 5 ppm 低磁場側へシフトし、その線幅は顕著に広がる（図２(A)参照）。また、このシグナルには pH 依存性がある。pH 低い時の NH シグナルは 73 ppm 付近に観測され、線幅も pH の高い時と比較して更に広がっているように見える。さて次に、pH 7.4 で IHP 存在下のスペクトルを見

てみると、この場合のシグナルはデオキシα_2(Fe)β_2(Ni)のそれとほとんど見分けがつかない位置に現れ、線幅も同じくらい狭くなっている。

α_2(Ni)β_2(Fe)に CO が結合した場合は、pH の高い時のみα(Ni)の NH シグナルが 77 ppm 付近に観測される。この NH シグナルは pH を下げたり IHP を加えたりした場合、シグナル強度が著しく減少し観測不可能となる。この変化の様子は、図５に示した。

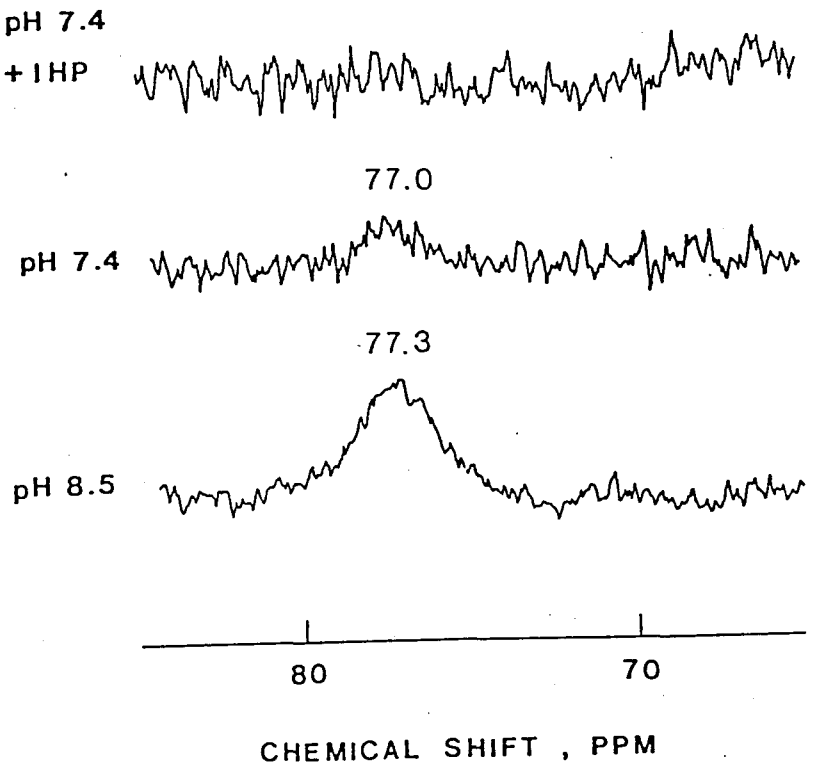


図５　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の常磁性シフトを受けた近位ヒスチジン NδH シグナルが示す強度変化（360.04 MHz）（上から順に 9 mM IHP 存在下の pH 7.4、pH 7.4、そして、pH 8.5 の時のスペクトル）

測定条件は、表１と同じ。

リングカレントシフトを受けたプロトンシグナル

CO の結合した通常の Fe(II) ヘモグロビンでは、ヘムのリングカレントシフトの影響を受けたプロトン６個分（２量体ヘモグロビン当り）のシグナルが - 1.8 ppm に現れる（図６の一番下のスペクトル）。このシグナルは、両サブユニットの E11-Val γ_2 メチルのシグナルが重なったものと同定されている[114]。CO 型ヘモグロビンの X 線結晶解析の結果から見ても、両サブユニット共に、E11-Val の γ_2 メチルがヘム面に一番近い立体配置になっているので[25][26]、この同定は良さそうである。

一方、Ni(II) ヘモグロビンのリングカレントシフト領域の NMR スペクトルは、Fe(II)-CO 型の場合と違い、複雑な形をしている（図６の一番上のスペクトル）。ここで、Ni(II) ヘモグロビンのスペクトルを、デオキシ Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンのスペクトルと比較すれば（デオキシ Fe(II) サブユニットのスペクトルは Fe(II) の常磁性のため観測されないから）、α(Ni)サブユニット由来のシグナルとβ(Ni)サブユニット由来のシグナルとを同定することができる。図６に示したスペクトルを比較すると、- 3 ppm 付近に現れる鋭い２本のシグナルがα(Ni)由来のもので、- 2 ppm 付近に現れる線幅の広いシグナルはβ(Ni)由来のものであることが解る。また、これら各サブユニット由来のシグナルは、その形こそ違え、積分面積ではほとんど差がない。

次に、CO の結合した混成ヘモグロビンのスペクトルについての結果をまとめることにする。α_2(Fe-CO)β_2(Ni)中のα(Fe-CO)サブユニットは、- 1.9 ppm に E11-Val γ_2 メチルのシグナルを示す。この化学シフトは通常の CO 型ヘモグロビンのそれとほぼ同じである。またこの時、同ヘモグロビン中β(Ni)サブユニットは、- 2.3 ppm 付近に線幅の広いシグナルを示す（図２参照）。そして、この混成ヘモグロビンに IHP が加えられた時、α(Fe-CO)のシグナルでは目だった変化は観測されないが、β(Ni)のシグナルは少し低磁場側へシフトするようである。一方、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)のスペクトルは図３に示したように複雑な変化を示す。pH の低い時、または IHPの存在する時、α(Ni)サブユニットは - 2.8 と - 3.3 ppm に２本のシグナルを示し、β(Fe)サブユニットは - 2.5 ppm に E11-Val の γ_2 メチルのシグナルを示す。これらのシグナルの同定は、図６に示したデオキシα_2(Ni)β_2(Fe)のスペクトルとの比較により行った。また、これら３本のシグ

ナルの積分面積は等しいことから、それぞれのシグナルがメチル基１個分（４量体あたり）に対応することが解る。さて、溶液の pH を上げてゆくとスペクトルは大きく変化し、おそらくオキシ型構造中α(Ni)から来ると思われる - 2.8 ppm のシグナルと、オキシ型構造中β(Fe)の E11-Val γ_2 メチルのものと思われる - 1.9 ppm のシグナルが現れてくる（図３参照）。この時、β(Fe)サブユニットの E11-Val γ_2 メチルが示す化学シフトは、通常の CO 型ヘモグロビンのそれとほぼ同じ値になる。

今回、デオキシ４次構造のα_2(Ni)β_2(Fe-CO)がリングカレントシフト領域に示す３本のメチルシグナル［うち１本はβ(Fe-CO)サブユニット由来のもので、残りの２本はα(Ni)サブユニットから来るものと思われる］を調べる目的で、この領域の NOESY スペクトル（２次元 NOE スペクトル）[118][119]を測定した。NOE とは核オーバーハウザー効果のことで 、ある NMR シグナルを選択的に照射し飽和させた時、他の NMR シグナルの強度が変化する現象のことである。この現象は、スピンスピン相互作用をしている核の間で観測され、一般には、それらの核の距離の６乗に逆比例するような緩和速度となることが知られている。したがって、プロトン NOE を測定すると、照射したシグナルのプロトンと空間的に近いプロトンのシグナルの所に NOE が現れる。また、この照射する化学シフトの値を連続的に変化させて、得られる NOE を２次元平面で表現したのが NOESY スペクトルと呼ばれるものである。図７に、2mM IHP を含む pD 7.2 の 50 mM Phos/Na 緩衝液中において、２０℃で測定したα_2(Ni)β_2(Fe-CO)のリングカレントシフト領域の NOESY スペクトルを示した（この測定条件でα_2(Ni)β_2(Fe-CO)は、デオキシ型構造をしていることが水素結合領域の NMR スペクトルとα(Ni)の吸収スペクトルから解っている）。図７を見ると、問題の３本のメチルシグナル間にはクロスピークは観測されず、それぞれのメチル基と対になっているメチルシグナルは、いずれもかなり低磁場側の領域に現れている。

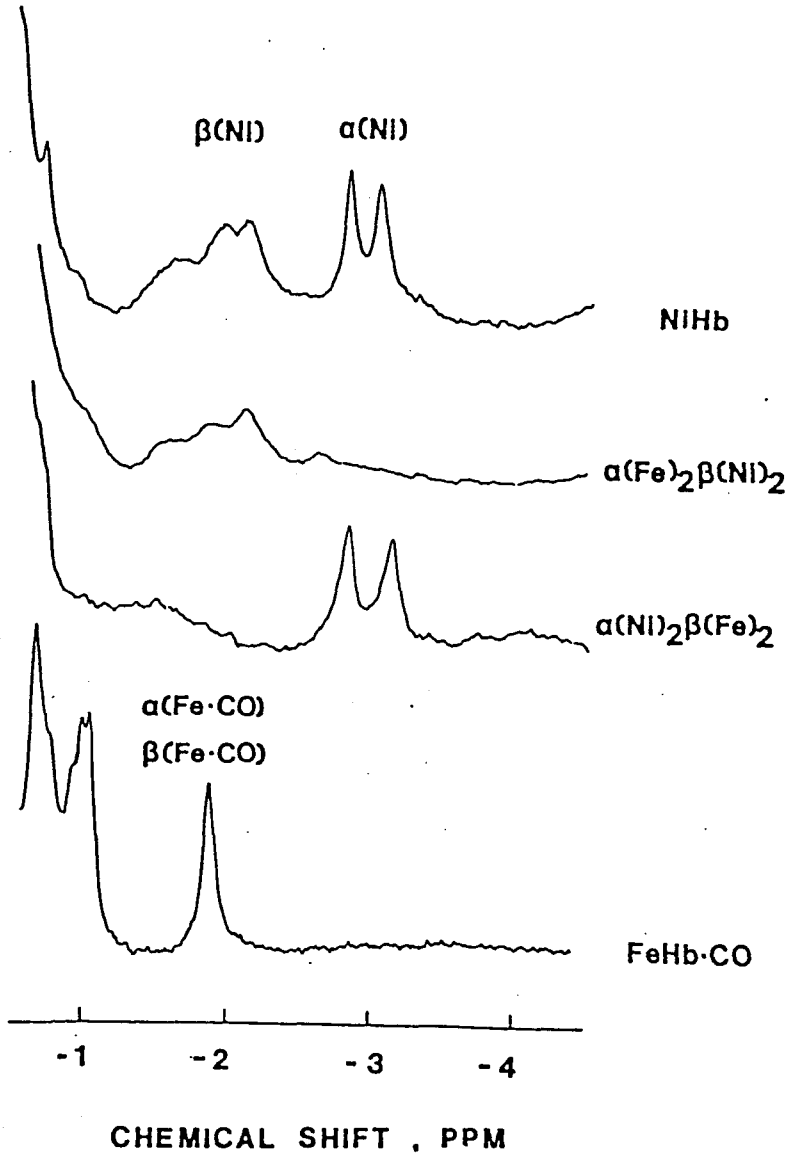


図6　Ni(II)ヘモグロビン、デオキシα_2(Fe)β_2(Ni)、デオキシα_2(Ni)β_2(Fe)、と CO の結合した Fe(II)ヘモグロビンの示すリングカレントシフトを受けたプロトンシグナル (360.04 MHz)

測定は、0.1 M Cl を含む pH 7.4 の 50 mM Bistris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。

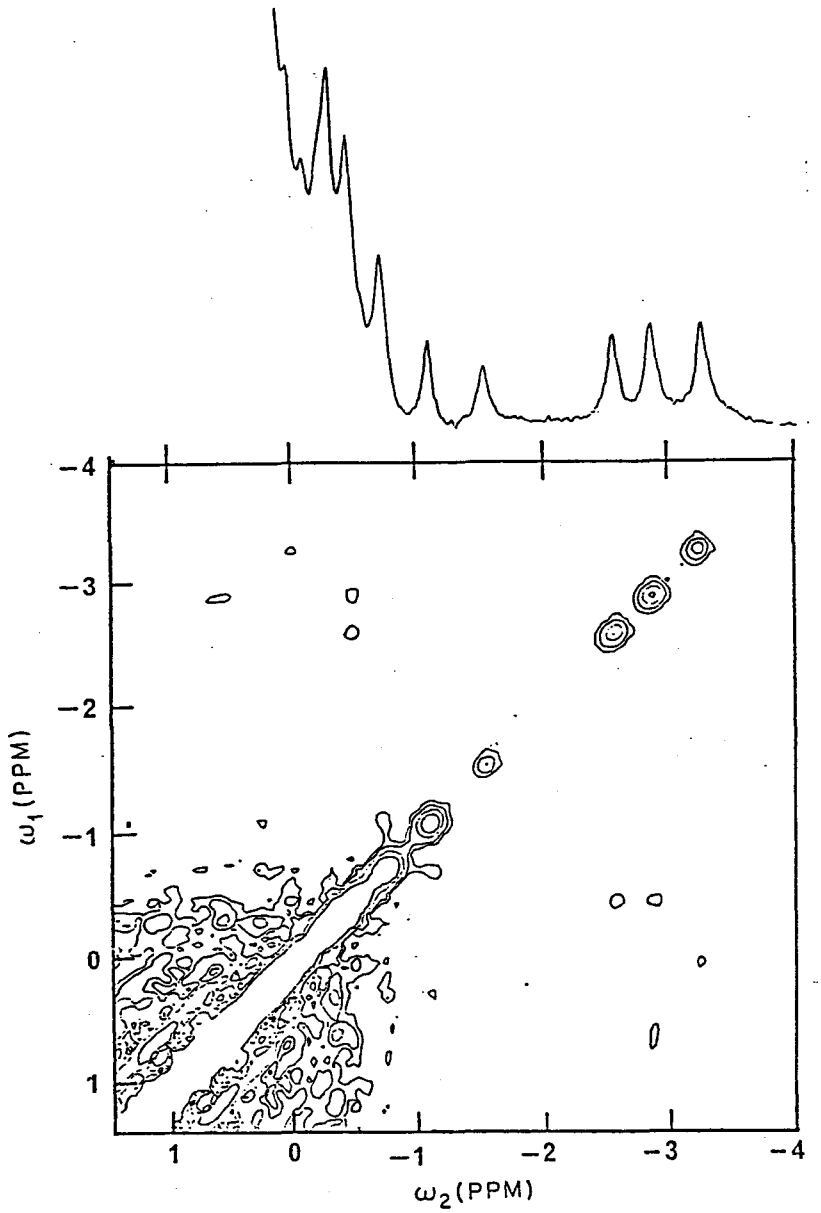


図７　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)のリングカレントシフト領域の２次元 NOE スペクトル（NOESY スペクトル）(600 MHz)

測定は、重水置換した 2 mM IHP を含む pD 7.2 の 50 mM Phos/Na 緩衝液中、２０℃で行った。

(v) 考察

Ni(II) ヘモグロビンの特徴

Ni(II) ヘモグロビンの諸性質は、β93-Cys-SH の反応性、４量体２量体間の平衡、CD（円偏光２色性）スペクトル、及び、X 線結晶解析等により調べられている[75]。 これらのデーターは全て、Ni(II) ヘモグロビンとデオキシ Fe(II) ヘモグロビンの構造上の類似性を支持するものである。今回の NMR の結果は、色々な溶液条件で Ni(II) ヘモグロビンの水素結合の状態が通常のデオキシヘモグロビンと同じになっていることを示した（図１参照）。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中 Ni-PP の配位数とスピン状態の関係

Ni(II) は、3d 電子を８個持つので、そのとりうる総スピン数は、０か１かのいずれかである。種々の Ni(II) 錯体の磁性測定から、平面４配位型錯体は普通、総スピン０の低スピンで、８面体６配位型錯体は総スピン１の高スピンであることが結論されている[120]。Ni(II) ポルフィリンを使った実験からも、同様なことが結論されていて、軸配位子の存在しない４配位型では低スピン、ピペリジン等の軸配位子が結合した６配位型では高スピンになると言われている[74]。また、軸配位子の濃度を色々変化させて NMR を測った実験では、軸配位子が１個だけ結合した５配位型 Ni-PP が溶液中にわずかながら存在しており、この５配位型 Ni-PP は低スピンと高スピンとのスピン平衡にあると報告されている[121][122]。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの常磁性シフトシグナルは５配位 Ni-PP でのみ観測されるから、４配位 Ni-PP は低スピン、５配位 Ni-PP は高スピン Ni-PP を含むことになる。また、α_2(Fe)β_2(Ni)の各サブユニットが、線幅は異なるが同じ積分面積の NH シグナルを示すことから、この場合の５配位 Ni-PP はスピン平衡にあるのではなくて純粋に高スピン状態であることが結論される。

α_2(Ni)β_2(Fe-CO)では溶液条件の変化で Ni-PP の配位数が変わり、これに伴いスピン数も変化して、常磁性シフトを受けた NH シグナルが大きくなったり小さくなったりする訳である（図５参照）。また、この時の化学シフトの値は約 77 ppm で、シグナルの大きさに依らずほとんど一定値をとる。今、Ni-PP のスピ

ン状態（配位状態）を決めるポルフィリン近傍の構造が２種類あり、それらの間の平衡が溶液条件で変わると仮定すると、この平衡の速度は NMR の時間スケールより充分遅くなければならない（もし、スピン間の速い平衡を仮定すると、２本のシグナルは平均化される。したがって、溶液条件で平衡が変わるのに伴い化学シフトも変化するはずである）。

リングカレントシフト領域のスペクトルの解釈

Ni(II) ヘモグロビンの示すリングカレントシフト領域のスペクトルは複雑な形をしていて、今まで知られているような、第６配位座にリガンドの結合したヘモグロビンのそれとは、様相が異なる。この違いを生み出す要因としては２つのことが考えられる。一つは、ポルフィリンの第６配位座にリガンドが有るか無いかの違いで、もう一つは、ヘモグロビンの４次構造がオキシ型かデオキシ型かの違いである。即ち、今回の測定は、デオキシ４次構造で第６配位座が空のヘモグロビンのリングカレントシフトをみているわけである。

最近、デオキシヘモグロビンのモデルとして Zn(II) ヘモグロビンを用いて、この領域のスペクトルを測定した結果が報告されている[10]。Zn(II) は、3d 電子を１０個持っているので、どんな時にも全ての 3d 軌道は電子で占有されており総スピン数は０である。したがって、リングカレントシフトが常に観測される。Zn(II) ヘモグロビンのリングカレントシフト領域のスペクトルは、Ni(II) ヘモグロビンのそれとよく似ており、各サブユニットが２本ずつ対になったシグナルをこの領域に示す[10]。ここで、Zn(II) ヘモグロビンのシグナルについて行われた各サブユニットへの帰属が正しいとすれば、α(Zn)サブユニットから来る２本のシグナルは α(Ni)サブユニットのそれらとほぼ同じ化学シフトを持つことになる。一方、βサブユニットの示すシグナルをこれら２種類のヘモグロビンで比較すると、化学シフトも形もかなり異なっている。この違いは、おそらくβサブユニット中にある Ni-PP の常磁性の影響と思われる。それでは、なぜ、デオキシヘモグロビン型の構造をしたヘモグロビンでは、この様に複数のシグナルを示すのであろうか？　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の低 pH、あるいは IHP が存在する時のスペクトルの比較から、デオキシ型構造中α(Ni)サブユニットの示す２本のシグナルが、

それぞれ、メチル１個分に対応することは先に述べた。デオキシヘモグロビンのＸ線結晶解析の結果[1][28]から考えて（図８参照）、これら２本のメチルシグナルのうちいずれか１本は、E11-Val γ_2 メチルに対応することはほぼ間違いない。

