OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射光を用いたMg(Ⅱ)-Fe(Ⅱ)混成ヘモグロビンのX線結晶解析
Author(s)	朴, 三用
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081490
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

放射光を用いたMg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのX線結晶解析

大阪大学大学院　基礎工学研究科　物理系専攻　生物工学分野

博士　論文

朴　　三　　用

(1)

放射光を用いたMg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのX線結晶解析

Crystallographic Studies of Magnesium (MgII) - Iron (FeII) Hybrid Hemoglobins using Synchrotron Radiation

大阪大学大学院　基礎工学研究科　物理系専攻　生物工学分野

博士　論文

by Sam - Yong Park

A thesis submitted to Osaka University for the degree of Doctor of Philosophy

Jan, 1995

朴　　三　　用

目　次

はじめに ---------- 1

第1章 序　論

(1) X線結晶解析からの Hb の構造 ---------- 4

(2) アロステリック転移 ---------- 6

(3) ヘムと周辺の構造変化 ---------- 8

(4) 配位子結合による Hb の3次構造変化 ---------- 8

(5) 金属置換混成 Hb のX線結晶解析 ---------- 9

第2章 T構造における α 鎖への配位子結合による構造変化

1. 序論 ---------- 12

2. 実験方法

(1) HbA と単離鎖の調製 ---------- 13

(2) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の調製 ---------- 14

(3) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶化

a) 硫安溶液 ---------- 15

b) PEG 溶液 ---------- 15

(4) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ のデータ収集 ---------- 15

(5) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の精密化 ---------- 18

3. 結果および考察

(1) 硫安溶液と PEG 溶液中での deoxyHbA 構造の違い ---------- 25

(2) 硫安溶液中の $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造変化

a) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と deoxyHbA の構造比較 ---------- 29

b) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ のに配位子 CO 結合による構造変化 ---------- 31

(3) PEG 溶液中の $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造変化

a) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と deoxyHbA の構造比較 ---------- 40

b) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ のに配位子 CO 結合による構造変化 ---------- 40

第 3 章 T構造における β 鎖への配位子結合による構造変化

1. 序論 ---------- 51

2. 実験方法

(1) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の結晶化

a) 硫安溶液 ---------- 52

b) PEG 溶液 ---------- 52

(2) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ のデータ収集 ---------- 54

(3) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の構造の精密化 ---------- 55

3. 結果および考察

(1) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ と deoxyHbA の構造比較 ---------- 59

(2) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ に配位子 CO 結合による構造変化 ---------- 59

(3) なぜ IHP の影響を見るか ---------- 74

(4) +IHP と -IHP 分子による $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造変化 ---------- 74

第 4 章 $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ の X線結晶解析

1. 序論 ---------- 80

2. 実験方法

(1) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ の結晶化およびデータ収集 ---------- 81

(2) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ の構造の精密化 ---------- 83

3. 結果および考察

(1) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ と deoxyHbA (PEG) の構造比較 ---------- 91

(2) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ に配位子 CO 結合による構造変化 ---------- 94

(3) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ 構造の比較 ---------- 102

第５章　Ｔ構造の deoxyHb に配位子が結合した時の構造変化

(1) Ｔ構造における α 鎖の構造変化 ---------- 113

(2) Ｔ構造における β 鎖の構造変化 ---------- 115

謝　辞 ---------- 120

参考文献 ---------- 121

Abbreviations and Notes

Hb: hemoglobin

Mb : myglobin

DPG: 2, 3-diphosphoglyceric acid

deoxyHb: hemoglobin, Fe(II), with no ligand bound

COHbA: hemoglobin with carbon monoxide as a ligands

met Hb: hemoglobin, Fe(III), with water as ligand

IHP: inositol hexaphosphate

P_{50}: half-saturation point in an oxygen binding curve of Hb

PEG: polyethylene glycol

Tris: 2-amino-2-(hydroxymethyl)-propane-1, 3-diol

ppIX: portoporphyrin IX

Mg-ppIX: magnesium portoporphyrin IX

Fe-ppIX: hemin

AS : ammonium sulfate

PDB : Protein Data Bank

Fe(TPivPP)(1-MeIm)(O_2), Fe(TPivPP)(2-MeIm)(O_2) : (1and 2-methylimidazole)-meso-tetra (α, α, α,α-o-pivalamidophenyl)porphyrinatoiron(II)-oxygen

R 値＝Σ｜｜Fo｜-｜Fc｜｜/Σ｜Fo｜, Fo : 観測された構造因子、Fc : モデルから計算された構造因子

T 構造: the structure having the same subunit arrangement as that of deoxyHb

R 構造: the structure having the same subunit arrangement as that of oxyHb

$\alpha(^{M})_2\beta(^{Fe(II)})_2$: α 鎖には金属イオンppIX,β 鎖には Fe-ppIX が入っている Hb。

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{M})_2$: β 鎖には金属イオンppIX,α 鎖には Fe-ppIX が入っている Hb。

T-metHb : Hb のヘムの配位子として水分子が配位しており（Fe^{3+}）、分子全体は deoxy 構造であるもの。

T(α-oxy)Hb：α鎖のヘムの配位子として酸素分子が配位しており、分子全体はdeoxy構造であるもの。

各構造はBrookhavenの PDBからの座標である

(1) deoxyHbA ：AS溶液、分解能 1.7Å, PDB deposit cord: 2HHB Fermi *et al.*, 1984.

(2) deoxyHbA : PEG溶液、分解能 1.9Å, PDB deposit cord: 1HBB, Kavanaugh *et al.*, 1992.

(3) $\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$: PEG溶液、分解能 2.6Å, PDB deposit cord: 1NIH, Luisi *et al.*, 1990.

(4) T-met Hb : PEG溶液、分解能 1.9Å, PDB deposit cord: 1HGB, Liddington *et al.*, 1992.

(5) T(α-oxy) Hb : PEG溶液、分解能 1.9Å, PDB deposit cord: 1HGC, Liddington *et al.*, 1992.

(6) COHbA : リン酸溶液、分解能 2.7Å, PDB deposit cord: 2HCO, Boldwin, 1980.

はじめに

Hbは呼吸ガスを運搬するアロステリックタンパク質で赤血球中に存在する。ヒト成人のHbは、2本のα鎖と2本β鎖からなる4量体で、それぞれのポリペプチトは直接の酸素結合部位であるヘムを1個ずつ持っている。したがって、Hb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同じではなく、始めの方の酸素結合がHb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見られる。これがHb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ため、いろいろと酸素結合状態にあるHb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deoxyHbと酸素が4個結合したoxyHbの構造と機能に関するデーターは膨大な蓄積を見る（Fermi, 1975; Heidner *et al.*, 1976; Ho *et al.*, 1981; Asher *et al.*, 1981）が、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。

現在までのところ2状態モデル（Monod *et al.*, 1965）がHb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なっている。2状態モデルは、deoxyHb型の4次構造をした酸素親和性の低い状態（T状態）とoxyHb型の4次構造をした酸素親和性の高い（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Hbの持ついろいろな性質を説明しようと言うモデルである。

Hbの酸素結合における中間段階のモデルとして金属置換した混成Hbを用いる方法がある（Banerjee *et al.*, 1969; Ikeda-Saito *et al.*, 1977; Blough *et al.*, 1984; Simolo *et al.*, 1985）。この方法で用いられる金属プロトポルフィリンは、Hb中で酸素の結合したoxyヘムの性質になっているか、あるいは酸素の結合していないdeoxyヘムの性質になっているかのいずれかである。現在までのところoxyヘムのモデルとしてはFe(III)CN（Banerjee *et al.*, 1969, 1973; Burunori, *et al.*, 1970; Maeda et al., 1972; Nagai *et*

al., 1977）とCr(III)プロトポルフィリン（Unzai 1993）が用いられてきた。そして、deoxyヘムのモデルとしては、Zn(II)（Miyazaki），Cu(II)（Sibayama），Ni(II)（Shibayama *et al.*, 1986），Mn(II)（Blough *et al.*, 1984），Mg(II)プロトポルフィリン（Minagawa）などが用いられる。

HbのX線の結晶解析はMbとともにタンパク分子のX線結晶解析を先導して来た。変異Hbや化学修飾Hbと金属置換混成Hbなど多くのHbの構造が決定されて来たが、酸素結合の中間段階にあるHbの構造については情報が不足している。そのため、酸素親和性調節メカニズムは部分的しか解かれてない。この研究は、酸素結合の中間段階であるMg(II)-Fe(II)混成Hbを結晶化して構造を解きT構造でのCOが結合した時の構造変化について報告する。

現在まで発表されているT構造のdeoxyHbへ配位子が結合した構造が幾つか決定された（Arnone *et al.*, 1989; Lusi *et al.*, 1989, 1990; Liddington *et al.*, 1992）。これらの構造はCOが結合したMg(II)-Fe(II)混成Hbの構造と比べると構造変化の傾向はほぼ一致しているが、配位子結合によりFe原子の位置や、β鎖のE11 Valなどの重要な部位の変化の大きさに大きな違いがある。この構造の差は恐らく、構造解析の低い分解能の精度と配位子の占有率、Fe原子の酸化などの問題から来る原因であると考える。つまり、これらの原因により現在までの酸素結合の中間段階での構造変化を取ることはできなかった。それに比べてCOが結合したMg(II)-Fe(II)混成Hbの構造は高い精度の構造と配位子の占有率、Fe原子の酸化などを充分に満たした最初の構造であり、T構造のdeoxyHbへ配位子が結合した構造を示していると考える。

この論文は、5つの章で構成されている。第1章は、序論としてHbの構造について概説し、第2章ではβ鎖にMg(II)を置換した$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$を調製し、硫安溶液とPEG溶液で結晶化を行って構造を決定し、配位子の一酸化炭素（CO）結合による構造変化について述べる。第3章では、α鎖にMg(II)を置換した$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$を調製し、deoxy型とCO型で結晶化を行って構造を決定し、CO分子の結合による構造変化を詳しく述べる。第4章では、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$のβ鎖に配位子結合の立体障害となるE11 ValをIleでアミノ酸置換したHbをdeoxy型とCO型で結晶化し、構造を解いてβ鎖の配位子結合の立体障害を大きくした時にヘム周辺

に及ぼす変化について報告する。第５章では、４次構造変化がＴ構造に止められたdeoxyHb に CO が結合した時の構造変化を今まで発表された構造と比較しながらこの章でまとめて論じる。

第 1 章

序　　論

(1) X線結晶解析からの Hb の構造

脊椎動物の Hb はすべて類似の構造を持っている。Hb は 2 本のα鎖と 2 本のβ鎖からなっている 4 量体で分子量約 64500 の球状のタンパク質である。α鎖は 141 個の、またβ鎖は 146 個のアミノ酸からなり、各鎖にはヘムを 1 個ずつ持っている。図 1-1 にはβ鎖の立体構造を表したものである。α鎖も基本的にこれと同一の構造であると考えてもさしつかえない。各サブユニットのポリペプチド鎖は N 末端から順番に A, B, ……, H と呼ばれる 8 個のα ヘリックスの部位と NA, AB, CD,……, HC と呼ばれる非ヘリックスの部位とからなっている。各々のα ヘリックスおよび非ヘリックスのアミノ酸残基に N 末端側からの順に A1, A2, CD1, CD2 などと番号をつける。Hb は、同じ 2 つのサブユニットを区別するため、図 1-2 に示したように、α サブユニットはα1、α2 とβ サブユニットはβ1、β2 と呼ぶ。各サブユニットはそれぞれ正四面体の頂点に位置するような配列し、1 個の球状分子を形成している。そして、Hb 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 回回転対称軸が存在する。Hb 分子はα1α2 間およびβ1β2 間のサブユニット間接触は非常に少ない。α サブニットとβ サブユニットとの接触には 2 通りあり、一つはα1β1 間の接触（これはα2β2 間と等価）、他方はα1β2 間（これはα2β1 間と等価）である。α1 のヘムとβ1 のヘムとの距離はα1β2 間 のそれに比べて大きい。α1β1（α2β2）接触に関与しているのは主として B, G, H のヘリックスと GH コーナーで、α1β2（α2β1）間は C と G のヘリックスと FG コーナーで接触する。二量体として堅固なα1β1 間は、α1β2 間に比べて接触する表面積が大きく、結合の数も多い。deoxyHbA の場合、α1β1 間には 32 残基の 126 原子が、α1β2 間には 27 残基の 107 原子が、接触している（Baldwin 1980; Baldwin *et al.*, 1979; Shaanan *et al.*, 1983; Fermi *et al.*, 1984）。

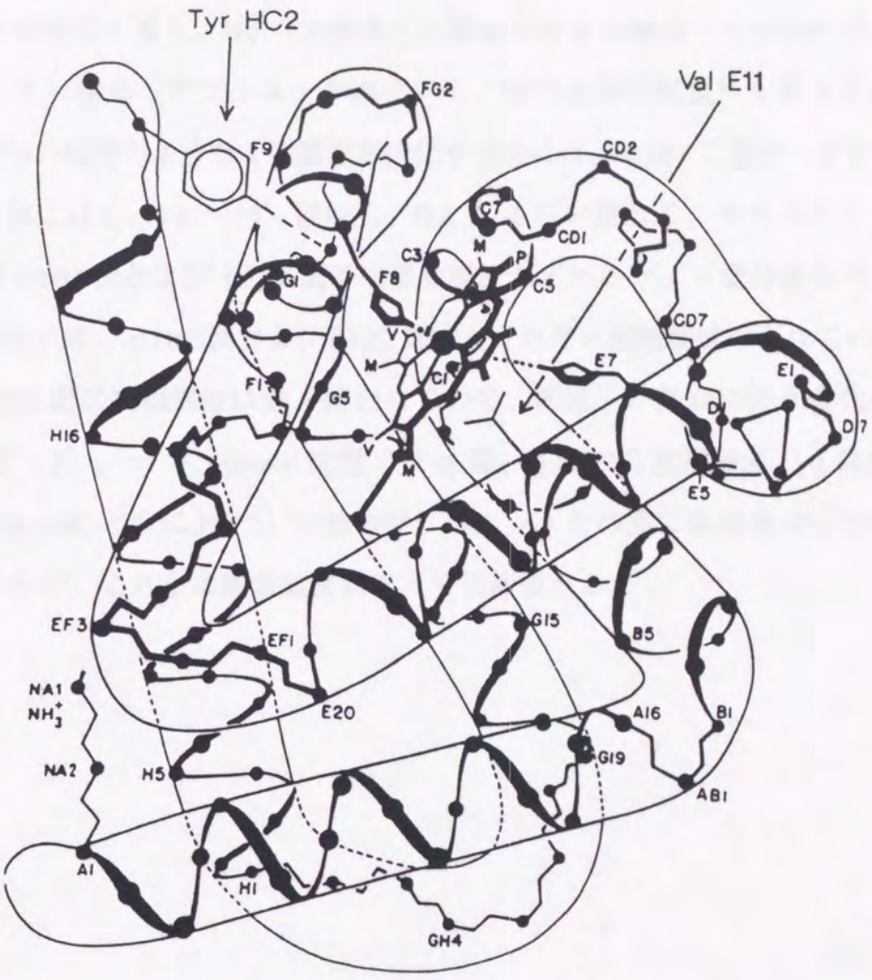

図 1-1　Hb のβサブユニットの立体構造で、主鎖がヘリックス部分と、非ヘリックス部分でつながっている様子が描かれている。主鎖の黒丸はアミノ酸残基の Cα 位置を表す。ヘムは E ヘリックスと F ヘリックスの間のポケット内に収まっている。α サブユニットも基本的にこれと同一の構造である（図は Perutz 1979 から）。

(2) アロステリック転移

Hb 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、タンパク部位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をアロステリック変化と言う。Hb のT構造とR構造では 4 次構造（4 つのサブユニットの配置）、3 次構造（サブユニット内のアミノ酸の立体的配置）も異なる。R 構造からT構造への転移のような 4 次構造が変化する時には、α1β1 二量体（ダイマー）が α2β2 二量体に対し、12 ～ 15° 回転し、0.8 Å くらい離れる。サブユニット間の接触部位では α1β2 間および α2β1 間では接触部位がずれるが、4 量体全体の 2 回回転対称軸は保たれる。α1α2 間およびβ1β2 間でもそれぞれ接触部位はずれているが、α1β1 間や α2β2 間の接触部位は強く結合していて、配位子が結合に伴う変化はほとんどない（図 1-2）。一方、deoxy 状態では α 鎖、β 鎖のC末端残基（α 鎖の Arg 141, β 鎖の His 146, ともに HC 3）が他のサブユニットとの間に塩橋をつくり構造を安定化していたが、これらは酸素結合に伴って切断される。

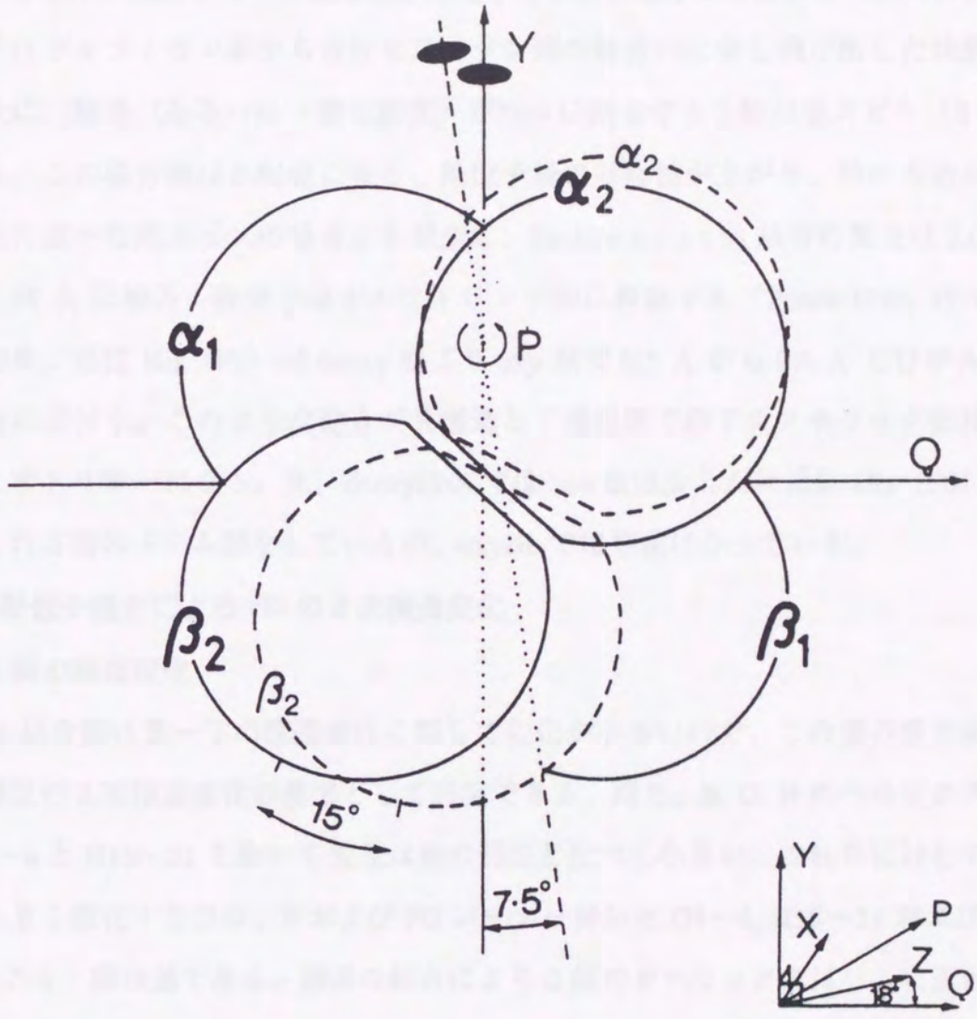

図 1-2　Hb の酸素結合に伴って起こるサブユニットの位置関係の変化（4 次構造変化）。deoxy 型を実線で表し、α1β1 サブユニットを重ね合わせたときの deoxy 型の α2β2 位置を破線で描いてある。α2β2 二量体は oxy 型になると、deoxy 型の位置から 2 回軸に直交する軸 P のまわりに約 15° 回転、さらに P に沿って紙面の奥へ約 1 Å 移動する（図は Baldwin & Chothia 1979 から）。

(3) ヘムと周辺の構造変化

deoxy 型と oxy 型の精密な結晶構造から、酸素化に伴う構造の変化を議論することができる。deoxyHbA では鉄が高スピン状態（S = 2）で 5 配位構造を取る。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。次に、酸素（あるいは一酸化炭素）がヘムに結合すると鉄は低スピン（S = 0）になる。この場合鉄は 6 配位になり、配位子場の対称性が上がり、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、Fe-N(ポルフィリン) 結合の長さは 2.06 Å から 1.98 Å に縮み、鉄原子はポルフィリン平面に移動する（Perutz 1970, 1979）。その結果、近位 His（F8）は deoxy 型より oxy 型で 0.5 Å から 0.6 Å だけポルフィリン面に近付く。このような動きが R 構造と T 構造間でのアロステリック転移を引き起こすトリガーになる。又、deoxyHbA ではヘム面は少しだけ近位 His（F8）の方にふくれる形のドーム型をしているが、oxyHb では平面になっている。

(4) 配位子結合による Hb の 3 次構造変化

a) α 鎖の構造変化

α1β1 結合面は R→T の構造変化に際して変化が小さいので、この面の原子はその他の部位の 3 次構造変化の基準として利用できる。即ち、B, G, H のヘリックス部分は G1～4 と H18～21 を除いて変化は他の部位と比べて小さい。これらに対してもっとも大きく変化するのは、F および FG コーナー部分と G1～4, H18～21 および HC1～3 のアミノ酸残基である。酸素の結合により α 鎖の F ヘリックスはヘムに近付き、同時に FG コーナーが動く。deoxyHbA の場合、ヒスチジン（His）F8 のイミダゾールはヘムに対して傾いている。一方、oxyHb では、F ヘリックスが動くことでイミダゾールはヘムに対して垂直に近くなる。そして、酸素結合によりヘム面が平面になりロイシン（Leu）FG 3（91）とバリン（Val）FG 5（93）が押し下げられる。これらのアミノ酸残基は 4 次構造の転換をに伴って大きな変化のある α1β2（α2β1）接触面の一部を形成している。

b) β 鎖の構造変化

酸素を結合することにより、F ヘリックスがヘムに向かって動き、FG コーナーは

ヘムから右の方向に移動し、近位 His（F8）がヘムに垂直になる。T構造では Val E11（67）の Cγ メチル基が鉄の配位子結合を立体障害になっているが、酸素の結合したR構造では、DとEヘリックスおよびCD部分とさらにBヘリックスの始まりの部分がともに動きとともに、ヘムが傾き、Cγ メチル基が配位子結合部位から離れる。

(5) 金属置換混成 Hb のX線結晶構造

a) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mn(II)})_2$ 混成　Hb

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mn(II)})_2$ 混成 Hb は Arnone *et al.*（1986）によって構造が解明された。結晶化は硫安溶液で行い、deoxyHbA と同型であった。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mn(II)})_2$ の結晶の作成は deoxy 型の結晶に後から CO 分子を結合させて作成し、分解能 3.0 Å、R値は 19 % まで解析された。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mn(II)})_2$ の混成 Hb はT構造であり、分子全体の構造変化は α 鎖内に止まっており、他の構造変化はない。ヘム鉄に CO 分子が結合したことにより、鉄原子は約 0.35 Å ヘム面に近付き F8 His も同じだけ動き（～0.35Å）F ヘリックス（残基番号85～89）を引っ張っているが、その動きは界面（α1β2）までは伝わっていない。β 鎖では、Fe(II) 原子の代わりに Mn(II) の置換を行った以外は deoxyHbA とほとんど変わらなかった。

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mn(II)})_2$ の構造は α 鎖のみ CO が結合した時の構造変化の最初の報告である。この構造は、分解能が低いところで解析されており、報告の電子密度図を見ると配位子 CO 分子の占有率も低く、詳しい構造変化を論議するのは無理であると考える。

b) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Co(II)})_2$ 混成　Hb

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Co(II)})_2$ 混成 Hb は、Luisi *et al.*（1989）によって構造解析された。結晶化は deoxy 型で硫安 溶液で行い、deoxyHbA と同型であった。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Co(II)})_2$ の結晶は $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Co(II)})_2$ の結晶に後から CO 分子を結合させて作り、deoxy 型と CO 型は分解能 2.8 Å, 2.9 Å でそれぞれ解析された。$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Co(II)})_2$ は deoxyHbA との差フリーエ電子密度図で比較した結果、β(Co) 鎖の中心金属の位置がわずかな変化しており、α(Fe) 鎖の変化はない。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Co(II)})_2$ 構造も分子全体はT構造であり、α 鎖への CO 分子の結合により鉄原子がヘム面に 0.2 Å くらい近ついており、

Fe-Pheme（Fe 原子からヘムの原子の平均した面までの距離）の距離は 0.40 Å である。F, FG コーナーはともに少し変化しており、その変化は α2β1 界面まで伝わっていると報告している。配位子結合に伴う Fe 原子の動きやその周辺に及ぼす構造変化は配位子の占有率によって変わってくると考えられる。$\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Co(II))}{}_2$ 構造の場合 α 鎖の CO 分子の占有率は α1 = 60 %, α2 = 55 % と報告されていて、配位子の占有率が低いことが分かる。β(Co) 鎖では中心金属の Co 原子がヘム面に近付いているが、近位 His(E7) の位置はあまり変化してない。

c) Ni(II)-Fe(II) 混成　Hb

$\alpha^{(Fe(II)\text{-}O_2)}{}_2\beta^{(Ni(II))}{}_2$

$\alpha^{(Fe(II)\text{-}O_2)}{}_2\beta^{(Ni(II))}{}_2$ の結晶は Co(II) 混成 Hb と同じように deoxy 型で硫安溶液を用いて結晶化し、酸素分子にさらして作成した（Luisi *et al.*, 1989）。分解能 3.5 Å で解析されている。α 鎖での変化は配位子酸素分子の結合により F, FG コーナーが変化しており、遠位 His E7 側もわずかな変化している。β 鎖の中心金属の Ni(II) 原子は 5 配位である。$\alpha^{(Fe(II)\text{-}O_2)}{}_2\beta^{(Ni(II))}{}_2$ の構造は Fe^{2+} 原子の酸化することと酸素分子の占有率が低いことや分解能が低いなどで、他の結晶と比較することは無理である。

$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$

$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ の結晶は Luisi *et al.*（1990）によって β 鎖にだけ配位子が結合した時の構造変化として最初の報告である。$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ の結晶は PEG 溶液を用いて結晶化を行い、空間群は $P2_1$ であり硫安溶液の deoxyHbA の空間群と格子定数は（a = 63.18 Å, b = 82.26 Å, c = 55.06 Å, β = 98.42°）非常に似ている。分解能は 2.6 Å, R 値 21.4 % まで精密化された。$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ の構造は T 構造であり、配位子 CO 分子の結合による β 鎖の変化は、E と F ヘリックスの変化が大きい。そして、配位子結合の立体障害である E11 Val（Cγ 原子）の動きは、ヘム中心から見ると R 構造と T 構造の中間くらいまで動いている。α1β2 界面は少し変化を見せており、α 鎖の Ni(II) は 4 配位である。His F8 の Nε と Ni(II) 原子との距離は 3.2 Å で F ヘリックスが自由になっている。