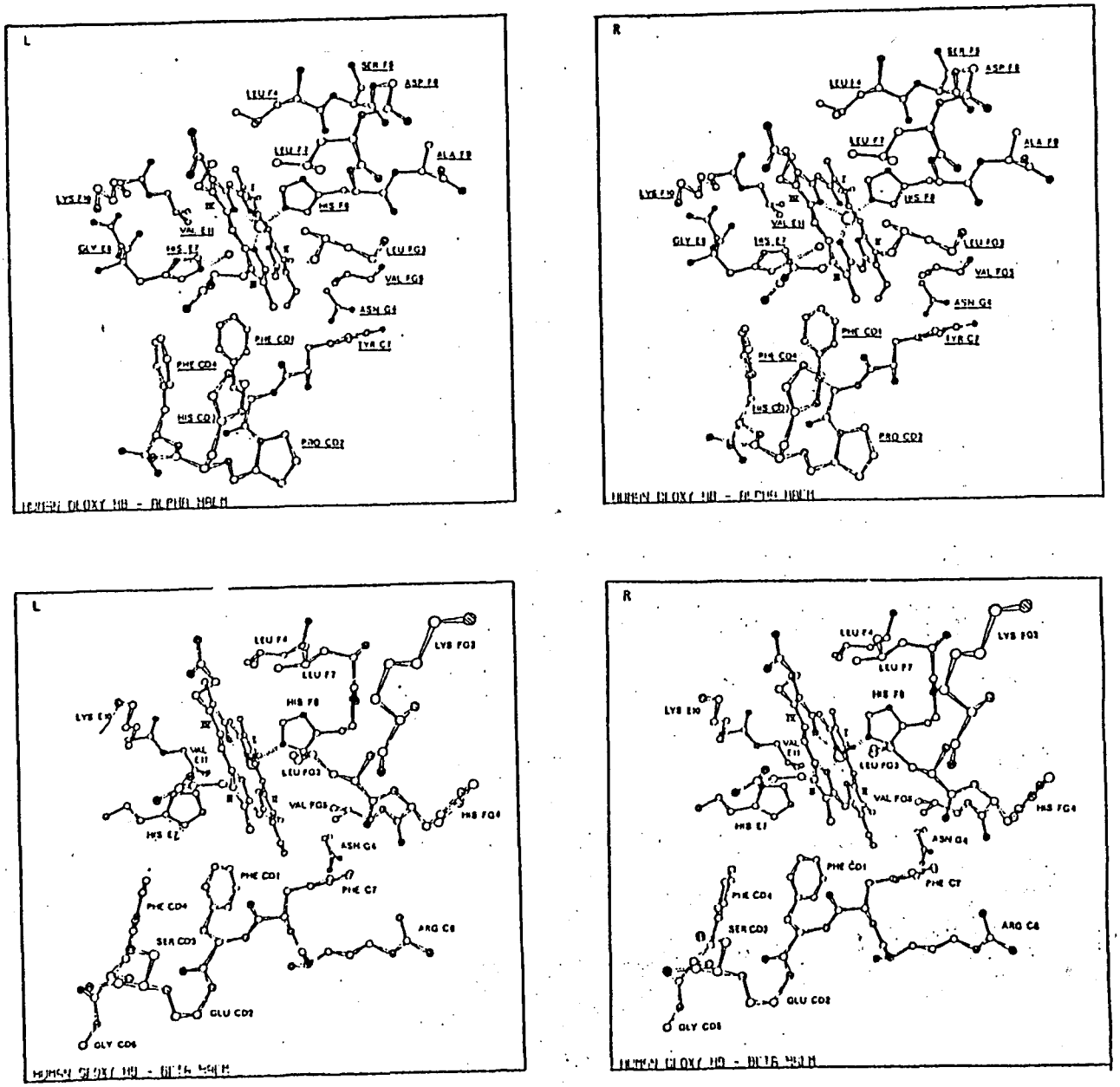


図８　デオキシヘモグロビンのαヘム近傍（上段）とβヘム近傍（下段）を表したステレオ図[1]

そうすると、残りの１本のメチル基シグナルは、E11-Val の持つもう一方のメチル基、即ち、γ_1 メチルから来るものであろうか？　確かに、デオキシヘモグロビンでは、CO 型のヘモグロビンと比較して E11-Val がヘムに近づいているので、当然 E11-Val γ_1 メチルも高磁場側へのシフトを受けるはずである。ところが、デオキシヘモグロビンの X 線結晶解析の結果を信じると、E11-Val の２個のメチル基がこれほど似通ったリングカレントシフトを受けることは、その立体構造上不可能である。また、デオキシ型構造のα_2(Ni)β_2(Fe-CO)が示す３本のメチルシグナル間で NOE は全く観測されなかったことから（図７参照）、これらのメチル基は全て異なるアミノ酸上にあることが結論される。したがって、α(Ni)サブユニットの示す２本のシグナルのうち１本は、E11-Val 以外のアミノ酸残基から来ると考えた方が良さそうである。

Fe(II) に CO の結合した Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンのこの領域のスペクトルには、Zn(II) サブユニット由来のシグナルが１本しか現れてこないと報告されている[10]。これは、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)がオキシ型構造になると、いずれか１本のα(Ni)シグナル（おそらく、E11-Val γ_2 メチルのシグナル）しか観測されなくなる事実ともよく合う。したがって、デオキシ型構造でヘム面に近接し、オキシ型構造でヘム面から離れて存在する未知のメチル基があることになる。そこで、デオキシヘモグロビンの X 線結晶解析の結果[1][28]を参考にして、ヘム周辺にあるメチル基を持つアミノ酸をピックアップしてみると、F4-Leu, F7-Leu, FG3-Leu, FG5-Val, G8-Leu, H19-Leu 等が挙げられる。これらのアミノ酸の中で、FG3-Leu はヘモグロビンの構造変化の際、そのヘム面との相対的位置が著しく変わることが知られていて、実際、デオキシヘモグロビン中では、このアミノ酸の側鎖のδ_1メチル基がヘムにかなり近接した配置になっている（図８参照）。したがって、現在のところ、デオキシ型のヘモグロビンでは、FG3-Leu δ_1 メチルのシグナルがこの領域に出てくる可能性があると考えている。

次に、ヘモグロビンの４次構造変化に伴う Fe(II)-CO サブユニット中の E11-Val の動きについて考えてみる。先ず、α(Fe-CO)サブユニットの場合、E11-Val γ_2 メチルの化学シフトは、ヘモグロビンの４次構造に依らず一定値を示すことが解った。したがって、α(Fe-CO)の E11-Val はヘモグロビンの次構造が変化してもほとんど動かないことになる。一方、β(Fe-CO)サブユニットの場合は、デオ

キシ型４次構造中でのシグナルはオキシ型４次構造中でのそれより約 0.5 ppm 高磁場側へ現れる。この結果は、デオキシ型４次構造中β(Fe-CO)の E11-Val がヘム面に近づくことを意味する。以前にも、異常ヘモグロビン Kansas（β102 Asn → Tyr）と異常ヘモグロビン M Iwate（α87 His → Tyr）を用いたリングカレントシフトの測定が行われていて、ヘモグロビンの構造変化に伴う E11-Val の動きは、α(Fe-CO)では小さいが、β(Fe-CO)では大きいと報告されている[123][124]。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの構造変化

第２章では、Ni-PP がヘモグロビン中で通常のデオキシヘムと同じ様な影響をタンパクに与えることを、パートナーの鉄サブユニットの酸素親和性測定から示した。また、第３章では、グロビン部分に化学修飾を受けたヘモグロビン中でも、Ni-PP はデオキシヘムのモデルとして使えることを明らかにした。今回行ったデオキシ Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの NMR の結果は、サブユニット界面の水素結合の様子と、Fe(II) サブユニットで観測される近位ヒスチジン NH の化学シフトが通常のデオキシヘモグロビンと全く同等であることを示唆しているので、この様な構造に与える影響から見ても Ni-PP はデオキシヘムのモデルとして妥当であることが解る。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 化に伴う構造変化を少し詳しく見てみよう。デオキシ状態の両混成ヘモグロビンの NMR スペクトルは溶液条件に依らず常にデオキシヘモグロビン型となっている。したがって、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の NMR スペクトルが pH 依存性を示すということは、言い替えれば、CO 化に伴う構造変化の大きさが pH によって変わるということである。これと同様なことが、光吸収スペクトルの場合にも言える（デオキシα_2(Ni)β_2(Fe)の光吸収スペクトルが pH 依存性を示さないことは、第２章で既に述べた）。即ち、酸性 pH の時、βサブユニットの CO 化は、ヘモグロビンの水素結合領域、α(Ni)サブユニットのリングカレントシフト領域、そして、α(Ni)サブユニットの光吸収スペクトルに全く影響を与えないが、pH 上昇に伴い CO 化の影響は大きくなる。また、α_2(Ni)β_2(Fe)の酸素結合はいずれの場合も非協同的なので（第２章参照）、中

性、あるいは、アルカリ pH の時の酸素結合はβ(Fe)の酸素親和性を変化させずに、水素結合領域、α(Ni)のリングカレントシフト領域、及び、α(Ni)の光吸収スペクトルを変化させていることになる。次に、水素結合領域の変化をよく見てみると、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)のデオキシ型構造が崩れていく時、先ず 14 ppm の強度減少、そして、次に線幅の増大が観測される（図３参照）。ここで、シグナル強度の減少は水素結合の壊れたことに対応し、シグナルの線幅増大は、水素結合プロトンと溶液中の水プロトンとの間の交換が速くなったこと、即ち、水素結合の弱まったことに対応する。これら 14 ppm の変化に引続き、11 ppm の強度減少、そして線幅の増大が起こり、これらの変化がかなり進んだ後で初めて、オキシ型構造の標識である 10.6 ppm が顔を出す。これら一連の構造変化を眺めてみると、２状態モデル[5]から予想される一斉転移のイメージではなくて（もし、２状態モデル的に構造変化を考えるなら、全ての NMR スペクトルは２種類のスペクトルの線形結合で表現されなければなれない）、もっとローカルな構造変化も許されている様に見える。さて次に、α_2(Fe)β_2(Ni)の CO 化過程の構造変化を見てみよう。α_2(Fe-CO)β_2(Ni)の示す水素結合領域のスペクトルは、pH に依らずオキシ型となっている。したがって、αサブユニットにリガンドが２個結合する時、サブユニット界面で起こる構造変化は２状態モデルでいうところの T から R への完全な転移に相当する（図２参照）。一方、pH 6.5 のα_2(Fe)β_2(Ni)の酸素結合には協同性が観測されなかった（n = 1 であった）。したがって、酸素結合で見るとヘモグロビンは T 状態のままであるが、この時、サブユニット界面の構造は R に変化したことになる。２状態モデルは、サブユニット界面の変化（４次構造変化）と酸素親和性変化に１対１の対応関係を要求するが、実際は、サブユニット界面の T から R への構造変化の方が、酸素親和性の T から R への変化に先行するようである。先に述べたβサブユニットにリガンドが結合する時のヘモグロビンの構造変化についても同様なことが言える。

α_2(Fe-CO)β_2(Ni)中β(Ni)の示す近位ヒスチジン NH シグナルは線幅が異常に広がり、化学シフト、線幅共に pH 依存性を示す。特に、pH 6.5 の時観測される、線幅が異常に広がったシグナルは 70.5 ppm と 75.5 ppm の両成分からなっているようにも見える。このことは、デオキシヘモグロビン型４次構造を形成する水素結合（14 ppm のシグナル）は壊れた状態でも、ヘムと近位ヒスチジンとの相互

作用は変化しうることを示している。この結果も、２状態一斉転移のイメージに反する事例の一つである。

今までに、水素結合プロトン領域の NMR の詳細が報告されている混成ヘモグロビンの種類は比較的少なく、今回の結果と比較可能なものとしては、CO の結合した Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン[10]、同じく Fe に CO の結合した Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン[53]、それと、デオキシ状態の Fe(III)CN^--Fe(II) 混成ヘモグロビンがある[48]。この中で、Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの場合、中性 pH のスペクトルのみが発表されている。この場合、α_2(Fe-CO)β_2(Zn) では、デオキシ型構造の標識である 14 ppm と 11 ppm が共に消失しており、α_2(Zn)β_2(Fe-CO) では 11 ppm のみ観測されている。Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの大体同じ溶液条件（pH 7.4 の場合）での測定結果を見てみると、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)では 14 ppm と 11ppm 共に消失し、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)では、強度が下がり、かつ、線幅が広がりブロードになった 14 ppm と、比較的鋭く強度をほとんど保った 11 ppm とが観測される（図３参照）。したがって、CO 結合に伴う構造変化の傾向としては、Ni(II)-Fe(II) と Zn(II)-Fe(II) とは比較的似ているようである。次に、Co(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの場合、両混成ヘモグロビン共、CO が２個結合すると pH によらずデオキシ型構造の水素結合は観測されない。そして、中性あるいは、酸性 pH で IHP を添加してやると、14 ppm と 11 ppm が現れデオキシ型構造となると言われている[53]。第１章で述べたように、αサブユニットに入った Co(II) プロトポルフィリンは、通常のデオキシヘムよりもヘモグロビンの構造をオキシ型にする傾向が強いので、α_2(Co)β_2(Fe-CO)とα_2(Ni)β_2(Fe-CO)との単純比較はできない。一方、βサブユニットに入った Co(II) プロトポルフィリンはデオキシヘムのモデルとして良さそうなので（第１章参照）、α_2(Fe-CO)β_2(Co)はα_2(Fe-CO)β_2(Ni)と比較可能である。そして実際、これら２種類の混成ヘモグロビンの水素結合プロトン領域のスペクトルは、pH 変化、IHP 効果を含めて非常によく似ている。また、Co(II)は常磁性なので常磁性シフトを受けた近位ヒスチジンの NH シグナルは、Co(II) を含むサブユニットで常に観測される[107]。そして、CO が結合した中間状態でのこの NH シグナルは、デオキシ状態の時のそれと比較して線幅が顕著に広がっており、これは、おそらくα_2(Fe-CO)β_2(Ni)で NH シグナルの線幅が広がったことに

対応する現象と思われる（この線幅の広がりについて、Inubushi らは、T と R の交換による exchange broadening と説明している[107]）。次に、２価鉄がデオキシ状態のシアノメト混成ヘモグロビンでは、14 ppm も 11 ppm も全く観測されないオキシ型のサブユニット界面になっている[48]。そして、これらの試料に IHP を加えた場合、14 ppm と 11 ppm は消失したままであるが、常磁性シフトを受けたヘムメチルプロトンのスペクトルはデオキシ型に変化すると報告されている[48]。 このことは、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)のサブユニット界面がオキシ型のままで、NH シグナルにはデオキシ型の特徴を残している事実と、構造変化の流れという点で合うように思われる。

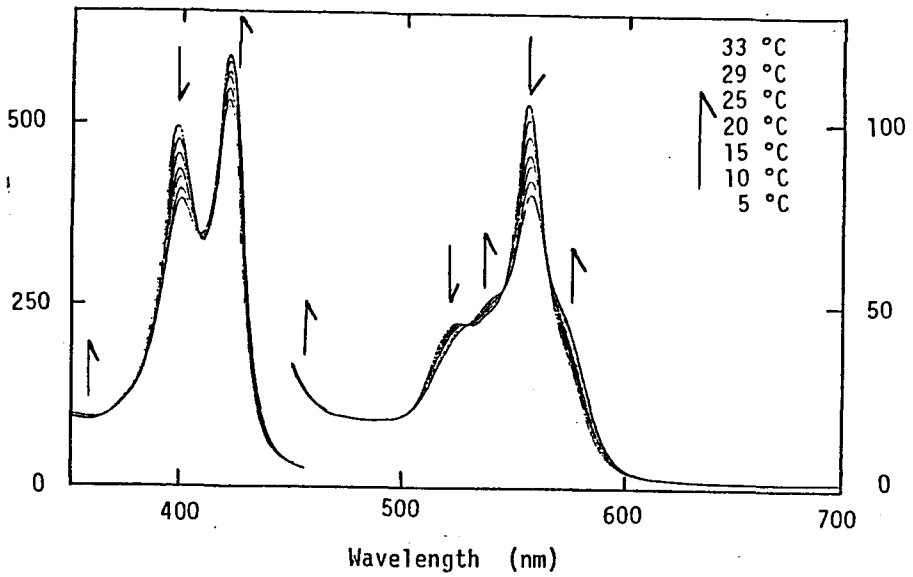
さてここで問題となるのは、これまでに述べてきた混成ヘモグロビンの諸性質が本当に通常のヘモグロビンの酸素結合における中間状態でも共通なものかどうか、ということである。この問いに、直接答えることはできないが、次に挙げる報告は、混成ヘモグロビンの NMR の結果を間接的に支持している。 Viggiano と Ho[43]は、通常のヘモグロビンの NMR スペクトルを色々な酸素分圧で測定して、水素結合領域のプロトンシグナルとヘムメチルの常磁性シフトシグナルとの間の相関を調べている。彼らの測定結果を見ても、酸素結合に少し先立ち 14 ppm のプロトンシグナルは消失してゆくようである。

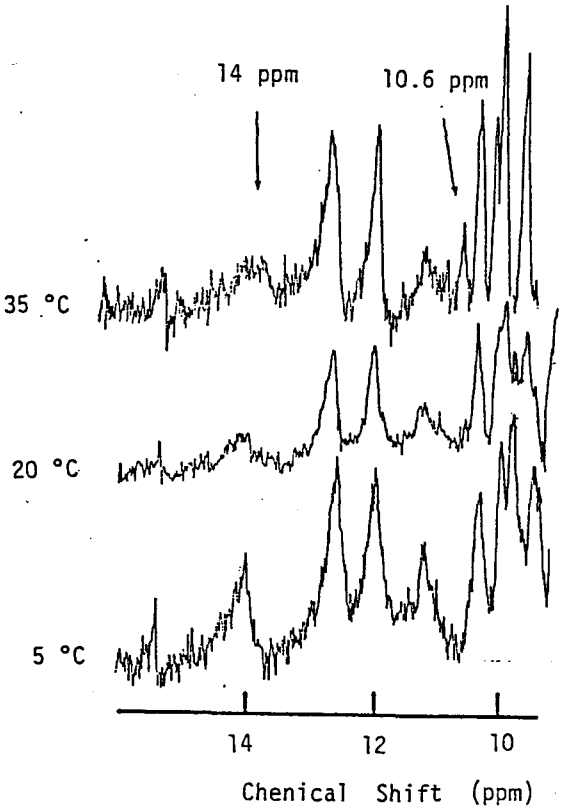
（vi）付録

（1） 温度変化の実験

α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の NMR スペクトル、及び、光吸収スペクトルが pH を変えることにより大きく変化することは、既に述べた（図３、４(A)、５参照）。またこの様な変化は、温度を２０℃で固定した場合についてのみ議論した。ここでは、水素結合領域の NMR スペクトルと光吸収スペクトルの温度依存性について簡単に触れることにする。

通常の（デオキシ、あるいは、CO 結合型）ヘモグロビンのソーレー帯の光吸収スペクトルが、わずかな温度変化を示すことは、既に報告されている[125]。また、Ni(II) ヘモグロビンと des-His(β146)-Tyr(β145) Ni(II)ヘモグロビン についてもこれに対応する小さな変化が見つかっている[125]。しかし、これらの光吸収スペクトル変化の大きさは、今ここで取り上げる、ヘモグロビンの４次構造変化に伴う Ni-PP の光吸収スペクトル変化よりは格段に小さい。Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの示すこの大きな変化は、リガンドが２個結合して、デオキシ型構造とオキシ型構造との相対的な安定性が微妙になった時観測される。特に、構造が微妙な状態になっている時のα_2(Ni)β_2(Fe-CO)の場合、NMR 、光吸収スペクトルは温度に著しく敏感である（図参照）。変化の傾向としては、低温になる程、デオキシ型構造が安定し、NMR スペクトルでは 14 ppm と 11 ppm のシグナル強度が増す。この時、光吸収スペクトルでは ４配位型 Ni-PP 由来の 398 nm の吸収が増加する。また反対に高温になる程、オキシ型構造が安定となり、NMR スペクトルでは 14 ppm と 11 ppm のシグナル強度が減り、オキシ型構造の指標となる 10.6 ppm のシグナルが出てくる。そして、光吸収スペクトルでは、５配位型 Ni-PP 由来の 420 nm の吸収が増加する。



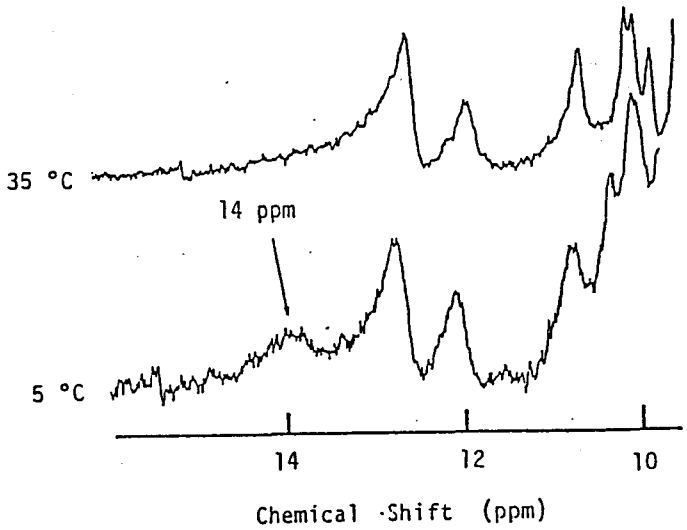


色々な温度で測定したα_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光吸収スペクトル（左上図）と水素結合領域の NMR スペクトル（右上図）

測定は、pH 7.5 の 50 mM Phos/Na 緩衝液中で行った。ヘモグロビン濃度は、光吸収スペクトル測定で約 4.2 μM（４量体）、NMR 測定で約 1 mM（４量体）とした。光吸収スペクトルは、５℃、１０℃、１５℃、２０℃、２５℃、２９℃、及び、３３℃での測定結果を重ねて書いたもの（図中の矢印は、温度上昇に伴う吸収変化の方向を表す）。光路長は 1 cm とし、450 nm から 700 nm までの吸収領域は５倍に拡大して書いた。

２０℃のα_2(Fe-CO)β_2(Ni)は、pH を変えてもその NMR スペクトルは常にオキシ型であった。しかしながら、この混成ヘモグロビンの場合でも pH 6.5 で温度を下げてゆくと、デオキシ型構造の指標の 14 ppm シグナルが現れてくることが解った（図参照）。このことは、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)のデオキシ型構造とオキシ型構造のバランスが、酸性 pH でかなり微妙になっていることを示唆する。またこの時、光吸収スペクトルについても温度変化に対応する小さな変化が観測された。しかしながら、これはヘモグロビンの構造変化に伴うスペクトル変化と、ヘモグロビンの４次構造変化と無関係な吸収変化（先に述べた Ni(II) ヘモグロビンの温度変化でも観測される吸収変化[125]）が重なっているので、別々に解析することは難しい。

また、デオキシ Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンでは、ヘモグロビンの構造変化に伴うスペクトル変化は全く観測されなかった。