金属置換混成 Hb のα鎖、あるいはβ鎖のみ配位子が結合した構造として現在まで以上のものがX線で構造解析されている。これらの混成 Hb は酸素親和性が低いものであり、T構造が安定化されたものである。混成 Hb に配位子が結合するときの構造変化は、解析の精度とともに配位子の占有率、配位子が酸素の場合鉄原子の酸化などにより及ぼされる影響は大きいだろうと考えられる。そのことを考えると過去の金属置換混成 Hb のX線の構造は、解析の精度はあまり高くなく、配位子の占有率も低いにも関わらず、色々と細い論議をして来た。それと比較して、この論文の Mg(II) 置換混成 Hb のX線結晶解析はより高分解能での解析なので精度は高いと考える。配位子の占有率は、CO の電子密度図と温度因子から見てほぼ 100 % ヘムと結合しており、X線のテーダー収集後の測定で Fe^{3+} の割合も 3 % 前後と非常に低い。

この論文で示す、T構造の Hb の α鎖に CO を付けた時の構造変化もβ鎖に CO を付けた時の構造変化も共に、過去の報告と種々の違いがあるが、解析の精度と鉄の酸化、配位子の占有率にその原因があると考えている。

第 2 章

T構造におけるα鎖への配位子結合による構造変化

1. 序　論

金属置換混成 Hb を使った、α鎖のみ配位子が結合した時の構造としてX線の構造解析は現在のところ $\alpha(^{Fe(II)-O_2})_2\beta(^{Ni(II)})_2$, $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Co})_2$（Luisi *et al.*, 1989）と $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mn(II)})_2$（Arnone *et al.*, 1986）が報告されている。これらの構造はT構造が安定化されており、T構造でのα鎖の配位子結合に伴う構造変化が報告されている。これらの構造は構造の精度や配位子の占有率が低く、精密な変化を述べることができていない。

PEG を沈澱剤として作られた deoxyHbA の結晶を適当に空気にさらすとα鎖にのみ酸素が結合し、β鎖はほぼ deoxy 状態のままの結晶が得られることが偶然見つかった。この結晶中の Hb を T(α-oxy)Hb 呼んでいる。この結晶は分解能 2.1 Å Å まで構造が精密化されている。CO と O_2 の違いはあるがここに報告する $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造と充分比較しうる。

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 混成 Hb は結晶化の沈殿剤として硫安溶液を使うと IHP を結合させたり pH の調整するのが難しいので、Hb の溶液中の条件と結晶化の条件を近付けるのが困難である。それに対し、PEG 溶液は IHP や pH が巾広く調整できるので Hb の溶液中の性質の観察した条件と似た条件で結晶化を試みることができる。

第 2 章では、Mg(II) でβ鎖の Fe(II) を置換した $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ を調製し、異なる沈澱剤の性質を用いて、硫安溶液と PEG 溶液で条件を変えて結晶化を行い、放射光を用いた高分解能での 3 次元的な立体構造に基づいた、T構造でのα鎖の配位子結合に伴う構造変化を報告する。

2. 実 験 方 法

(1) HbA と単離鎖の調製

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、上澄みの血清成分を捨てる。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。血球と等量（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、1000 rpm で 1 時間程度、遠心分離して除く。これで、得られた溶血流は、1 mM Na_2HPO_4 の Sephadex G25（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。

溶血液は、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置いた CM52 セルロース（Whatman）のカラムに、脱塩した溶血をそのままのせる。（カラムの大きさは、Hb 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、試料をのせ終わった後、カラム容積と等量の緩衝液（カラムの平衡をとったのと同じ緩衝液）でカラムを洗い、この時抜ける物も一緒に集める。こうやって、HbA_2 が、除去された Hb が得られる。次に、この Hb 溶液を、あらかじめ 5 mM Tris, 1 mM Acetate, pH 7.2 の緩衝液で平衡をとった DE52 セルロース（Whatman）のカラム（容積は Hb 1 g 当り 3 ml とする）に通す。この時、大部分の Hb は吸着し、全部吸着させたらカラム容積の 2 倍量（容積）の同緩衝液でカラムを洗う。次にイオン強度が高い 50 mM Tris, 28 mM Acetate, pH 8.2 の緩衝液で HbA のみ押し出す。この操作で、HbA_1 は、ほとんど除去されほぼ純粋な HbA 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 HbA を用いて、Kilmartin *et al.* (1971, 1973) 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。

(2) $\alpha^{(Fe(II))}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ と　$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II))}{}_2$ の調製

アポグロビンβ（α）鎖（各鎖からヘムを抜いたもの）は塩酸アセトン法により以下の手順で調製する。β鎖はアポグロビンβ鎖にする前、DTT（dithiothreitol）でSH基を還元し（β鎖1 ml当り3～5 mg）20 mM Tris/HCl, pH 8.2緩衝液のSephadex G25 fineのカラムを通し（α鎖の場合この手順は入らない）、oxy型にしてβ（α）鎖100 mgを100 mlの塩酸アセトン（35 % HClがアセトンの容積にして0.04 %となるように混ぜ、それを-15 ℃以下に冷やしたもの: 塩酸-アセトン法、Rossi Farelli *et al.*, 1958）に滴下かくはんする（約20分）。アポグロビンは、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、アセトンが完全になくなるまで吸引を続け、得られたアポグロビンは60 mlの20 mM Borate/NaOH, pH 12緩衝液に溶かす。

アポグロビン溶液をDMFに溶かしたMg-ppIXで、分光滴定する（普通419 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、アポグロビンの1.2倍量のMg-ppIXを小量のDMFに溶かし、これをアポグロビン溶液に加える。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 Tris/HCl, pH 8.8緩衝液のSephadex G25のカラムを通し過量のMg-ppIXを除く。β鎖の場合、20 mM Tris/HCl, pH 8.2緩衝液のDE 23セルロース（Whatman）に試料を吸着させ50 mM Tris/HCl, pH 7.4緩衝液で溶出する。α鎖の場合、20 mM Tris/HCl, pH 8.8緩衝液のDE 23セルロース（Whatman）に試料を吸着させ50 mM Tris/HCl, pH 8.3緩衝液で溶出する。これで、得られたβ(Mg)（α(Mg)）は電気泳動でβ(Fe)（α(Fe)）と同じ位置に泳動されることを確認する。Mg-ppIXは光化学反応を起こすので、Mg(II)置換混成Hbの調製は通常の光照射による一酸化炭素分子をはずす方法が使えないので、再結合する鉄を酸素化型にして調製する。まず、β(Mg)（α(Mg)）をSH基を還元して酸素化型α(Fe-O_2)（β(Fe-O_2)）と等量混ぜ、0 ℃で1時間程置く。再構成された混成Hbは、20 mM Tris/HCl, pH 7.4の緩衝液のSephadex G25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 $\alpha^{(Fe(II)\text{-}O_2)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$（$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}O_2)}{}_2$）を集め濃縮して、液体窒素温度で保存する。

(3) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶化

a) 硫安溶液

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶化は Perutz（1968）の deoxyHbA の方法に基づいて行い、硫安溶液の濃度 2.5 ～ 2.3 M, pH 6.5 の間に良い単結晶ができる。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶は、$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶に CO ガスを吹き込んで作成した。両結晶は結晶学的なデータ（結晶の格子定数、空間群など）を確認するためプレセッション写真をとり、deoxyHbA（Fermi *et al.*, 1984, 空間群 $P2_1$, a = 63.15 Å, b = 83.59 Å, c = 53.80 Å, β = 99.34° ）の結晶と同型であることを確認した。

b) PEG 溶液

deoxyHbA の結晶化を沈澱剤として PEG 溶液で結晶化する方法は、Ward *et al.*（1975）によって提案された。$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 混成 Hb はこの方法を基づいて、PEG(1000) 溶液濃度 22 % ～ 24 %（50 mM $Na_2S_2O_4$, 2 mM IHP, 試料 50 mg/ml）、酸素親和性の低い pH 6.5 の条件で結晶化した。

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶は硫安溶液中の $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 結晶の結晶化の方法と違って、試料を最初から CO 分子を結合させ結晶化を行った。結晶化の条件は PEG(1000) 濃度 22 % ～ 24 %（50 mM $Na_2S_2O_4$, 試料 50 mg/ml）、酸素親和性の高い pH 8.4 の条件で結晶化し良質の単結晶が得られた。

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の deoxy 型と CO 型の結晶は deoxyHbA（Kavanaugh *et al.*, 1992, 空間群 $P2_12_12$, a = 97.1 Å, b = 99.3 Å, c = 65.8 Å）の結晶と同型であった。

(4) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ のデータ収集

結晶のデータ収集は高エネルギー物理学研究所·放射光（Synchrotron radiation）実験施設（茨城県つくば市）BL-6A のX線光源を用いて行った。放射光は、回転対陰極型のX線発生装置に比べて数桁強度の強いX線が得られるほか、白色光であるので任意の波長のX線が利用でき、また発散角が小さいのでシャープな回折像が得られるなどの特長を持っている。

BL-6A でのデータ収集に用いる巨大分子ワイセンベルグカメラ（Sakabe, 1983）は、生体高分子結晶の回折強度データの収集を行う目的で広く利用されているシステムである。巨大分子ワイセンベルグカメラは低分子ワイセンベルグ写真と違い、通常

は層線スクリーンを入れないで結晶の回転（ω）とフィルムカセットの並進（Z）を同期（ワイセンベルグ運動）させて回折像の記録を行う。したがって層線スクリーンを使ったワイセンベルグ写真と異なり、一度に多くの層線を記録できる特長を持っている。しかも層線間のスペースも利用して回折像を記録するため、振動写真法に比べて1枚当りの振動範囲を広くすることができる。振動写真法では通常1枚当りの振動範囲が1°程度であるため、記録された回折点のうちで部分反射の占める割合が多く部分反射の扱いを考慮しなければならないが、ワイセンベルグ法の場合は、部分反射の占める割合が相対的に少なくなり、完全反射のみ処理すればよくなるので、より信頼性の高いデータ収集が可能である。このほかにも巨大分子ワイセンベルグカメラは、1) 円筒形カセットを使用しているので2θの大きな反射まで精度よく記録できる、2) 結晶の軸立てを行うので単斜晶系以上の対称性をもつ結晶の場合、バイフット（Bijvoet: 等価な反射点）対を同一フィルム上に記録するため、異常分散もより精度の高いデータとして収集することができる、といった特長を持っている。

BL-6Aステイションでデータを収集する前、$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$結晶の結晶学的なパラメーターを用いてデータ収集の条件を決めなければならない。その条件としては、1) 結晶のプレセッション写真をとりどのくらいまで反射点が出るがを確認して、カメラの半径（143.3, 286.5, 429.7, 537.0, 859.5 mm）を決定する、2) 結晶の反射点に対し隣同士の反射が重なり合わないように結晶の回転角度（ω）、および回転の回数を決定する、3) フィルムカセットは富士フィルム製IP（200×400 mm^2）を取付けデータの収集を行うがIP 1 mm 動き（Z）にどのくらい結晶を回転させるか（カップリング定数c.c.（°/mm））を決定するなど色々とパラメーターを決めなくてはならない。プログラムシステムWEIS（Higashi, 1989）を用いて回折パタンーのシミュレーションを計算してテストし、良いとすれば、データ収集を行う。一般的に結晶の軸立てを行ってから、ワイセンベルグ写真の撮影を行う。軸立ての方法はポラロイドフィルムを用いて小さいな角度の振動写真（$\Delta\omega = 1\sim3°$）を撮影し、写真上で逆格子面が結晶の回転軸に対して垂直となるようにゴニオメーターヘッドを調整する。さらに結晶を90°回転させた位置で同様の調整を行うことにより、結晶の逆格子面が回転軸に垂直になるように軸立てを行う。

a) 硫安溶液の結晶

データ収集のパラメーターを決定し、$\alpha^{(Fe(II))_2}\beta^{(Mg(II))_2}$ と $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta^{(Mg(II))_2}$ の結晶を $\Delta\omega = 10.5^\circ$, $\Delta\omega$ の重ねる角度（overlap）は 0.5°, 回転速度（speed） 2.0°/sec, c.c = 2.0 °/mm, 結晶の回転回数 5 回、カメラ半径 286.5 mm, 1 枚の IP に対して X線の入射時間は 52.5 sec, X線の波長は 1 Åの条件で回転軸 a に対して 180° （E = 2.5 Ge.V, 328～318 mA）, c 軸に対して 60° （E=2.5 Ge.V, 340～339 mA）を回転しながらデータ収集を行った。そして、IP に記録された回折像は、富士フィルム製の IP システム BA-100 で 2 次元の強度情報として、読み取った後、磁気テープを用いて他の計算機とのデータの受渡しを行う。結晶やフィルムの方位マトリックスの精密化、反射の指数付け、積分強度の計算などはプログラムシステム WEIS（Higashi, 1989）を用いて行う。このプログラムシステム WEIS は、放射光計算機システムの Facom M-780/10 R で利用してデータの解析を行った。その結果は表 2-1 に示している。

b) PEG 溶液の結晶

$\alpha^{(Fe(II))_2}\beta^{(Mg(II))_2}$ と $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta^{(Mg(II))_2}$ の結晶を 回転軸 c 軸に対しては $\Delta\omega = 7.0^\circ$, $\Delta\omega$ の重ねる角度（overlap）は 0.5°, 回転速度（speed） 2.0°/sec, c.c = 1.0 °/mm, 結晶の回転回数 5 回、カメラ半径 429.7 mm, 1 枚の IP に対してX線の入射時間は 35.0 sec, X線の波長は 1 Åの条件で回転軸 c に対して 120° （E = 2.5 Ge.V, 338～325 mA）, a 軸に対して 90° （E=2.5 Ge.V, 333～3323 mA）を回転しながらデータ収集を行った。a 軸回転の場合は $\Delta\omega$ = 4.0°、1 枚の IP に対してX線の入射時間は 20.0 sec のみが異なり他のパラメーターは c 軸と同じである。この条件でデータ収集を行った結果は表 2-1 に示している。

Table 2-1

Summary of X-ray Diffraction measurements

solution	crystal	space group	No. of reflections	independent reflections	R-merge[a] (%)
AS[b]	$\alpha_{(Fe(II))_2}\beta_{(Mg(II))_2}$	$P2_1$	283630	108411	7.07
	$\alpha_{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta_{(Mg(II))_2}$	$P2_1$	297677	112896	7.79
PEG[c]	$\alpha_{(Fe(II))_2}\beta_{(Mg(II))_2}$	$P2_12_12$	132210	43553	5.76
	$\alpha_{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta_{(Mg(II))_2}$	$P2_12_12$	173737	47371	6.66

[a]R-merge = $\Sigma \mid I_i - \langle I \rangle \mid / \Sigma \mid I_i \mid$, where I_i is the intensity of an observation and $\langle I \rangle$ is the mean value for that reflection and the summations are over all reflections. [b]AS, ammonium sulfate. [c]PEG, polyethylene glycol.

(5) $\alpha_{(Fe(II))_2}\beta_{(Mg(II))_2}$ の構造の精密化

a) 硫安溶液で作った結晶の構造の精密化

<u>$\alpha_{(Fe(II))_2}\beta_{(Mg(II))_2}$ の構造の精密化</u>

$\alpha_{(Fe(II))_2}\beta_{(Mg(II))_2}$ の構造の精密化は Brookhaven National Laboratory の PDB から deoxyHbA （Fremi *et al.*, 1984）の構造を持ってきて、deoxyHbA 分子のβ鎖 Fe(II) 原子を Mg(II) で置き換えて、制限付き最小二乗法プログラム PROLSQ （Hendrickson & Konnert, 1985）を用いて精密化を行った。$\alpha_{(Fe(II))_2}\beta_{(Mg(II))_2}$ では PROLSQ のプログラムを 52 回行い、PROLSQ 25 回目と 43 回目に分子構造を Evans & Sutherland 社製 3 次元グラフィディスプレー PS340 上で CHAIN のプログラムを使い、分子モデルを作成し、分解能 10.0～1.7 Åの 47348 反射（$F > 3.0\sigma(F)$）に対し、$Fo/Fc < 3.0$, Fc/Fo

<3.0 のみの反射点を用いて、2Fo - Fc, Fo - Fc を係数とするフーリエ電子密度図をかき、モデル修正を行った。最後まで精密化を行った結果、R 因子 17.5 % まで構造が精密化された（図 2-1, 表 2-2）。$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造には 406 個 の水分子を含まれている。

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$の構造の精密化

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の精密化は、$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造と同じように deoxyHbA（Fremi *et al.*, 1984） の座標を用いて解析を行った。β 鎖 の中心金属を Mg(II) に置き換え、PROLSQ のプログラムを利用し 67 回行い、同グラフィディスプレと CHAIN のプログラムを使い、分子モデルを作成し、25, 41, 57 回目に分子モデルの修正を行った。ここまではα 鎖に CO 分子は結合させてない。PROLSQ のプログラム 57 回目に 2Fo - Fc, Fo - Fc の電子密度図をかき（この時の R 因子 18.8 %）、CO 分子を入れてモデル作成を行った。配位子 CO 分子の C 原子と Fe 原子間の制限は付けておらず、CO 分子の C と O原子間のみ制限を付けている。CO 分子入れた後、数回 PROLSQ を回してから CO 分子を見るとヘムの Fe 原子から少し離れていた。2Fo-Fc 電子密度図でも CO 分子は真ん中から外れている。つまり、配位子 CO 分子の C 原子の位置の電子分布は O 原子と比較して細くなっている。William （1994）の赤貝のX線の構造解析（分解能 1.4 Å）と Quillin *et al.* (1993) の COMb（一酸化炭素ミオグロビン）構造の報告でもヘム Fe 原子に配位している CO 分子の C 原子の位置の電子密度図がへこんでいることが分かる（分解能 2.0 Å）。これはヘムの中心金属の Fe 原子の強いピークに C 原子の位置の電子密度が影響を受けていると考えられる。そのため、 CO 分子は Fe 原子から離れてしまう。しかし、ヘム周辺の残基の CO 分子のモデル作製の前後の座標の変化はほとんどなかった。このことから CO 分子の最終的な座標は構造の精密化終了後、2Fo-Fc（contoured level 3σ：ノイズレベルの 3 倍以上）電子密度図（図 2-4）を見ながら CO 分子のみ再修正を行い座標を決定した。表 2-4 に示した Fe と CO の間の構造は CO 分子を再修正行った後の結果である。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の最終的な精密化の結果は、表 2-7 に示したように分解能 10.0～1.7 Åの 50333 反射（F＞3.0σ(F)）に対し、R 因子 18.5 % の構造を得た（表 2-2）。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造には 405 個の水分子を含まれており、配位子

CO 分子の温度因子は表 2-3 に示している（図 2-4）。

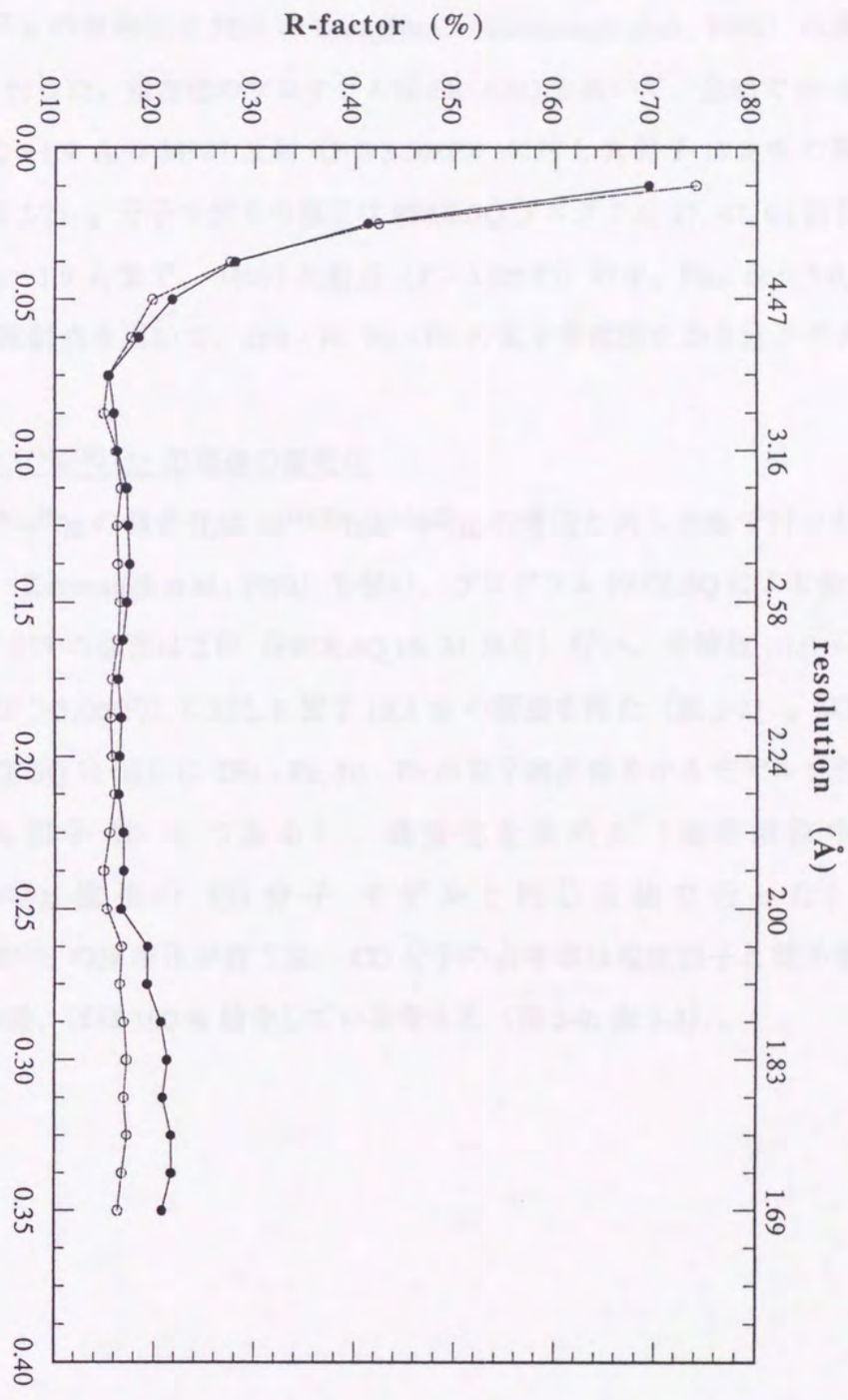

図 2-1　硫安溶液中の構造の各分解能と R-factor の関係（ —○— : $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$, —●— : $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ ）。

b) PEG 溶液で作った結晶の構造の精密化

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の精密化

$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の精密化は PDB の deoxyHbA（Kavanaugh *et al.*, 1992）の座標を用いて精密化を行った。精密化のプログラムは PROLSQ を用いて、全部で 80 回を行い、分解能 10.0～1.9 Å の 34907 反射（$F>3.0\sigma(F)$）に対し R 因子 19.3 % の構造を得た（図 2-2, 表 2-2）。分子モデルの修正は PROLSQ プログラム 27, 42, 61 回目に行い、分解能 10.0～1.9 Å まで、34907 反射点（$F>3.0\sigma(F)$）の中、$Fo/Fc<3.0$, $Fc/Fo<3.0$ のみの反射点を用いて、2Fo - Fc, Fo - Fc の電子密度図をかき分子モデルの修正を行った。

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の精密化

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の精密化は $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造と同じ方法で行った。座標は deoxyHbA（Kavanaugh *et al.*, 1992）を使い、プログラム PROLSQ により全部 44 回行って分子モデルの修正は 2 回（PROLSQ 16, 31 回目）行い、分解能 10.0～1.9 Å の 37380 反射（$F>3.0\sigma(F)$）に対し R 因子 19.3 % の構造を得た（表 2-2）。CO 分子のモデルは PROLSQ 31 回目に 2Fo - Fc, Fo - Fc の電子密度図をかきモデルを作成し（この時の R 因子 20 % である）、精密化を進めた（硫安溶液中の $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の CO 分子モデルと同じ方法で行った）。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の精密化が終了後、CO 分子の占有率は温度因子と電子密度図で確認をした結果、ほぼ 100 % 結合している考える（図 2-9, 表 2-3）。

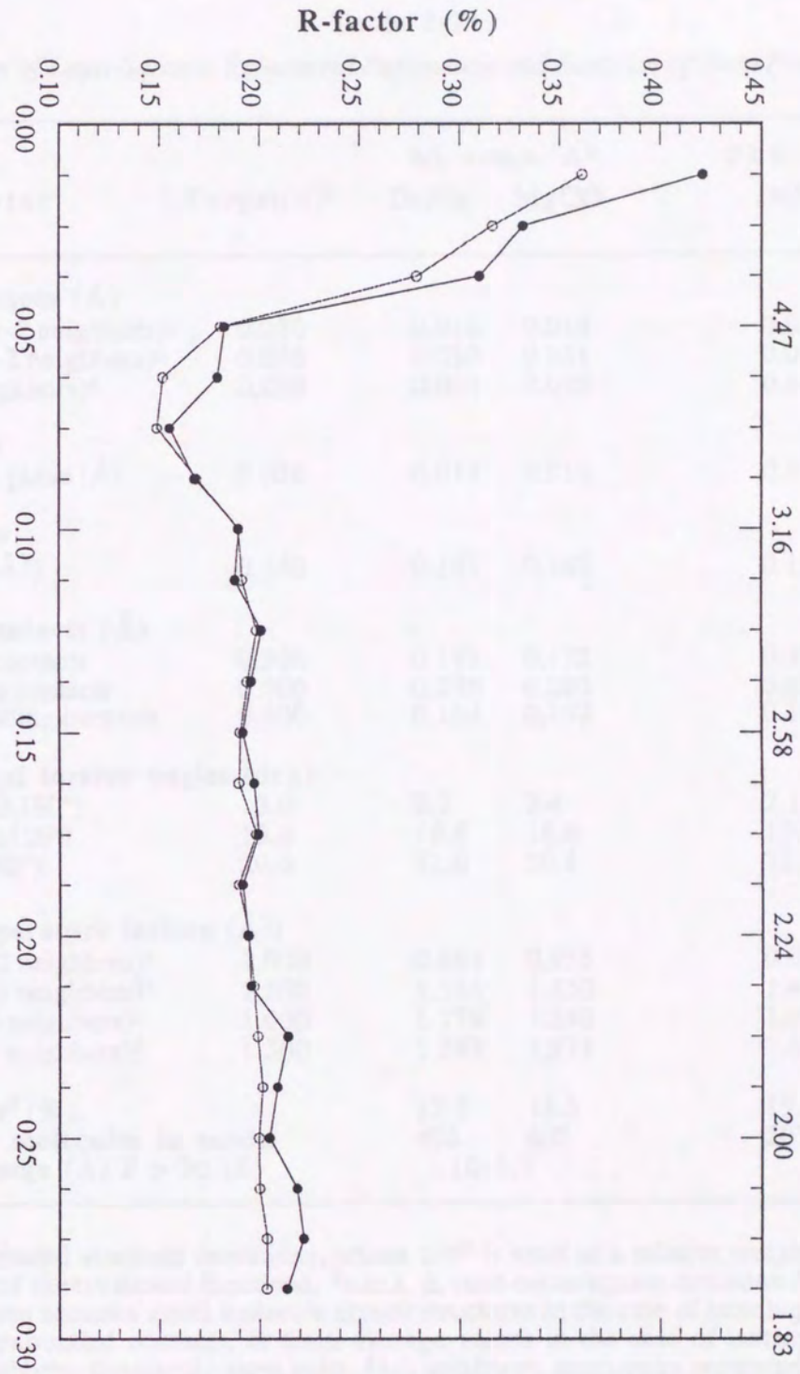

図 2-2 PEG 溶液中の構造の各分解能と R-factor の関係
(—○— : $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$, —●— : $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$) 。

Table 2-2

Summary of Least-Squares Refinement Parameters and Statistics of Data Processing

Parameter	Target(σ)[a]	AS, r.m.s. Δ[b] DeMg	AS, r.m.s. Δ[b] MgCO	PEG, r.m.s. Δ[b] DeMg	PEG, r.m.s. Δ[b] MgCO
Bonding distances (Å)					
bond lengths (1-2 neighbors)[c]	0.020	0.016	0.018	0.018	0.017
bond angles (1-3 neighbors)[d]	0.030	0.030	0.031	0.032	0.034
planes (1-4 neighbors)[e]	0.050	0.044	0.045	0.044	0.046
Planar groups					
deviations from plane (Å)	0.020	0.014	0.014	0.013	0.014
Chiral centers					
chiral volume (Å^3)	0.150	0.151	0.163	0.159	0.169
Nonbonded contacts (Å)					
single-torsion contacts	0.500	0.171	0.172	0.176	0.184
multiple-torsion contacts	0.500	0.275	0.283	0.283	0.293
possible H-bonding contacts	0.500	0.164	0.197	0.169	0.229
Conformational torsion angles (deg)					
peptide plane (0,180°)	3.0	2.2	2.4	2.1	2.3
staggered (±60,120°)	15.0	16.6	16.6	19.0	19.4
orthonormal (±90°)	20.0	32.0	30.4	32.3	32.8
Isotorpic temperature factors (Å^2)					
main chain (1-2 neighbors)[c]	1.000	0.884	0.955	0.892	0.878
main chain (1-3 neighbors)[d]	1.500	1.344	1.450	1.420	1.432
side chain (1-2 neighbors)[c]	1.000	1.179	1.240	1.034	1.049
side chain (1-3 neighbors)[d]	1.500	1.887	1.971	1.675	1.745
Final R-factor[f] (%)		17.5	18.5	19.3	19.3
No. of water molecules in model		406	405	203	210
Resolution range (Å) **F > 3σ (F)**		10-1.7		10-1.9	

[a]Target σ, estimated standard deviations, where $1/\sigma^2$ is used as a relative weighing factor in the minimized sum of observational functions. [b]r.m.s. Δ, root-mean-square deviation from ideal values as determined from accurate small molecule crystal structures in the case of bonding distances, chiral volumes, and nonbonded contacts, or from average values in the case of isotropic termperature factors. [c]1-2 neighbors, covalently atom pairs. [d]1-3 neighbors, atom-pairs separated by two covalent bonds. [e]1-4 planar neighbors, atom pairs in a planar group separated by three covalent bonds. [f]R-factor = $\Sigma \| F_o|-|F_c\| / \Sigma |F_o|$, whrer F_o is the observed structure factor and F_c is that calculated from the model. AS, ammonium sulfate. PEG, polyethylene glycol. DeMg: $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$, MgCO: $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$.

Table 2-3

Atomic temperature factors of the CO molecules ($Å^2$).

	AS		PEG	
	$\alpha_{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta_{(Mg(II))_2}$		$\alpha_{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta_{(Mg(II))_2}$	
	α1	α2	α1	α2
C (ligand)	10	14	16	24
O (ligand)	15	14	17	25

AS, ammonium sulfate. PEG, polyethylene glycol.

3. 結果および考察

Hb の配位子結合による構造変化は Baldwin & Chothia（1979）によって、提案されており、deoxyHb A（Fermi, 1975; 分解能 2.5 Å）と COHbA の α1β1 の B と G と H ヘリックスを中心として重ねて残りの部分の相対的な変化を調べて構造変化を論議して来た（これを BGH-frame と呼んだ）。Baldwin & Chothia の場合、α: B 30～36, G 102～113, H 117～127; β: B 30～36, D 51～55, H 107～132 である。その後、deoxyHbA の構造が精密化され、D ヘリックスの主鎖の変化 0.48 Å であり、β B ヘリックスは 0.43 Å（Baldwin, 1979）と比較的大きいことが分かった。そのため、Luisi *et al.*（1990）と Liddington *et al.*（1992）によって BGH-frame に使うアミノ酸残基が修正されて来た。Luisi の場合 deoxyHbA（Fermi *et al.*, 1984; 分解能 1.74 Å）と COHbA（Baldwin et al., 1980; 分解能 2.7 Å）構造の BGH-frame, α: B 20～36, G 94～112, H 118～134; β: B 18～33, G 98～116, H 122～140 であり、Cα を中心と合わせると fitting error は 0.555 Å である。Liddington *et al.* の場合は oxyHb（Shaanan *et al.*, 1983, 分解能 2.1 Å）と deoxyHb A（Fermi *et al.*, 1984）の間で BGH-frame は、α: B 20～36, G 98～112, H 118～134; β: B 22～33, G 104～116, H 125～139 とした（fitting error α = 0.29 Å, β = 0.31 Å）。

今回の BGH-frame は COHbA の Baldwin & Chothia（1980, 分解能 2.7 Å）と deoxyHbA（Fermi *et al.*, 1984; 分解能 1.74 Å）の構造を Luisi と Liddington と同じように BGH-frame の残基の fitting error を小さくするため残基の修正を行った。その残基番号は α: B 23～32, G 97～110, H 118～134; β: B 23～33, G 104～116, H 123～137 となり、この時の fitting error は 0.359 Åであった。これからは上の残基で 2 つの構造を重ねる方法を "BGH-frame" と呼ぶ。そして、ヘム周辺の構造変化を調べるためヘム面の全原子を重ねる（fitting error を小さくするため propionic 酸の -COO 基は除いてある）方法を "Heme-frame" と呼ぶ。

(1) 硫安溶液と PEG 溶液中での deoxyHbA 構造の違い

deoxyHbA の構造は結晶化する沈殿剤により少し構造が違っていると報告されている（Liddington *et al.*, 1992）。その違いを PDB から硫安溶液（Fermi *et al.*, 1984）と PEG 溶液中（Kavanaugh *et al.*, 1992）の deoxyHbA の座標を用いて構造変化を調べた。

両結晶の α1β1 の BGH-frame で重ねて（fitting error 0.125 Å）α1β1 の主鎖（main-chain）の変化は 0.31 Å, α2β2 の変化は 0.80 Å である。又、α2β2 の BGH-frame で重ねて（fitting error 0.133 Å）α2β2 と α1β1 の二量体は 0.33 Å, 0.58 Å のそれぞれ相対的な変化を示している。そして、α1β1-BGH frame で重ねて α1 鎖と β1 鎖の主鎖の各残基の変化を図 2-3a, 3b に示した。その変化の BGH-frame の fitting error の 2σ より大きい変化している残基を調べると α1 鎖の場合 A（3, 4, 5, 7, 14）, B（19, 21）, E（49～55）, EF（71～79, 81, 82）, GH（113～115）, HC（140, 141）の残基である。これらの残基を詳しく見ると、すべての残基は Hb 分子の表面に存在する残基であることが分かった。

β1 鎖を見ると全体の相対的な変化は α 鎖より大きく変化している。N（1～3）, A（4～8, 12, 16, 18）, CD（41～50）, D（52）, E（58～66, 69, 70, 73～76）, EF, F, FG（77～96）, H, HC（139～146）の残基が変化している。これらの残基を詳しく見ると E, EF, F, FG コーナーを除いて Hb 分子の表面にある残基である。そして、一番激しい変化を見せている EF, F ヘリックスは、配位子結合に直接関しているヘリックスである。

Liddington *et al.*（1990）は deoxyHbA の構造は結晶化する沈殿剤によって構造が違っているのは、結晶の中で Hb 分子間の接触から生じる変化であると報告している。

以上の結果から、同じ分子でも細かな構造変化を論議する場合、結晶化する沈殿剤が硫安溶液と PEG 溶液でできた結晶を直接比較することは注意が必要とする。$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 混成 Hb に関する構造変化はできるかぎり、同型の結晶系で論議することにする。

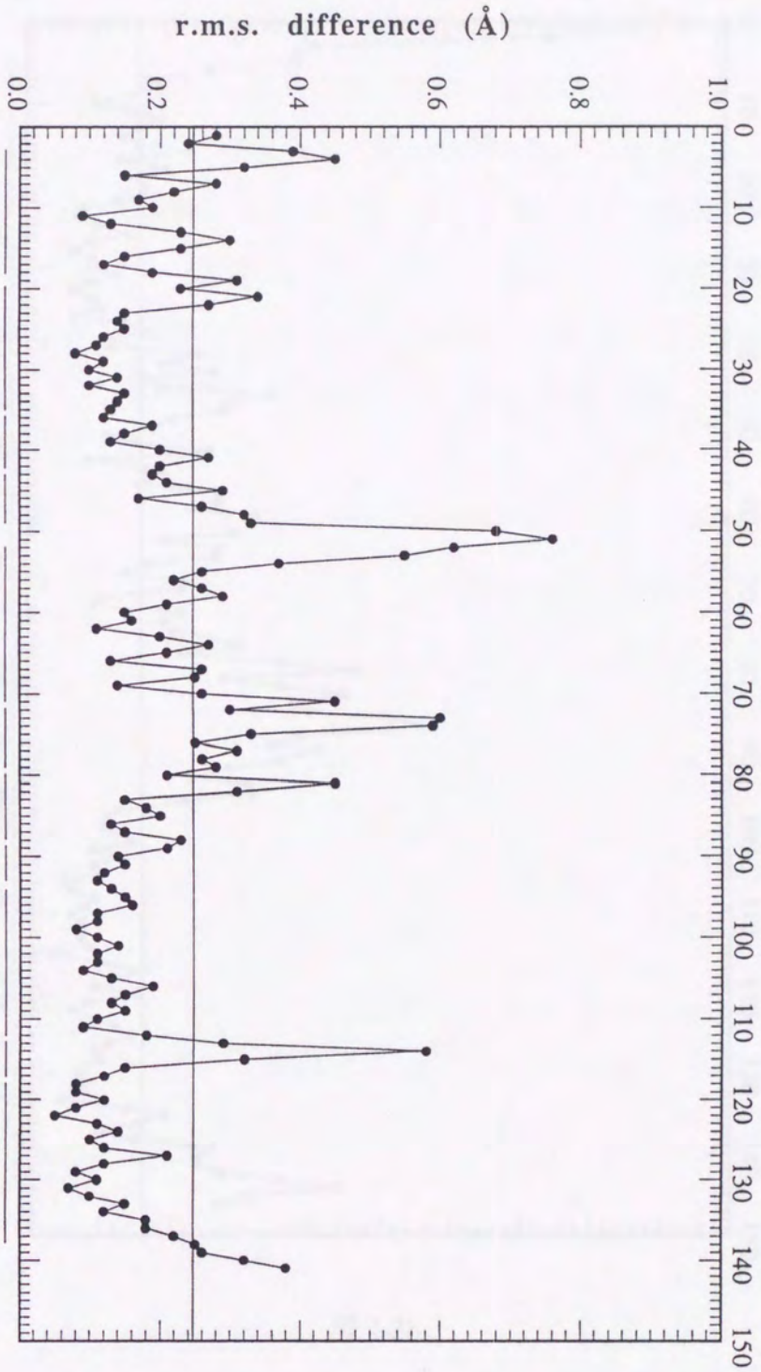
r.m.s. difference (Å)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
residue number
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
A
B
C
CD
E
EF
F
FG
G
GH
H
helix notation

図 2-3a

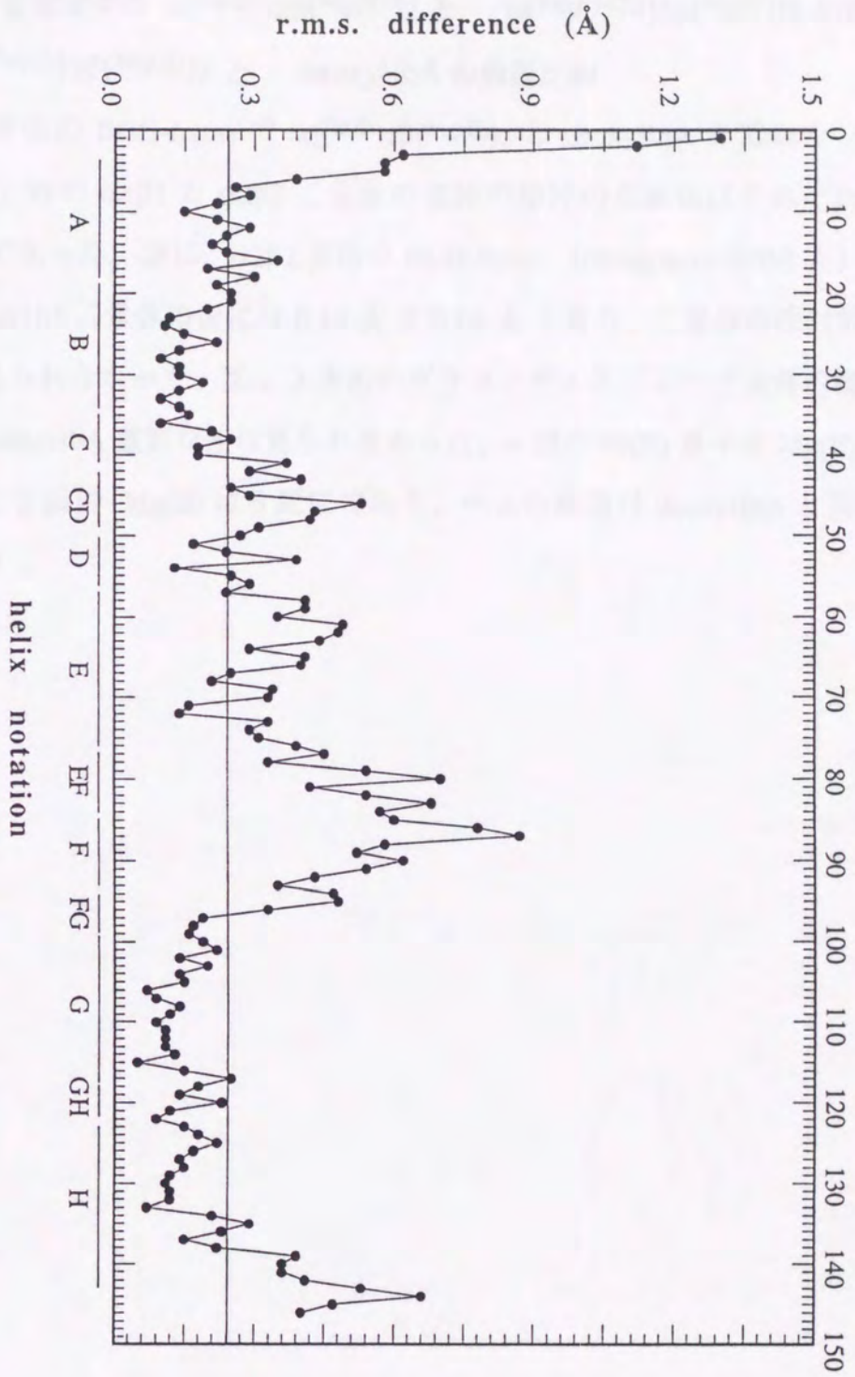

図 2-3b

図 2-3　硫安溶液と PEG 溶液を用いて結晶化した時の deoxyHbA 構造どうしの α1β1-BGH frame（fitting error 0.125 Å）で重ねた時の α1 鎖（a）と β1 鎖（b）の主鎖の変化。

(2) 硫安溶液中の $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と　$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造変化

a) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と　deoxyHbA の構造比較

α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と deoxyHbA を重ねた（fitting error 0.101 Å）時の α1β1 と α2β2 二量体の主鎖の相対的な変化はそれぞれ 0.13 Å と 0.16 Å であった。逆に、α2β2 界面の BGH-frame（fitting error 0.082 Å）で重ねると α2β2 と α1β1 二量体の変化は 0.14 Å と 0.16 Å となり、二量体の相対的な変化はほとんど見られなかった。又、3 次元のグラフィディスプレーで全体の構造を調べた結果、deoxyHbA 重要な差は見られなかった。α 鎖の Fe(II) 原子を Mg(II) 原子で置換を行った β 鎖の Mg(II) は 5 配位であり、ヘムの構造は deoxyHbA と同じであった（表 2-4）。

Table 2-4
Ligand and Heme Geometry

	AS DeMg[a]		AS MgCO[b]		PEG DeMg[a]		PEG MgCO[b]		AS(PEG) deoxyHbA[c]		COHbA[d]	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
Interatomic distances (Å)												
M - N_{porph}(mean)	2.05	2.04	2.02	2.05	2.04	2.02	2.01	2.03	2.09(2.08)	2.06(2.06)	2.00	2.00
M - N_{ε}(F8)	2.29	2.20	2.21	2.22	2.33	2.37	2.31	2.37	2.17(2.21)	2.10(2.22)	2.09	2.08
Fe - C(ligand)	-	-	1.65	-	-	-	1.80	-	-	-	1.81	1.81
C - O(ligand)	-	-	1.19	-	-	-	1.25	-	-	-	1.31	1.30
Nε(E7) - O(ligand)	-	-	3.21	-	-	-	3.50	-	-	-	4.02	3.42
Nε(E7) - C(ligand)	-	-	3.45	-	-	-	3.56	-	-	-	4.11	3.56
Distances to planes (Å)												
M - P_{heme}	0.64	0.57	0.20	0.62	0.70	0.52	0.20	0.47	0.64(0.75)	0.56(0.57)	0.07	0.00
M - P_N	0.41	0.38	0.01	0.37	0.40	0.39	0.01	0.33	0.40(0.47)	0.36(0.37)	0.00	-0.02
Nε(F8) - P_{heme}	2.86	2.76	2.41	2.83	3.00	2.88	2.50	2.83	2.74(2.94)	2.65(2.78)	2.15	2.07
P_C - P_N	0.15	0.11	0.11	0.15	0.19	0.07	0.08	0.07	0.16(0.17)	0.10(0.11)	0.04	0.01
Angles (degs)												
N_{ε}(F8)-Fe-C(ligand)	-	-	177	-	-	163	-	172	-	-	170	170
Fe-C-O(ligand)	-	-	173	-	-	155	-	155	-	-	179	181

a-d refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ (this work); b: $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg})_2$ (this work); c: deoxy HbA (Kavanaugh *et al.,* 1992; Fermi et al., 1984: parenthesis), d: COHbA (Baldwin *et al.,* 1980) were taken from the Brookhaven data base. AS, ammonium sulfate. PEG, polyethylene glycol.
M, central metal ; P_N, mean plane of the 4 porphyrin nitrogens ; P_C, mean plane of the 20 porphyrin carbons ; P_{heme}, mean plane of porphyrin nitrogens and carbons plus first side-chain atoms (32 atoms). M - N_{porph}, the distance of the metal from the mean 4 prophyrin nitrogens.

b) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ に配位子　CO 結合による構造変化

α 鎖ヘム面の変化

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の α1 鎖のヘム周辺と配位子 CO 分子の電子密度図（2Fo-Fc）を図 2-4 に示した。それに伴うヘムの構造も表 2-4 に示しており、$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の Fe 原子の位置は COHbA 分子の α 鎖の Fe 原子の位置とほぼ同じように 4 つの pyrrole の窒素原子の作る面内に入っていることが分かった。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の α 鎖の 近位 His(F8) の Nε の位置は deoxyHbA と COHbA 分子の中間くらいである。ヘム面の doming parameter である Pc-Pn は deoxyHbA と似ている。

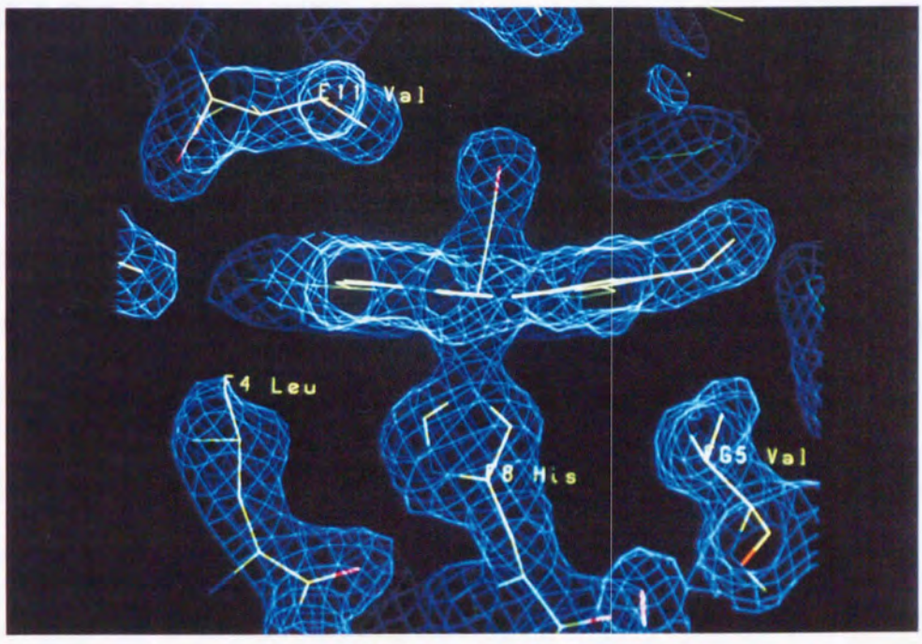

図 2-4　$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の α1 鎖のヘム周辺と配位子 CO 分子の電子密度図（2Fo-Fc）。この電子密度図は分解能 1.7 Å まで解析されたものであり、ノイズレベル（contoured level = 2 σ）の 2 倍の点がつないである。α2 鎖のヘム周辺の電子分布もこれとほぼ同じである。

4次構造変化

α1β1 界面の BGH-frame 中心で（fitting error 0.139 Å） deoxyHbA と $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ の構造を重ねて二量体の変化を見た。α1β1 と α2β2 のそれぞれの二量体の変化は 0.23 Å, 0.43 Å であり、α2β2 界面の BGH-frame（fitting error 0.13 Å）で重ねると α2β2 と α1β1 の二量体は 0.23 Å と 0.45 Å となっている。その二量体の変化の模様を図 2-5 に立体的に示した（α1β1 界面の BGH-frame）。この図を見ると 4 次構造変化に大きく関与している二量体の α1C-β2FG の界面（switch region と呼ぶ）と α1FG-β2C の界面（flexible joint と呼ぶ）に少し相対的なずれが見られている。

Hb 分子の T 構造から R 構造へ転移する時、β 鎖の His（HC3）のイミダゾールが β 鎖の Asp（FG1）と、His（HC3）のカルボキシル基は α 鎖の Lys（C5）と塩橋を作って T 構造を安定化させているが、R 構造になると界面（α1β2, α2β1）の構造変化を引き起こし、この塩橋が切れてしまう。$\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ 結晶の界面を switch region と flexible joint を α1 鎖と β2 鎖の C ヘリックスの Cα を中心で重ねて各鎖の FG コーナーの変化を見ると界面で構造変化はしておらず、T 構造の塩橋はかかっている（図 2-6a, 6b）。つまり、界面の BGH-frame で重ねると二量体の相対的にずれが見られることは、BGH-frame で合わせた時の見かけの変化であり、二量体の 4 次構造変化はなかったと考える。

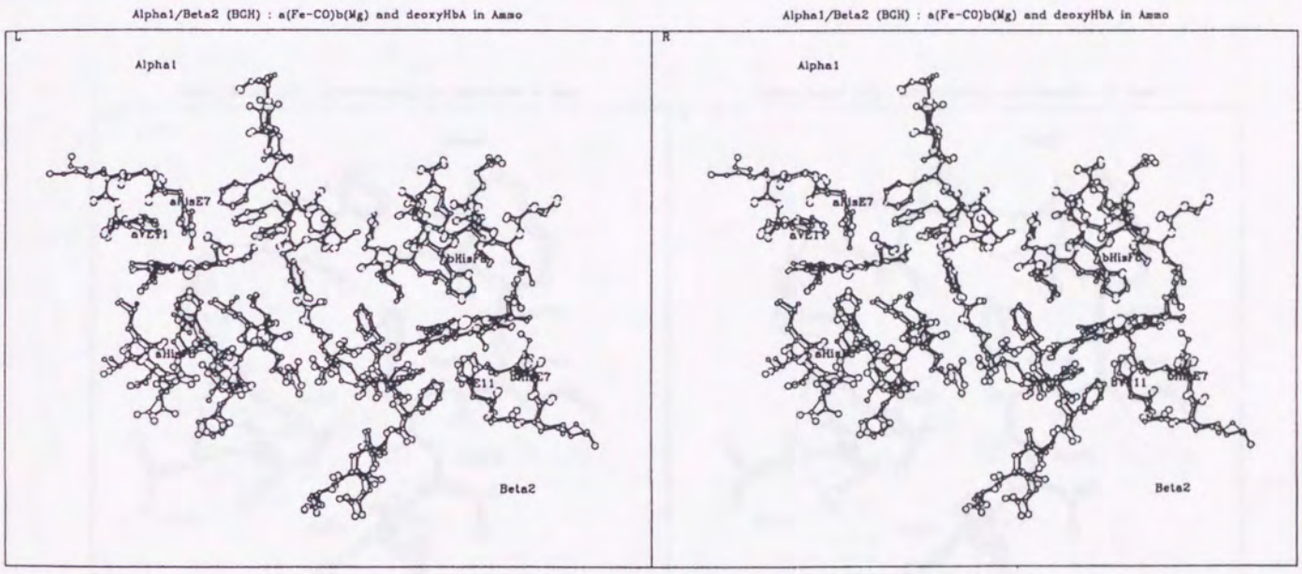

図 2-5　$\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta^{(Mg(II))_2}$（thick bonds）と deoxyHbA（thin bonds）構造を α1β1-BGH frame で重ねて（fitting error = 0.139 Å） α1β2 界面を立体的に示した。アミノ酸残基は α1 鎖 β2 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を図に示した。二量体の界面の switch region（ α1C-β2FG ）と flexible joint（ α1FG-β2C ）にずれが少し見られている。

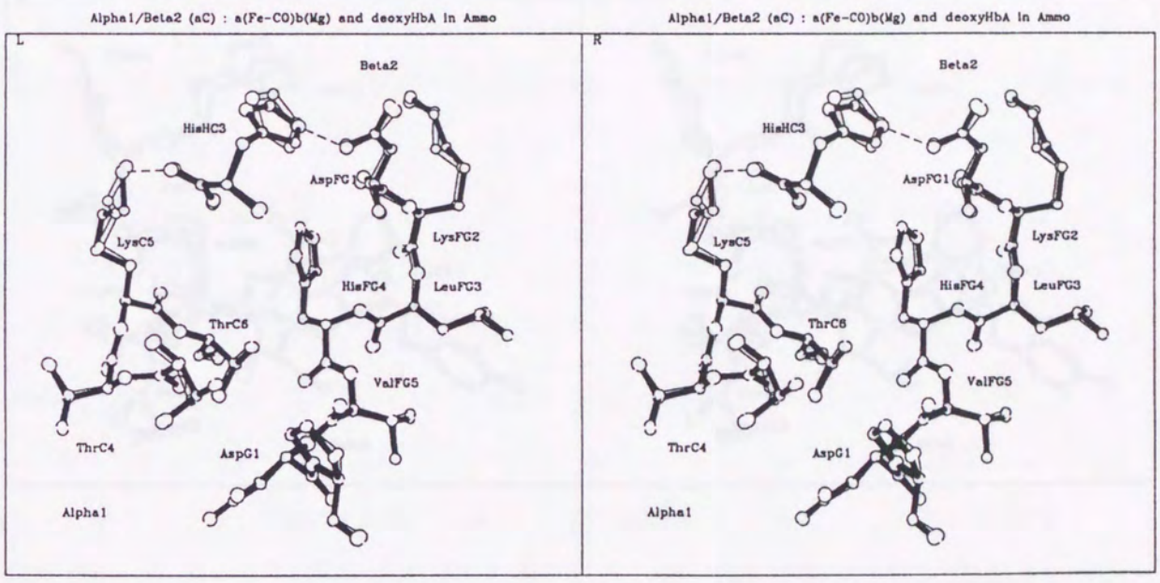
Alpha1/Beta2 (aC) : a(Fe-CO)b(Mg) and deoxyHbA in Ammo
L
Beta2
HisHC3
AspFG1
LysC5
LysFG2
HisFG4
LeuFG3
ThrC6
ValFG5
ThrC4
AspG1
Alpha1
Alpha1/Beta2 (aC) : a(Fe-CO)b(Mg) and deoxyHbA in Ammo
R
Beta2
HisHC3
AspFG1
LysC5
LysFG2
HisFG4
LeuFG3
ThrC6
ValFG5
ThrC4
AspG1
Alpha1