温度５℃と３５℃におけるα_2(Fe-CO)β_2(Ni)の水素結合領域の NMR スペクトルの違い。

測定は、pH 6.5 の 50 mM Phos/Na 緩衝液中で行った。ヘモグロビン濃度は約 1 mM （４量体）とした。
（注１）同試料の光吸収スペクトルの温度依存性は小さいので載せなかった。

(2) 11 ppm のプロトンシグナルの起源

水素結合領域の NMR シグナルの変化を、ヘモグロビンの構造変化と結び付けて議論する際、どうしても気になるのが、これらシグナルの帰属の確からしさである。Ho らのグループにより行われた水素結合プロトンの同定の中で、最も疑わしいと思われるのがデオキシ型構造特有の 11 ppm シグナルの同定である。このプロトンシグナルは、一応、β145 Tyr と β98 Val の間のβサブユニット内水素結合から来るものと同定されている[102]。この同定は、デオキシヘモグロビン Osler (β145 Tyr → Asp) とデオキシヘモグロビン Mckees Rocks (β145 Tyr → terminal)の NMR スペクトルから行われた。しかし妙なことに、これらの異常ヘモグロビンのスペクトルには、11 ppm 辺りにはっきりとしたシグナルが現れている。筆者らの説明では、この 11 ppm 辺りに現れたシグナルは、通常のデオキシヘモグロビンに観測される 11 ppm シグナルとは別物として片付けられているが、この仮定は妥当であろうか？ この件に関して筆者らは、両異常ヘモグロビンがオキシ型構造に対応するような非常に高い酸素親和性を示すことが知られていたので、この時観測される 11 ppm 辺りのシグナルがデオキシ型構造由来のものでは有り得ないと説明している。この説明は、一見、もっともなようにも思えるが、des-His(β146)-Tyr(β145)ヘモグロビンを用いた他の測定結果と比較すると、あまり適当でないことが解る。例えば、des-His(β146)-Tyr(β145)ヘモグロビンでは、αサブユニットの近位ヒスチジン NH の常磁性シフトの大きさは、通常のデオキシ型構造のヘモグロビンのそれと同じで[108] βサブユニットの近位ヒスチジン NH シグナルは、通常のデオキシヘモグロビンより約 5 ppm 低磁場側に現れる[108]。また、この化学修飾ヘモグロビンのいずれか一方のサブユニットのヘムを Ni-PP で置き換えた、des-His(β146)-Tyr(β145) Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は、この様なヘモグロビン中で、βヘムの酸素親和性がαヘムよりかなり高くなっていることを示唆している。これらの結果は全て、β鎖 C 末端のアミノ酸２個を除去した影響がβヘムには著しく影響し、αヘムにはそれほどでもない、といった印象を我々に与える。また、この様なヘモグロビンでは、最初にβサブユニットから酸素結合が起こり、αサブユニットに酸素結合が起きる時点で既にヘモグロビンがオキシ型構造に変化しており、見かけ上、

酸素結合に協同性が失われている可能性が高い。したがって、これらのデオキシヘモグロビンの構造（４次構造を含めて）をオキシ型と断定するのは危険で、以前、行われた同定の基本的な仮定は崩れることになる。

また、Ho らのグループがβ145 Tyr と β98 Val の間の水素結合に注目した大きな理由として、Perutz の提唱した立体化学モデル[36]があった。当初のモデルでは、デオキシヘモグロビン中で存在していたβ98 Val とβ145 Tyr との間の水素結合がヘモグロビンの酸素結合に伴うβ98 Val（ヘムのビニル基と側鎖が接触しているのでヘムの構造変化に敏感なアミノ酸残基）の動きで壊れ、Tyr の側鎖が F, H ヘリックスの外側に飛び出し、その結果、サブユニット間の水素結合が切れヘモグロビンの酸素親和性は上昇すると言われていた。しかし、最近のオキシヘモグロビンの構造解析[27]では、β145 Tyr の動きはそれほど大きくなくて、ヘモグロビンの４次構造に関わらず β98 Val との水素結合は存在すると言われている。それでもなお、デオキシ型構造のみに観測される 11 ppm シグナルが、Ho らの同定どうりβ145 Tyr とβ98 Val の水素結合由来のものとするなら、ヘモグロビンの構造変化に伴う水素結合の状態変化、あるいは水素結合近傍の環境の変化といった要因から、オキシ型構造ではどこか違う位置にシグナルがシフトしたとでも考えなければ説明できない。したがって、一般に受け入れられている 11 ppm のプロトンシグナルの同定は、かなり疑わしいことになる。それでは、11 ppm の水素結合は一体どこの水素結合から来るのであろうか？

先ず第１の候補として、α140 Tyr とα93 Val の間に見られるサブユニット内水素結合が考えられる。この水素結合はサブユニットの３次構造上、ちょうどβ145 Tyr とβ98 Val の水素結合に対応する位置にあるαサブユニット内の水素結合である。この水素結合も先に述べたβサブユニット内のものと同様に、ヘモグロビンの構造に依らず常に存在することが、最近の X 線結晶解析の結果[27]から言われている。しかし、オキシヘモグロビン中での水素結合は、デオキシヘモグロビン中ほどはっきり現れておらず、水素結合の状態はかなり変化しているようである（実際、ヘモグロビンの４次構造変化に伴うβ37 Trp の動きによって、α140 Tyr のフェノールリングが約９０°回転し、水素結合の状態はオキシ型構造中とデオキシ型構造中とで多少変化するようである）。また、pH 6.0、IHP 存在下のデオキシ des-Arg(α141)-Tyr(α140) ヘモグロビンの NMR スペクトルには、

はっきりとした 14 ppm シグナルが現れるにも関わらず、11 ppm シグナルは完全に消失しているという報告がある[108]。 したがって、11 ppm のシグナルは、α140 Tyr の直接関与しているα140 Tyr とβ93 Valの間の水素結合か、あるいは、α140 Tyr のフェノールリングと相互作用可能な β37 Trp の関与する、β37 Trp とα94 Asp の間の水素結合から来ると考えることが可能である。

(3) Fe(II) にリガンドが結合した Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの X 線結晶解析

最近、α_2(Fe-O_2)β_2(Ni)[126]とα_2(Ni)β_2(Fe-CO)[127][128]の X 線結晶解析が行われた。これらの結果は、結晶中の構造という点を除けば、今回の NMR の測定結果と比較可能なはずである。また、酸素結合における中間状態分子の構造の全体像を知る上で、これらのデーターは重要である。

先ず、3.5 A の分解能で行われたα_2(Fe-O_2)β_2(Ni)の X 線結晶解析の結果を概説しよう。 β(Ni)サブユニット中の Ni-PP は、我々の予想どうり近位ヒスチジンと結合した５配位状態となっていることが示された。そして、得られたα_2(Fe-O_2)β_2(Ni)の結晶系は、デオキシヘモグロビンと同じ単斜晶系と報告されている。通常のデオキシヘモグロビンとの主な違いは、αヘムの酸素結合による鉄のヘム面への移動が見られることと、それに伴う F ヘリックスや遠位ヒスチジンの小さな動きが観測されることである。また、この変化の度合は２つのαサブユニットで異なり、特に FG 領域の変化はα2 サブユニットで大きく、その結果、β1 サブユニットで観測される Ni-PP の傾きがβ2 のそれより顕著になっている。この様な、４量体中で観測される対称性の崩れは、α_2(Fe-CO)β_2(Co)[126]やα_2(Fe-CO)β_2(Mn)[59]の X 線結晶解析にも共通に見られる現象である。

さて、X 線結晶解析の結果を NMR 等の結果と比較してみると、いくつかの矛盾点が浮かび上がってくる。例えば、X 線結晶解析の結果は α_2(Fe-O_2)β_2(Ni)の４次構造がデオキシ型であることを示唆するが、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)の水素結合領域の NMR スペクトルは、オキシ型構造となっている。これは、まるで正反対の結果の様に見える。α_2(Fe-CO)β_2(Ni)とほぼ同じ性質を持つ混成ヘモグロビン、α_2(Fe-CO)β_2(Co)、についての結果[126]を見てみると、溶液の NMR で観測されない Tyr(α42) と Asp(β99) の間の水素結合は、結晶構造中で存在するが、この場合、その結合はかなり弱められていると報告されている。そして、X 線結晶解析の試料の結晶化条件は、いずれの混成ヘモグロビンの場合でも、高濃度の硫酸アンモニュウムとリン酸を含む pH の低い緩衝液中となっているので NMR の測定条件よりも、デオキシ型の構造が安定しやすい溶液条件になっている。また、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)は pH の低い時、温度を下げるとデオキシ型４次構造がかな

り安定になってくることは、付録1で既に述べた。 したがって、このようにデオキシ型構造とオキシ型構造との相対的安定性がかなり微妙な状態にある試料では、上で述べた様な溶液条件の違いが効いてくる可能性がある。

また、もう1つ別の疑問として次の様なことが挙げられる。X 線結晶解析にはボーア効果に関与すると思われるサブユニット末端のアミノ酸残基、NA1-Val と HC3-His に、ヘムのリガンド結合による動きが全く見られない [このことは、α_2(Fe-CO)β_2(Co)[126]、α_2(Fe-CO)β_2(Mn)[59]、及び、α_2(Fe-O_2)β_2(Fe)にも共通する]。しかし一方、β146(HC3) His の動きに敏感なはずのβ93 Cys-SH の p-hydroxymercuri benzoic acid に対する反応性は、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)でオキシヘモグロビンなみに上がっている。この食い違いは、結晶格子中で働く力がデオキシヘモグロビンの立体構造を安定化させ、その結果、リガンド結合に伴うアミノ酸残基の動きが溶液中の時より小さくなっているとでも考えなければうまく説明できない。

次に、2.6 A 分解能で行われたα_2(Ni)β_2(Fe-CO)の X 線結晶解析の結果を見てみる[127]。光吸収スペクトルの結果から予想されたとうり、α(Ni)サブユニット中の Ni-PP は、平面構造をした4配位状態であることが電子密度図から確認された。そしてこの時、ポルフィリン面 と 近位ヒスチジン Nεとの距離は 3.2 A と報告されており、この値は、通常のヘモグロビンのαサブユニットの値[28]、2.7 A、より有意に長い。また、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の結晶系はデオキシヘモグロビンと同じ単斜晶系である。この試料の場合、pH の低い溶液条件では水素結合領域の NMR スペクトルもデオキシヘモグロビン型になっているので（本文中図3参照）、溶液中と結晶中とで4次構造上の矛盾は無いようである。そして、βサブユニットでは CO 結合によるヘムの傾きの変化と F ヘリックスの動きが観測される。また、遠位ヒスチジンと遠位バリン（E11-Val）の動きも見られる。

第５章　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合の速度論的解析

(i) 概要

CO の２個結合した Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO を光解離させ、生じたデオキシ混成ヘモグロビンに再び CO が結合する過程の速度論的解析から、CO の２個結合した混成ヘモグロビンの４量体２量体平衡を計算した。この時、４量体機能単位説にのっとり、２量体ヘモグロビンのリガンド結合過程には協同性が無くオキシ型構造を持つヘモグロビンなみの速い結合速度を示すと仮定した。この解析結果から、CO の２個結合した Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンはその４次構造に依らず、CO の４個結合した通常のヘモグロビンと同程度、２量体への解離がすすんでいることが結論された。さらにこの結果は、酸素平衡曲線の濃度依存性の実験と、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光吸収スペクトルの濃度依存性の実験からも確認された。

光の強度を弱めて部分的に CO を解離させる実験から、１個だけ CO の結合した混成ヘモグロビンの CO 再結合の様子が調べられた。α_2(Fe)β_2(Ni)の場合、解離させる CO の量を減らしてゆくと反応速度の速い成分が増大し、この傾向は pH が高くなるほど顕著である。一方、α_2(Ni)β_2(Fe)の場合、解離させる CO の量を減らしても速い成分と遅い成分の比率はほとんど変化しなかった。これらの結果は、第２章で述べた両混成ヘモグロビンの協同性の違いからうまく説明される。

（ii）序論

ヘモグロビンに結合した CO を光解離させ、その再結合過程を光吸収スペクトルの時間変化から調べる実験はここ３０年あまりにわたって多くの研究者が行っている[129]-[134]。オキシ型構造のヘモグロビンはデオキシ型構造のヘモグロビンと比べて約５０倍速く CO と結合する性質があるので[129]、CO 再結合の様子からヘモグロビンの構造を研究することが可能となる。この様な研究が始まった当初は、光解離の光源として写真撮影用のフラッシュが用いられた[128]-[130]。普通、写真撮影用フラッシュの長さは、ヘモグロビンの構造変化にかかる時間（CO 解離直後のデオキシヘモグロビンは CO が結合していた時の構造を保っているが、ある速度で通常のデオキシヘモグロビンの構造に変化する）と比較して長いか、あるいは、同程度と言われている[134]。したがって、フラッシュを切った直後から CO の再結合過程を測定しても、既にその時点で、ヘモグロビンはほとんど通常のデオキシヘモグロビンと同じ構造になっており、CO の結合していた時の構造の情報はあまり出てこないことになる（図１参照）。

一方、最近よく使われるレーザーフォトリシスによる方法は[133][134]、比較的長さの短いパルスレーザーを用いるので、上で述べた写真用フラッシュの方法より光解離させる前のヘモグロビンの構造に関する情報が幾分多く得られる。しかしながら、CO 解離直後オキシ型構造を保っているデオキシヘモグロビンに CO が再結合してゆく速度は、ヘモグロビンの構造変化速度と比べてそれほど速くないので、結局、オキシ型構造の結合速度で CO が再結合する間にヘモグロビンのかなりの割合はデオキシ型構造に構造変化してしまうようである（図１参照）。この様に、ヘモグロビンの構造変化速度と CO の再結合速度との間には競争関係がある[134]。

光解離の直後現れるオキシ型構造を持つデオキシヘモグロビンの光吸収スペクトルは、通常のデオキシヘモグロビンのそれとは少し違うこともかなり以前から知られていた[129]。具体的には、前者が示すソーレー帯は後者のそれより少しブロードで、430 nm にある吸収極大の吸収係数も前者ではかなり小さくなっている。これら両デオキシヘモグロビンの吸収スペクトルは 436 nm に等吸収点を持つの

で[134]、ヘモグロビンの CO 再結合過程を調べる際、この波長の吸収の時間変化を測定することが多い。そしてまた、通常のデオキシヘモグロビンの吸収スペクトルと CO の結合したヘモグロビンの吸収スペクトルとの間に観測される 425 nm の等吸収点は、オキシ型構造のデオキシヘモグロビンがデオキシ型構造に構造変化する過程を調べる目的で、しばしば用いられる測定波長である[134]。

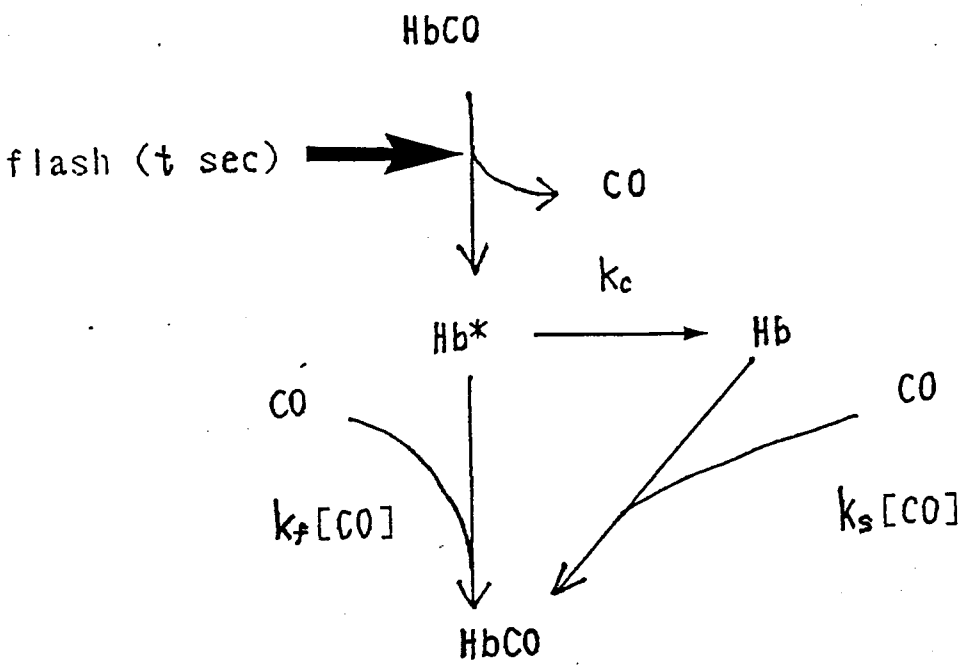


図１　CO の結合したヘモグロビン（HbCO）の光解離実験の図

Hb* は光解離直後に存在するオキシ型構造のデオキシヘモグロビンを表す。Hb* は不安定なので、ある速度 k_c で通常のデオキシ型構造のデオキシヘモグロビン(Hb) に構造変化する。 Hb* は速い反応速度 k_f[CO]（k_f は２次反応速度定数）で CO と結合し、Hb は約５０倍遅い反応速度 K_s[CO]（k_s は２次反応速度定数）で CO と結合し、共に HbCO になる。

ここで、Kc は溶液条件等で変化すると言われるが、通常の測定条件では大体 K_f[CO] と同じ位の速度となる。また、フラッシュ強度が充分強く、かつまた、照射時間 t が充分長ければ、フラッシュ照射中に Hb* → Hb の構造変化は終ってしまい、この場合、速い速度で結合する成分は消失する。

（注１）４量体２量体間の平衡の速度は、上で述べた反応のどれよりも充分に遅いので、２量体の CO 結合の系は、この系と時間的に完全に分離している。そして、２量体ヘモグロビンは Hb* 並の速い結合速度を有する（本文参照）。

425 nm で見たヘモグロビンの CO 再結合過程の速度論的解析から、ヘモグロビンの構造変化の速度は、pH 等の溶液条件、または、ヘモグロビンに結合しているリガンドの個数で大きく変わることが結論されている[134]。具体的には、pH の高い時や結合しているリガンドの数の多い時、デオキシヘモグロビンがオキシ型構造からデオキシ型構造へ変化する速度は低下すると報告されている。

リガンド結合の中間状態にあるヘモグロビンの情報を引き出す有効な手段の1つとして、照射する光の強度を弱め、ヘモグロビンに結合している CO を部分的に解離させる方法がしばしば用いられる[134]。特に今回の試料の場合、部分解離の実験で生ずる分子種が、1個だけ CO の結合したヘモグロビンに限定されているので、結果の評価は比較的容易に行える。

ヘモグロビンの光解離の実験では、非常にしばしば、ヘモグロビンの２量体への解離が問題となってくる。溶液中の４量体ヘモグロビンは、２個の２量体ヘモグロビンとの平衡にある（$\alpha_2\beta_2 \rightleftarrows 2\alpha\beta$）[135]。そして、２量体ヘモグロビンは、その結合しているリガンドの個数に依らずオキシ型構造のヘモグロビンなみの速い結合速度で CO と結合すると言われている[130]-[132]。言い替えると、ヘモグロビンの持つ協同的な機能は４量体になって初めて現れるということである。このことは４量体機能単位説と言われ、ヘモグロビン研究者の間では当然の事のように扱われている。４量体機能単位説の証拠としては、des-Arg-(α141)ヘモグロビンの酸素平衡曲線がイオン強度の高い溶液条件で、n = 1、かつ、高い親和性であることを示した論文[136]が一般によく引用されてきた。しかし、もともと des-Arg(α141) ヘモグロビンはそれほど協同性の強いヘモグロビンではないし[34]、これが決定的な証拠というには少しもの足りない感じがする。他にも、この説を間接的に支持するデーターはいろいろあるので[137][138]、結局、総合的に判断して４量体機能単位説は正しいのではないか、というのが一般的な解釈であろう。この仮説を受け入れたとして、実験で問題となるのは、観測される速い成分がオキシ型構造の４量体ヘモグロビン由来なのか、あるいは、２量体ヘモグロビン由来なのか区別できなくなることである。溶液中で２量体ヘモグロビンの占める割合はヘモグロビン濃度の関数になっているので、高濃度のヘモグロビン溶液を使えば２量体ヘモグロビンへの解離は、ある程度は抑えられる。しかしながら、通常、測定光の波長はソーレー帯の 436 nm を用いるので（普通、照射

光は波長が 500 ～ 600 nm のレーザーを用いることが多いので、これを避ける意味もある）、試料の濃度を上げると吸収が大きくなり過ぎて測定できなくなるジレンマがある。

一方、２量体ヘモグロビンが速い結合速度を持つ性質を利用して、ヘモグロビンの４量体２量体平衡を解析する方法がある[131]-[132][139]-[142]。ここで、４量体２量体平衡の速度は CO 再結合と比較してかなり遅いので[143]、２量体ヘモグロビンに CO が結合する時間内に４量体に会合するようなことはない。したがって、４量体２量体平衡と CO 再結合とは時間的に分離される。そこで、この測定で重要なポイントとなるのは、オキシ型構造を持つデオキシヘモグロビンの影響をいかに減らすかということである。実際、ヘモグロビンの構造変化が遅くなる条件下では、オキシ型構造を持つヘモグロビンの影響が無視できなくなってくる（例えば、文献[141]のアルカリ pH の場合等）。一般には、フラッシュの照射時間を長くしてやれば、この問題は解決しそうに思えるが、照射時間を長くし過ぎると、今度は４量体２量体平衡の時間領域にかかってしまうので、使用可能なフラッシュの長さには自ずと限度がある。そこで、今回、オキシ型構造を持つデオキシヘモグロビンの影響を分離するための解析方法を考案したので、これを、CO の結合した Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンに適用してみた。そして、この解析方法の妥当性を示すため、酸素平衡曲線や吸収スペクトルの濃度変化の結果と比較してみた。