図 2-6a

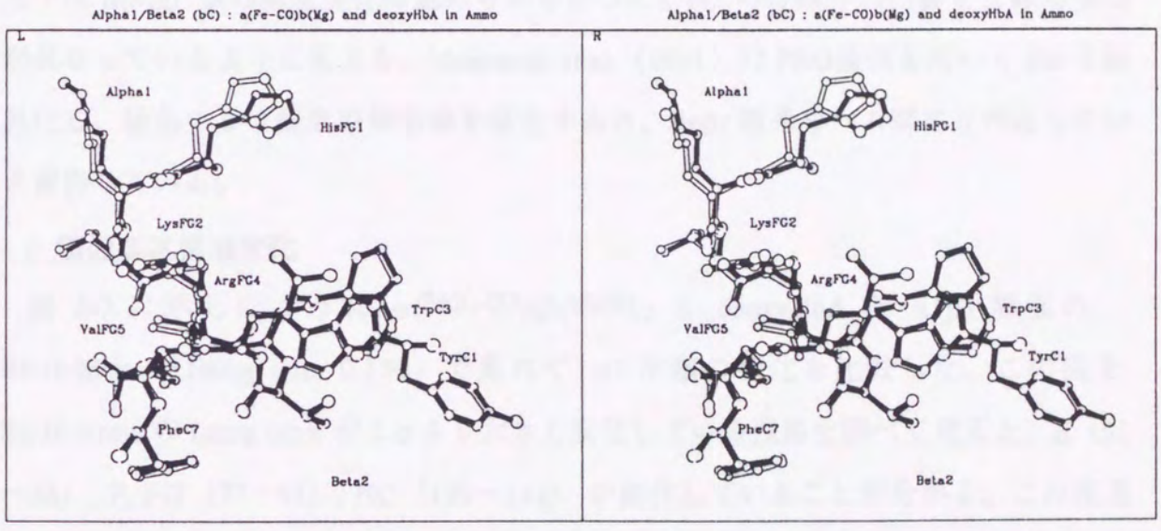

図 2-6b

図 2-6　$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$（filled bonds）と deoxyHbA（open bonds）両構造を α1β2 界面の switch region（a, α1C-β2FG）と flexible joint（b, α1FG-β2C）の界面を α1 鎖（fitting error = 0.065 Å）と β2 鎖（fitting error = 0.088 Å）の Cα 中心に重ねて FG コーナーの変化を立体的に示した。switch region の界面は変化してないが、flexible joint ではやや変化しているように見える。

β 鎖の 3 次構造変化

α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ の構造と deoxyHbA を重ねで β1 鎖の構造を見るとヘム周辺では同じ構造であった（図 2-8）。表 2-3 に示した β(Mg) 鎖のヘムの構造も deoxyHbA と同じであり、Mg(II) 原子は 5 配位であった。$\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ の混成 Hb の溶液中の性質では、α 鎖に配位子 CO, O_2 が結合するとβ 鎖の Mg-ppIX の吸収スペクトルが変化する（Minagawa）。今回の、X線の構造では β(Mg) 鎖の構造変化は認められなかった。Hb の溶液中の性質とX線の構造が異なっているように見える。Mozzarelli *et al.*（1991）は PEG溶液を用いて Hb を結晶化し、結晶のまま酸素平衡曲線を測定すると、Bohr 効果もヘム間相互作用もないと報告している。

α 鎖の 3 次構造変化

図 2-7 に示したように $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ と deoxyHbA を α1β1 界面の BGH-frame （fitting error 0.139）で重ねて α1 主鎖の変化を比較した。この図を BGH-frame の fitting error が 2 σ より大きく変化している残基を調べて見ると、E（51～58）, F, FG（77～95）, HC（139～141）が変化していることが分かる。この残基の中、F ヘリックスの変化は配位子 CO 分子の結合により一番大きく動いている。その影響は FG コーナーにまでまで及んでている。HC 界面にある 3 つの残基の変化が少しあるように見えるが、二量体のずれ（α1β1 界面の BGH-frame で重ねて α1β1 と α2β2 の相対的な変化は 0.23 Å, 0.43 Å であった）によって生じる変化であると考えられる。E ヘリックスでは 51～58 残基が少し動いている。この残基は、配位子結合による E7 His（58）から数残基（57, 56）まで変化が伝わっており、51～54 の残基は Hb 分子の表面にある残基で配位子結合によりの構造変化ではないと考えられる。

ヘム周辺の E ヘリックスは F ヘリックスの変化と比較すると非常に小さい変化である（図 2-8）。T(α-oxy)Hb（Liddington *et al.*, 1992）の構造変化は $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ と結晶系が異なっているが、T 構造での α 鎖への配位子結合による構造変化は図 2-7 に示したように F ヘリックスが E ヘリックスより大きく変化しており、非常によく似ていることが分かる。

以上のことから、$\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ の構造の α 鎖への配位子結合による構造変

化はヘム周辺に限られており、分子全体の構造はT構造であると考える。そして、ヘム周辺の変化はEヘリックスよりFヘリックス変化が主に見られており、この変化はT構造においてα鎖にだけ配位子が結合した時の構造変化であり、酸素親和性の制御しているヘリックスはEよりFヘリックスが重要であると考えられる。

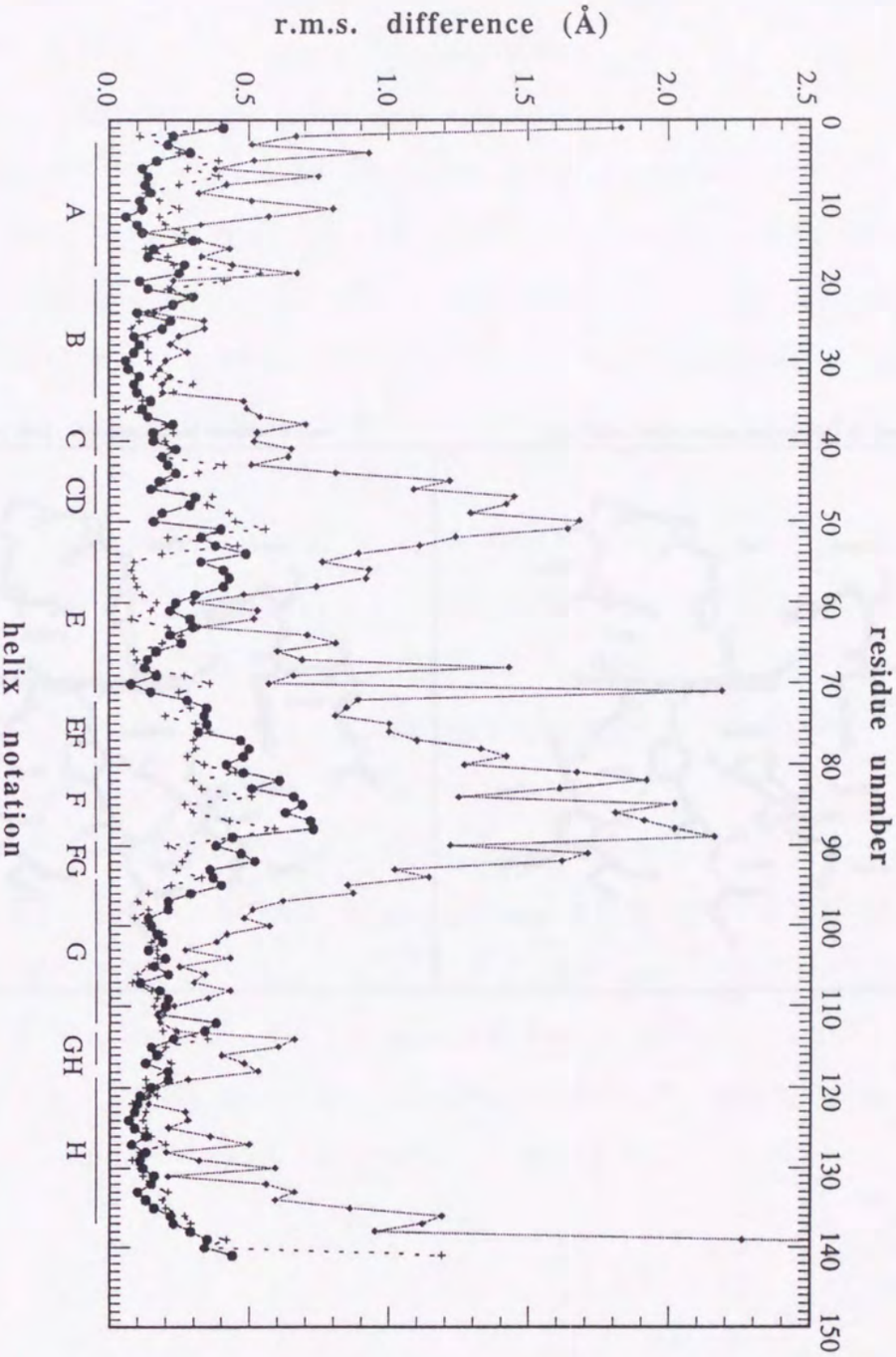

図 2-7　deoxyHbA の α1β1 界面の BGH-frame 中心で $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$（ ——•—— ），T(α-oxy)Hb（ ····+···· ），COHbA（ ——•—— ）の構造を重ねてα1 鎖の主鎖の変化である。

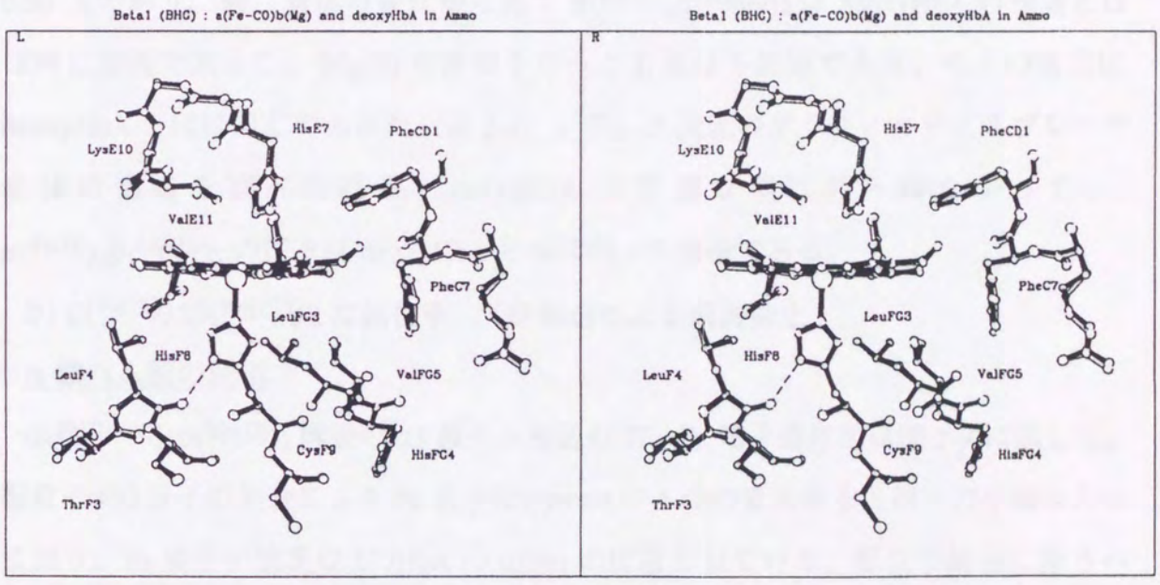

図 2-8　α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta^{(Mg(II))_2}$（filled bonds）と deoxyHbA（open bonds）の構造を重ねでβ1(Mg) 鎖のヘム周辺を立体的に表した。

(3) PEG 溶液中の $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と　$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造変化

a) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と　deoxyHbA の構造比較

α 鎖ヘム面の変化

PEG 溶液中の両構造も硫安溶液の構造と同じように、α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と deoxyHbA を重ねると（fitting error 0.131 Å）α1β1 と α2β2 二量体の主鎖の相対的な変化は 0.23 Å, 0.34 Åであった。又、α2β2 の BGH-frame（fitting error 0.149 Å）で重ねると α2β2 と α1β1 の二量体の主鎖の変化は 0.23 Å, 0.30 Åであり、両二量体の変化から見て $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ は deoxyHbA の構造とほぼ同じ構造であった。Mg(II) の置換を行った β 鎖は 5 配位であり、ヘムの構造は deoxyHbA とほぼ同じであった（表 2-4）。又、3 次元のグラフィクディスプレーで全体の構造を調べた結果、deoxyHbA と重要な差は見られなかった。$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造は deoxyHbA とほぼ同一の構造である。

b) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ に配位子　CO 結合による構造変化

α 鎖ヘム面の変化

$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の α1 鎖ヘム周辺の 2Fo-Fc 電子密度図は図 2-9 に示した。配位子 CO 分子の結合により Fe 原子は pyrrole の 4 つの窒素原子と同一の平面に入っており、Fe 原子の位置は COHbA の α(Fe) の位置と似ている。配位子結合に伴うヘムの構造は表 2-3 に表した。$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の α 鎖の F8 His のイミダーゾルの $N\varepsilon_2$ 原子とヘム面の距離を見ると deoxyHbA と COHbA の中間くらいである。ヘムの doming parameter の $P_C\text{-}P_N$ は deoxyHbA の方に近い構造である。

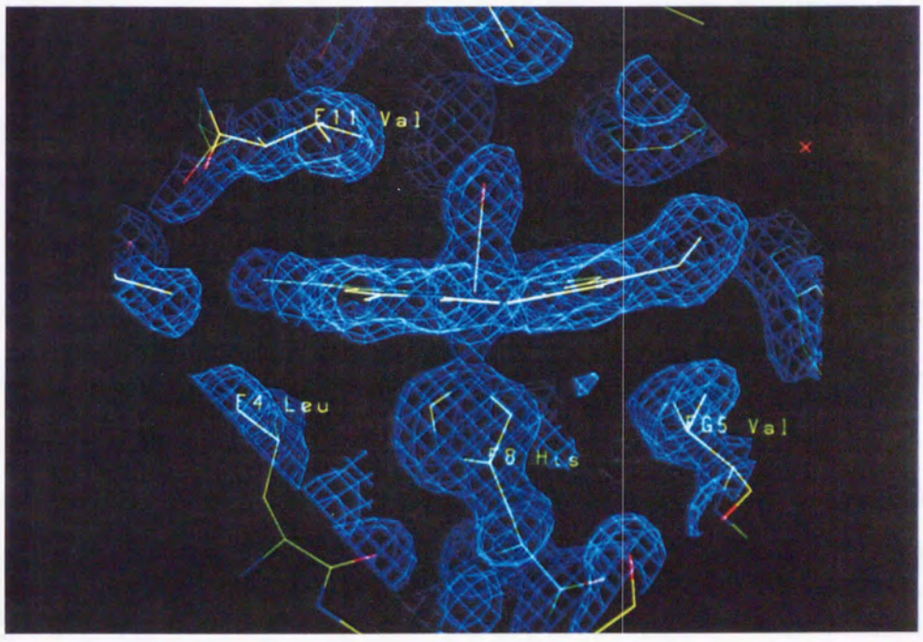

図 2-9　$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の α1 鎖のヘム周辺と配位子 CO 分子の電子密度図（2Fo-Fc）である。この電子密度図は分解能 1.9 Å まで解析されたものであり、ノイズレベル（contoured level）の 2σ の点がつないである。α2 鎖のヘム周辺の電子分布もこれとほぼ同じである。

4次構造変化

上に述べたように $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ は deoxy 構造をとっている。α 鎖に配位子 CO が結合した時の 4 次構造変化を調べて見た。α1β1 界面の BGH-frame（fitting error 0.149 Å）で $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と deoxyHbA を重ねると α1β1 と α2β2 二量体の主鎖の相対的な変化は 0.37 Å, 0.52 Åであった。又、α2β2 の BGH-frame（fitting error 0.151 Å）で重ねると α2β2 と α1β1 の二量体の主鎖の変化は 0.42 Å, 0.60 Åとなり、二量体の相対的なずれが少し見られている。T(α-oxy)Hb（Liddington *et al.*, 1992）の結晶を deoxyHbA（PEG）と α1β1 界面の BGH-frame（fitting error 0.145 Å）で α1β1 と α2β2 二量体の主鎖の相対的な変化は 0.27 Å, 0.50 Åであり又、α2β2 の BGH-frame（fitting error 0.170 Å）で重ねると α2β2 と α1β1 の二量体の主鎖の変化は 0.30 Å, 0.49 Åとなり、二量体間の相対的なずれが少し生じており、その変化は $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と非常によく似ている。そして、図 2-10 には $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の二量体の 4 次構造変化に伴う α1β2 界面の変化を立体的に示した。この図を見ると各二量体の相対的なずれに生じて、二量体間の switch region（α1C-β2FG）と flexible joint（α1FG-β2C）の界面の構造変化が少し見られている。しかし、これらの界面を α1 鎖と β2 鎖の C ヘリックスの Cα 中心として deoxyHbA と重ねて見ると各鎖の FG コーナーの変化は全く見せずに、塩橋も作っておりT構造をとっていることが分かる（図 2-11a, 11b）。

つまり、結晶の 4 次構造変化を二量体での BGH-frane で重ねたから少し二量体のずれが生じているが、界面の周辺残基で比較すると結晶の 4 次構造変化は全く起きっていなかった。

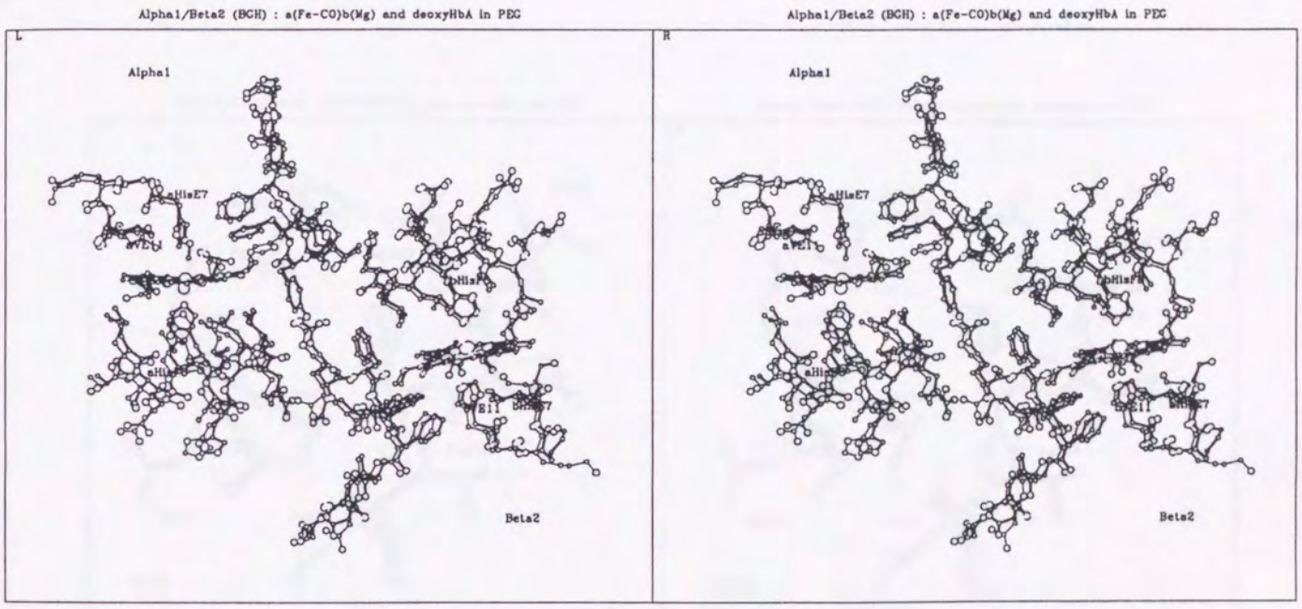

図 2-10　$\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$（thick bonds）と deoxyHbA（PEG, thin bonds）構造を α1β1-BGH frame で重ねて（fitting error = 0.149 Å） α1β2 界面を立体的に示した。アミノ酸残基は α1 鎖 β2 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を図に示した。二量体の界面の switch region（α1C-β2FG）と flexible joint（α1FG-β2C）にずれが少し見られている。

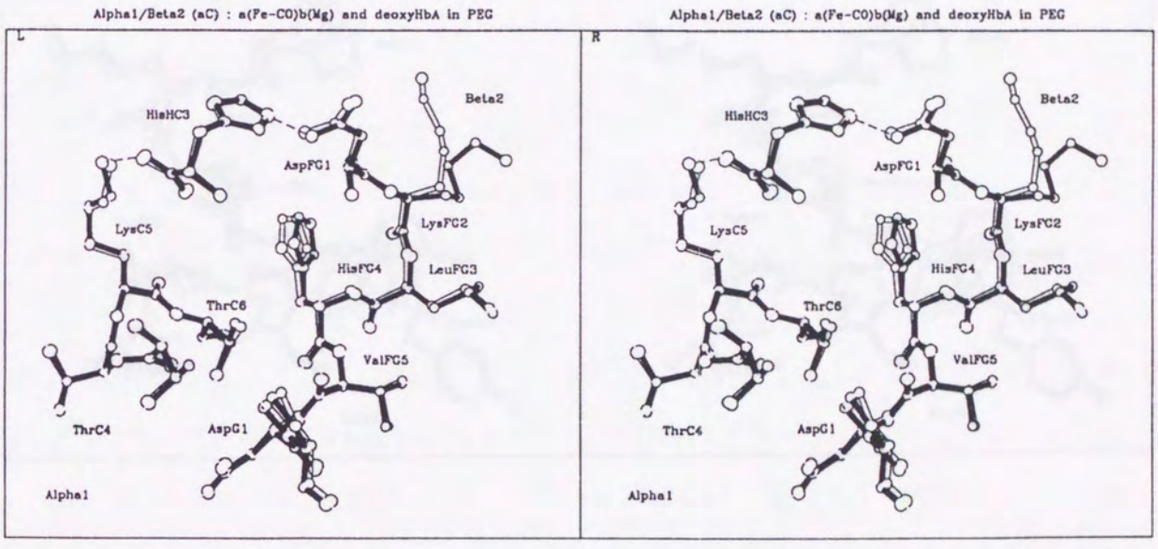
Alpha1/Beta2 (aC) : a(Fe-CO)b(Mg) and deoxyHbA in PEG
L
HisHC3
Beta2
AspFG1
LysC5
LysFG2
HisFG4
LeuFG3
ThrC6
ValFG5
ThrC4
AspG1
Alpha1
Alpha1/Beta2 (aC) : a(Fe-CO)b(Mg) and deoxyHbA in PEG
R
HisHC3
Beta2
AspFG1
LysC5
LysFG2
HisFG4
LeuFG3
ThrC6
ValFG5
ThrC4
AspG1
Alpha1

図 2-11a

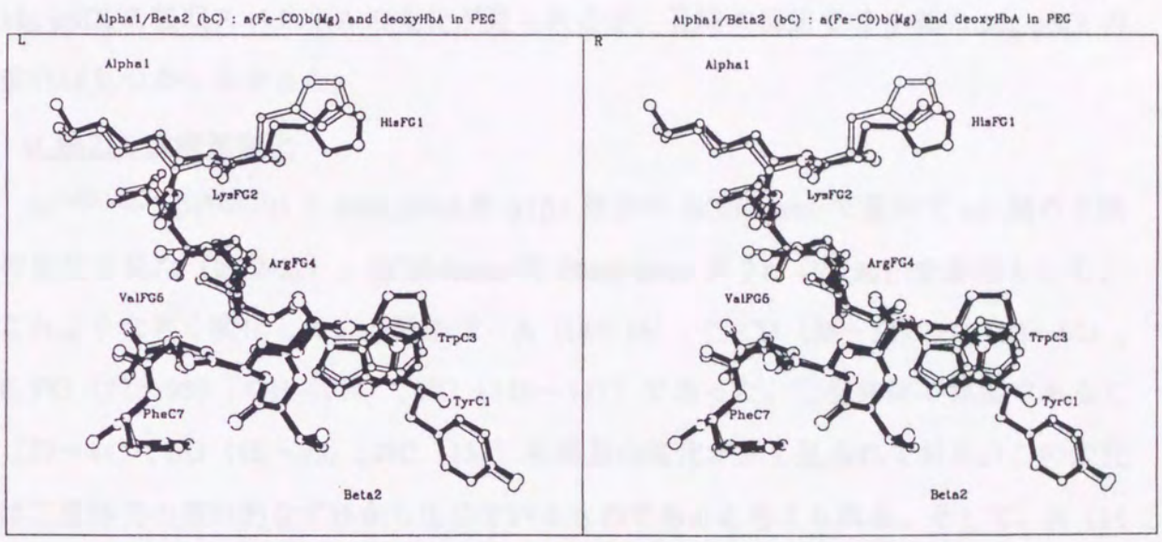

図 2-11b

図 2-11 $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$（filled bonds）と deoxyHbA（open bonds）の両構造を α1β2 界面の switch region（a, α1C-β2FG）と flexible joint（b, α1FG-β2C）を α1 鎖（fitting error = 0.073 Å）と β2 鎖（fitting error = 0.086 Å）の Cα 中心に重ねて FG コーナーの変化を立体的に示した。switch region の界面は変化してないが、flexible joint ではやや変化しているように見える。

β 鎖の 3 次構造変化

PEG 溶液で結晶化を行った $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造を、deoxyHbA と α1β1 界面の BGH-frame で重ねて β1 鎖のヘム周辺の構造を見ると、ほぼ deoxyHbA の構造と同じであった（図 2-13）。Mg(II) で置換を行った β 鎖のヘムの構造も、deoxyHbA とほぼ同じであり（表 2-3）、Mg(II) 原子は 5 配位であった。$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 混成 Hb で、結晶化する前の PEG の溶液中では、α 鎖への配位子結合による β 鎖の Mg-ppIX の吸収スペクトルの変化が見られるが、X 線の構造では β 鎖の Mg-ppIX の変化は見つからなかった。

α 鎖の 3 次構造変化

$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と deoxyHbA を α1β1 界面の BGH-frame で重ねて α1 鎖の主鎖の変化を見た（図 2-12）。BGH-frame の fitting error が 2σ（0.298）を基準として、これより大きく変化している残基は　A（14～16）, C, CD（38～51）, E（52～62）, F, FG（77～95）, GH（114）, HC（138～141）であった。二量体間の界面である C（37～44）, FG（88～95）, HC（138）の残基の変化が少し見られており、この変化は二量体間の相対的なずれから生じているものであると考えられる。そして、A（14～16）, CD, E（46～54）, GH（114）のヘリックスの残基は無視できないくらいの構造変化を示しているが、これらの残基は 配位子結合に伴う意味がある有意の差であるかどうかを 3 次元グラフィクディスプレーで確認を行った。その結果、これらの残基は Hb の分子の外側にある残基で、ある程度残基は自由に動きやすい残基であると判断した。そして、T(α-oxy)Hb（Liddington *et al.*, 1992）の構造にもその傾向が見られており、このことからこれらの残基の変化は α 鎖の配位子結合から伝わる構造変化ではないと判断した。

$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ と T(α-oxy)Hb の構造を比較して見ると α1β1 界面の BGH-frame で重ねた時の二量体間の変化は似ているが、配位子結合部位である F, FG コーナーの変化が大きく違っている。

配位子結合に伴う、E ヘリックスの変化を見ると E7 His（58）から E4 Val までの変化が配位子結合から伝わっているように見られるが、これらの残基は F ヘリックスと比較して変化が小さくなっている。