４量体ヘモグロビンの２量体ヘモグロビンに対する相対的安定性は、リガンド結合に伴う自由エネルギー変化と関連する物理量である。今、４量体機能単位説を受け入れるとすれば、デオキシ型構造にある４量体ヘモグロビンの２量体への解離は酸素親和性の大きな変化を伴うことになるので、ヘモグロビンの機能と構造、及び、結合しているリガンドの個数が４量体２量体平衡を決める上で重要な要因となる。このような考えは、古くは Shulman らの総説[144]にも載っており、彼らは４量体２量体平衡を含む系の２状態モデルで、リガンド結合に伴う４量体２量体平衡の変化を予想している。最近発表された、Edelstein と Edsall の論文[145]も基本的には Shulman らと同じ論法で、酸素結合における中間状態ヘモグロビンの４量体２量体平衡を予想している。今回実験に用いた Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは、酸素平衡機能と CO 結合による４次構造変化が調べられて

いる試料なので、得られた４量体２量体間の平衡定数は、この様な観点から調べることが可能である。

(iii) 実験方法

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合過程の速度論的解析

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製法は第２章で述べたとうり。測定には、0.1 M Cl を含む 50 mM Bistris/HCl、あるいは、Tris/HCl 緩衝液を用いて、測定温度は２０℃とした。緩衝液は予め、１気圧の 9.5 % CO (N_2 との混合ガス) で平衡をとっておく。また、sodium dithionite を実験で用いる場合の注意として、この試薬はヘモグロビンの２量体への解離を促進すると報告されているので、この影響を抑えるため β-mercaptoethanol を容積にして 0.08 % 加えた[142]。

CO の光解離は、写真用フラッシュによる実験と、レーザーによる実験と２通り行った。写真用フラッシュは 100-J photographic Xe-flash lamp を用いた。このフラッシュの長さは約１ミリ秒で、その強度低下の過程は 2300 s^{-1} 位である。吸収スペクトル変化の測定は、 25-W halogen tungsten lamp と Bausch Lomb small grating monochrometer との組合せで行う。一方、レーザーフォトリシスの実験は、色素レーザー (DL-1000 dye laser, Phase-R) を用いて行う。今回、エタノールに溶かした 0.1 mM の rhodamine 6G (Exciton) を用いて、約３００ナノ秒のパルス幅で実験した。また、CO の部分光解離の実験では、数種類の減光フィルター (Neutral Density Filter) の組合せで、光の強度を調節した。

CO の再結合は、デオキシ型構造のデオキシヘモグロビンとオキシ型構造のデオキシヘモグロビンとの等吸収点である 436 nm の吸収の時間変化から求める（図１参照）。全ての場合、測定結果は２層性だったので、次式で表される様な２つの指数関数の和に最小２乗法で合わせた、

$$\Delta A(t)/\Delta A_0 = F_s \exp(-k_s't) + (1 - F_s)\exp(-k_f't)$$

ここで、$\Delta A(t)/\Delta A_0$ は時間 t における規格化された吸収変化、F_s は見かけの１次反応速度 k_s' を持つ遅い方の成分の割合で、k_f' は速い方の成分が示す見かけの１次反応速度である。

酸素平衡曲線

酸素平衡曲線は、0.1 M Cl を含む pH 7.4 の 50 mM Tris/HCl 緩衝液中、２５℃の条件で、自動記録装置により Imai らの方法[72]で測定した。０％酸素飽和の吸収と１００％酸素飽和の吸収は、それぞれ酸素平衡曲線の下部と上部から各々コンピューターで外挿した。また、ヘモグロビンの自動酸化を最小に抑えるため、Hayashi らのメトヘモグロビン還元系[146]を加えた。全ての測定で、酸素解離曲線は、その直後、同じ試料で測定された酸素結合曲線とよく一致した。そこで、酸素平衡機能のパラメーターは酸素解離曲線から求まる値を採用した。

光吸収スペクトルの濃度変化

光吸収スペクトルは Hitachi 557 spectrophotometer で記録した。この時の光路長は、ヘモグロビンの濃度に応じて、1 mm、2 mm、5mm、あるいは、50 mm のうち、最も測定誤差の小さくなる長さで測定した。

(iv) 結果と考察

CO 再結合の速度論的解析（1）　「4量体2量体平衡について」

写真用フラッシュを用いたα_2(Fe-CO)β_2(Ni)、または、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光解離後の CO 再結合過程は全ての溶液条件で2層性となる。図2には、吸収の時間変化の典型例を片対数プロットで示した。

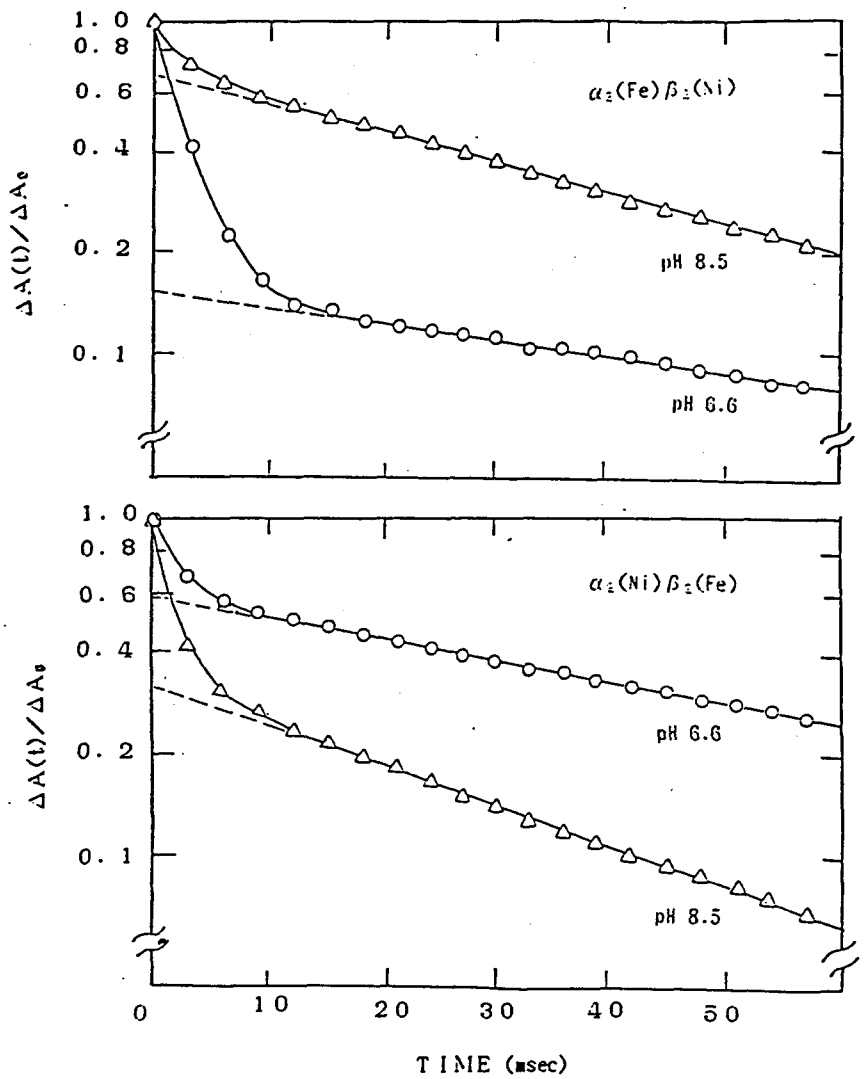


図2　写真撮影用フラッシュ（長さ約1ミリ秒）で CO を完全光解離させた後観測される Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合の時間変化を片対数プロットで表した図　：（○）pH 6.6 ；（△） pH 8.5

測定は、0.1 M Cl を含む 50 mM Bistris/HCl (pH 6.6)、あるいは、Tris/HCl (pH 8.5) 緩衝液中、20℃で行った（ただし、酸素の混入を防ぐため 250 μM の sodium dithionite を入れて測定した）。 CO 結合は 436 nm の吸収変化で測定し、この時の測定光路長は 10 mm とした。試料の濃度は、α_2(Fe)β_2(Ni)とα_2(Ni)β_2(Fe)で、それぞれ、6 μM と 12 μM（ポルフィリンで数えた濃度）とした。また、緩衝液中に存在する CO の濃度は 95 μM とした。

ここでもし、１００％光解離後に観測される反応速度の速い成分が全て、２量体の混成ヘモグロビンの CO 結合によるものであると仮定するなら、４量体２量体間の解離平衡定数は次の式で書ける。

$$^{app}K_{4.2} = [Dimer]^2 / [Tetramer] = C(1 - F_s)^2 / F_s$$

ここで、[Dimer] と [Tetramer] は、それぞれ、２量体と４量体の濃度、そして、C は溶液の総ヘモグロビン濃度（ポルフィリンで数えた濃度）、F_s は遅い反応速度で CO と再結合する成分の全体に占める割合とした。これが、従来行われてきた一般的な解析方法である[131]。しかしながら、オキシ型構造の４量体ヘモグロビンが吸収変化に加わってくる場合、この方法では実際より２量体への解離定数を大きく見積ってしまうことになる。 そういった訳で、 平衡定数の前に app（apparent の略）という添え字を付けた。

次に、レーザーフォトリシスによる実験結果を見てみよう。この場合、速い成分に混入してくるオキシ型構造の４量体ヘモグロビンの影響を考え、次の様な解析方法を行った。先ず、いろいろなヘモグロビン濃度で、観測される遅い成分の割合を調べる。そして、残りの速い成分を計算上、更に２成分に分けて考える。１つは、ヘモグロビンの濃度変化の際、遅い成分の絶対量に比例して変化するもので、もう１つは、観測される遅い成分の絶対量と比例関係にないものを考える。そうすると、前者はオキシ型構造を持つ４量体ヘモグロビンで、後者は２量体ヘモグロビンということになる。また、光解離が１００％達成されなかった場合、即ち、部分光解離が起きている場合でも、ヘモグロビンの濃度と総吸収変化の間に線形な関係が保持されていれば、部分光解離で生じる速い成分は上で述べた前者の枠組みに入れて計算できる。したがって、２量体ヘモグロビンの量を算出する上での問題はない（実際、今回の測定では約７０％解離の条件で実験したので、この様な確認を行った）。今、総ヘモグロビン濃度を C（ポルフィリン濃度）、観測される遅い成分の割合を F_s 、そして、全ての４量体ヘモグロビンのうち遅い成分の占める割合をαとおくと、

$$\alpha = CF_s / 4[Tetramer] \quad あるいは、\quad 4[Tetramer] = CF_s / \alpha$$

なる関係が得られる。したがって、４量体２量体間の解離平衡定数、$K_{4,2}$ は、

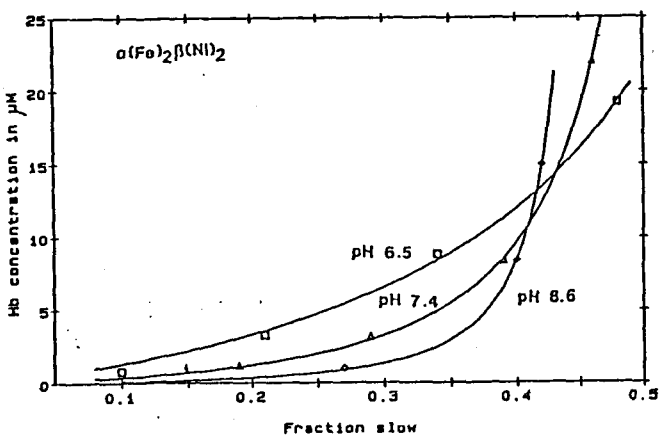
$$K_{4,2} = [\mathrm{Dimer}]^2 / [\mathrm{Tetramer}]$$

$$= (C-4[\mathrm{Tetramer}])^2 / 4[\mathrm{Tetramer}]$$

$$= [C - 4(CF_s / \alpha)]^2 / (CF_s / \alpha)$$

$$= C(F_s - \alpha)^2 / \alpha F_s$$

と表現される（ここで、一般によく行われる解析方法は、$\alpha = 1$ の場合と考えられる）。さてここで、C と F_s は共に観測可能な変数で、未知数の $K_{4,2}$ とαは非線型最小２乗法で求めることができる（図３参照）。



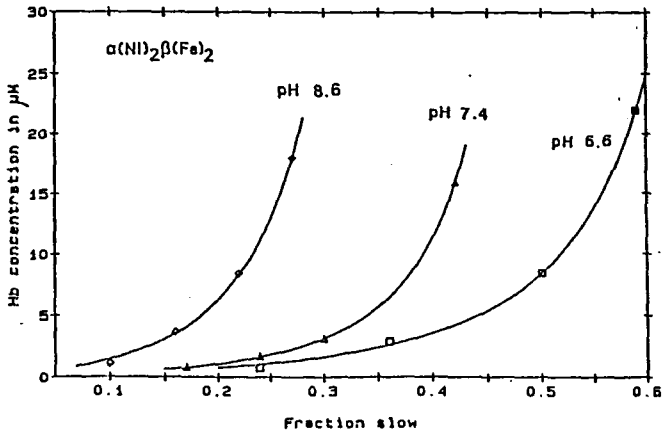


図３　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合で観測される遅い成分の割合（F_s）とヘモグロビン濃度の関係

測定条件は、300 ナノ秒のパルスレーザーを用いたことを除けば図２と同じ。実線は、実験方法のところで述べた理論式 [$K_{4,2} = C(F_s - \alpha)^2/\alpha F_s$] に非線形最小２乗法で合わせた最適曲線を表す。
（注１）この場合、約 70 % 光解離しか達成できなかったので、ヘモグロビン濃度と総吸収変化量（A_0）が比例する範囲で測定した。

preparation	pH	$K_{4,2}$ (μM)	($^{app}K_{4,2}$)
	6.6	11	(33)
$\alpha(Fe\text{-}CO)_2\beta(Ni)_2$	7.4	1.7	(1.8)
	8.6	0.32	(0.69)
	6.6	1.7	(3.3)
$\alpha(Ni)_2\beta(Fe\text{-}CO)_2$	7.4	1.3	(5.8)
	8.6	3.7	(20)
	6.5	6.5	
oxy Hb	7.4	1.0	
	8.5	0.15	
	6.5	4.3×10^{-6}	
deoxy Hb	7.4	20×10^{-6}	
	8.5	140×10^{-6}	

表１　$\alpha_2(Fe\text{-}CO)\beta_2(Ni)$と$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe\text{-}CO)$の４量体２量体平衡の解離平衡定数

２量体への解離平衡定数（$K_{4,2}$）は、図３の方法で求めた値を載せた。また、括弧内に示した $^{app}K_{4,2}$ は、写真用フラッシュを用いた CO 再結合実験で観測される速い成分を全て２量体と仮定した計算値である。また、オキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンのデーターは、 Chu と Ackers[147]がゲル濾過法で測定した値を比較のため掲載した。

こうやって求めた両混成ヘモグロビンの $K_{4,2}$ は、先に述べた $^{app}K_{4,2}$ と共に上の表１に載せた。また、通常のオキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンの $K_{4,2}$ も比較のため表１に載せた。ここで、表中の $K_{4,2}$ は $^{app}K_{4,2}$ と比較して数倍小さい値になっている。この差が特に大きいのは、酸性 pH にある $\alpha_2(Fe\text{-}CO)\beta_2(Ni)$と アルカリ pH での$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe\text{-}CO)$である。これらの試料では、オキシ型構造のデオキシヘモグロビンが通常のデオキシ型構造のそれに構造変化する速度が遅いと説明される。

CO 再結合の速度論的解析（２）　「部分光解離の実験」

フラッシュの強度を減光フィルターで段階的に落としていった時の CO 再結合過程を両混成ヘモグロビンで調べた。先ず、pH 7.4 のα_2(Fe)β_2(Ni)の場合、フラッシュの強度減少に伴い速い成分の割合が増加してゆくことが解った。この様子は、図４(A)にヒストグラムにして表現した。この現象は、CO が１個結合した混成ヘモグロビン、即ち、α(Fe-CO)α(Fe)β_2(Ni)がα_2(Fe)β_2(Ni)と比較して速い成分を多く持つことで説明される。また、ヒストグラムをよく見ると、フラッシュ強度をある程度以上弱めても、速い成分の割合は４０％程度までしか増えないことが解る。したがって、α(Fe-CO)α(Fe)β_2(Ni)は、約４０％の速い成分（この中には、２量体の CO 結合も含まれる）と約６０％の遅い成分とを持つような状態になっていると結論される。また、この４０％程度という値は、CO 濃度を極限まで（ヘム濃度まで）下げて、CO 結合速度を遅くした実験でもほとんど変わらなかった。この現象は、結合速度の速いα(Fe-CO)α(Fe)β_2(Ni)が結合速度の遅いα(Fe-CO)α(Fe)β_2(Ni)に構造変化する速度が著しく遅いことに対応する。さて、この様な構造変化の速度は、オキシ型構造からデオキシ型構造に構造変化する際通る遷移状態の自由エネルギーの高さで決まるはずである。今、この遷移状態の自由エネルギーの高さを一定と考えれば、構造変化の速度が結合しているリガンドの個数の増加につれ低下することの説明になる（リガンド結合に伴いオキシ型構造の自由エネルギーは低下してゆく）。

さて次に、同じ実験を pH を変えて行った。先ず、pH 8.5 の場合、フラッシュの強度を落としてゆくと速い成分の割合が段々増加し、遂には、ほとんどが速い成分となる。この結果は、CO 濃度を下げた実験でも変わらない。 したがって、pH 8.5 の時 CO が結合することによって引き起こされる構造変化は中性 pH の時よりも大きいことが結論される。このことを２状態モデルの枠組みで考えると、α_2(Fe)β_2(Ni)の酸素結合の協同性が、pH の上昇に伴い、大きくなることと矛盾しないが、NMR で見たリガンド結合によって引き起こされるサブユニット界面の状態変化の大きさが pH 依存性を示さなかった事実をうまく説明できない。また、pH 6.5 の実験では、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)がかなり２量体に割れ易くなっているので（表１参照）、１００％光解離した時でも速い成分がかなり多くなり（図２参照）、部分光解離による変化を正確に知るのは困難である。

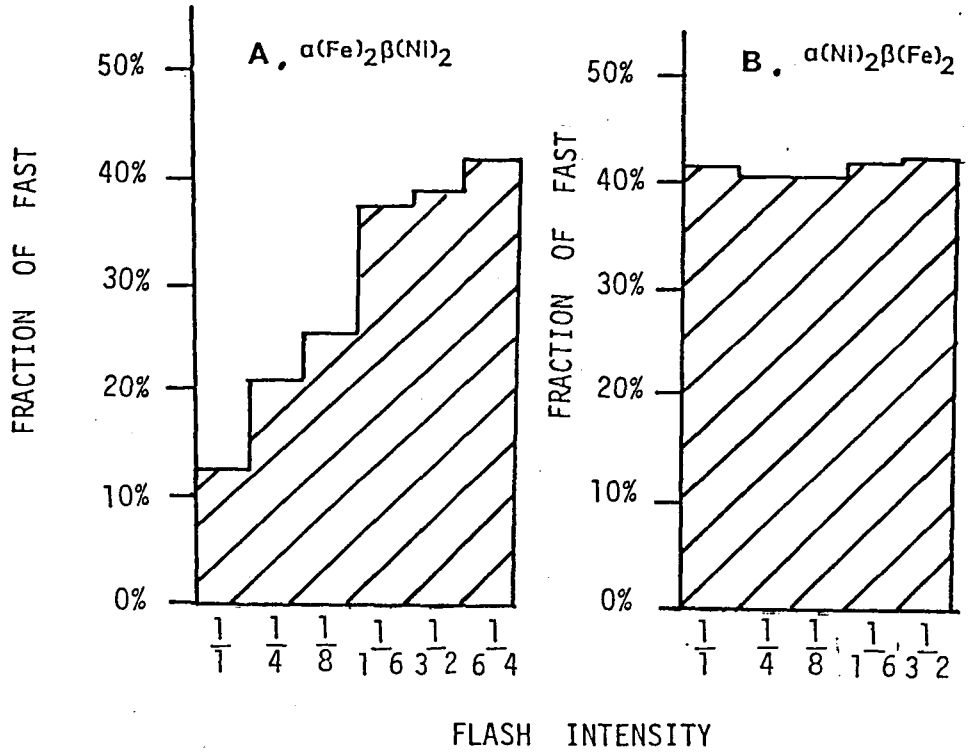


図4　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合で観測される速い成分の割合とフラッシュ強度の関係を表すヒストグラム ： （A） $\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$ ；（B） $\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$

測定は、0.1 M Cl を含む pH 7.4 の 50 mM Tris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。図２と同じ写真撮影用フラッシュで試料を光解離させ、 436 nm の吸収の時間変化を測定した。ただし、この場合の測定光路長は 2 mm とした。ヘモグロビン濃度は、$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$と$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$で、それぞれ、55 μM と 26 μM（ポルフィリンで数えた濃度）とした。また、緩衝液中に存在する CO の濃度は 95 μM とした。フラッシュ強度は、数種類の Neutral Density Filter の組合せで調節した。

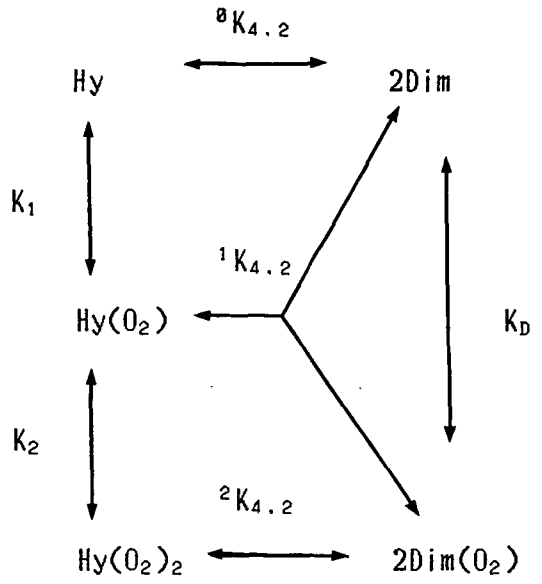
（注１）ここで、表１の $K_{4.2}$ を用いて、このヒストグラム中の２量体混成ヘモグロビンの寄与を考えてみる。先ず、$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$ではフラッシュ強度 1/1 の時見られる速い成分は、ほとんど全部が２量体の CO 再結合から来るものである（このことは、表１の $K_{4.2}$ と $^{app}K_{4.2}$ がほぼ一致することに対応する）。また一方、$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$では、観測される速い成分のうち約半分が２量体の CO 再結合であることが解る（このことは、$K_{4.2} < {}^{app}K_{4.2}$ に対応する）。

さて次に、α_2(Ni)β_2(Fe)について同様の実験を行った。図4(B) に、pH 7.4 の時観測される速い成分の占める割合をヒストグラムにして示した。この場合、フラッシュ強度を変化させても速い成分の占める割合に変化はほとんどないことが解る。また、pH を変化させた実験でも速い成分の占める割合の部分解離による変化はあまり観測されなかった。このことは、α_2(Ni)β_2(Fe)が各 pH で酸素結合に協同性を示さないことに対応している。しかし、先に述べたα_2(Fe)β_2(Ni)の場合と同様に、NMR で見た界面の状態変化との対応関係は２状態モデルではうまく説明できない。したがって、混成ヘモグロビンを用いた中間状態分子のモデルでは、リガンド結合機能はデオキシヘモグロビン型（T 状態）のままなのに、サブユニット界面の状態はオキシヘモグロビン型（R 状態）に変化している場合がしばしば見られる。

今回行った Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 再結合の結果と比較可能なものとして Mn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを用いた実験の報告がある[55]。これら２つの金属置換混成ヘモグロビン、 Ni(II)-Fe(II) と Mn(II)-Fe(II) は、α置換混成ヘモグロビンとβ置換混成ヘモグロビンの部分光解離で見られる違いを含めて、非常のよく似た性質を持っているようである。

酸素平衡曲線のヘモグロビン濃度依存性

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は、ヘモグロビン濃度に依存することが解った（図５(A)(B)参照）。また、図６に両混成ヘモグロビンの P_{50} の濃度依存性を示した。この図から解る様に、ヘモグロビン濃度を低くしてゆくと、両混成ヘモグロビンの酸素親和性は除々に上がってゆく。このことは、２量体への解離が起きて、酸素親和性の高い２量体ヘモグロビンが増えたと考えれば理解できる。４量体２量体平衡を含めた混成ヘモグロビンの酸素平衡は、下に示す様な系になっている。



ここで、Hy は４量体の混成ヘモグロビン、Dim は２量体の混成ヘモグロビン、$^{i}K_{4,2}$ は i 個リガンドの結合した４量体混成ヘモグロビンの２量体への解離平衡定数、K_i は４量体混成ヘモグロビンに i 個目の酸素が結合する時の解離平衡定数、そして、K_D は２量体混成ヘモグロビンに酸素が結合する時の解離平衡定数とした。今回の測定条件（pH 7.4、0.1 M Cl 存在下、２５℃）では、４量体混成ヘモグロビンの酸素親和性は２量体のそれと比較してかなり低くなっており、協同性もあまり大きくない。

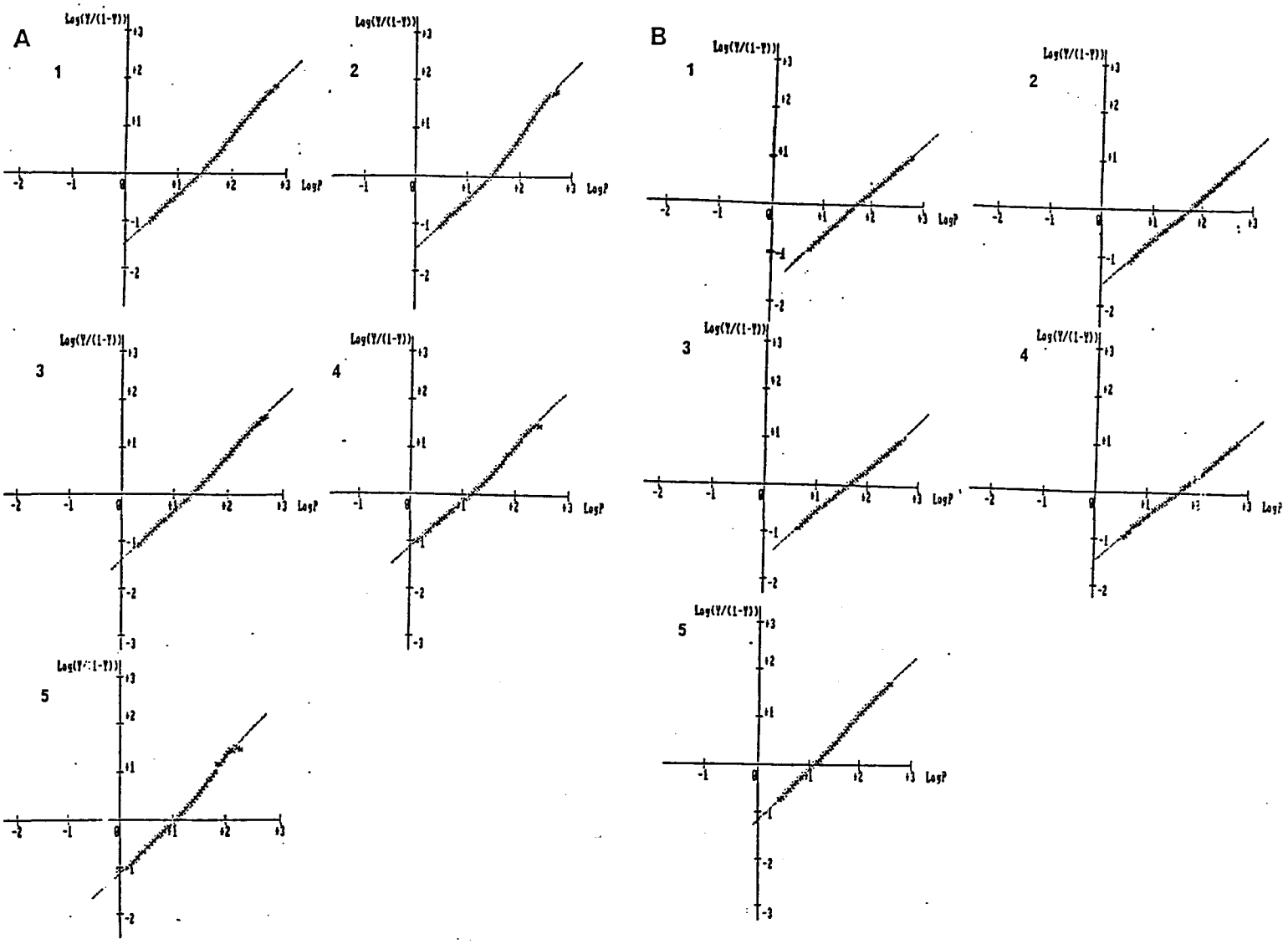


図５　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線（ヒルプロット）のヘモグロビン濃度依存性：（A）α_2(Fe)β_2(Ni)の酸素平衡曲線（1）ヘモグロビン濃度は 282 μM（ポルフィリンで数えた濃度）、以下同様に、（2）65 μM、（3）6.4 μM、(4) 2.0 μM、（5）0.5 μM ；（B）α_2(Ni)β_2(Fe) の酸素平衡曲線（1)ヘモグロビン濃度は 145 μM（ポルフィリンで数えた濃度）、以下同様に、(2) 16 μM、（3）10 μM、(4) 2.5 μM、（5）1.8 μM

測定は、0.1 M Cl を含む pH 7.4 の 50 mM Tris/HCl 緩衝液中、２５℃で行った。 P は酸素分圧を mmHg で表したもので、Y は酸素飽和度を表す。

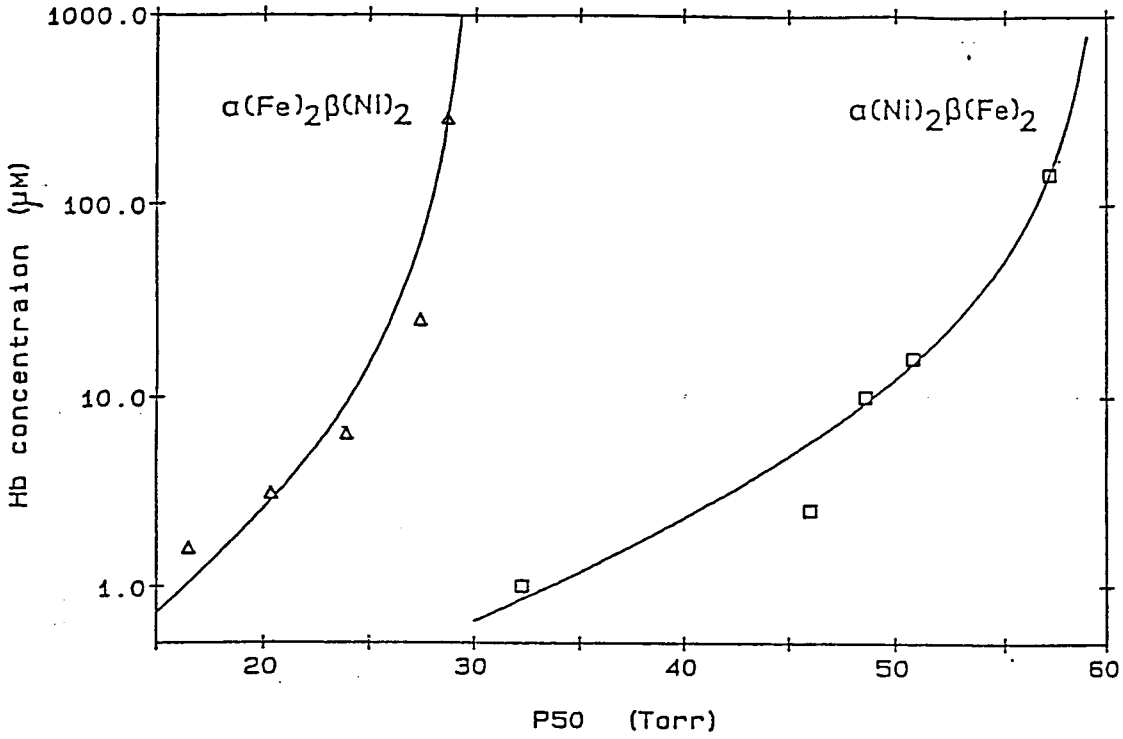


図６　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素親和性（P_{50}）のヘモグロビン濃度依存性 ：（△）$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$；（□）$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$

測定条件等は図５と同じである。P_{50} は、５０％酸素飽和の時の酸素分圧を mmHg で表したもの。実線は、本文中に述べた条件を使って非線形最小２乗法で合わせた最適曲線である。また、$\alpha_2(Fe\text{-}O_2)\beta_2(Ni)$と$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe\text{-}O_2)$の $K_{4,2}$ は、それぞれ、0.9 μM と 1.0 μM になり、また、４量体$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$と４量体$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$ の P_{50} は、それぞれ、30 mmHg と 60.5 mmHg になる。

また、デオキシ混成ヘモグロビン、あるいは、１個酸素の結合した混成ヘモグロビンの４量体２量体平衡は、かなり４量体が安定になっていると思われるので、

$$K_1 \sim K_2 \gg K_D \qquad {}^2K_{4,2} \gg {}^0K_{4,2} \text{ あるいは } {}^1K_{4,2}$$

として、最小２乗法を用いて図６の結果を解析した（図中の実線が最適曲線）。その結果、${}^2K_{4,2}$ は、$\alpha_2(Fe\text{-}O_2)\beta_2(Ni)$ と $\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe\text{-}O_2)$ で、それぞれ、0.9 μM と 1.0 μM になった。これらの値は、先述の CO 結合型混成ヘモグロビンの値と同程度で、酸素の４個結合したオキシヘモグロビンの４量体２量体平衡定数とほぼ同じ値となっていることが確認された（表１参照）。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの光吸収スペクトルの濃度依存性

α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光吸収スペクトルが、pH や温度といった条件で大きく変化することは、既に、前章までに述べた。そして、こういった変化は、α(Ni)サブユニットの Ni-PP の配位数が変化することによって引き起こされる変化であることを既に結論した。今回、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の吸収スペクトルを色々なヘモグロビン濃度で測定して、その濃度依存性を詳しく調べた。図7(A)にはその一例として、pH 8.5、２０℃での、吸収スペクトルの濃度依存性を示した。この変化は、４量体混成ヘモグロビンの吸収スペクトルが２量体混成ヘモグロビンのそれと異なると考えれば、うまく説明される。実際、２量体への解離を著しく促進するような溶液条件、例えば、1 M $MgCl_2$ を含む緩衝液[136]などを用いた場合の吸収スペクトルは、ヘモグロビン濃度の非常に低い時の吸収スペクトルとほぼ一致する。また、こういった測定を、pH 7.4 と pH 6.5 でも行ってみたが、２量体混成ヘモグロビンの吸収スペクトルは pH を変えてもほとんど変化しないことが解った。ただ、ここで注意しなければいけないことは、２量体α(Ni)β(Fe-CO)中 Ni-PP の配位状態が、ちょうど、pH 7.4 の時のα_2(Ni)β_2(Fe-CO)中 Ni-PP とほぼ同じになっていることである。前章までの議論では、混成ヘモグロビンが酸素親和性の低い構造をとる時、αサブユニット中の Ni-PP は４配位が安定となり、酸素親和性の高い構造をとる時、近位ヒスチジンが結合した５配位型 Ni-PP が増えるということであった。しかしながら今回の測定結果を見ると、酸素親和性の高いと思われる２量体α(Ni)β(Fe-CO)中 Ni-PP では、それほど５配位が増えていない。したがって、今までに議論してきた、酸素親和性とαサブユニット中 Ni-PP の配位数との関係が成立するのは、４量体ヘモグロビンの場合に限られるようである（また、単離したα(Ni)鎖中の Ni-PP は、ほとんど４配位型になっていることも知られている[148]）。

図7(B)には、図7(A)と同じ条件で測定した、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の吸収係数の濃度依存性を示した。この様な実験を行えば、４量体２量体平衡の平衡定数を最小２乗法で求めることが可能となる（図中の実線が最適曲線）。この方法で求まった４量体２量体平衡の平衡定数は 5 μM で、CO 再結合の実験から得られた値 3.7 μM とほぼ一致することが解る。

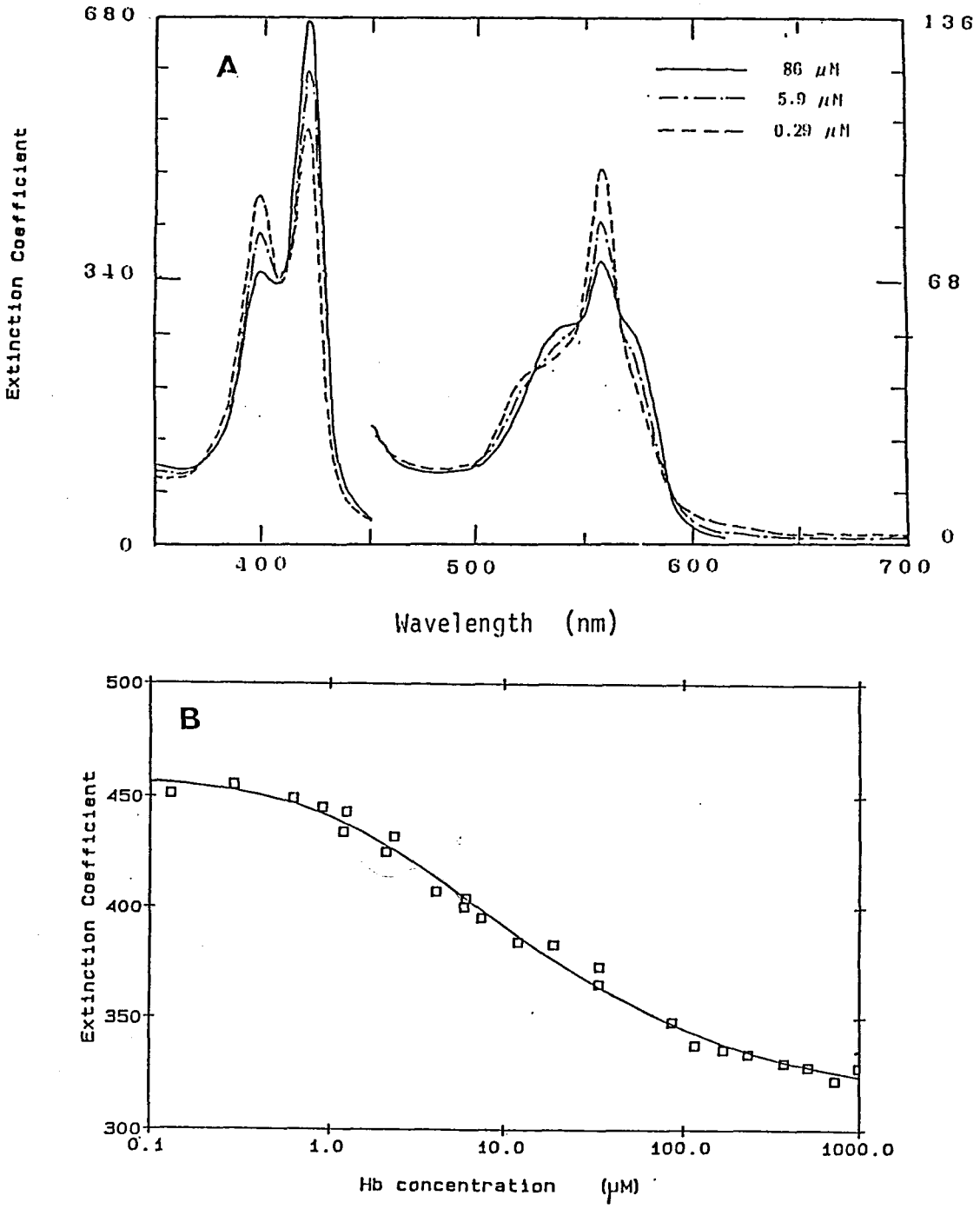


図７　α_2(Ni)β_2(Fe-CO)の光吸収スペクトルのヘモグロビン濃度依存性：（A）pH 8.5 の 50 mM Tris/HCl 緩衝液中、２０℃でヘモグロビン濃度を 0.29 μM、5.9 μM、86 μM と変化させた時のミリモル吸光係数の変化；（B）同じ溶液条件で測定したα_2(Ni)β_2(Fe-CO)のミリモル吸光係数（398 nm）の濃度依存性を示すプロット。実線は最小２乗法で求めた最適曲線を表す。この計算から４量体、及び、２量体のミリモル吸光係数（398 nm）は、それぞれ、453 と 328 になり、また $K_{4,2}$ は 5 μM となる。

ただ、この方法は図に示したような吸収スペクトル変化の大きい場合には、極めて有効であるが、４量体と２量体との吸収スペクトルの差が小さい条件での解析は非常に困難となる（例えば、pH 7.4 の場合等）。また、同様な実験をα_2(Fe-CO)β_2(Ni)についても行ったが、この場合、２量体解離に伴う吸収スペクトル変化はほとんど観測されなかった。