図 2-12 の $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ 構造の α 鎖の変化を見ると CD, D, E（43～54）の極く近い残基間で大きく変化しているところが目立っている。COHbA の場合は、各所に近傍残基の差が激しくなっている所がある。これらの変化に対し、硫安溶液中の $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ の変化を見ると（図 2-7）各近傍隣残基の差があまり大きい所はない。$\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2\beta^{(Mg(II))}{}_2$ 構造の PEG の結晶と硫安結晶の精密化について比較すると、PEG の結晶では CD, D, E ヘリックスのこの部分の構造精密化の作業が不充分である可能性がある。

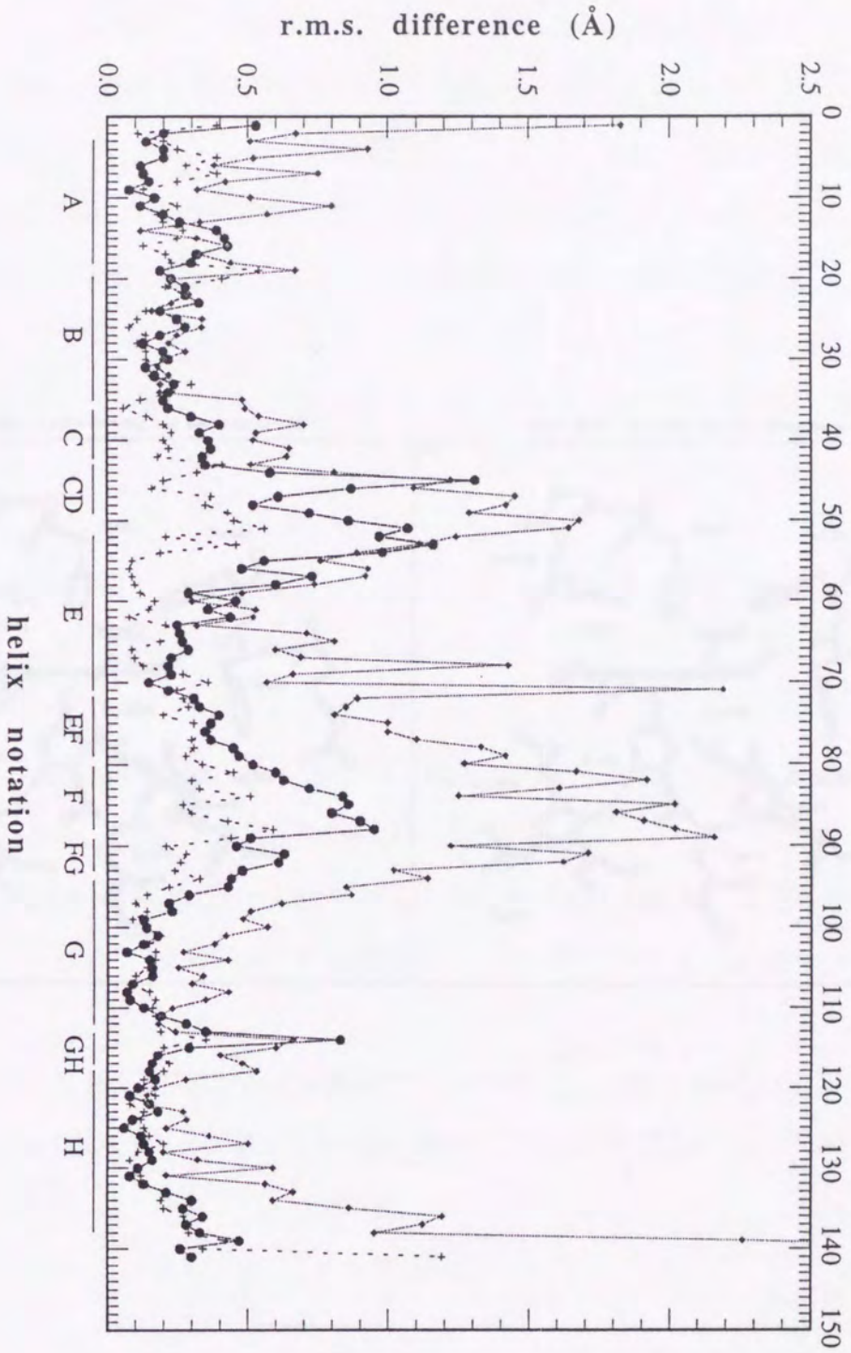

図 2-12　deoxyHbA の α1β1 界面の BGH-frame 中心で $\alpha^{(Fe(II)\text{-}CO)_2}\beta^{(Mg(II))_2}$（ ——•—— ），T(α-oxy)Hb（ ---+--- ），COHbA（ ——•—— ）の構造を重ねてα1 鎖の主鎖の変化である。

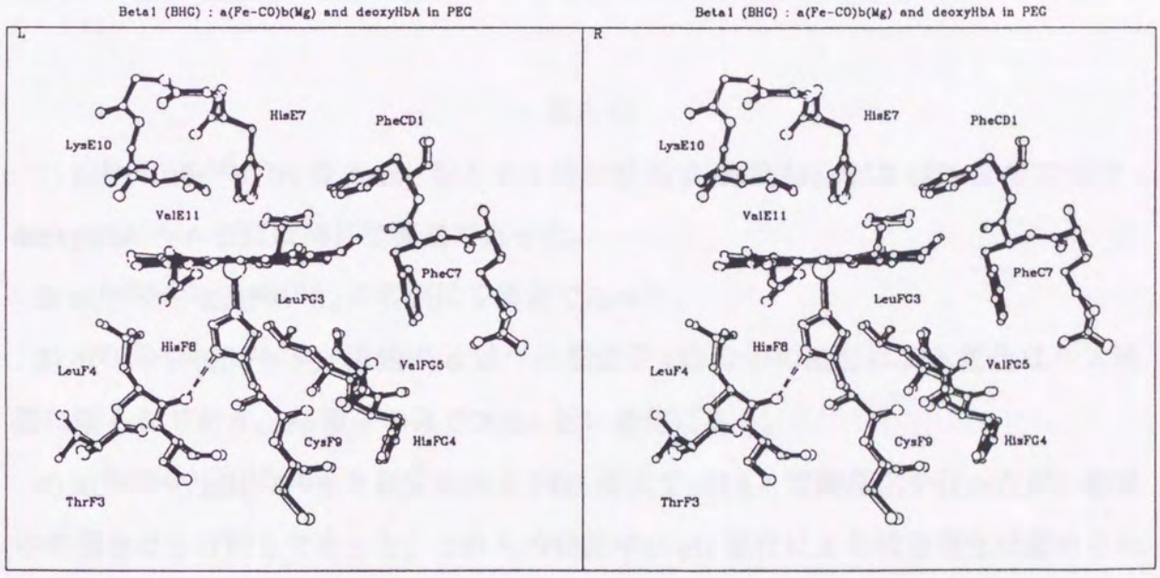

図 2-13　α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ （filled bonds）と deoxyHbA（open bonds）の構造を重ねてβ1(Mg) 鎖のヘム周辺の構造を立体的に表した。

以上の構造から、$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の全体の構造変化のパターンは PEG と硫安溶液はよく似ており、α 鎖の配位子結合により変化はヘム周辺にとどまっている。PEG と硫安溶液中の構造を比較するとヘム周辺の E, F ヘリックスは PEG の結晶がやや大きく変化しているが、2 つの結晶は結晶系が異なっており、deoxyHbA を基準として変化の差の差を見ているが、単純な比較は無理かも知れない。又、PEG の結晶の構造精密化の作業が足らないことが原因の一部である可能性もある。2 つ構造は α 鎖の配位子結合によりヘム周辺の変化は E より F ヘリックスが大きく動いており、酸素親和性の制御に重要なヘリックスであることは共通点になっている。

まとめ

1) $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の deoxy 型と CO 型の結晶 β 鎖の Mg-ppIX は 5 配位であり deoxyHbA ヘムとほぼ同じで構造であった。

2) $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の界面は T 構造であった。

3) $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造の α 鎖への配位子 CO 分子の結合による変化はヘム周辺に限られており、Fe 原子のみ COHbA 近い変化にある。

4) $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ を硫安溶液と PEG 溶液で pH 8.4 で結晶化を行ったが、結晶中の構造はほぼ同じであった。これらの結晶中に pH 変化による構造変化は認められなかった。

5) T 構造にいて α 鎖にのみ CO を結合させた時の構造変化は E ヘリックスより F ヘリックスの変化が大きく、酸素親和性の制御しているヘリックスは F ヘリックスであると考えられる。

第 3 章

T構造におけるβ鎖への配位子結合による構造変化

1. 序　論

Ni(II)-Fe(II)（Shibayama *et al.*, 1986）, Mn(II)-Fe(II)（Blough *et al.*, 1984a, 1984b）, Co(II)-Fe(II)（Yonetani *et al.*, 1974） 混成 Hb では、deoxy 状態で結晶化させるとdeoxyHbA と同型の結晶となる。この結晶を CO 分子や O_2 分子にさらすことでFe-ppIX にだけ配位子を結合させて、中間状態の分子種を得る方法はα鎖にリガンドを結合させるときは成功しているがβ鎖では成功していない。Luisi *et al.*（1990）は $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の混成 Hb を IHP 分子存在下で PEG 溶液を使い、硫安溶液で作られた deoxyHbA と同型の結晶を作ることに成功し、T構造でβ鎖にだけ CO 分子が結合させたときの構造変化を示した。 $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の場合も硫安溶液で結晶化すると deoxyHbA と同型の結晶となる。しかし、これを CO 分子にさらして、β鎖に CO 分子を結合させると結晶は壊れてしまう。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ を硫安溶液で結晶化すると、別の結晶系の結晶が得るが、結晶化の再現性が悪く分解能 2.7 Å までしか回折点が得られなかった。一方、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 混成 Hb を PEG 溶液で結晶化すると、格子定数が少し変化したが、PEG 溶液で結晶化した deoxyHbA と同型の結晶となった。

第 3 章では、T構造が安定化した $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の deoxy 型（硫安溶液）と -IHP（IHP 分子の非存在化）の CO 型（PEG 溶液）と +IHP（IHP 分子の存在化）の CO 型（PEG 溶液）でそれぞれ分解能 1.7 Å, 1.9Å, 1.9Å まで解析を行い、β鎖に配位子 CO 分子の結合した時の構造変化を報告する。

2. 実 験 方 法

(1) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の結晶化

a) 硫安溶液

$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の混成 Hb の試料の調製は第 2 章で述べてある。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の結晶は硫安溶液中の $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶化と同条件で行い、硫安溶液の濃度 2.5 ～ 2.3 M, pH 6.5 の間に良い単結晶ができる。この結晶の情報をとるため、プレセッション写真をとり、deoxyHbA の結晶と同型であることを確認した。そして、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の結晶に CO 分子をさらして、プレセッション写真を撮影を行ったが撮影途中で、結晶は壊れてしまい高角の反射点は消えて行くことが確認された。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 混成 Hb を硫安溶液で結晶化すると 2.1 ～ 2.0 M, pH 6.5 の間で単結晶ができる。この結晶は硫安溶液の deoxyHbA と違う結晶系になったが、結晶化の再現性が悪く又、分解能 2.7 Å までしか回折点が得られなかった。

b) PEG 溶液

PEG 溶液で -IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の結晶は、PEG 溶液の CO 型 $\alpha(^{Fe(II)\text{-}CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の結晶と同じ方法で結晶化を行い、PEG 溶液の濃度 18 ～ 22 %, pH 7.0 の間に良質の単結晶ができる（図 3-1）。この結晶は PEG 溶液のdeoxyHbA の結晶系の $P2_12_12$ と同じであるが格子定数が少し延びている（a = 98.59 Å, b = 101.01 Å, c = 67.09 Å）。+IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の結晶は 2 mM なるように IHP 分子を加えて -IHP と同じ条件で良質の結晶ができる。この結晶も -IHP 結晶と同じ結晶系で、ほぼ同じ格子定数を持っている（a = 98.80 Å, b = 100.80 Å, c = 66.62 Å）。



図 3-1　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 混成 Hb の結晶。PEG 溶液 20 %, pH 7.0, 25 °C の条件で真ん中の結晶の大きさは 0.7 x 0.2 x 0.1 mm, 結晶系は $P2_12_12$, a = 98.59 Å, b = 101.01 Å, c = 67.09 Å の単結晶である。

(2) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ のデータ収集

$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ 混成 Hb の deoxy 型と CO 型の結晶データ収集は高エネルギー物理学研究所·放射光実験施設 BL-6A で行った。データ収集は $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の硫安溶液と PEG 溶液中の結晶と同じ条件で行った（表 3-1 ）。結晶やフィルムの方位マトリックスの精密化、反射の指数付け、積分強度の計算などはプログラムシステム WEIS（Higashi, 1989）を用いて行い、プログラムシステム WEIS は放射光計算機システムの Facom M-780/10 R を利用してデータの解析を行った。その結果は表 3-2 に示している。

Table 3-1

Data Collection of $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ Hb

solution	crystal	camera radius (mm)	rotation axis	rotation range	E=2.5 Ge.V
AS	$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$	286.5	a c	130 60	341-313
PEG	$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ (-IHP)	429.7	c b	120 40	336-316
PEG	$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ (+IHP)	429.7	c b	120 40	320-298

AS, ammonium sulfate; PEG, polyethylene glycol. IHP, inositol hexaphosphate, - : in the absence of IHP, + : in the presence of IHP.

Table 3-2

Summary of X-ray Diffraction measurements

solution	crystal	space group	No. of reflections	independent reflections	R-merge[a] (%)
AS	$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$	$P2_1$	209163	90366	6.87
PEG	$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ (-IHP)	$P2_12_12$	137526	44611	6.14
PEG	$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ (+IHP)	$P2_12_12$	146785	47975	5.31

[a]R-merge = $\Sigma \mid I_i - \langle I \rangle \mid / \Sigma \mid I_i \mid$, where I_i is the intensity of an observation and <I> is the mean value for that reflection and the summations are over all reflections. AS, ammonium sulfate. PEG, polyethylene glycol. IHP, inositol hexaphosphate, - : in the absence of IHP, + : in the presence of IHP.

(3) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の構造の精密化

a) deoxy 型

$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ 構造の精密化は、硫安溶液の deoxyHbA の座標を PDB からとって来てα鎖の中心金属を Mg(II) に置き換え精密化を行った。基本的な精密化の条件は $\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造と同じように行い、プログラム PROLSQ 134 回行い、11 回分子モデルを修正し、最終的には分解能 10.0～1.7Åの 44700 反射（$F > 3.0\sigma(F)$）に対し、R 因子 17.7% の構造を得た（図 3-2, 表 3-3 ）。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造には 385 個の水分子を含まれている。

b) CO 型（-IHP）

-IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の構造の精密化は PEG 溶液で結晶化された deoxyHbA の座標を利用して、X-PLOR package（Brunger *et al.*, 1988）の分子置換法（Brunger, 1990, 1991a, 1991b, 1991c）を用いて行った。X-PLOR package は主に、SA（simulated annealing refinement）と呼ばれるプログラムで行った。この精密化は分子構造を高温で溶かし、充分な時間をかけ平衡状態にした後、冷却することにより精密化を試みるプログラムである。X-PLOR package の分子置換法により、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造の精密化は、deoxyHbA の座標を用いて並進と回転を合わせて、SA-refinement を行った。その条件は分解能 5.0～2.0 Å, 温度は 4000～300 K, 時間 0.0005 μsec ごとに毎回 25 K を下げて、120 回行った。そして、温度因子の精密化をやって電子密度図を（2Fo - Fc）かき、分子モデルの修正を行った（R 因子は 23.5 %）。その後プログラム PROLSQ を用いて 61 回の精密化を行い、4 回の分子モデルの修正をした。CO 分子のモデルは第 2 章の $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ 構造と同じようにモデルを作成した。表 3-4 に示したヘムの構造は CO 分子を再修正行った後の結果である。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造の最終的な精密化の結果は、表 3-3 に示したように分解能 10.0～1.9 Å の 35686 反射（$F > 3.0\sigma(F)$）に対し、R 因子 18.3% の構造を得た（図 3-2）。

c) CO 型（+IHP）

+IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造の精密化は、-IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造の座標を用いて、X-PLOR package の SA-refinement を行った（条件は上と同じ）。次にプログラム PROLSQ 24 回行い、最終的に分解能 10.0～1.9 Å の 35856 反射（$F > 3.0\sigma(F)$）に対し、R 因子 19.5 % の構造を得た（図 3-2, 表 3-3）。IHP 分子のモデルの製作は分解能 1.9 Å まで精密化が終わったところで、$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の構造（Luisi *et al.*, 1990）から IHP 分子取ってきて行った。しかし、IHP 分子の電子密度図（2Fo - Fc, Fo - Fc）を描いて見ると、IHP 分子の電子分布はつながっておらず、電子分布は非常に薄く見えている。-IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の IHP 分子の結合部位である β 鎖 Lys 82 の周辺を見ると、IHP 分子の結合部位の電子分布はあまり強くは見られなかったので IHP は占有率が低いが確かに結合はしている。

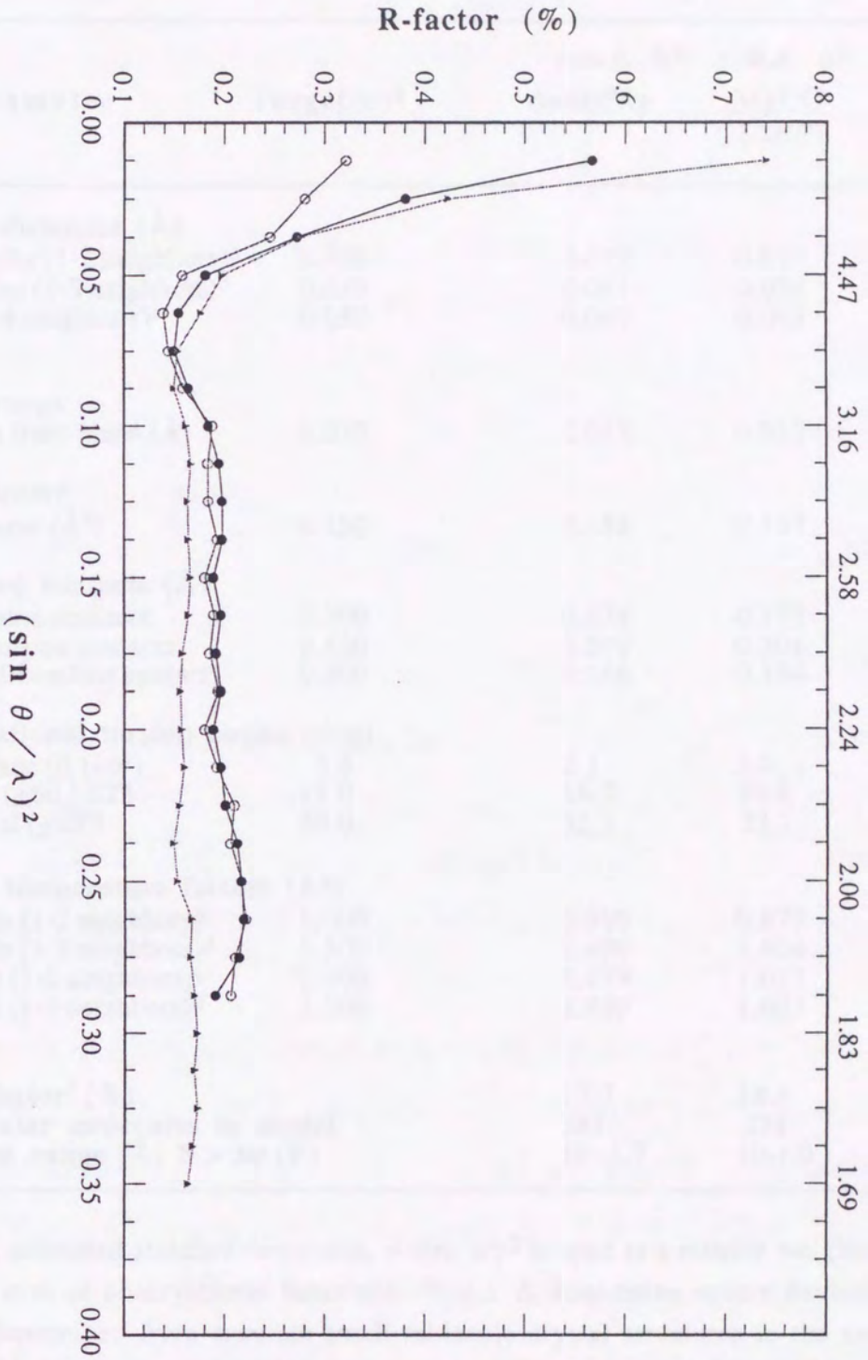

図 3-2　$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II))}{}_2$ 混成 Hb の deoxy 型（ ——•—— ）と -IHP の CO 型（ ——○—— ）と +IHP の CO 型（ ——●—— ）の構造の各分解能と R-factor の関係。

Table 3-3

Summary of Least-Squares Refinement Parameters and Statistics of Data Processing

Parameter	Target(σ)[a]	r.m.s. Δ[b] deoxyMg	r.m.s. Δ[b] MgCO (-IHP)	r.m.s. Δ[b] MgCO (+IHP)
Bonding distances (Å)				
bond lengths (1-2 neighbors)[c]	0.020	0.017	0.018	0.020
bond angles (1-3 neighbors)[d]	0.030	0.031	0.034	0.036
planes (1-4 neighbors)[e]	0.050	0.047	0.043	0.044
Planar groups				
deviations from plane (Å)	0.020	0.013	0.013	0.015
Chiral centers				
chiral volume (Å^3)	0.150	0.158	0.167	0.194
Nonbonded contacts (Å)				
single-torsion contacts	0.500	0.174	0.172	0.172
multiple-torsion contacts	0.500	0.270	0.308	0.307
possible H-bonding contacts	0.500	0.166	0.194	0.189
Conformational torsion angles (deg)				
peptide plane (0,180°)	3.0	2.1	2.0	2.5
staggered (±60,120°)	15.0	16.2	20.4	20.2
orthonormal (±90°)	20.0	32.2	32.1	33.6
Isotorpic temperature factors (Å^2)				
main chain (1-2 neighbors)[c]	1.000	0.966	0.877	0.909
main chain (1-3 neighbors)[d]	1.500	1.496	1.404	1.420
side chain (1-2 neighbors)[c]	1.000	1.199	1.027	1.098
side chain (1-3 neighbors)[d]	1.500	1.959	1.693	1.742
Final R-factor[f] (%)		17.7	18.3	19.6
No. of water molecules in model		385	274	214
Resolution range (Å) **F > 3σ (F)**		10 -1.7	10-1.9	10-1.9

[a]Target σ, estimated standard deviations, where $1/\sigma^2$ is used as a relative weighing factor in the minimized sum of observational functions. [b]r.m.s. Δ, root-mean-square deviation from ideal values as determined from accurate small molecule crystal structures in the case of bonding distances, chiral volumes, and nonbonded contacts, or from average values in the case of isotropic termperature factors. [c]1-2 neighbors, covalently atom pairs. [d]1-3 neighbors, atom-pairs separated by two covalent bonds. [e]1-4 planar neighbors, atom pairs in a planar group separated by three covalent bonds. [f]R-factor = $\Sigma \, || F_o|-|F_c|| \, / \, \Sigma \, |F_o|$, whrer F_o is the observed structure factor and F_c is that calculated from the model. deoxyMg: $\alpha_2^{(Mg(II))}\beta_2^{(Fe(II))}$, MgCO: $\alpha_2^{(Mg(II))}\beta_2^{(Fe(II)\text{-}CO)}$. IHP, inositol hexaphosphate, - : in the absence of IHP, + : in the presence of IHP.