結論

CO の２個結合した中間状態ヘモグロビンの４量体２量体平衡は、ヘモグロビンの４次構造に依らず、酸素の４個結合したオキシヘモグロビンと同程度２量体への解離が進んでいることが示された。このことは、一見、矛盾している様に思われがちであるが、リガンド結合に伴う自由エネルギー変化のダイヤグラムを書いてみると当然予想される現象である。図８に、一例として、α_2(Ni)β_2(Fe)の酸素結合に伴う自由エネルギー変化を表してみた。今、α_2(Ni)β_2(Fe-O_2)、及び、α_2(Ni)β_2(Fe)の４量体２量体間平衡の平衡定数（この場合は、会合の平衡定数であることに注意）を、それぞれ、${}^2K_{4.2}$、${}^0K_{4.2}$ とし、また、４量体混成ヘモグロビン、α_2(Ni)β_2(Fe)、に１個目、２個目の酸素が結合する時の平衡定数（この場合、結合の平衡定数であることに注意）を、それぞれ、K_1、K_2 と書くことにする。また、２量体混成ヘモグロビン、α(Ni)β(Fe)、に酸素が結合する時の平衡定数を K_D とすると、自由エネルギーの大きさの比較から

$$RT\ln {}^2K_{4.2} + RT\ln K_1 + RT\ln K_2 = RT\ln {}^0K_{4.2} + 2RT\ln K_D$$

したがって、

$$K_1K_2 / K_D^2 = {}^0K_{4.2} / {}^2K_{4.2}$$

である。ここで、４量体機能単位説を受け入れ、２量体ヘモグロビンの酸素親和性を $K_D = 4\ mmHg^{-1}$ と仮定し、今回行った pH 7.4 の酸素平衡曲線のヘモグロビ

ン濃度変化の実験結果から ${}^{0}K_{4.2}$ の逆数を計算すると（表１は解離平衡定数で定義しているので、比較のため逆数にした）

$$({}^{0}K_{4.2})^{-1} = 17 \times 10^{-6} \ \mu M$$

となる。この値は、表１に掲載した通常のデオキシヘモグロビンの解離平衡定数、20×10^{-6} μM（100 mM Cl 存在下、pH 7.4、21.5℃での測定）とよく一致する。したがって、もともとデオキシα_2(Ni)β_2(Fe)が、通常のデオキシヘモグロビンと同じ位の $K_{4.2}$ を持っていたとしても、リガンドが結合してゆくに伴い４量体の２量体に対する相対的安定性は低下してゆくことになる。

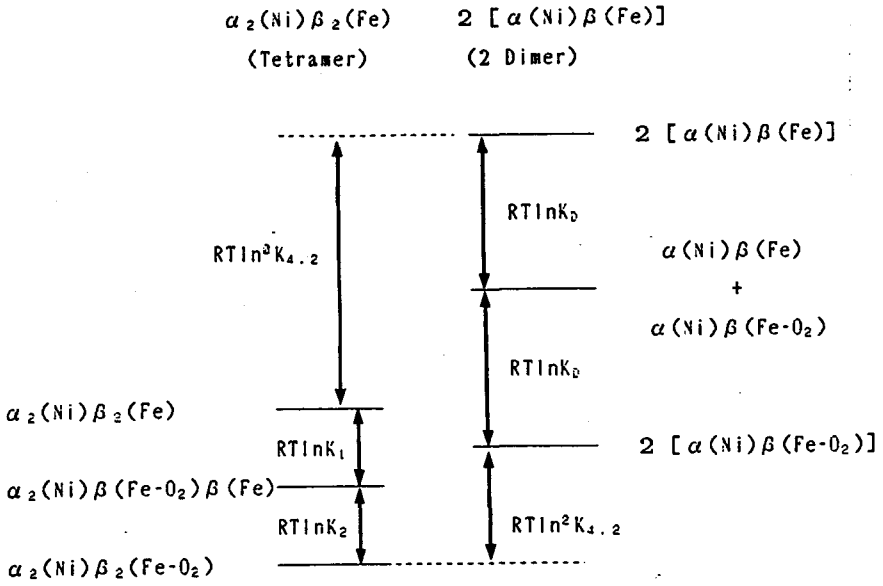


図８　４量体２量体平衡にあるα_2(Ni)β_2(Fe)の酸素化に伴う自由エネルギー変化を表す図

ここで、K_1 と K_2 は、それぞれ、１個目あるいは２個目の酸素が結合する時の結合平衡定数［ただし、α_2(Ni)β_2(Fe)の場合、$K_1 = K_2$ となっている］、そして、K_D は２量体に酸素が結合する時の結合平衡定数を表す。また、${}^{3}K_{4.2}$ と ${}^{2}K_{4.2}$ は、それぞれ、α_2(Ni)β_2(Fe)とα_2(Ni)β_2(Fe-CO)の４量体２量体（会合の）平衡定数を表す。

第６章　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合の速度論的解析

(i) 概要

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンのヘムに結合している酸素をレーザーパルス（パルス幅は約３００ナノ秒）で光解離させた後、酸素が再びヘムに結合する過程をいろいろな酸素濃度の条件で調べた。酸素結合過程は全ての場合、２層性だったので、そのうち遅い結合速度を持つ成分をデオキシ型構造のヘモグロビンの酸素再結合過程として、デオキシ型構造中にある各サブユニットの酸素結合速度定数と酸素解離速度定数とをそれぞれ求めた。また、酸素の結合速度定数と解離速度定数の比として各サブユニットの酸素親和性を見積り、これが、酸素平衡曲線から直接求めた値と一致することを確認した。今回、pH 7.4、２０℃、0.1 M Cl 存在下で行われた測定結果を見てみると、デオキシヘモグロビン中βサブユニットの酸素結合は、αサブユニットのそれと比較して、結合速度で約２倍、解離速度で約５倍速くなっていて、結局、酸素親和性はαサブユニットの方がβサブユニットより２～３倍高くなっていることが解った。これらの結果は、Sawicki と Gibson によって予想されたデオキシヘモグロビン中αサブユニットとβサブユニットの酸素結合における非等価性[149]をうまく説明できる。そして、彼らの実験結果と今回の混成ヘモグロビンを用いた実験の結果は、互いに相補的な関係にあり、通常のヘモグロビンの平衡測定の結果ともよく合うので、結局、デオキシヘモグロビンではαサブユニットから先に酸素が付き始める可能性が高いことを示唆している。

（ii）序論

ヘモグロビンに結合した酸素を光解離させ、その再結合過程を調べる実験は、先に述べた CO の光解離実験と、いくつかの相違点があるので、先ずこれらの点について簡単にふれることにする。

第１に、酸素結合と CO 結合との速度論的振舞いの違いがある[150)-(152)]。オキシ型構造のヘモグロビンに対する親和性で比較すると、CO の方が酸素より１００倍以上親和性は高いが、結合速度で比較すると酸素の方が約１０倍速い。したがって、酸素の解離速度は CO の解離速度より約１０００倍速くなっている訳である。また、酸素結合平衡と CO 結合平衡で協同性を比較した場合、大きさは両者であまり差はないが、酸素結合の協同性はヘモグロビンの構造変化に伴う解離速度変化によるところが大きく、CO 結合の協同性は結合速度変化が重要と言われている[152)]。したがって、ヘモグロビンの協同的酸素結合を速度論的に研究するには、酸素の解離速度の測定がどうしても必要になってくる。そこで、今回の実験では、酸素濃度を色々変化させて酸素再結合過程を調べ、見かけの一次反応速度の酸素濃度依存性から、結合速度定数と解離速度定数とをそれぞれ求めた。

また、光解離実験の装置に対する要求も、リガンドが酸素の場合と CO の場合とでは多少異なる。具体的には、吸収変化観測の時間分解能、及び、光解離用レーザー強度に対する要求の違いである。前者は、酸素結合の方が CO 結合より約１０倍速い速度定数を持つこと、また後者は、酸素の光解離の量子収率が CO のそれより約１０倍低いことに起因する[153)]。

この様な違いをふまえた上で、今回、酸素をリガンドとした再結合過程の速度論的解析を Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンに対して行った。既に述べたように、Ni-PP は、ヘモグロビン中でデオキシヘムの様に振舞うので、デオキシヘモグロビン中αサブユニット、あるいは、βサブユニットの酸素結合の違いを別々に観測することが可能となる（デオキシヘモグロビンのモデルとなる他の金属置換混成ヘモグロビンを用いた酸素のレーザーフォトリシス実験は、今までに報告された例が無い。第１章で述べた様に、Mn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンには酸素をリガンドとして用いることはできないし、Zn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンには

強い光を用いることができないので、結局、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを用いるのが今のところ一番良いようである）。また、今回の結果は、Sawicki と Gibson が、低酸素分圧下にある通常のヘモグロビンに対して行った酸素再結合の実験結果[149]と比較可能なので、この様な比較から、デオキシヘモグロビン中αサブユニットとβサブユニットとの違いについて議論する。

（iii）実験方法

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの調製は第２章で述べたとうり。測定には、0.1 M Cl を含む 50 mM Tris/HCl 緩衝液を用いて、測定温度は２０℃とした。先ず、約 2 ml の測定試料をトノメーター（光路長 1 mm、幅 10 mm のコルツセルの上部に 100 ml のガス採集管を取り付けたもの）に入れ、トノメーターの気相部分を濃度既知の酸素ガス（100% O_2、5% O_2、2% O_2、あるいは、普通の空気を用いる）で満たし、液相と気相が平衡になるようよく混ぜる。この操作を４、５回繰り返してから光解離の実験を行う。

酸素の光解離（レーザーフォトリシス）は、文献[154]にあるような装置の配置で行う。色素レーザー（2100 B dye laser, Phase-R）には、エタノールに溶かした 0.1 mM の rhodamine 6G (Exciton) を用いる。この時のレーザーのパルス幅は、約３００ナノ秒となる。また、光吸収変化は、75W Xe arc lamp を光源として、レーザーの照射面と同一面を、レーザービームと約１０°の角度から観測する。この時、観測光はレンズで集光し試料に当て、測定領域をレーザー照射領域より狭くすることが完全光解離を達成するために必要である。

酸素の再結合速度は、デオキシ型構造のデオキシヘモグロビンとオキシ型構造のデオキシヘモグロビンとの等吸収点である 436 nm の吸収の時間変化から求める[150]。測定結果は、第５章で述べた CO 再結合の解析と同様に、２つの指数関数の和に最小２乗法で合わせる。

(iv) 結果と考察

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合過程は、全ての測定で２層性である。ここで、２成分のうち速い結合速度を持つ成分は、オキシ型構造の４量体ヘモグロビンと２量体ヘモグロビンの重ね合わせで、遅い結合速度を持つ成分は、デオキシ型構造の４量体ヘモグロビンから来ると考えられる。そこで、色々な酸素濃度の条件で測定した混成ヘモグロビンの酸素再結合過程は２つの指数関数の和に最小２乗法で合わせた。そして、このようにして得られる見かけの一次反応速度を表１にまとめた。

ここで、溶液中に存在するであろう分子種とそれぞれの反応経路を図１に示した。第２章で述べたように、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは非常に酸素親和性の低いヘモグロビンで、なおかつ、酸素結合の協同性も小さいので、低酸素分圧下の測定では、光解離前に酸素が０個、または、１個結合した混成ヘモグロビンがかなりの割合で存在していることになる。

	α_2(Fe)β_2(Ni)				α_2(Ni)β_2(Fe)			
Used O_2 gas	ΔA_0	$k_f'(s^{-1})$	$K_s'(s^{-1})$	F_s	ΔA_0	$k_f'(s^{-1})$	$K_s'(s^{-1})$	F_s
100% O_2	0.33	47000		31%	0.14	64180	10800	77%
21% O_2	0.35	13040	1175	35%	0.13	18830	3044	69%
5% O_2	0.19	5116	369.4	49%	0.09	4940	1239	63%
2% O_2	0.11	3746	241.0	45%	0.05	4057	1081	75%

表１　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合の速度

測定は、0.1 M Cl を含む pH 7.4 の 50 mM Tris/HCl 緩衝液中、２０℃で行った。緩衝液は、あらかじめ濃度既知の１気圧の O_2 ガス（表の左端）で平衡をとってから用いた。光解離には、300 ナノ秒のパルスレーザーを用い、酸素再結合は 436 nm の吸収変化で測定した。また、この時、測定光路長は 1 mm とした。試料の濃度は、α_2(Fe)β_2(Ni)とα_2(Ni)β_2(Fe)で、それぞれ、88 μM と 39 μM とした。ここで、ΔA_0 は 436 nm の総吸収変化（光路長は 1mm）を表し、k_f' と k_s' は、それぞれ、速い成分と遅い成分の見かけの１次反応速度定数で、F_s は遅い成分の吸収変化が全体に占める割合である。

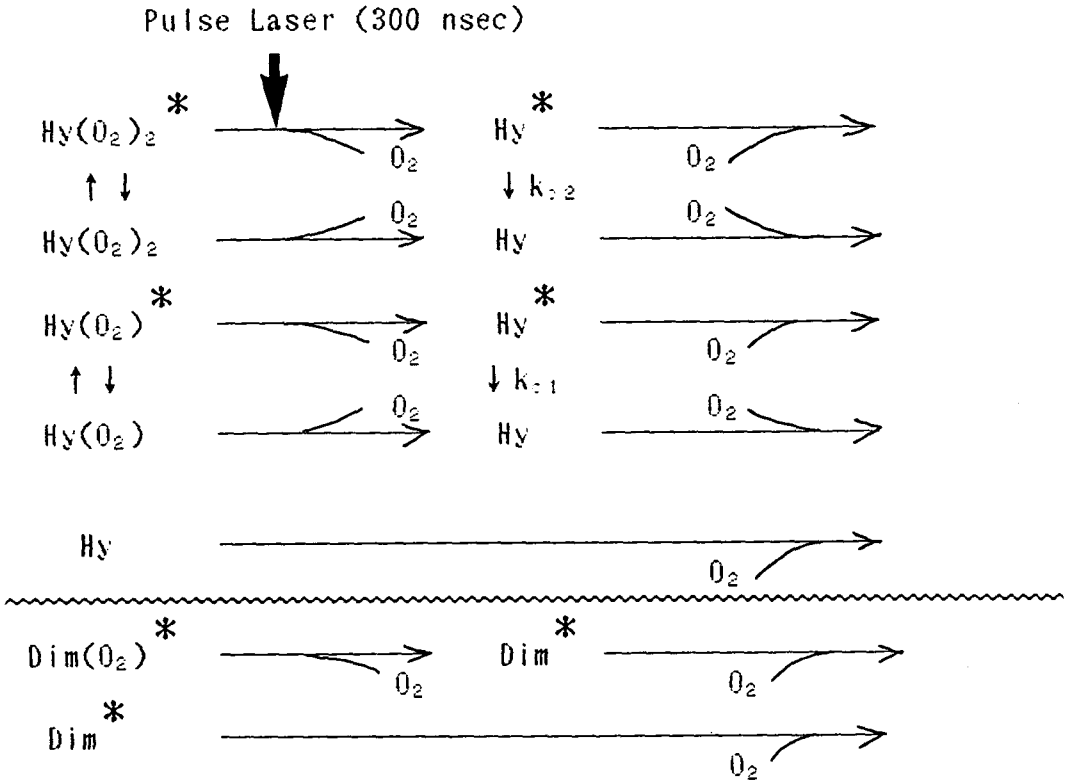


図１　酸素の結合した Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの光解離後の酸素再結合

Hy は４量体の混成ヘモグロビンを表し、Dim は２量体の混成ヘモグロビンを表す（４量体２量体平衡は、酸素結合速度より充分に遅いので Hy と Dim は別の系として扱える）。ここで、オキシ型の速い反応速度を持つであろう分子種には＊を付け、デオキシ型の遅い反応速度を持つ分子種と区別した。また、k_{c2} と k_{c1} はオキシ型構造のデオキシ混成ヘモグロビンが、デオキシ型構造のデオキシ混成ヘモグロビンに変化する構造変化の速度とした。

酸素結合による Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの構造変化

図２(A)に、２０℃で、0.1 M Cl を含む pH 7.4、の緩衝液中（１気圧、１００％酸素で平衡化したもの）での、両混成ヘモグロビンの酸素再結合過程を示した。図を見ると、α_2(Fe)β_2(Ni)ではα_2(Ni)β_2(Fe)より速い速度成分の割合がかなり多いことが解る。ここで、これらの速い成分中には２量体混成ヘモグロビンの酸素結合も含まれている。そこで、この測定条件で両混成ヘモグロビン中にどれだけ２量体が含まれているか考えてみよう。先ず、混成ヘモグロビンの濃度は、α_2(Fe-O_2)β_2(Ni) と α_2(Ni)β_2(Fe-O_2)で、それぞれ、88 μM と 39 μM（ポルフィリンで数えた濃度）である。また、４量体２量体平衡の平衡定数は、この溶液条件で両混成ヘモグロビン共に約 1 μM なので（第５章参照）、２量体混成ヘモグロビンの酸素結合は、全体の吸収変化（ΔA_0）の内、 α_2(Fe)β_2(Ni)で１０％、α_2(Ni)β_2(Fe)で１４％を占めることになる（ただし、簡単のため、酸素飽和度を１と考えた）。したがって、この実験で見られる速い成分の割合の違いは２量体ヘモグロビンの影響から来るものではなくて、２個酸素の結合した４量体混成ヘモグロビンの構造の違いを反映していることになる。 具体的に言うと、α_2(Fe-O_2)β_2(Ni)の方がα_2(Ni)β_2(Fe-O_2)よりもオキシ型構造が安定であることを示している。そして、酸素は CO より速く結合するので[151]、この様な構造上の違いが CO の再結合実験で見るより大きく現れる訳である（酸素は CO より約１０倍速く結合するし、またこの場合の酸素濃度は第５章で用いた CO 濃度より１０倍以上高いので、結局、第５章の CO 再結合実験より１００倍以上速い時間領域での再結合過程を見ていることになる）。

次に、１気圧、５％酸素での結果を図２(B)に示した。この場合、見かけの一次結合速度が遅くなるので時間軸のスケールは図２(A)の場合より１０倍遅くしてある。ここで、図２(A)と図２(B)を比較した場合、α_2(Fe)β_2(Ni)での速い成分の占める割合の減少が顕著である。この様な低酸素濃度の条件では、光解離させる前に１個酸素の結合した混成ヘモグロビンがかなりの割合で溶液中に存在するので（図１参照）、この分子種の影響で遅い成分が増加したと考えられる。また、もう１つの考え方として、酸素結合とヘモグロビンの構造変化との間にある速度論的競争関係が酸素濃度低下によって変わったとも考えられる。さてもう一方の混成ヘモグロビン、α_2(Ni)β_2(Fe)、の酸素再結合の場合、酸素濃度変化を行っ

ても観測される速い成分の割合はあまり変化していない。この結果から α_2(Ni) β_2(Fe)では結合している酸素の個数に依らず、酸素結合機能がほとんど同じであることが解る。そしてこのことは、第２章で述べたα_2(Ni)β_2(Fe)が酸素結合に協同性を示さない事実と対応するし、第５章で述べた CO の部分光解離の実験結果とも合う。

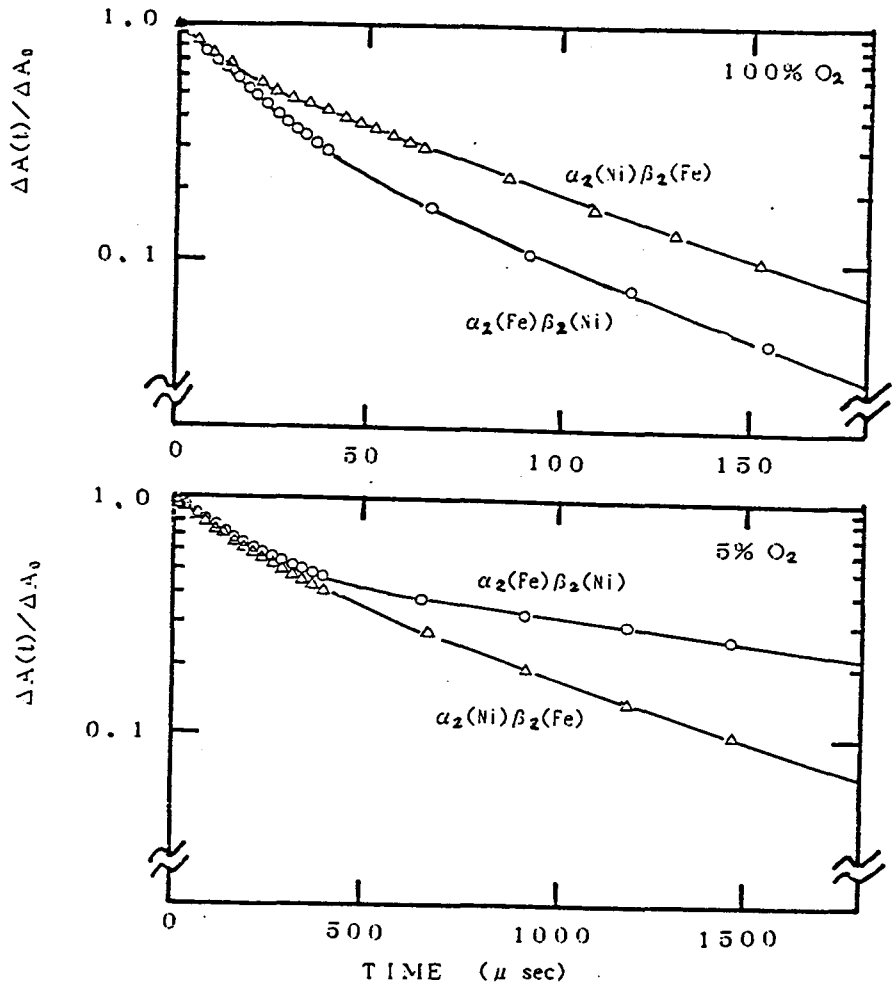


図２　３００ナノ秒パルスレーザーで酸素を完全光解離させた後 Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの示す酸素再結合を片対数プロットした図：（A）１００% O_2 で緩衝液の平衡をとった場合；（B）５% O_2 で緩衝液の平衡をとった場合