3. 結果および考察

(1) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ と　deoxyHbA の構造比較

α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ と deoxyHbA を重ねた（fitting error 0.102 Å）時の α1β1 と α2β2 二量体の主鎖（main-chain）の相対的な変化は両方とも 0.15 Å であった。3 次元のグラフィディスプレーで全体の構造を調べた結果、deoxyHbA と重要な差は見られなかった。α(Mg) 鎖は 5 配位であり、ヘムの構造は deoxyHbA と同じであった（表 3-4）。両結晶は全く同じであると言ってよい。

(2) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ に配位子　CO 結合による構造変化

a) β 鎖ヘム面の変化

$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の β2 鎖の配位子 CO 分子とその近くの電子密度図（2Fo-Fc）を 図 3-3 に示した。又、ヘムの構造は表 3-4 に示した。ヘムの構造を見ると、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の Fe 原子の位置は、COHbA 分子の Fe 原子の位置とほぼ同じように、4 つの pyrrole の窒素原子の同一平面の中に入っていることが分かる。$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の β 鎖の Fe 原子の位置を調べて見ると、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ と違って deoxyHbA と COHbA の中間くらいにある。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の β 鎖のヘム doming は　deoxyHbA と似ている。又、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の β 鎖の 近位 His(F8) の Nε の位置を見ると 2 つの結晶では deoxyHbA と COHbA 分子の中間くらいになっている。

T構造からR構造に転移する時、β 鎖のヘム面は大きく変化している。COHbA, $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$, T-met Hb を、deoxyHbA（PEG）を基準として、各結晶の β1 鎖のヘム面（4 つの N 原子と 32 個の C 原子）の傾きを、α1β1 の BGH-frame で比較した。R状態の COHbA の β 鎖のヘムは deoxyHbA より 5.4° 傾いており、Fe 間の位置は deoxyHbA から 1.38 Å であった。$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ は deoxyHbA と比較してヘムの傾きと Fe 原子間の距離は 3.4° , 0.37 Å であった。T-met Hb は 1.4° , 0.30 Å であった。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ では deoxyHbA の β 鎖のヘムより 3.6° 傾いており、Fe 間の距離は 0.44 Å であった。この結果から、ヘム面の動きは $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ でよく似ているが、T-met Hb は少し小さくなっている。T-met Hb の β 鎖のヘム面の傾きは小さいのは、配位する配位子の違

いにより生じることであると考えられる。

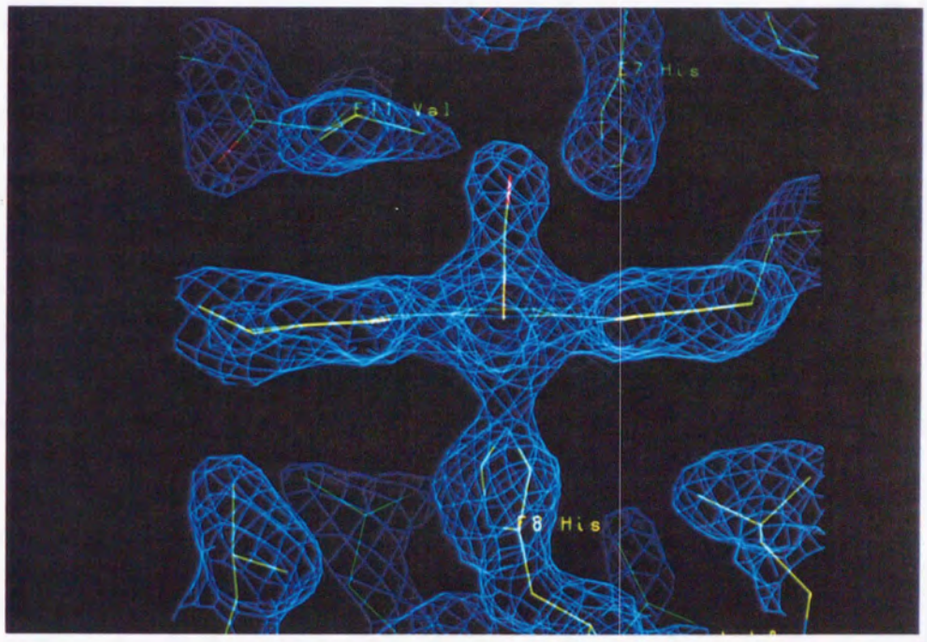

図 3-3　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の β2 鎖のヘム周辺と配位子 CO 分子の電子密度図（2Fo-Fc）である。この電子密度図は分解能 1.9 Å まで解析されたものであり、ノイズレベル（contoured level = 1.5 σ）の 1.5 倍の点がつないである。β1 鎖のヘム周辺の電子分布もこれと同じである。

Table 3-4
Ligand and Heme Geometry

	deoxyMg[a]		(-IHP) MgCO[b]		(+IHP) MgCO[b]		(+IHP) NiCO[c]		deoxy HbA[d]		COHbA[e]	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
Interatomic distances (Å)												
M - N_{porph}(mean)	2.05	2.04	2.05	2.01	2.04	2.01	1.92	1.96	2.08	2.06	2.00(2.02)	2.00(2.03)
M - N_{ε}(F8)	2.28	2.18	2.39	2.30	2.37	2.22	3.23	2.23	2.21	2.22	2.09(1.95)	2.08(2.20)
Fe - C(ligand)	-	-	-	1.82	-	1.82	-	1.80	-	-	1.81(1.83)	1.81(1.77)
C - O(ligand)	-	-	-	1.26	-	1.26	-	1.24	-	-	1.31(1.21)	1.30(1.32)
N_{ε}(E7) - O(ligand)	-	-	-	3.14	-	3.27	-	2.87	-	-	4.02(2.95)	3.42(3.30)
Nε(E7) - C(ligand)	-	-	-	3.34	-	3.38	-	3.13	-	-	4.11(3.28)	3.56(3.45)
Distances to planes (Å)												
M - P_{heme}	0.71	0.58	0.71	0.14	0.70	0.19	0.19	0.32	0.75	0.57	0.07	0.00
M - P_N	0.46	0.39	0.44	-0.04	0.42	0.01	0.09	0.15	0.47	0.37	0.00(-0.1)	-0.02(-0.1)
N_{ε}(F8) - P_{heme}	2.86	2.75	3.07	2.43	3.05	2.40	3.36	2.51	2.94	2.78	2.15	2.07
P_C - P_N	0.15	0.12	0.17	0.11	0.17	0.11	0.05	0.10	0.17	0.11	0.04	0.01
Angles (degs)												
N_{ε}(F8)-Fe-C(ligand)	-	-	-	165	-	163	-	172	-	-	170(173)	170(171)
Fe-C-O(ligand)	-	-	-	147	-	155	-	155	-	-	179(175)	181(171)

a-e refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ (this work); b: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ (this work); c: $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ (Luisi *et al.*, 1990), d: deoxy HbA (Kavanaugh *et al.*, 1992), e: COHbA (Baldwin *et al.*, 1980) were taken from the Brookhaven data base. For COHbA the numbers taken from the Table of Derewenda *et al.*, (1990) were added in the parenthesis.
M, central metal ; P_N, mean plane of the 4 porphyrin nitrogens ; P_C, mean plane of the 20 porphyrin carbons ; P_{heme}, mean plane of porphyrin nitrogens and carbons plus first side-chain atoms (32 atoms). M - N_{porph}, the distance of the metal from the mean 4 prophyrin nitrogens. IHP, inositol hexaphosphate, - : in the absence of IHP, +: in the presence of IHP.

b) 4 次構造変化

$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の α1β1 と α2β2 の二量体の相対的な変化を調べて見ると、deoxyHbA と α1β1 のBGH-frame（fitting error 0.251 Å）で重ねて α1β1, α2β2 二量体の主鎖の二乗平均変化はそれぞれ 0.45, 0.90 Åであった。又、α2β2 の BGH-frame（fitting error 0.287 Å）で重ねた時の α2β2 は 0.49, α1β1 は 0.80 Åとなり、二量体間の相対的な変化が少し見られる。$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ も deoxyHbA と比較して見ると（α1β1 のBGH-frame, fitting error 0.196 Å）α1β1 変化は0.37 Å, α2β2 の変化は 0.84 Åであり、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の場合とよく似ていた。

図 3-4 には $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ と deoxyHbA のα1β1 界面の BGH-frame で重ねた時の（fitting error は 0.251 Å） α2β1 界面（図 3-4a）と α1β2 界面（図 3-4b）の 4 次構造変化を立体的に比較して見た。2 つの二量体の界面の変化が少し見られている。この界面は 4 次構造変化で大きく変化している部位である。図 3-4 に表したようにα1β1-BGH-frame に重ねると α2β2 の二量体が一様に少しずれている。つまり、ある二量体の BGH-frame で重ねると残りの二量体がずれており、その大きさが上に述べた二乗平均変化である。しかし、この二量体の塩橋は切れておらず switch region（α2C-β1FG）の界面を α2 鎖 Cα 中心で重ねると deoxy 構造をとっていることが分かる（図 3-5）。図 3-6 は α1β1-BGH-frame に重ねた時の β1 鎖の変化であるが、二量体の界面である残基と塩橋作っている βHC3 His の変化は 0.81 Å であるが、その変化は界面の構造を deoxy 構造に保つためのものである。

β 鎖に配位子結合による二量体間の相対的な変化は見られているのは、BGH-frame で重ねたから生じることであり、実際的な二量体の変化である界面で見ると変化が小さい。このことから $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の構造はT構造をとっていることが分かる。

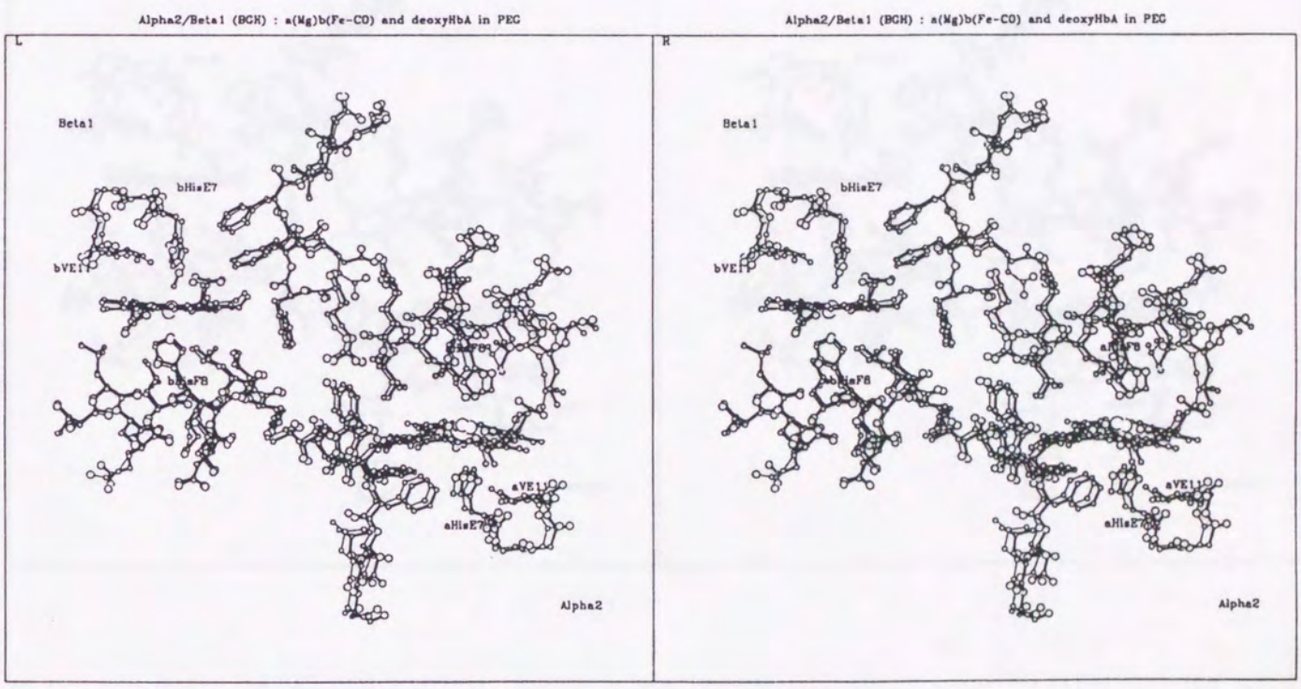
Alpha2/Beta1 (BGH) : a(Mg)b(Fe-CO) and deoxyHbA in PEG
L
Beta1
bHisE7
bVE11
aVE11
aHisE7
Alpha2
Alpha2/Beta1 (BGH) : a(Mg)b(Fe-CO) and deoxyHbA in PEG
R
Beta1
bHisE7
bVE11
aVE11
aHisE7
Alpha2

図 3-4a

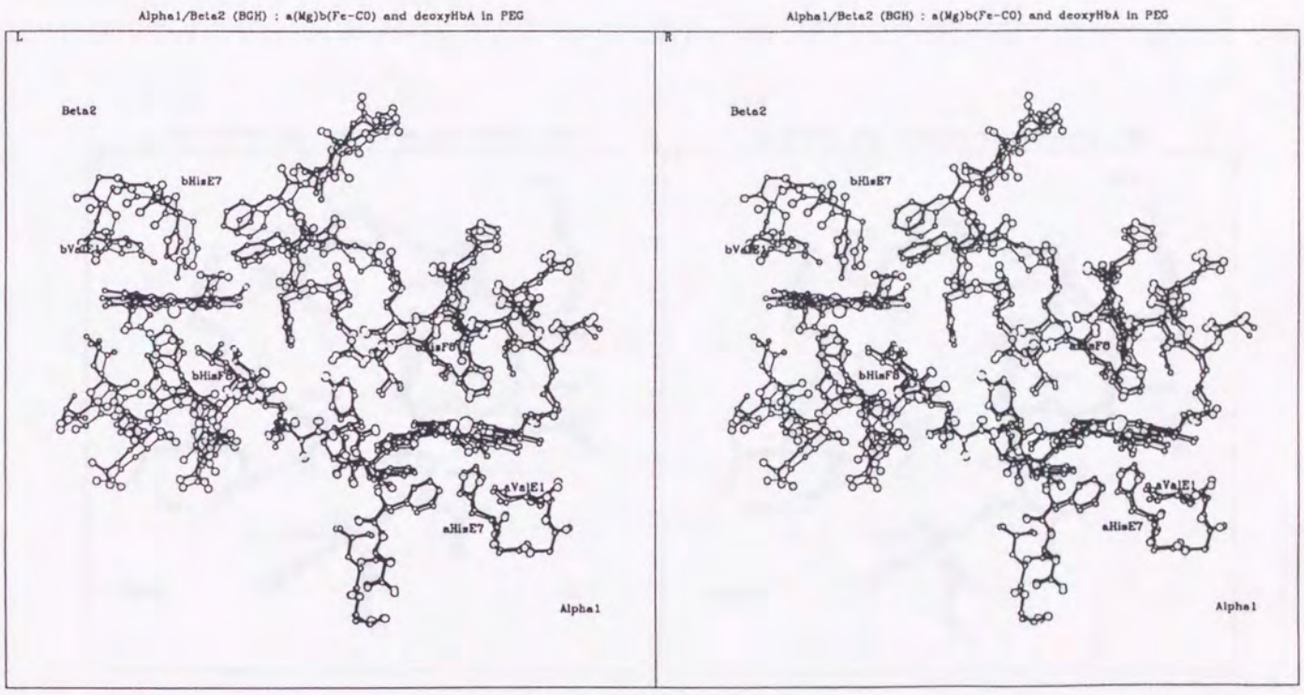

図 3-4b

図 3-4 $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$（thick bonds）と deoxyHbA（thin bonds）構造を α1β1-BGH frame で重ねて α2β1 界面（a）と α1β2 界面（b）を立体的にそれぞれ示した（fitting error = 0.251 Å）。アミノ酸残基は α 鎖 β 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を図に示した。各鎖の二量体の switch region（α1C-β2FG, α2C-β1FG）と flexible joint（α1FG-β2C, α2FG-β1C）の界面は相対的なずれが少し見られている。

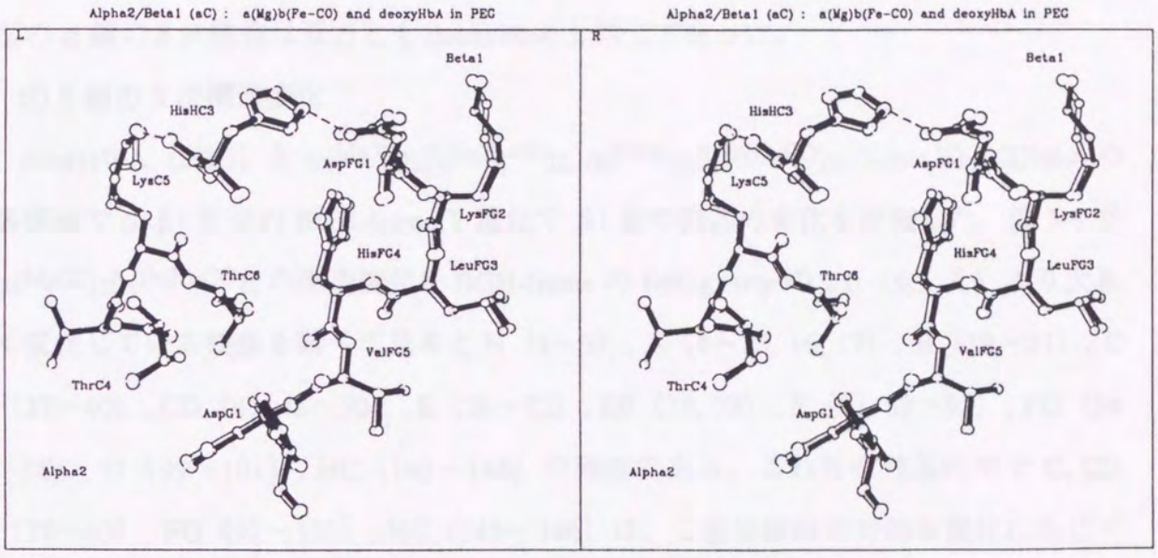

図 3-5　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$（filled bonds）と deoxyHbA（open bonds）の両構造を α2β1 界面の switch region（α2C-β1FG ）を α2 鎖（fitting error = 0.058 Å）の Cα 中心に重ねて β1 鎖の FG コーナーの変化を立体的に示した。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の構造は塩橋（点線）は切れておらず、界面はT構造である。

c) α 鎖の 3 次構造変化

α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造と deoxyHbA（PEG）を重ねて（fitting error 0.251 Å）グラフィクディスプレーで α 鎖の構造を見ると deoxyHbA の構造と同じであり、α1 鎖の主鎖の相対的な変化は 0.39 Å であった。Mg(II) 原子は 5 配位であり、α 鎖のヘムの構造は deoxyHbA と同じであった（表 3-4）。$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造は α 鎖の中心金属 Ni(II) と F8 His の Nε の結合は切れており、Ni(II) がヘム面の中に入っている。$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II))}{}_2$ 混成 Hb の deoxy 型と CO 型の α 鎖の 3 次構造は双方とも deoxyHbA と同じであった。

d) β 鎖の 3 次構造変化

deoxyHbA（PEG）と $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$, $\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$, T-met Hb, COHbA の各構造で α1β1 界面の BGH-frame を重ねて β1 鎖の残基の変化を比較した。図 3-6 で $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造変化を BGH-frame の fitting error の 2σ（0.5 Å）より大きく変化している残基を調べて見ると N（1～3），A（4～10, 16, 17），B（19～21），C（37～40），CD（43, 45～50），E（58～75），EF（78, 79），F（87, 89～93），FG（94～98），G（99～101），HC（143～146）の残基である。これらの残基の中で C, CD（37～43），FG（97～101），HC（145～146）は、二量体間の相対的な変化に応じて変化する α 鎖の界面との接触部位である。N（1～3）末端の残基の変化は DPG 結合部位であるが、不安定である。他の残基と比較して温度因子も高くて、3 次元のグラフィクディスプレーで電子密度図（2Fo-Fc, Fo-Fc）を見ても電子密度分布がつながってていない。N 末端と A ヘリックスの最初の一部の残基の変化は、Fermi（1975）の deoxyHbA 構造でも不安定であり、動きやすい残基であると報告している。A（4～10, 16, 17），B（19～21），CD（45～50）の残基の変化は Hb 分子の表面にある残基であり、配位子 CO 分子の結合による変化ではないと考えられる。したがって、残りの E（58～75），F（87, 89～93），FG（94～98）コーナーの残基の変化が配位子結合に伴うものであり、これらはヘム周辺のアミノ酸残基である。$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ と T-met Hb の β 鎖の構造変化の場合も、他のアミノ酸残基の変化は小さくて配位子結合によりヘム周辺の残基のみ変化していることが分かる。しかし、その変化は $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ 構造より小さい変化である。それに対し、R

状態の COHbA の変化は $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造と比較してさらに大きくなっている。したがって、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造の 3 次構造は deoxy Hb 構造に似ていることになる。

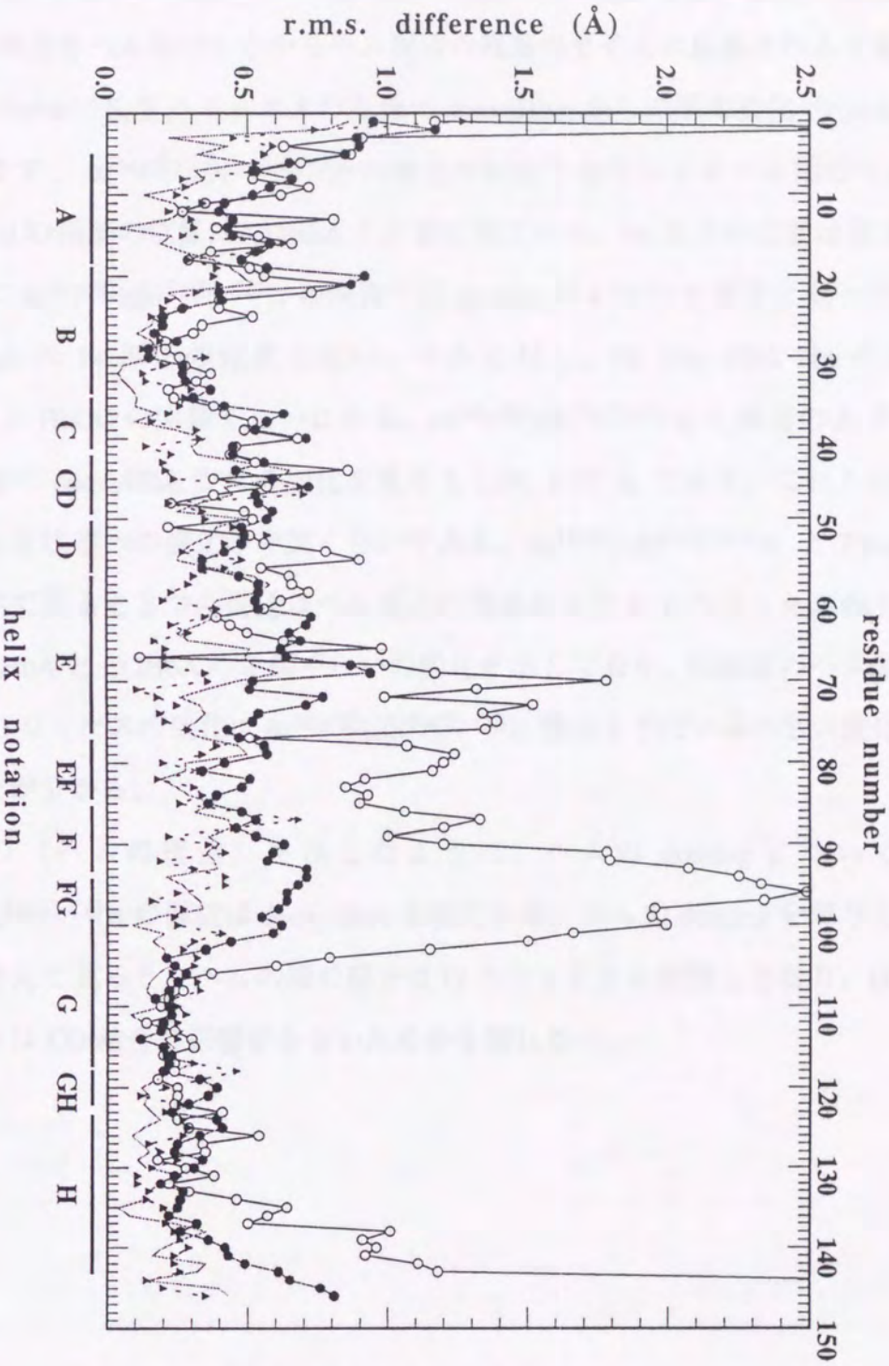

図 3-6　deoxyHbA（PEG）を中心として $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$（ ——●—— ），$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$（ ----▲---- ），T-metHb（ ———— ），COHbA（ ——○—— ）の構造をそれぞれ α1β1-BGH frame で重ねて β1 鎖の主鎖の変化を示した。

表 3-5. には $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$, $\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$, T-met Hb,, deoxyHbA, COHbA の構造をヘム面の中心からヘム周辺の残基の原子との距離とヘムを重ねた時の（Heme frame） E, F ヘリックスの主鎖の deoxyHbA からの平均変化（r.m.s.）とを示した。まず、$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造の配位子結合によるヘム周辺の残基 E7 His, E11 Val の残基の位置は COHbA と非常に似ている。Fe 原子の位置は表 3-4 に示したように $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造では pyrrole の 4 つの N 原子と同一平面にあり、COHbA の Fe 原子の位置と近い。それに対し、F8 His, CD1 Phe の残基は deoxyHbA と HbCO の中間くらいにある。$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造の E, F ヘリックスの主鎖の deoxyHbA からの変化を見ると 1.08, 0.37 Å であり、これらの変化はＴ状態からＲ状態への変化の中間くらいである。$\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ と T-met Hb の結晶を調べて見ると２つの構造はヘム周辺の残基および E, F ヘリックスの主鎖の変化は deoxyHbA と COHbA の中間くらいの変化を示しており、両結晶のヘム周辺の残基と E, F ヘリックスの変化は $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ 構造よりだいぶ小さい変化を示していることが分かる。

表 3-4 の（ヘムの構造）を示したように、ヘムの doming については、$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)-CO)}{}_2$ の構造は deoxyHbA と似ている。ヘムの doming を関与しているところを考えて見ると、ヘムの端の部分は G ヘリックスと接触しており、G ヘリックスあたりは CO 結合の影響が小さいためかも知れない。

Table 3-5

A comparison of the distance between neighboring atoms of the CO molecule and heme centers plus r.m.s. differences of E and F helices referred to deoxy HbA under the superposition of the hemes in the β subunit of intermediate and end-state hemoglobins

atoms		MgCO[a] (Å)	NiCO[b] (Å)	T-met Hb[c] (Å)	deoxy HbA[d] (Å)	COHbA[e] (Å)
E11 Val -	C_α	6.50	5.89	6.08	5.65	6.86
	C_β	5.88	5.55	5.51	5.05	6.07
	$C_{\gamma 1}$	5.90	5.58	5.55	5.24	5.99
	$C_{\gamma 2}$	4.76	4.43	4.31	3.81	4.87
E7 His -	C_α	8.50	8.15	8.00	7.96	8.53
	C_β	7.90	7.63	7.49	7.47	7.92
	C_γ	6.57	6.25	6.03	6.03	6.54
	$C_{\delta 2}$	5.36	5.21	5.08	5.04	5.39
	$N_{\varepsilon 2}$	4.52	4.23	3.93	3.94	4.44
F8 His -	C_α	6.73	6.65	6.63	6.94	6.53
	C_β	5.88	5.98	5.85	6.20	5.66
	C_γ	4.44	4.55	4.41	4.75	4.24
	$C_{\delta 2}$	3.34	3.38	3.32	3.67	3.09
	$N_{\varepsilon 2}$	2.27	2.38	2.26	2.59	2.08
CD1 Phe -	C_ζ	6.04	6.05	6.07	6.30	5.60
E-helix mean		1.08	0.68	0.56	0.00	2.02
F-helix mean		0.37	0.41	0.39	0.00	1.14

a-e refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ (this work); b: $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ (Luisi *et al.*, 1990), c: T-met Hb (Liddington *et al.*, 1992), d: deoxy HbA (Kavanaugh *et al.*, 1992), e: COHbA (Baldwin *et al.*, 1980) were taken from the Brookhaven data base.