測定条件等は表１と同じ。

酸素の結合速度定数と解離速度定数

ヘモグロビン（Hb）に酸素（O_2)が結合する時の反応は、酸素の結合速度定数（k_{on}）と解離速度定数（k_{off}）とを用いて次のように書ける。

$$Hb + O_2 \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} HbO_2$$

既に述べたように、ヘモグロビンの酸素結合量と 436 nm の吸収変化には比例関係があるので、規格化した 436 nm の吸収時間変化（$\Delta A(t)/\Delta A_0$）は結局、

$$\Delta A(t)/\Delta A_0 = \exp[-\{k_{on}[O_2] + k_{off}\}t]$$

と書き表せる。

さて、酸素再結合の実験で観測される見かけの反応速度は $k_{on}[O_2] + k_{off}$ なので、これを酸素濃度 $[O_2]$ の関数としてプロットすれば、得られる直線の傾きと切片が、それぞれ、K_{on} と K_{off} とに対応することになる。今回の実験の主なねらいは、デオキシヘモグロビン中αサブユニットとβサブユニットの酸素結合の違いを調べることにあるので、両混成ヘモグロビンで観測される遅い成分の速度を酸素濃度の関数としてプロットした（図３参照）。図３のプロットから求まる両サブユニットの k_{on} と k_{off} の値は、これらの値の比である平衡定数（ここでは、解離平衡定数 k_{off}/k_{on} を載せた）と一緒に表２にまとめた。また、第５章で述べた両混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は、今回の測定と温度が５℃違うことを除けば他は同じ条件で測定されているので（酸素平衡曲線測定は、温度が２５℃）比較可能なデーターである。そこで、第５章の酸素平衡曲線の解析でヘモグロビンの濃度を無限大に外挿した時の平衡定数も表２に載せた。

表２の値を比較してみると、速度論的解析から求めた平衡定数は、酸素平衡曲線から直接求めた値とよく合っている。また、両サブユニットの平衡定数の平均値は通常のデオキシヘモグロビンに１個目の酸素が結合する時の平衡定数[155]（これも比較のため表２に載せた）と一致している。これらの結果は、今回の

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを用いた速度論的解析が通常のデオキシヘモグロビンのモデル実験として妥当であることを間接的に支持するものである。さて、表２に掲げた速度定数を両サブユニットで比較してみると、酸素結合速度も酸素解離速度もβサブユニットの方が数倍速くて、酸素親和性としてはαサブユニットの方が約２倍高くなっている。

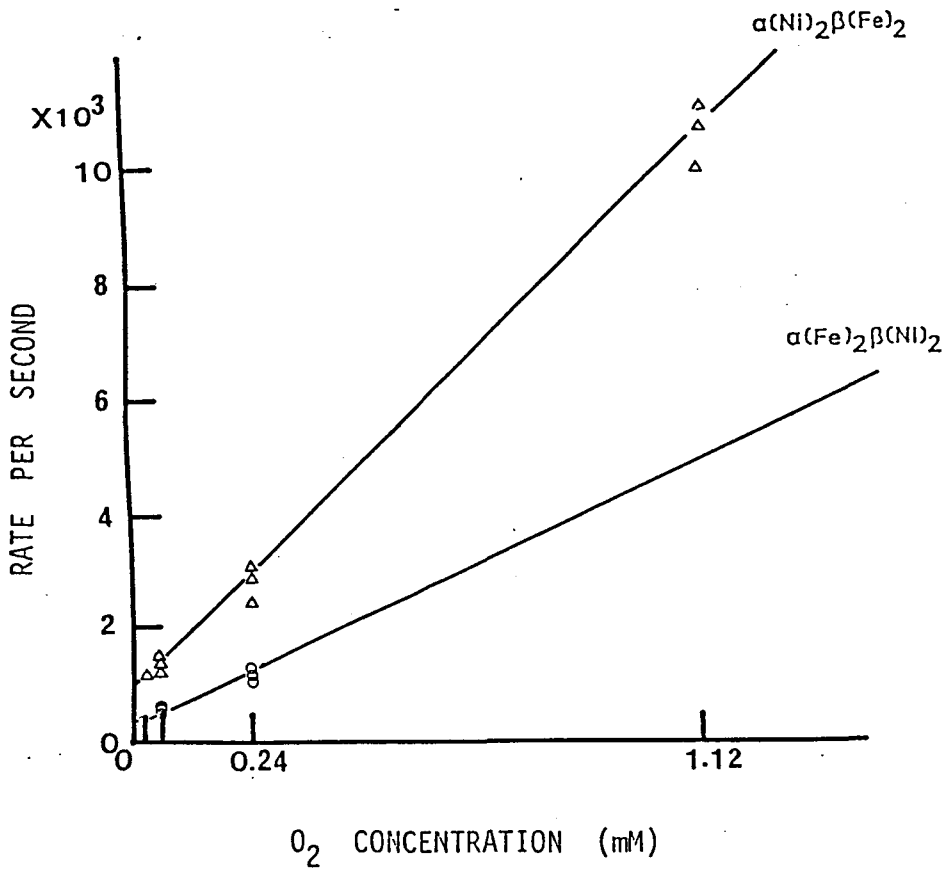


図３　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合で観測される遅い成分の見かけの１次反応速度定数（k_s'）の酸素濃度依存性：（○）$\alpha_2(Fe)\beta_2(Ni)$；（△）$\alpha_2(Ni)\beta_2(Fe)$

測定条件等は表１と同じ。ただし、１気圧の１００％ O_2 の溶解度は２０℃で 1.12 mM とした。

	k_{off}	k_{on}	Equilibrium Constant (k_1)			
			koff/kon	by OEC	K_1	K_1 of HbA (by OEC)
	(s^{-1})	($M^{-1}s^{-1}$)		(mmHg)		
$\underline{\alpha_2(Fe)}\beta_2(Ni)$	200	4.0×10^5	32	30		
	(180)	(2.9×10^6)	(42)			
					47	46
					(65)	(74)
$\alpha_2(Ni)\underline{\beta_2(Fe)}$	950	8.9×10^5	74	61		
	(2500)	(11.8×10^6)	(140)			

表２　Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合に見られる遅い成分の速度パラメーター、及び、平衡定数の表

測定条件等は表１と同じ。 K_{on} と K_{off} は、それぞれ、酸素の結合速度定数と解離速度定数を表す。 K_1（１個目の酸素が結合する時の平衡定数）は速度定数の比から求めた値と、第５章の図６の解析から求めた値とを載せた。また、K_1 は両混成ヘモグロビンの K_1 の平均値を表す。 Sawicki と Gibson[149]が通常のヘモグロビンの速度論的解析で求めた値を（彼らの予想したサブユニットへの帰属が正しいと仮定して）、括弧内に掲載した。ただし、彼らの測定は、pH 7.0 の 50 mM Phos/K 緩衝液を使っている点が今回の測定条件と異なる。また、通常のヘモグロビンの K_1 は、今回の溶液条件と同じもの（ただし２５℃）[155]と、 pH 7.4 の 0.1 M Phos/K 緩衝液中、２５℃での測定結果（括弧内）[156]を比較のため載せた。

今回得られた結果と比較可能な報告例が今までにもいくつかある。中でも重要と思われるのは、Sawicki と Gibson が行った、低酸素分圧下にある通常のヘモグロビンのレーザーフォトリシス実験であろう[149]。酸素飽和度を２０％以下にしたヘモグロビンのレーザーフォトリシスでは、結合速度が約４倍異なる２種類の成分が観測された。そして、これら速度の異なる２成分は、デオキシヘモグロビン中のαサブユニットとβサブユニットの酸素結合によるものと推定された。彼らは、これら２成分の酸素結合定数と酸素解離定数とを計算しているが、この実験だけでは、どちらがαサブユニット由来で、どちらがβサブユニット由来のものか決めることはできなかった（ただし、彼らは、他の実験結果との比較から速い方の成分をβサブユニットの酸素結合と予想している）。 今回の実験で得ら

れた結果は、彼らの観測した２成分の帰属を明かにする上で重要であるから、表２の括弧内にこれらの速度定数も掲載した。表中に掲げた速度定数を比較すると、α_2(Fe)β_2(Ni)の酸素結合は通常のデオキシヘモグロビンの示す遅い成分に対応し、α_2(Ni)β_2(Fe)のそれは通常のデオキシヘモグロビンの示す速い成分に対応するようである。これらの対応関係は、Sawicki と Gibson の予想と一致している。また、定量的にデーターを比較するとβサブユニットの解離速度定数のずれが大きいように見える。ただし、彼らの用いた溶液条件は、pH 7.0 の 50 mM phos/K 緩衝液となっているので、この違いがβサブユニットの解離速度定数に影響しているのかもしれない。実際、通常のヘモグロビンの K_1 も、この様な溶液条件の違いを反映して変化しているので（表２中の値参照）[155][156]、速度定数にも当然変化が期待されるはずである。

Gibson がストップトフローを用いて行った、酸素パルス実験の結果[157]も今回の測定結果と比較できる。この実験は、sodium dithionite を含むデオキシヘモグロビン溶液と酸素を溶かした緩衝液を混合し、デオキシヘモグロビンが部分的に酸素結合された後、再び dithionite で脱酸素化される過程を速度論的解析したものである。このような解析から、デオキシ型構造のヘモグロビン中で速い酸素解離速度を持つサブユニットの解離速度定数が求められている。したがって、これはα_2(Ni)β_2(Fe)の酸素解離速度定数と比較できる。２０℃、pH 7 の 50 mM Bistris/HCl 緩衝液での酸素パルス実験の解析結果は、解離速度が 1000 s^{-1} と報告されているので、今回、混成ヘモグロビンの実験から得た値 950 s^{-1} とよく一致している。

Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンがデオキシヘモグロビンのモデルとして妥当なことは既に何度も述べてきた。しかし、混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定結果だけで、デオキシヘモグロビン中αサブユニットとβサブユニットの酸素親和性の（２、３倍程度の）違いを結論するのは少々やり過ぎかもしれない。なぜならば、通常のヘモグロビンの酸素平衡による測定では、デオキシヘモグロビンの２種類のサブユニットの違いが平均化されてしまうので、この平均値（K_1）が両混成ヘモグロビンの K_1 の平均と一致するかどうかということでしか、混成ヘモグロビンのモデルとしての妥当性がチェックできない状況にあるからである。したがって、第２章で２種類の混成ヘモグロビンの酸素親和性の違いを、通常の

ヘモグロビンのサブユニットの違いに直接結び付けることは難しかった。一方、速度論的解析を用いれば、通常のヘモグロビンでも、それぞれのサブユニットの特徴を時間分離することが可能となる場合がある。先に取り上げた Sawicki と Gibson の実験[149]もそういった例の一つである。今回行った混成ヘモグロビンと通常のヘモグロビンの速度定数の比較は、サブユニットによる酸素結合（解離）速度の違いも含めて、両混成ヘモグロビンがデオキシヘモグロビンの良いモデルであることを示唆している。そして更に、これら速度論的研究の結果は、再び酸素平衡の議論に戻すことが可能で、結局、デオキシヘモグロビンではαサブユニットから先に酸素が付く可能性が高いことを強く示唆している。

第７章　まとめ

ヘモグロビンの協同性は、ヘモグロビンの酸素結合に伴う構造変化によって生み出される。このことは、デオキシヘモグロビンとオキシヘモグロビンの X 線結晶解析から決まる構造の違いで証明された。ヘモグロビンの協同性と構造変化の関係を結び付けるモデルとしては、現在のところ２状態モデルが最も頻繁に用いられ、ヘモグロビン研究の現状は２状態モデルに大きく依存していると言っても過言ではない。２状態モデルは、デオキシヘモグロビン型の分子構造をした酸素親和性の低い T 状態と、オキシヘモグロビン型の分子構造をした酸素親和性の高い R 状態の２種類のみを仮定し、各々の状態の中では１個目から４個目までの酸素が同じ親和性で結合するとする。そして、これら２状態の平衡でヘモグロビンの諸性質を説明してしまうモデルである。また２状態モデルでは、ヘモグロビンの構造変化が分子内全ての部位で一斉に起こることを予想するので、２状態一斉転移モデルとも呼ばれる。

この論文の主旨は、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを用いたモデル実験の結果から、現在、研究者の間で事実上受け入れられている２状態モデルの問題点を指摘し、ヘモグロビンの協同性発現の仕組みをもう一度考え直すことにある。ここで、２状態モデルを検証する上でのポイントは、現在まだよく知られていないヘモグロビンの酸素結合における中間状態分子（１～３個酸素の結合したヘモグロビン分子）の構造と機能を知ることにあると筆者は考えている。もし、これら中間状態分子の示す色々な物理量が T 状態のそれと R 状態のそれとの混ざりとして説明できるなら、２状態モデルは正しいことになる。しかしながら、通常の測定で中間状態分子の性質を見ようと思っても、この様な中間状態分子はヘモグロビンの持つ強い協同性のため溶液中に低濃度しか存在しない。したがって、測定される物理量のほとんどは、デオキシヘモグロビンの物理量とオキシヘモグロビンの物理量の線形結合に近くなり、結果として、２状態モデル的に見えてしまうことが多い。そこで、ヘモグロビン中４個あるヘムのうちいくつかを、酸素の結合したオキシヘムのモデルとなる金属ポルフィリン、ないしは、酸素の解離したデオキシヘムのモデルとなる金属ポルフィリンで置き換えた金属置換混成ヘモ

グロビンを調製し、中間状態分子をモデルで実現しようということになる。今回、デオキシ状態で固定されたヘムのモデルとして Ni(II)プロトポルフィリン（Ni-PP）を用いた一連の実験を行った。ここで先ず問題となるのは、 今回使用した Ni-PP がタンパクとの相互作用という点から見て、デオキシヘムのモデルとして妥当かどうかということである。今、仮に、２状態モデルを受け入れる立場に立てば、Ni-PP のモデルとしての妥当性は何か１つの物理量についてのみ示せば良いことになる（なぜならば、２状態モデルは他の物理量も分子内で同時に変化することを予想する）。しかし、この論文は２状態モデルを否定する立場にあるので、複数の測定手段を用いて色々な角度から Ni-PP のデオキシヘムのモデルとしての妥当性を検証する必要がある。

先ず、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンに１個目の酸素が結合する時の平衡定数（K_1）と、通常のヘモグロビンの K_1 とを比較することになる。この比較は様々な溶液中で行われ、プロトン、あるいは、IHP といったアロステリックエフェクターの効果を含めて K_1 は非常に良い一致を示した。またこの比較は、化学修飾法を用いて酸素親和性を、デオキシヘモグロビンの親和性からオキシヘモグロビンの親和性まで、ほぼ連続的に変えたヘモグロビンに対して行われ、この場合も K_1 は良い一致を示した。これらの結果は、Ni-PP が、その置かれているヘモグロビンの構造によらず（オキシ型構造、デオキシ型構造を問わず）、通常のデオキシヘムと等価な影響を対になる鉄サブユニットに与えていることを示唆している。また、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素再結合の速度論的解析は、デオキシ型構造中各 Fe(II)サブユニットの酸素結合速度、及び、酸素解離速度が通常のデオキシヘモグロビンのそれらと一致することを明らかにした。

次に、Ni-PP がヘモグロビンの構造に与える影響をプロトン NMR で調べてみた。その結果、デオキシ状態にある Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンのサブユニット界面の水素結合の状態は、通常のデオキシヘモグロビンのそれと様々な溶液条件で一致した。そしてまた、デオキシ Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン中 Fe(II) サブユニットで観測される近位ヒスチジンイミダゾール NδH プロトンがヘム鉄から受ける常磁性シフトの大きさも、デオキシヘモグロビン中各サブユニットで見られる常磁性シフトの大きさと完全に一致した。このことは、ヘム鉄と近位ヒスチジンの間の相互作用の強さが通常のデオキシヘモグロビンの場合と同じであ

ることを示している。これらの測定結果は全て、Ni-PP がデオキシヘムと等価な影響をタンパク構造に与えていることを示唆するので、Ni-PP はデオキシヘムの優れたモデルということになる。ちなみに、他の金属を用いた混成ヘモグロビンに関する今までの報告を見ると、モデルとしての良さがこれ程色々な測定手段から検討された例はない。

Ni-PP がデオキシヘムの優れたモデルなら、Fe(II) サブユニットにリガンドの結合した Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンは中間状態分子のモデルとして意味を持つことになる。そこで先ず、α_2(Fe)β_2(Ni)を使ったモデル実験、即ち、αサブユニットに２個酸素が結合する時のヘモグロビンの構造変化を調べる実験、についてまとめてみよう（この論文では、 Fe(II)サブユニットのリガンドとして CO と O_2 を使っているが、両リガンド結合がヘモグロビンの平衡状態の性質に与える影響は等価であると言われている）。ここで、βサブユニットに入っている Ni-PP は、常に近位ヒスチジンと結合した高スピン（Ｓ＝１）５配位状態なので、近位ヒスチジンイミダゾール NδH が高スピン Ni(II) から受ける常磁性シフトの大きさはポルフィリン近傍の構造標識として使える。また、β(Ni)サブユニットの光吸収スペクトルはヘモグロビンの構造変化に伴いわずかに変化するので、これもポルフィリン近傍の構造標識として使える。そして、デオキシヘモグロビン型４次構造特有の 14 ppm プロトン NMR シグナル［デオキシヘモグロビン型４次構造でα1β2界面に存在する Tyr(α42)-Asp(β99) の水素結合プロトンと同定されている］は、ヘモグロビンのサブユニット界面の構造標識となる。更にまた、デオキシα(Fe)サブユニットで観測される Fe-Nε（ヘム鉄と近位ヒスチジンイミダゾールの結合）伸縮振動の共鳴ラマン線の波数は、ヘモグロビンの構造変化に伴い比較的大きく変化するので、リガンド結合の前のデオキシヘム近傍の構造を知る上で、この構造標識は重要である。これらの構造標識で見たヘモグロビン分子内の個々の部位の構造変化と、酸素平衡曲線、及び、リガンド再結合の速度論的解析から見た機能との関係は次頁の表１(A)にまとめた。また、化学修飾を加えて酸素親和性を変えたα_2(Fe)β_2(Ni)の構造と機能の関係は表１(B)にまとめた。

α_2(Fe)β_2(Ni) + 2Ligands

	pH 8.5	pH 7.4 (pH 7.5)	pH 6.5	pH 7.4 (+ IHP)
酸素親和性 K_1 (mmHg)	8.2	31	73	167
酸素平衡の協同性 (n)	++ n = 1.3	+ n = 1.1	− n = 1	− n = 1
CO 再結合で見た協同性	++	+	−	−
β(Ni)の光吸収スペクトル	T → R	T → R	T のまま	T のまま
β(Ni)の NH の常磁性シフト	T → T,R R が優勢	T → T,R	T → T,R	T のまま
14 ppm の界面水素結合プロトン	T → R	T → R	T → R	T のまま

表1(A)　α_2(Fe)β_2(Ni)のリガンド結合に伴う構造変化

化学修飾を受けたα_2(Fe)β_2(Ni)

酸素親和性 K1 (mmHg)	<1	1～3	3～6	7～10	>10
α(Fe)の Fe-Nε 伸縮振動ラマン線	R	R	T,R の 混ざり	T が ほとんど	T
酸素平衡の協同性 (n)	− n = 1	++ 1.1～1.3	+++ 1.3～1.4	+++ 1.2～1.4	− 1～1.1

表1(B)　化学修飾を受けたα_2(Fe)β_2(Ni)の構造と機能

α_2(Ni)β_2(Fe)についても同様のまとめを行うことができる（表2(A)(B)にまとめた）。ただ、αサブユニットに入っている Ni-PP と近位ヒスチジンの相互作用は、ヘモグロビンの構造変化に対してヒスチジンが結合したり、結合が切れたりする程大きく変化する。したがって、この配位数変化に付随する大きな光吸収スペクトル変化がヘム近傍の構造標識として使える点でα_2(Fe)β_2(Ni)より有利である。また一方、ヒスチジンが切れた状態、即ち、4配位 Ni-PP は低スピン状態（S＝0）となるので、この場合α(Ni)サブユニットの近位ヒスチジンイミダゾール NδH の常磁性シフトは観測されなくなる。

α_2(Ni)β_2(Fe) + 2Ligands

	pH 8.5	pH 7.4 (pH 7.5)	pH 6.5	pH 7.4 (+ IHP)
酸素親和性 K1 (mmHg)	16.2	44	106	215
酸素平衡の協同性 (n)	— n = 1	— n = 1	— n = 1	— n = 1
CO 再結合で見た協同性	—	—	—	—
α(Ni)の光吸収スペクトル	T → T,R R が優勢	T → T,R	T のまま	T のまま
14 ppm の界面水素結合プロトン	T → T,R R が優勢	T → T,R	T のまま	T のまま

表2(A)　α_2(Ni)β_2(Fe)のリガンド結合に伴う構造変化

化学修飾を受けたα_2(Ni)β_2(Fe)

酸素親和性 K_1 (mmHg)	＜1	2～7	＞8
β(Fe)の Fe-Nε 伸縮振動のラマン線	R	T	T
α(Ni)の光吸収 スペクトル		T,R の 混じり	T
酸素平衡の協同性 (n)	－ n = 1	＋ (?) 1.0～1.3(?)	－ n = 1

表2(B)　化学修飾を受けたα_2(Ni)β_2(Fe)の構造と機能

（注１）K_1 ＜ 1 mmHg の時の光吸収スペクトルは２量体解離の影響が大きいので比較できなかった。

（注２）2 mmHg ＜ K_1 ＜ 7 mmHg 試料の中で、協同性が大きく見えるのは、NES-desArg(α141)α_2(Ni)β_2(Fe)だけである。そして、α_2(Fe)β_2(Ni)の場合と異なり、α_2(Ni)β_2(Fe)の K_1 と n 値との関係はベル型曲線にならない。

これら４つの表中には、構造変化の指標と酸素平衡機能との関係が２状態モデル的でない例がいくつか出てくる。先ず、pH 6.5（IHP 無し）のα_2(Fe)β_2(Ni)に２個リガンドが付く場合、酸素平衡曲線で見ると酸素親和性の低い T 状態のまま酸素を結合するが（n = 1）、α_2(Fe-CO)β_2(Ni)では 14 ppm のプロトン NMR が消失しており、サブユニット界面の状態は既に R に変化している。したがって、サブユニット界面の構造変化は酸素親和性変化より先に起こり、これらの変化は同期していないことになる。ただ、α_2(Fe)β_2(Ni)は、酸素親和性の上昇に伴い協同性も大きくなるので、この様に協同性の大きくなる条件ではα_2(Fe-CO)β_2(Ni)のサブユニット界面が R 状態になっていても２状態モデルと矛盾しない。しかし、化学修飾で酸素親和性を更に高くし、1 mmHg < K_1 < 3 mmHg とした時、共鳴ラマン線で見た酸素の結合する前のヘム近傍の状態は既に R なのに、酸素結合にかなり大きな協同性が観測される場合がある。この現象も、２状態モデルではうまく説明できない。

更に決定的に２状態モデルと矛盾するのが、pH 8.5 のα_2(Ni)β_2(Fe)の酸素結合である。この場合、酸素は T 状態の親和性のまま２個結合するが（n = 1)、この酸素結合と同期してα(Ni)の吸収スペクトルは大きく変化する［β(Fe)の酸素結合とα(Ni)の光吸収スペクトル変化が同期することは、色々な酸素飽和度で測定したα_2(Ni)β_2(Fe)の光吸収スペクトルが等吸収点を結ぶことで確認された］。したがって、α_2(Ni)β_2(Fe-CO)は、βサブユニットで見ると T 状態で、同一分子のαサブユニットで見るとほぼ R 状態になっており、また、サブユニット界面の状態で見るとほぼ R 状態といった、２状態モデルの枠組みでは考えにくい構造をとっている。

以上の結果から考えると、Ni(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンで作った酸素結合の中間状態は２状態モデルで表現できないことになる。それでは、２状態モデルはヘモグロビンの構造と機能の関係を記述する上で全く使い道の無いモデルであろうか？　今回の結果を含め、今までに報告されている色々なヘモグロビンの酸素平衡曲線の結果を統一的に見てみると、ヘモグロビンの酸素親和性には、もうそれ以上親和性の上がらない極限状態と、逆に、もうそれ以上親和性の下がらないもう一方の極限状態とが有るようである。そして、ヘモグロビンの個々の測定量にも両極端の２つの状態（２状態モデルで言うところの T と R ）が存在する

ようである。事実、１個の物理量にのみ着目すればヘモグロビン性質は、大体２状態に分類されるようである。例えば、αヘム近傍の構造は大体２状態に分けることができたし（第３章参照）、リガンド再結合の速度論的解析では、結果は全て２個の速度成分の和として表現される（第５章、第６章参照）。こういった状況下で、ヘモグロビン分子中の個々の部位の構造変化が必ずしも同時に起こっていないことが、２状態モデルからのズレとして現れる訳である。ここでこのズレ、即ち、ヘモグロビン分子内の個々の部位間の相互作用の大きさを示すことが可能になれば、ヘモグロビンの構造変化の仕組みを、２状態モデルを骨組みにして、統一的に理解することが可能となるであろう。

謝辞

この論文中の一連の実験は、大阪大学基礎工学部、岡崎分子科学研究所、ペンシルバニア大学医学部、及び、コーネル大学生化学研究室において行われたものです。論文を終えるにあたり、筆者の指導や協同研究、及び、この論文作成に協力して頂いた森本英樹先生に深く感謝します。なお大阪大学在学中に、指導して頂いた宮崎源太郎先生、堀洋先生、三浦成敏先生、及び、森本研究室の皆様に感謝いたします。また1年半の渡米期間中、研究の場を与えて頂き、ご指導下さった米谷隆先生、ヘモグロビンをはじめ生物物理学一般の知識を与えてくれた斉藤正男先生に深く感謝いたします。そして、この論文を注意深く読んでくださった葛西道生先生、三井利夫先生、柳田敏雄先生、堀尾武一先生に感謝いたします。

実験にあたっては、共鳴ラマンスペクトルの測定法を指導してくれた北川禎三先生、NMR スペクトルの測定を指導してくれた犬伏俊朗先生、リガンド再結合の速度論的解析法等を指導してくれたコーネル大学の Quentin. H. Gibson 先生に心より感謝いたします。

参考文献

(1) Fermi, G. (1975) J. Mol. Biol. 97, 237.

(2) Heidner, E. J., Ladner, R. C. & Perutz, M. F. (1976) J. Mol. Biol. 104, 707.

(3) Ho, C. & Russu, I. M. (1981) Methods Enzymol. 76, 275.

(4) Asher, S. A. (1981) Methods Enzymol. 76, 371.

(5) Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P.(1965) J. Mol. Biol. 136, 271.

(6) Minton, A. P. & Imai, K. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1418.

(7) Banerjee, R. & Cassoly, R. (1969) J. Mol. Biol. 29, 225.

(8) Ikeda-Saito, M., Yamamoto, H. & Yonetani, T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8639.

(9) Blough, N. V. & Hoffman, B. M. (1984) Biochemistry 23, 2875.

(10) Simolo, K., Stucky, G., Chen, S., Bailey, M., Scholes, C. & McLendon, G. (1985) J. Am. Chem. Soc. 107, 2865.

(11) Burunori, M., Amiconi, G., Antonini, E., Wyman, J. & Winterhalter, K. H. (1970) J. Mol. Biol. 49, 461.

(12) Maeda, T., Imai, K. & Tyuma, I. (1972) Biochemistry 11, 3865.

(13) Banerjee, R., Stretzkowski, F. & Henry, Y. (1973) J. Mol. Biol. 73, 455.

(14) Nagai, K. (1977) J. Mol. Biol. 111, 41.

(15) Shibayama, N., Morimoto, H. & Miyazaki, G. (1986) J. Mol. Biol. 192, 323.

(16) Shibayama, N., Morimoto, H. & Kitragawa, T. (1986) J. Mol. Biol. 192, 331.

(17) Shibayama, N., Inubushi, T., Morimoto, H. & Yonetani, T. (1987) Biochemistry 26, 2194.

(18) Adair, G. S. (1925) J. Biol. Chem. 63, 529.

(19) Imai, K. (1982) Allosteric Effects in Haemoglobin, Cambridge University Press, Cambridge.

(20) Bohr, C., Hassehbach, K. & Krogh, A. (1904) Skand. Arch. Physiol. 16, 402.

(21) Wyman, J (1964) Advan. Protein. Chem. 19, 223.

(22) Benesch, R. & Benesch, R. E. (1967) Biochem. Biophys. Res. Comm. 26, 162.

(23) Chanutin, A. & Curnish, R. R. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 96.

(24) Imai, K. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7607.

(25) Baldwin, J. M. & Chothia, C. (1979) J. Mol. Biol. 129, 175.

(26) Baldwin, J. M. (1980) J. Mol. Biol. 136, 103.

(27) Shaanan, B. (1983) J. Mol. Biol. 171, 31.

(28) Fermi, G., Perutz, M. F., Shaanan, B. & Fourme, R. (1984) J. Mol. Biol. 175, 159.

(29) Gelin, B. R., Lee, A. W. & Karplus, M. (1983) J. Mol. Biol. 171, 489.

(30) Ladner, R. C., Heidner, E. J. & Perutz, M. F. (1977) J. Mol. Biol. 114, 385.

(31) Fung, L. W. & Ho, C. (1975) Biochemistry 14, 2526.

(32) Dickerson, R. E. & Geis, I. (1983) Hemoglobin : Structure, Function, Evolution, and Pathology, Benjamin/Cummings, Menlo Park.

(33) Antonini, E., Wyman, J., Zito, R., Rossi-Fanell, A. & Caputo, A. (1961) J. Biol. Chem. 236, 60.

(34) Kilmartin, J. V., Hewitt, J. A. & Wooton, J. F. (1975) J. Mol. Biol. 93, 203.

(35) Arnone, A. (1972) Nature (London) 237, 146.

(36) Perutz, M. F. (1970) Nature (London) 228, 726.

(37) Greenfield, N. J. & Williams, M. N. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 637.

(38) Kilmartin, J. V., Breen, J. J., Roberts, G. C. K. & Ho, C. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1246.

(39) Ohe, M. & Kajita, A. (1980) Biochemistry 19, 4443.

(40) Koshland, Jr. D. E., Nemethy, G. & Filmer, D. (1966) Biochemistry 5, 365.

(41) Perutz, M. F., Ladner, J. E., Simon, S. R. & Ho, C. (1974) Biochemistry 13, 2163.

(42) Anderson, N. L. (1975) J. Mol. Biol. 94, 33.

(43) Viggiano, G. & Ho, C. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3673.

(44) Makino, N. & Sugita, Y. (1982) J. Biol. Chem. 257, 163.

(45) Pin, S., Valat, P., Cortes, R., Michalowicz, A. & Alpert, B. (1985) Biophys. J. 48, 997.

(46) Ogawa, S. & Shulman, R. G. (1972) J. Mol. Biol. 70, 315.

(47) Cassory, R., Gibson, Q. H., Ogawa, S. & Shulman, R. G. (1971) Biochim. Biophys. Acta. 44, 1015.

(48) Miura, S. & Ho, C. (1982) Biochemistry 21, 6280.

(49) Miura, S., Ikeda-Saito, M., Yonetani, T. & Ho, C. (1987) Biochemistry 26, 2149.

(50) Yonetani, T., Yamamoto, H. & Woodrow, G. V. (1974) J. Biol. Chem. 249, 682.

(51) Hoffman, B & Petering, D. H. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 637.

(52) Tsubaki, M., Nagai, K. & Morimoto, H. : unpublished results.

(53) Inubushi, T. : unpublished results.

(54) Inubushi, T., D'Ambrosio, C., Ikeda-Saito, M. & Yonetani, T. (1986) J. Am. Chem. Soc. 108, 3799.

(55) Blough, N. V., Zemel. & Hoffman, B. M. (1984) Biochemistry 23, 2883

(56) Smith, F., Gingrich, D., Hoffman, B. M. & Ackers, G. K. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 7089.

(57) Waterman, M. R. & Yonetani, T. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5847.

(58) Yamada, K. & Morimoto, H. : unpublished results.

(59) Arnone, A., Rogers, P., Blough, N. V., McGoury, J. L. & Hoffman, B. M. (1986) J. Mol. Biol. 188, 693.

(60) Miyazaki, G. & Morimoto, H. : unpublished results.

(61) Shibayama, N., Itaroku, K. & Morimoto, H. : unpublished results.

(62) Hirota, Y. & Morimoto, H. : unpublished results.

(63) Kajitani, K., Kido, T. & Morimoto, H. : unpublished results.

(64) Yamazaki, T. & Morimoto, H. : unpublished results.

(65) Ishimori, K. & Morishima, I. : unpublished results.

(66) Fujii, M. & Morimoto, H. : unpublished results.

(67) Adler, D. A., Longo, F. R., Kampas, F. & Kim, J. (1970) J. Inorg. Nucl. Chem. 32, 2443.

(68) Caughey, W. S., Fujimoto, W. Y., Bearden, A. J. & Moss, T. H. (1966) Biochemistry 5, 1255.

(69) Kilmartin, J. V., Fogg, J., Luzzana, M. & Rossi-Barnerdi, L. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7039.

(70) Rossi-Farelli, A., Antonini, E. & Caputo, A. (1958) Biochim. Biophys. Acta. 30, 608.

(71) Kilmartin, J. V. & Rossi-Bernardi, L. (1971) Biochem. J. 124, 31.

(72) Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Hirata, W. & Kuroda, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta. 200, 189.

(73) Lowry, H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.

(74) McLees, B. D. & Caughey, W. S. (1968) Biochemistry 7, 642.

(75) Alston, K., Schechter, A. N., Arcoleo, J. P., Greet, J., Parr, G. R. & Friedman, F. K. (1984) Hemoglobin 8, 47.

(76) Shelnutt, J. A., Alston, K., Ho, J. Y., Yu, N. T., Yamamoto, T. & Rifkind, J. M. (1986) Biochemistry 25, 620.

(77) Imai, K., Yonetani, T. & Ikeda-Saito, M. (1977) J. Mol. Biol. 109, 83.

(78) Baldwin, J. M. (1975) Prog. Biophys. Mol. Biol. 29, 225.

(79) Imai, K. (1981) Methods Enzymol. 76, 438.

(80) Nagai, K., LaMar, G. N., Jue, T. & Bunn, H. F. (1982) Biochemistry 21, 842.

(81) Sugita, Y. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1251.

(82) Perutz, M. F., Kilmartin, J. V., Nagai, K., Szabo, A. & Simon, S. R. (1976) Biochemistry 15, 378.

(83) Nagai, K & Kitagawa, T. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2033

(84) Ondrias, M. R., Rousseau, D. L., Kitagawam T., Ikeda-Saito, M., Inubushi, T. & Yonetani, T. (1982) J. Biol. Chem. 257, 8766.

(85) Suzuki, T., Hayashi, A., Yamamura, Y., Enoki, Y. & Tyuma, I. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 691.

(86) Suzuki, T., Hayashi, A., Shimizu, A. & Yamamura, Y. (1966) Biochim. Biophys. Acta. 127, 280.

(87) Hayashi, N., Motokawa, Y. & Kikuchi, G. (1966) J. Biol. Chem. 241, 79.

(88) Hayashi, N., Suzuki, T., Imai, K., Morimoto, H. & Watari, H. (1969) Biochim. Biophys. Acta. 194, 6.

(89) Ranny, H. M., Nagel., R. L., Heller, P. & Udem, L. (1968) Biochim. Biophys. Acta. 160, 112.

(90) Maxwell, J. C. & Caughey, W. S. (1976) Biochemistry 15, 388.

(91) Miura, S. & Morimoto, H. (1980) J. Mol. Biol. 143, 213.

(92) Tsubaki, M. & Nagai, K. (1979) J. Biochem. 86, 1029.

(93) Ikeda-Saito, M. (1980) J. Mol. Biol. 255, 8497.

(94) Riggs, A. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1948.

(95) Benesch, R. & Benesch, R. E. (1961) J. Biol. Chem. 236, 405.

(96) Chanutin, A. & Curnish, R. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 123, 163.

(97) Matukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y. & Kitagawa, T. (1985) J. Am. Chem. Soc. 107, 1108.

(98) Matukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y. & Shimokawa, Y. (1981) J. Mol. Biol. 150, 615.

(99) Imai, K. (1983) J. Mol. Biol. 167, 741.

(100) Fung, L. W. M. & Ho, C. (1975) Biochemistry 14, 2526.

(101) Asakura, T., Adachi, K., Wiley, J. S., Fung, L. W. M., Ho, C., Kilmartin, J. V. & Perutz, M. F. (1976) J. Mol. Biol. 104, 185.

(102) Viggiano, G., Wiechelman, K. J., Chervenick, P. A. & Ho, C. (1978) Biochemistry 17, 795.

(103) Russu, I. M., Ho, N. T. & Ho, C. (1987) Biochim. Biophys. Acta. 914, 40.

(104) LaMar, G. N., Budd, D. L. & Goff, H. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 104.

(105) LaMar, G. N., Nagai, K., Jue, T., Budd, D. L., Gersonde, K., Sick, H., Kagimoto, T., Hayashi, A. & Taketa, F. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 96, 1172.

(106) Takahashi, S., Lin, A. K. L. C. & Ho, C. (1980) Biochemistry 19, 5196.

(107) Inubushi, T., Ikeda-Saito, M. & Yonetani, T. (1983) Biochemistry 22, 2904.

(108) Miura, S. & Ho, C. (1984) Biochemistry 23, 2492.

(109) Davis, D. G., Lindstrom, T. R., Mock, N. H., Baldassare, J. J., Charache, S., Jones, R. T. & Ho, C. (1971) J. Mol. Biol. 60, 101.

(110) Shulman, R. G., Ogawa, S., Wuthrich, K., Yamane, T., Peisach, J. & Blumberg, W. E. (1969) Science (Washington, D.C.) 165, 251.

(111) Shulman, R. G., Ogawa, S., Wuthrich, K., Yamane, T., Patel, D. J. & Blumberg, W. E. (1970) J. Mol. Biol. 53, 143.

(112) Lindstrom, T. R., Noren, I. B. E., Charache, S., Lehmann, H. & Ho, C. (1972) Biochemistry 11, 1677.

(113) Lindstrom, T. R. & Ho, C. (1973) Biochemistry 12, 134.

(114) Dalvit, C. & Ho, C. (1985) Biochemistry 14, 2526.

(115) Farrar, T. C. & Becker, E. D. (1971) Pulse and Fourier Transform NMR : Introduction to Theory and Methods, Academic Press.

(116) Redfield, A. G., Kantz, S. D. & Ralph, E. K. (1975) J. Mag. Res. 19, 114.

(117) Becker, E. D. & Inubushi, T. (1982) J. Mag. Res. 51, 128.

(118) Kumar, A., Ernst, R. R. & Wuthrich, K. (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 95, 1

(119) Wuthrich, K., Wider, G., Wagner, G. & Braun, W. (1982) J. Mol. Biol. 155, 311

(120) Ballhausen, C. J. & Liehr, A. D. (1959) J. Am. Chem. Soc. 81, 538.

(121) Abraham, R. J. & Swinton, P. F. (1969) J. Chem. Soc. B, 903.

(122) LaMar, G. N. & Walker, F. A. (1979) Porphyrins 4, Academic Press.

(123) Ogawa, S., Mayer, A. & Shulman, R. G. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 1485.

(124) Mayer, A., Ogawa, S. & Shulman, R. G. (1973) J. Mol. Biol. 81, 187.

(125) Chuknyiski, P. P., Alston, K. & Rifkind, J. M. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 721.

(126) Luisi, B. & Shibayama, N. (1988): submitted to J. Mol. Biol.

(127) Perutz, M. F., Fermi, G., Luisi, B., Shaanan, B. & Liddington, R. C. (1987) Acc. Chem. Res. 20, 309.

(128) Fermi, G. & Shibayama, N. : unpublished results.

(129) Gibson. Q. H. (1959) Biochem. J. 71, 293.

(130) Gibson, Q. H. & Antonini, E. (1967) J. Biochem. 251, 1533.

(131) Edelstein, S. J., Rehmar, M. J., Olsen, J. S. & Gibson, Q. H. (1970) J. Biol. Vhem. 245, 4327.

(132) Gray, R. D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2870.

(133) Gray, R. D. (1975) J. Biol. Chem. 250, 790.

(134) Sawicki, C. A. & Gibson, Q. H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1533.

(135) Rosemeyer, M. A. & Huehns, E. R. (1967) J. Mol. Biol. 25, 253.

(136) Hewitt, J. A., Kilmartin, J. V., Eyck, L. F. T. & Perutz, M. F. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 203.

(137) Mills, F. C., Johnson, M. L. & Ackers, G. K. (1976) Biochemistry 15, 5350.

(138) Mills, F. C. & Ackers, G. K. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 273.

(139) Andersen, M. E., Moffat, J. K. & Gibson, Q. H. (1971) J. Biol. Chem. 249, 2879.

(140) Chiancone, E., Anderson, N. M., Antonini, E., Bonaventura, J., Bonaventura, C., Brunori, M. & Spagnuolo, C. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2883.

(141) Gray, R. D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1812.

(142) Sawicki, C. A. & Gibson, Q. H. (1981) Biophys. J. 35, 265.

(143) Kellet, G. L. & Gutfreund, H. (1970) Nature (London) 227, 921.

(144) Shulman, R. G., Hopfield, J. J. & Ogawa, S. (1975) Quart. Rev. Biophys. 8, 325.

(145) Edelstein, S. J. & Edsall, J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 3796.

(146) Hayashi, A., Suzuki, T. & Shin, M. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 310, 309.

(147) Chu, A. H. & Ackers, G. K. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1199.

(148) Manoharanm P. T., Alston, K & Rifkind, J. M. (1986) J. Am. Chem. Soc. 108, 7095.

(149) Sawicki, C. A. & Gibson, Q. H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7538.

(150) Henry, E. R., Hofrichter, J., Sommer, J. H. & Eaton, W. A. (1983) J. Mol. Biol. 166, 443.

(151) Sawicki, C. A. & Gibson, Q. H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5783.

(152) Szabo, A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2108.

(153) Saffran, W. A. & Gibson, Q. H. (1977) 252, 7955.

(154) Sawicki, C. A. & Morris, R. J. (1981) Methods Enzymol. 76, 667.

(155) Imai, K. (1979) J. Mol. Biol. 133, 233.

(156) Imai, K. : unpublished results.

(157) Gibson, Q. H. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1.