図 3-7 は $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$, $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$, deoxyHb, COHbA を α1β1 の BGH-frame で重ねて β1 鎖のヘム面を調べたものである。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ と $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ は deoxyHbA と似ているが COHbA は配位子結合により、ヘム面は大きく動いていることが分かる。

Baldwin（1980）の COHbA 構造の報告によると β 鎖の配位子結合の立体障害である E11 Val の影響で配位子 CO は E11 Val から遠い方向に行くと報告されている。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造では、β1 鎖と β2 鎖の配位子 CO の C 原子の位置が異なっている（図 3-8）。β1 鎖の場合、配位子 C 原子からヘム面に対し垂直な線を引いて、面を切る点と Fe との距離を計ると 0.5 Å であり、ヘムの N_d（ヘムのpyrrole の 4 番目の窒素原子）原子の方向に向かっている。そして、Fe-C-O をヘム面に垂直になるように CO 分子修正すると、E11 Val の $C\gamma_2$ 原子と配位子CO の O 原子間の距離が 2.83 Å となり、ファンデルワールス反発力を考えるとこの距離は近すぎる。β2 鎖は β1 鎖と配位子 C 原子の位置が異なっており、β2 鎖の配位子 CO も β1 鎖の配位子と同じように操作して、Fe と配位子 C 原子から下した垂線の足との距離を計ると 0.5 Å であるが方向はヘムの Nc 原子に向かっている（図3-8）。そして、Fe-C-O をヘム面に垂直にすると E11 Val の $C\gamma_2$ 原子と配位子 O 原子の距離が 2.92 Å となり各原子間の距離は近すぎる。このことから β 鎖の配位子 CO 結合は立体障害である E11 Val の障害を受け、E11 Val の $C\gamma_2$ 原子から遠いところに配位する。しかも、C-O の原子はヘム面に対し垂直に結合することはできないと言える。しかし、現時点では CO 分子の正確な位置を決定するのは難しく、β1 と β2 鎖の位置の差が誤差でないといいきることはできない。

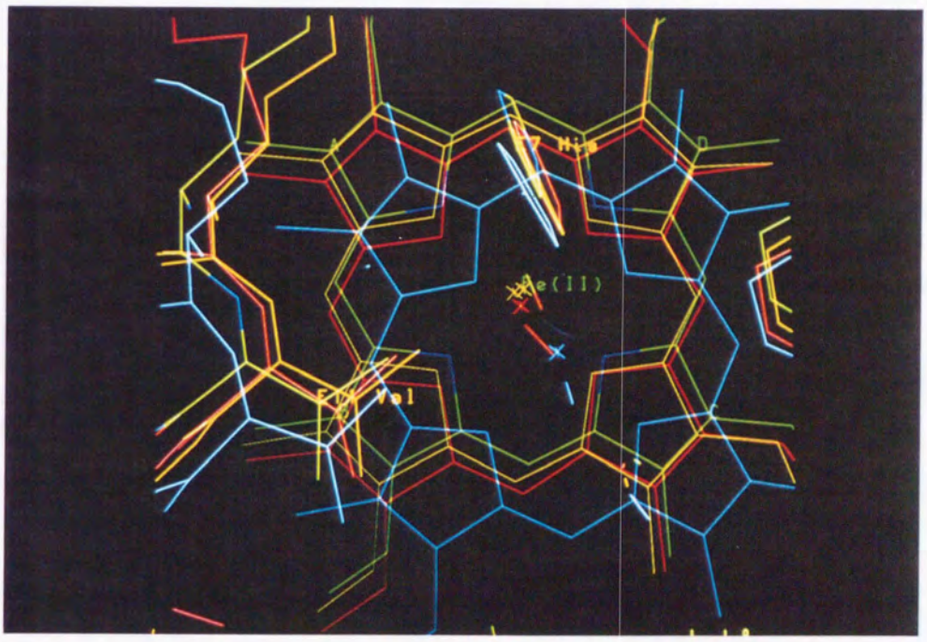

図 3-7　deoxyHbA（黄色）の α1β1-BGH frame で $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$（緑色），$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$（赤色），COHbA（青色）の構造を重ねて β1 鎖のヘムと E11 Val の変化を示した。

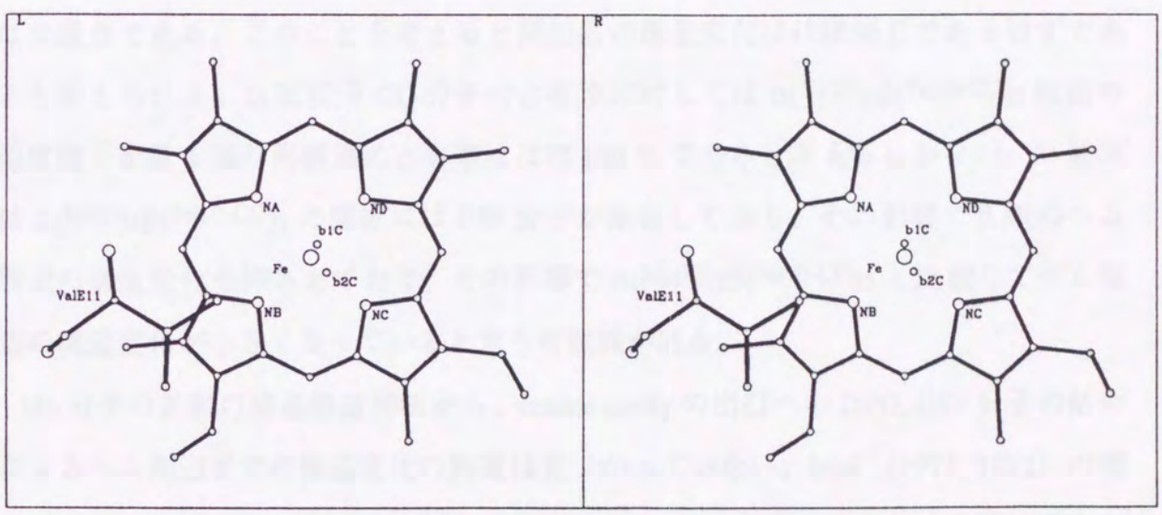

図 3-8　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の β1 鎖ヘムと β2 鎖ヘムを Heme-frame で重ねて（fitting error 0.113）β 鎖の配位子 CO 分子の中、C 原子の位置をそれぞれ示した（b1C : β1 鎖の配位子 CO の C 原子、b2C : β2 鎖の配位子 CO の C 原子）。

(3) なぜ IHP の影響を見るか

$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造を比較すると分子全体の構造は似ているが配位子結合による β 鎖のヘム周辺の E ヘリックスの残基（E7 His, E11 Val）と Fe 原子の deoxyHbA からの変化は異なっている。両構造の違いの原因として考えられることは、1) α 鎖に置換した金属が異なっている、2) 配位子 CO 分子の占有率の差、そして、3) $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の結晶には IHP 分子が結合していることである。これらの、1) 金属の違いに関しては、溶液中の酸素親和性はほぼ同じであり（Shibayama, 1986; Minagawa）、両方とも deoxy 構造を安定化するものであることは共通点である。このことを考えると両結晶の構造変化はほぼ同じであるはずであると考えられる。2) 配位子 CO 分子の占有率に対しては $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の温度因子を見る限り両構造の占有率はほぼ 100 % であると考えるしかない。3) 最後は $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造には IHP 分子が結合しており、その影響で β 鎖のヘム周辺の構造変化を抑さえており、その影響で $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ と比較してヘム周辺の構造変化が小さくなっていると言う可能性がある。

Hb 分子の X 線の結晶構造解析から、central cavity の出口への DPG, IHP 分子の結合によるヘム周辺までの構造変化の筋道は見つかっていない。Imai（1975, 1982）の報告によると Hb 分子の酸素平衡曲線の K_1（Hb 分子に 1 個目が結合しする時に平衡定数）はこれらの DPG, IHP, pH などに影響を及ぼされているが X 線の方ではこれらの構造変化を見つけられていない。

そこで、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ に IHP を加えて結晶化して構造を解析を行い、-IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造と構造変化を比較した。

(4) +IHP と -IHP 分子による $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造変化

両構造の β 鎖のヘムの構造は同じであった（表 3-4）。IHP 分子による二量体の位置関係の変化はなく、switch region（α1C-β2FG）と flexibe joint（α1FG-β2C）の界面の変化（α2β1 の界面もほぼ同じ）もなく、4 次構造変化はしてなかった。α 鎖と β 鎖の 3 次構造にも IHP よる構造変化は認められなかった。以上のことから $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造に IHP を加えても構造は変化しないと結論した（図 3-9, 10, 11, 12）。

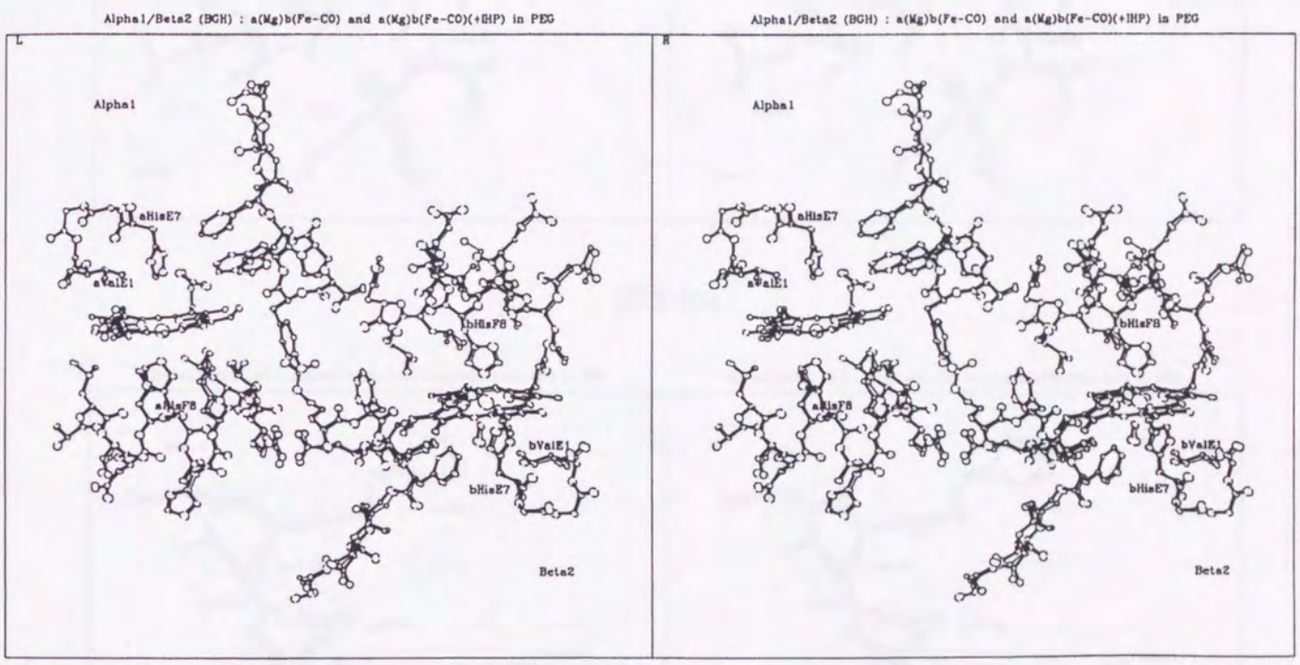

図 3-9　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の -IHP（thick bonds），+IHP（thin bonds）両構造を α1β1-BGH frame で重ねて（fitting error = 0.098 Å）α1β2 界面を立体的に示した。アミノ酸残基は α1 鎖 β2 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を図に示した。各鎖の二量体間の switch region（α1C-β2FG）と flexible joint（α1FG-β2C）の界面の相対的な変化も見られていない。

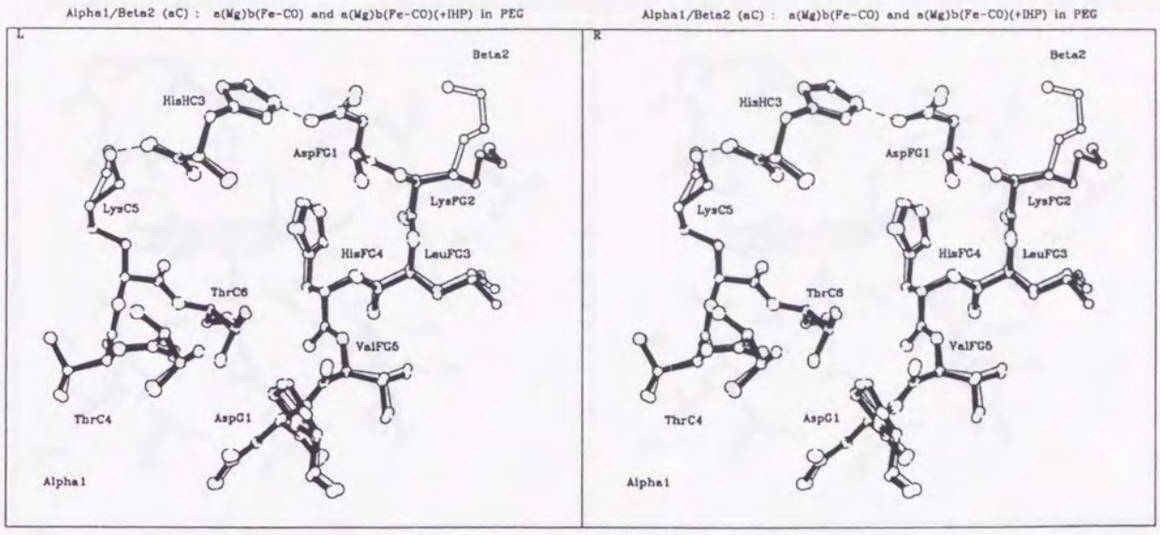

図 3-10a

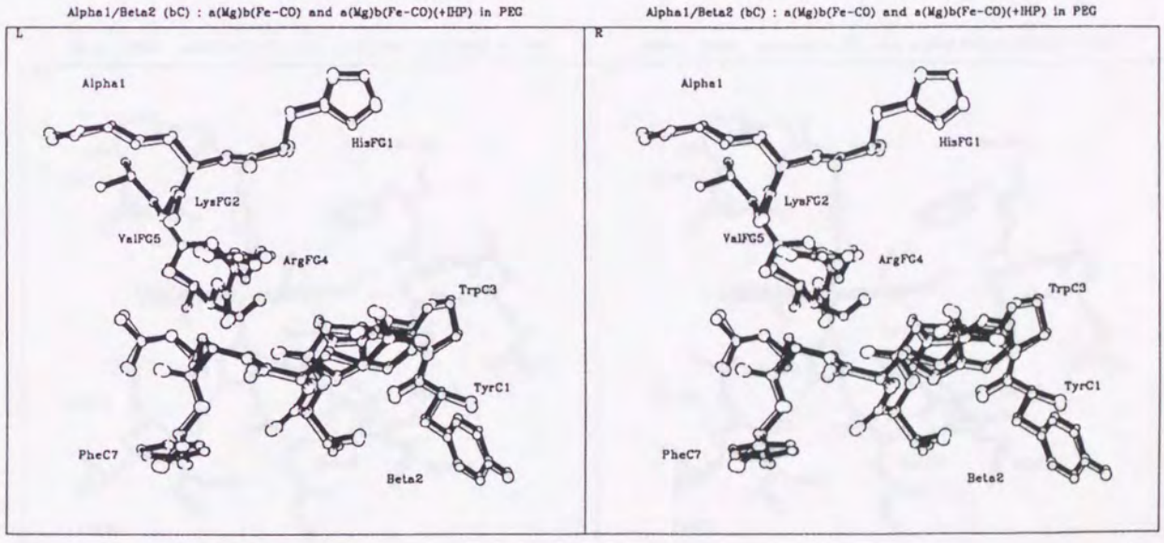

図 3-10b

図 3-10　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の -IHP（filled bonds），+IHP（open bonds）両構造を α1β2 界面の switch region（a, α1C-β2FG ）と flexible joint（b, α1FG-β2C ）の界面を α1 鎖（fitting error = 0.0064 Å）と β2 鎖（fitting error = 0.073 Å）の Cα 中心に重ねて FG コーナーの変化を立体的に示した。両構造の二量体間の界面での構造変化は見られなかった。

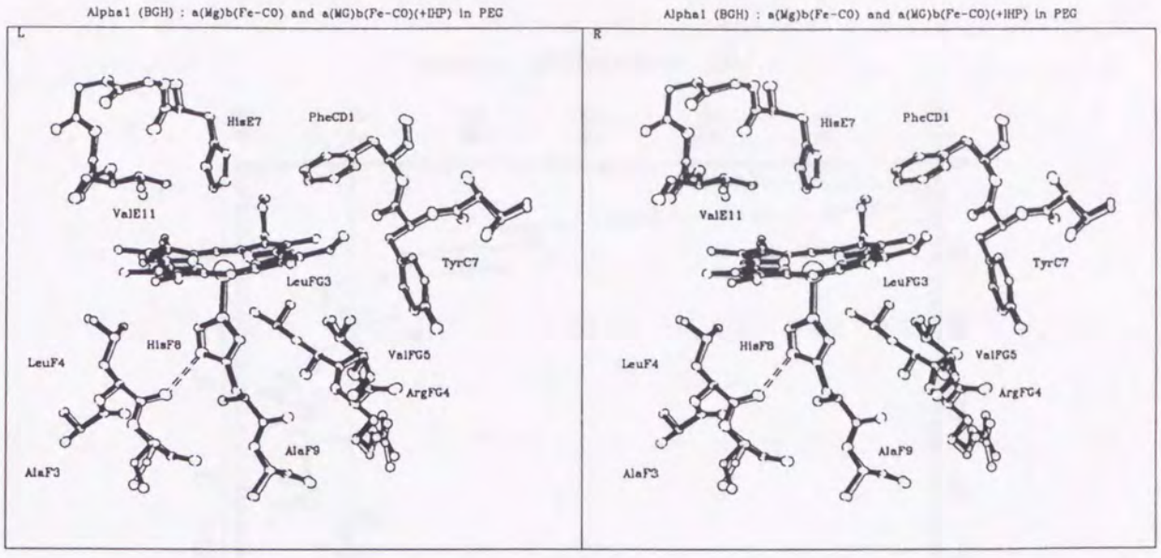

図 3-11a

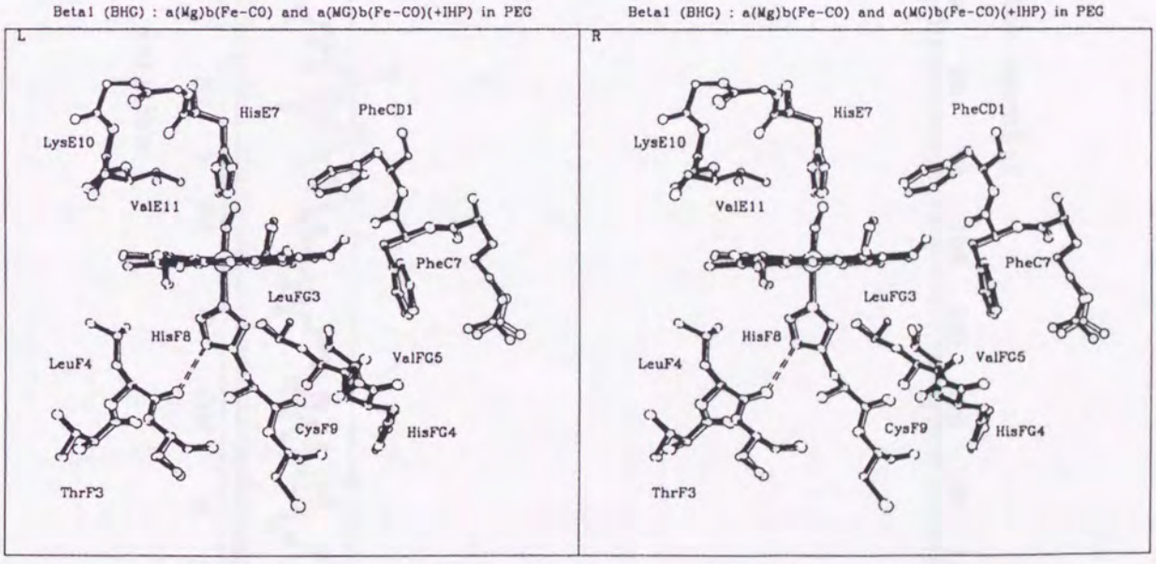

図 3-11b

図 3-11　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の -IHP（filled bonds），+IHP（open bonds）の両構造を α1β1-BGH frame で重ねて（fitting error = 0.098 Å）α1 鎖（a）と β1 鎖（b）のヘム周辺の構造変化を立体的に示した。両構造の α 鎖のヘム周辺の構造変化は認められなかった。

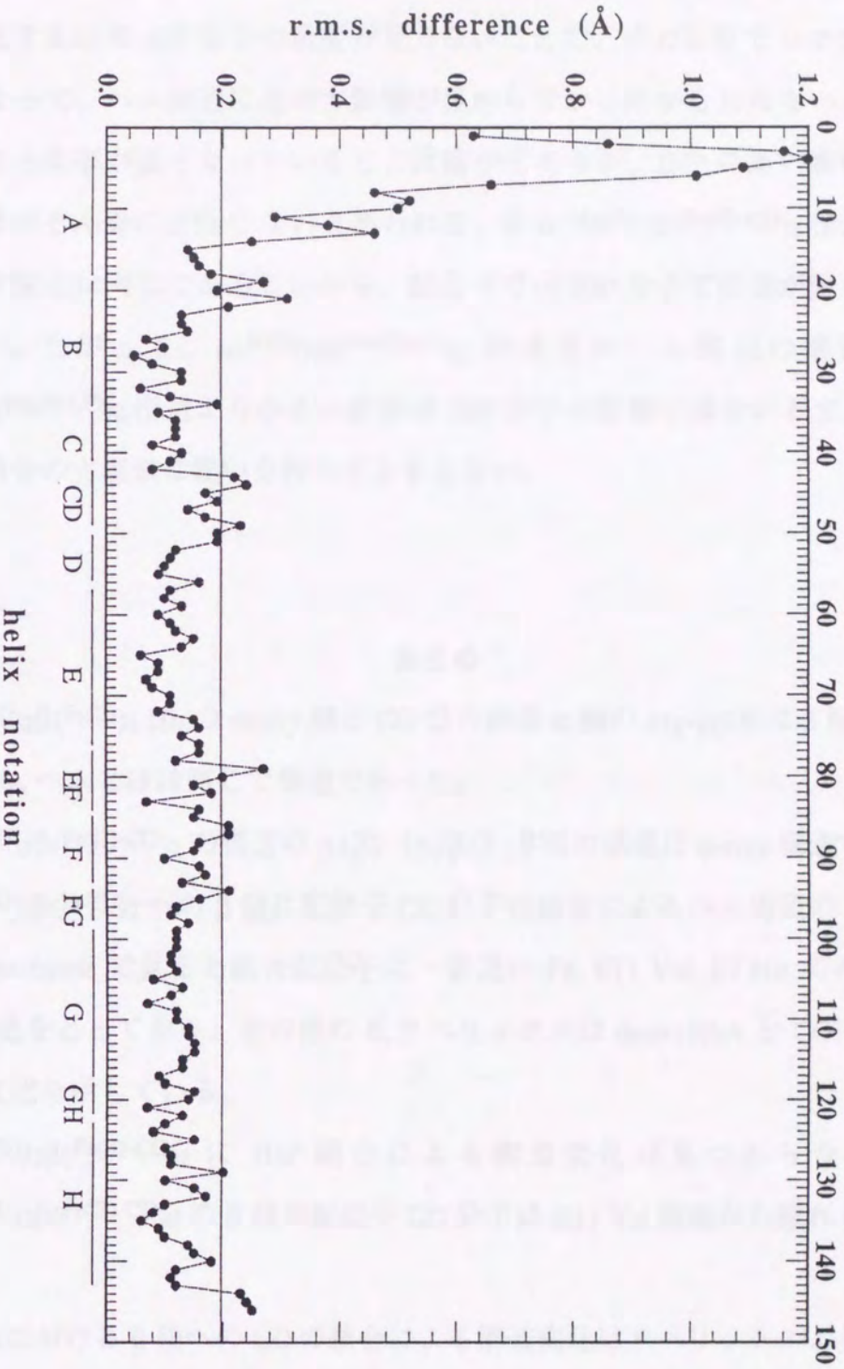

図 3-12　$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の -IHP, +IHP の両構造を α1β1-BGH frame で重ねて（fitting error = 0.098 Å）β1 鎖の主鎖の変化の差を示した。β1 鎖の変化はなく 2 つの構造は同じである。

今回の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造の IHP 分子の電子密度図ははっきりとは見えなかった。結晶化する時の IHP 分子の濃度が足りないことで、その影響で IHP 分子の占有率が弱くなって、ヘム周辺に及ぼす影響が見からなかったかも知れない。しかし、IHP 分子の占有率が低くなっているとこは確かであるが、IHP の高い親和性を考えると占有率がそんなには低くないと思われる。両 $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造のヘム周辺に及ぼす変化は同じであることから、結晶中では IHP 分子で構造が変化しないと考える。したがって、$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の構造のヘム周辺の構造変化が $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造より小さい原因は IHP 分子の影響ではないとすると、β 鎖の配位子結合の占有率に疑いを持たざるをえない。

まとめ

1) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ Hb の deoxy 型と CO 型の結晶 α 鎖の Mg-ppIX は 5 配位で あり deoxyHbA ヘムとほぼ同じで構造であった。

2) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の構造の α1β2（α2β1）界面の構造は deoxy 構造であった。

3) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ への β 鎖に配位子 CO 分子の結合によるヘム周辺の 3 次構造変化は、Heme-frame で見ると結合配位子に一番近い Fe, E11 Val, E7 His のみ R 状態の COHbA 構造をとっており、その他の E, F ヘリックスは deoxyHbA と COHbA の中間くらいの変化を示している。

4) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ に IHP 結合による構造変化は見つからなかった。

5) $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ の β 鎖の配位子 CO 分子は E11 Val 残基から離れる方向に傾いている。

6) T 構造における β 鎖への CO の結合による構造変化は F ヘリックスより E ヘリックスの変化が大きく、酸素親和性の制御する重要なヘリックスは E ヘリックスであると考えられる。

第 4 章

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ のX線結晶解析

1. 序　論

遺伝子操作技術の進歩により、様々な遺伝子を発現させることが可能となり、DNA分子を自由に切りつなぐ技術、オリゴヌクレオチドの化学合成技術の進歩等により遺伝子の全部または一部を合成したり、天然の遺伝子のDNA配列を自由に変えることが容易に行えるようになった。Hb分子もDNA組換え技術を用いて分子の機能と構造に関する研究がなされている。

この4章では、T構造を安定化させるMg-ppIXをα鎖に置換を行って、Hb分子のβ鎖の酸素親和性の制御しているβ67(E11) Val アミノ酸残基を、配位子結合に立体障害を大きくするIleで置換を行い、T構造のβ鎖への配位子結合に立体障害が大きくなった時、ヘム周辺に及ぼす構造変化について報告する。この試料は、放射光をX線源を利用して時分割ラウエ法によるHbの動的構造解析の最初の試料としても使われている。それはこの結晶が、1) 強い白色X線にたえる、2) 蛋白質の構造変化が起こっても結晶性を保つ、3) 結晶中の蛋白質が数ミリ秒くらいの時間で構造変化を起こすことを満足する試料だからである。

2. 実 験 方 法

(1) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ の結晶化およびデータ収集

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ の試料は Miyazaki に調製してもらい、結晶化は沈殿剤として PEG 溶液を用いて行った。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ Hb の deoxy 型と CO 型の結晶化は第 3 章の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 混成 Hb とほぼ同じ条件で行い、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ Hb の deoxy 型結晶は PEG の濃度（pH 7.0） 20 %, CO 型では 18 % にそれぞれ良い単結晶ができる。

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe})_2$ の Hb 結晶のデータ収集は高エネルギー物理学研究所·放射光実験施設 BL-6A で行った。結晶のデータ収集条件は $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ 混成 Hb の deoxy 型と CO 型の結晶とそれぞれ同じ条件で行った（表 4-1, 2）。

Table 4-1

Data Collection of $\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile_{(Fe\text{-}CO)_2}}$ Hb

solution	crystal	camera radius(mm)	rotation axis	rotation range	E=2.5 Ge.V
PEG	$\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile_{(Fe)_2}}$	429.7	c	120	295-286
			a	40	
PEG	$\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile_{(Fe\text{-}CO)_2}}$	429.7	c	120	280-265
			a	40	

PEG, polyethylene glycol.

Table 4-2

Summary of X-ray Diffraction measurements

solution	crystal	space group	No. of reflections	independent reflections	R-merge[a] (%)
PEG	$\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile_{(Fe)_2}}$	$P2_12_12$	139758	46481	5.80
PEG	$\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile_{(Fe\text{-}CO)_2}}$	$P2_12_12$	147883	49029	4.91

[a]R-merge = $\Sigma \mid I_i - \langle I \rangle \mid / \Sigma \mid I_i \mid$, where I_i is the intensity of an observation and $\langle I \rangle$ is the mean value for that reflection and the summations are over all reflections. PEG, polyethylene glycol.

(2) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の構造の精密化

a) deoxy 型

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の精密化は、deoxyHbA（PEG）の座標を基にして精密化を行った。β 鎖の中心金属 Fe(II) を Mg(II) に置き換えてプログラム PROLSQ 47 回行い、分子モデルの修正は 2 回行って精密化を終了した。PROLSQ 21 回終了後、β67(E11) Val を含むヘムの周辺の電子密度図 2Fo-Fc（緑色）, Fo-Fc（赤色: positive 電子分布）を見ると（図 4-1） β67(E11) Val の Cγ2 から -CH_3 基がヘムポケットの方に延びていることが分かる。この電子密度分布を 3 次元のグラフィクディスプレーを見ながら β67(E11) Val を Ile に置き換え、アミノ酸のモデル作成を行った（この時の R 因子 19.3 %）。その後、分子モデルの構造を修正を行い、最終的には表 4-3 に表したように分解能 10.0～1.9Åの 33106 反射（F>3.0σ(F)）に対し、R 因子 19.2% の構造を得て、その結果を表 4-4 に示している（図 4-3）。図4-2 には最終的に決定した $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ 分子の、β1 鎖のヘム周辺の 2Fo-Fc の電子密度図である。この電子密度図を見ると、β67(E11) Ile の電子分布がはっきり見えている。

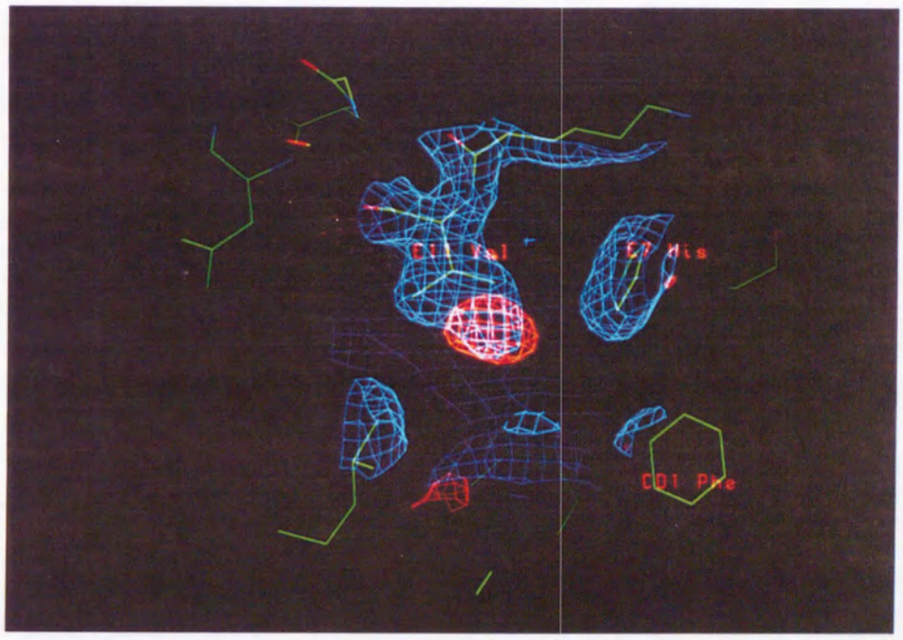

図 4-1　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(^{Fe})}{}_2$ の β67(E11) Val を Ile で置き換える前の電子密度図（緑色: 2Fo-Fc contoued label 1.5σ, 赤色: Fo-Fc contoured level 2.8 σ の positive 電子密度図）である。β67(E11) Val の Cγ2 から -CH_3 基がヘムポケットの方に延びている。

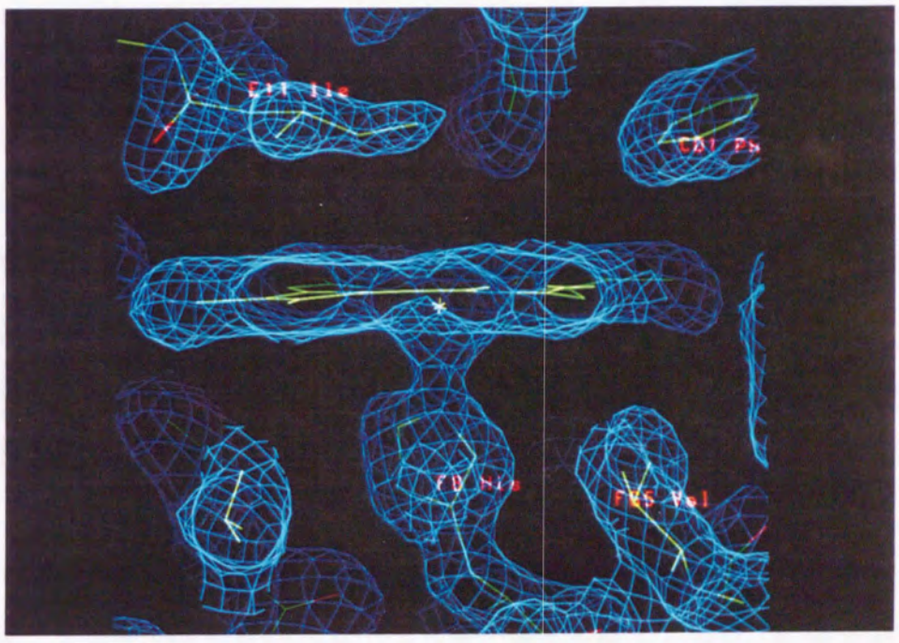

図 4-2　$\alpha_{(^{Mg})2}\beta^{E11Val\rightarrow Ile}{}_{(^{Fe})2}$ の β1 鎖のヘム周辺の電子密度図（2Fo-Fc）である。電子密度図の contoured levell 1.5 σ であり、β67(E11) Ile の電子密度がはっきり見えている。

b) CO 型

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ の精密化は -IHP の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の座標を用いて SA プログラムで精密化を行った。SA 精密化は $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 結晶と同じ条件で行っており、最終的にはプログラム PROLSQ を用いて43 回回して精密化を行った。PROLSQ 36 回終了後は 3 次元のグラフィクディスプレーで 2Fo-Fc, Fo-Fc の電子密度図をかき、β67(E11) Val を Ile で置き換えるとともに、CO 分子のモデル製作を行った。図 4-4 にはヘム面の上から見て β67(E11) Val 周辺の電子密度図である。 Fo-Fc（赤色） の positive 電子密度図が、β67(E11) Val の $C\gamma 2$ から -CH_3 基がヘムポケットの方に延びていることと、CO 分子の電子密度分布がきれいに見えている。配位子 CO 分子を入れる作業は、第 3 章の $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の CO 分子と同じ方法で位置を決定を行った。構造の精密化終了後、CO 分子の 2Fo-Fc（contoured level 3σ）の電子密度図を見ながら再修正を行い配位子 CO 分子の位置を決定した。結晶の最終的な精密化結果、分解能 10.0～1.9Åの 36352 反射（F＞3.0σ(F)）に対し、R 因子 19.1% の構造を得て、その結果を表 4.3 に示している（図 4-3）。図 4-5 は $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ の、精密化終了後の β1 鎖のヘム周辺の 2Fo-Fc 電子密度図である。β67(E11) Ile の電子密度図は β1 鎖と β2 鎖ともきれいに見えるが、配位子 CO 分子の場合、β1 鎖は図 4.4 の通り Fe-C 原子間の電子密度はきれく見える。しかし β2 鎖は、配位子 CO 分子の O 原子のみ電子密度が見えており、C 原子の電子分布は弱くなっている。そして、配位子 CO 分子の再修正前の温度因子を見ると、β1 鎖の C = 23 $Å^2$, O = 24 $Å^2$ で、β2 鎖は C = 42 $Å^2$, O=43 $Å^2$ であった。 この温度因子を $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の配位子の温度因子と比較して大きくなっている。しかし、β1 鎖と β2 鎖の配位子結合によるヘム周辺の残基の構造変化はほぼ同じことを確認しており、両 β 鎖に配位子 CO 分子の占有率はそれほど差はないと考えられる（図 4-9 ）。

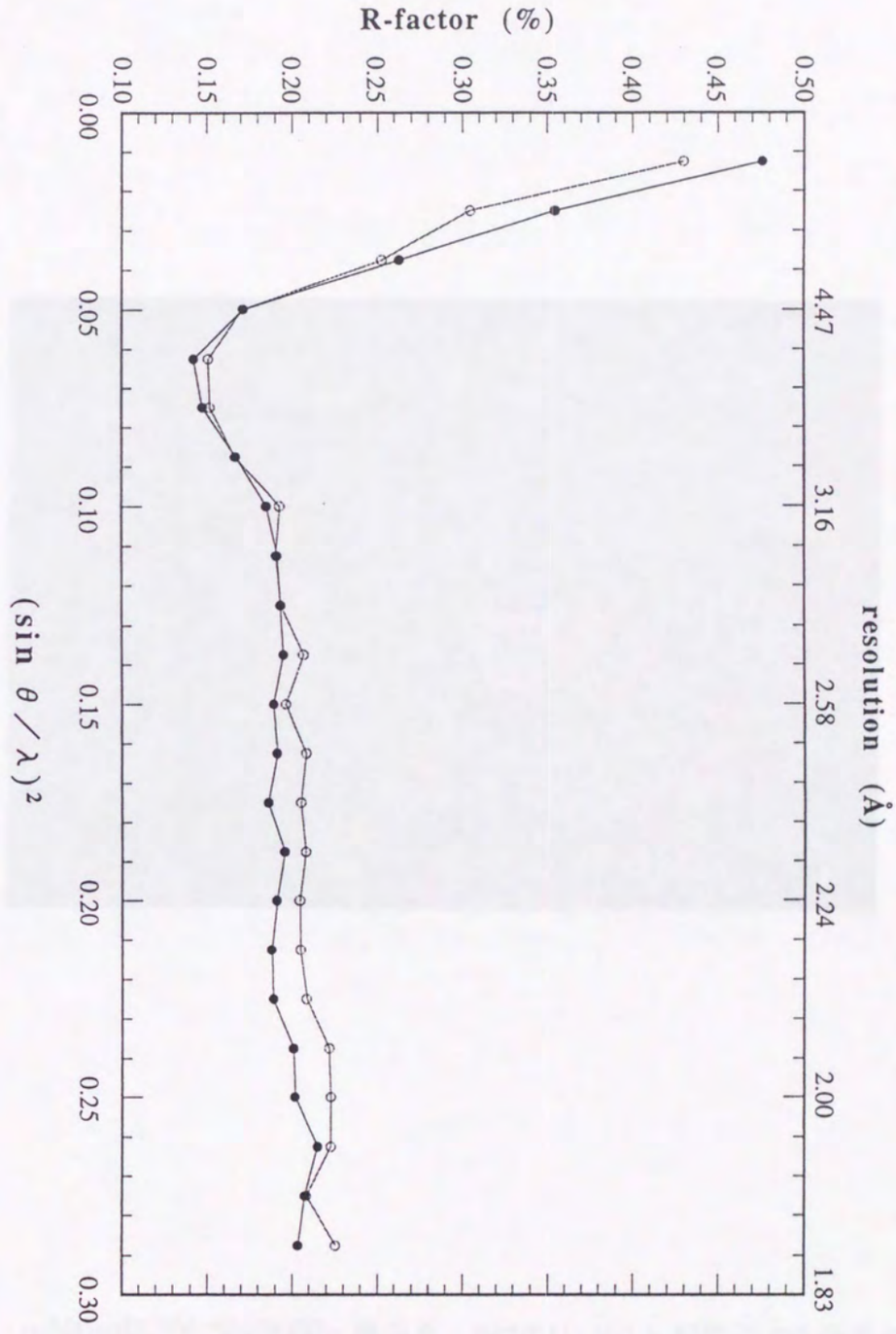

図 4-3　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(^{Fe})}{}_2$ 混成 Hb の deoxy 型（ ——○—— ）と CO 型（ ——●—— ）の構造の各分解能と R-factor の関係。

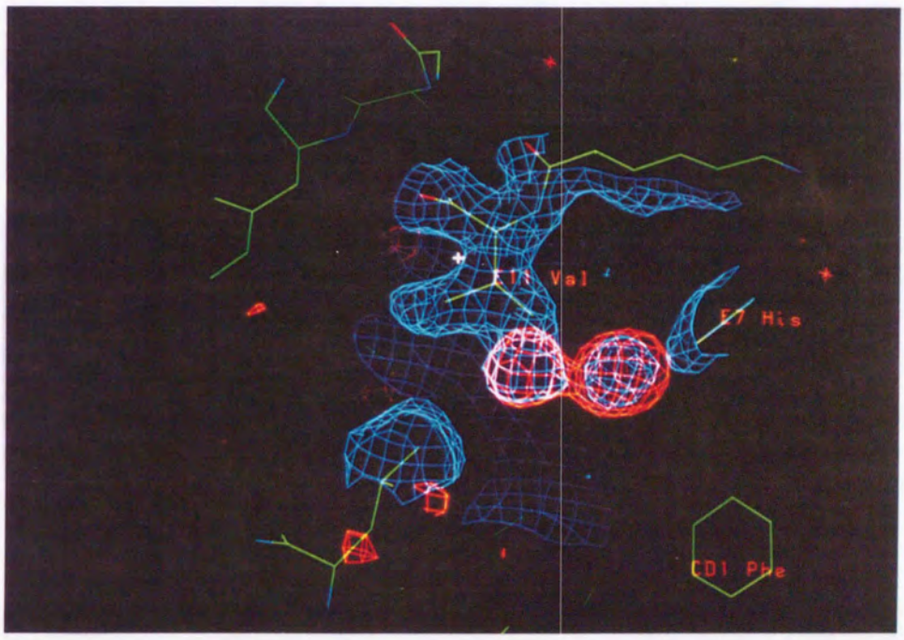

図 4-4　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ 構造を、β67(E11) Val と配位子 CO 分子モデルを製作する前の電子密度図（緑色: 2Fo-Fc contoued level 1.3σ, 赤色: Fo-Fc contoured level 2.8 σ の positive 電子密度図）を β1 鎖のヘム面の上から見ている。β67(E11) Val の Cγ2 から -CH_3 基がヘムポケットの方に延びており、その横に配位子 CO 分子の positive の電子密度図が見える。

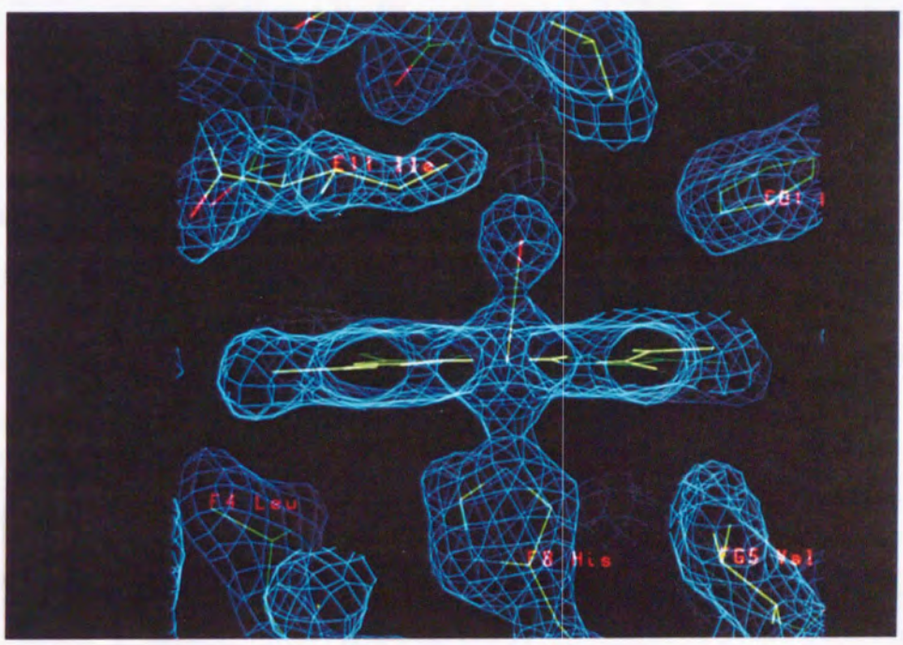

図 4-5　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(Fe\text{-}CO)_2$ の構造の精密化終了後の β1 鎖のヘム周辺の電子密度図（2Fo-Fc）である。電子密度図の contoured level 1.3 σ であり、β67(E11) Ile と配位子 CO 分子の電子密度図ははっきり見えている（β2 鎖のヘム周辺の電子密度分布も β1 鎖とほぼ同じである）。

Table 4-3

Summary of Least-Squares Refinement Parameters and Statistics of Data Processing

Parameter	Target(σ)[a]	r.m.s. Δ[b] Mg(E11-Ile)	r.m.s. Δ[b] MgCO(E11-Ile)
Bonding distances (Å)			
bond lengths (1-2 neighbors)[c]	0.020	0.020	0.019
bond angles (1-3 neighbors)[d]	0.030	0.034	0.035
planes (1-4 neighbors)[e]	0.050	0.047	0.045
Planar groups			
deviations from plane (Å)	0.020	0.014	0.014
Chiral centers			
chiral volume (Å^3)	0.150	0.186	0.181
Nonbonded contacts (Å)			
single-torsion contacts	0.500	0.183	0.172
multiple-torsion contacts	0.500	0.298	0.317
possible H-bonding contacts	0.500	0.200	0.208
Conformational torsion angles (deg)			
peptide plane (0,180°)	3.0	2.2	2.3
staggered (±60,120°)	15.0	19.1	20.3
orthonormal (±90°)	20.0	31.6	32.7
Isotorpic temperature factors (Å^2)			
main chain (1-2 neighbors)[c]	1.000	0.904	0.874
main chain (1-3 neighbors)[d]	1.500	1.400	1.367
side chain (1-2 neighbors)[c]	1.000	1.034	1.051
side chain (1-3 neighbors)[d]	1.500	1.670	1.689
Final R-factor[f] (%)		19.2	19.1
No. of water molecules in model		203	274
Resolution range (Å) **F > 3σ (F)**		10 -1.9	10-1.9

[a]Target σ, estimated standard deviations, where $1/\sigma^2$ is used as a relative weighing factor in the minimized sum of observational functions. [b]r.m.s. Δ, root-mean-square deviation from ideal values as determined from accurate small molecule crystal structures in the case of bonding distances, chiral volumes, and nonbonded contacts, or from average values in the case of isotropic termperature factors. [c]1-2 neighbors, covalently atom pairs. [d]1-3 neighbors, atom-pairs separated by two covalent bonds. [e]1-4 planar neighbors, atom pairs in a planar group separated by three covalent bonds. [f]R-factor = $\Sigma \| F_o|-|F_c\| / \Sigma |F_o|$, whrer F_o is the observed structure factor and F_c is that calculated from the model. Mg(E11-Ile), $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\text{-}Ile(Fe)}{}_2$; MgCO(E11-Ile), $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\text{-}Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$.

3. 結果および考察

(1) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ と deoxyHbA（PEG）の構造比較

α1β1 界面の BGH-frame で $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ と deoxyHbA を重ねた（fitting error 0.126 Å）時の α1β1 と α2β2 二量体の主鎖（main-chain）の相対的な変化は 0.20 Å と 0.30 Å であった。又、α2β2 界面の BGH-frame（fitting error 0.123 Å）で重ねると α2β2 と α1β1 の変化は 0.20 Å と 0.26 Å であった。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の構造を 3 次元のグラフィクディスプレーで全体の構造を調べた結果、deoxyHbA と重要な差は見られなかった。α(Mg) 鎖のヘムの構造は deoxyHbA 結晶の α 鎖と同じであり、Mg(II) は 5 配位であった（表 4-4）。

図 4-6 には $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ と deoxyHbA をβ1 鎖の Heme-frame で重ねて（fitting error 0.094 Å） β67(E11) の動きを比較して見た。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の構造の β67(E11) Ile の $C_{\delta 1}$ と、β63(E7) His のイミダーゾルの $N_{\varepsilon 2}$ 原子との距離は β1=3.57 Å, β2=3.53 Å であり、原子の間にファンデルワールス反発力が働き、β67(E11) Ile の side-chain がヘムポッケトの外側に（ヘムの pyrrole の N_A と N_B 原子を平行にする方向）やや移動している。この β67(E11) Ile の side-chain の変化は β2 鎖にも β1 鎖と同じように生じている。

Table 4-4
Ligand and Heme Geometry

	Mg(E11-Ile)[a]		MgCO(E11-Ile)[b]		T-met Hb[c]	
	α	β	α	β	α	β
Interatomic distances (Å)						
M - N_{porph}(mean)	2.03	2.02	2.04	2.00	2.01	2.02
M - N_{ε}(F8)	2.44	2.30	2.46	2.29	2.26	2.21
Fe - C or O(ligand)	-	-	-	1.84	2.28	2.11
C - O(ligand)	-	-	-	1.23	-	-
N_{ε}(E7) - O(ligand)	-	-	-	3.30	-	-
N_{ε}(E7) - C(ligand)	-	-	-	3.61	-	-
Distances to planes (Å)						
M - P_{heme}	0.68	0.54	0.69	0.17	0.33	0.32
M - P_N	0.43	0.36	0.42	-0.01	0.08	0.09
N_{ε}(F8) - P_{heme}	3.12	2.82	3.13	2.43	2.53	2.47
P_C - P_N	0.16	0.10	0.16	0.11	0.16	0.13
Angles (degs)						
N_{ε}(F8)-Fe-C(ligand)	-	-	-	169	-	-
Fe-C-O(ligand)	-	-	-	158	-	-

a-c refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile}{}_{(Fe)_2}$ (this work); b: $\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile}{}_{(Fe\text{-}CO)_2}$ (this work); c: T-met Hb (Liddington *et al.*, 1992) were taken from the Brookhaven data base.
M, central metal ; P_N, mean plane of the 4 porphyrin nitrogens ; P_C, mean plane of the 20 porphyrin carbons ; P_{heme}, mean plane of porphyrin nitrogens and carbons plus first side-chain atoms (32 atoms). M - N_{porph}, the distance of the metal from the mean 4 prophyrin nitrogens.

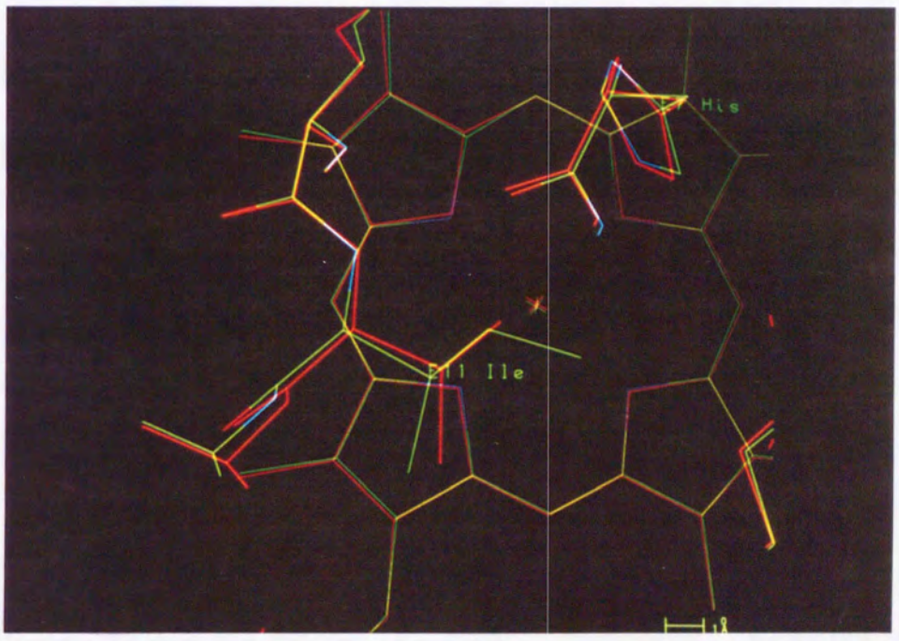

図 4-6　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ 構造（緑色）と deoxyHbA（PEG）の構造（赤色）を β1 鎖の Heme-frame で重ねて（fitting error 0.094 Å）β1 E11 の残基を見ている。E7 His のイミダゾールが右上に見えており、ヘム面の上から見ている。

(2) $\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ に配位子 CO 結合による構造変化

a) β 鎖ヘムの変化

$\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ の β1 鎖ヘム周辺の電子密度図（2Fo-Fc）を図 4-5 に示した。β1 鎖と β2 鎖の配位子 CO 分子の電子密度分布が少し差があることは結晶の精密化で述べたが、詳しいことは β 鎖の 3 次構造変化で述べる。ヘムの構造は表 4-4 に示しており、CO 分子が結合すると、Fe 原子は pyrrole の 4 つの窒素原子の平面の中に入っており、その位置は COHbA と近い。β 鎖(F8) His のイミダゾールの $N\varepsilon_2$ 原子とヘム面の距離は、deoxyHbA と COHbA と中間くらいである。$\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ のヘムの doming parameter の $P_C\text{-}P_N$ を見ると、deoxyHbA とほぼ同じである。ヘムの傾きは deoxyHbA（α1β1 の BGH-frame）と 3.31° 傾いており、Fe 間の距離は 0.55 Å であった。このヘムの変化は $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ 構造と非常に似ており、β67(E11) Ile のアミノ酸置換により配位子結合に伴うヘムの傾きに与える影響はほぼ同じである。

b) 4 次構造変化

$\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ の 4 次構造変化に伴う二量体の相対的な変化を調べると、deoxyHbA と α1β1 の BGH-frame （fitting error 0.243 Å）で α1β1 と α2β2 二量体の主鎖の変化は 0.45 Å, 0.82 Åであった。又、α2β2 の BGH-frame （fitting error 0.260 Å）で各二量体の変化は 0.48 Å, 0.77 Åとなり、二量体間の相対的位置に少し変化が見られる。図 4-7 には α2β1 界面の相対的な構造変化を立体的に示した（α1β1 界面の BGH-frame ）。二量体間の switch region（α2C-β1FG）と flexible joint（α2FG-β1C）の界面のずれが少し見られている。しかし、図 4-8 に示したように α2 の C ヘリックスの Cα を中心で重ねて二量体の switch region（α2C-β1FG）の界面を見ると塩橋は切れておらず deoxy 構造をとっている。つまり他の場合と同じように、二量体の相対的な変化が見られるのは BGH-frame で重ねたことで生じたもので、図 4-8 で示したように、界面の周辺の残基の変化していなかった。

このことから、$\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ の構造は、β 鎖への配位子結合により 4 次構造は変化しておらず、deoxy 構造をとっている。

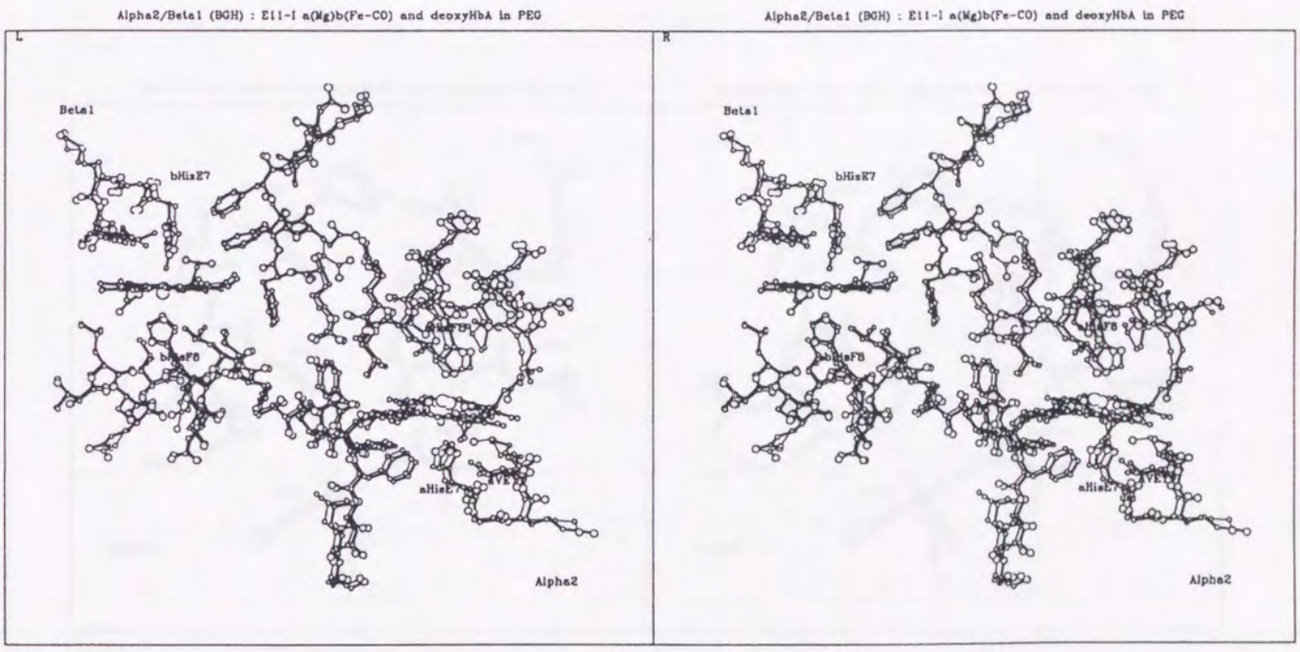

図 4-7　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$（thick bonds）と deoxyHbA（PEG）の構造（thin bonds）を α1β1 の BGH-frame（fitting error 0.243 Å）で重ねた時のα2β1 界面の相対的な変化。アミノ酸残基は α2 鎖 β1 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を示した。各鎖の二量体の switch region（α2C-β1FG）と flexible joint（α2FG-β1C）の界面の相対的なずれが少し見られている。

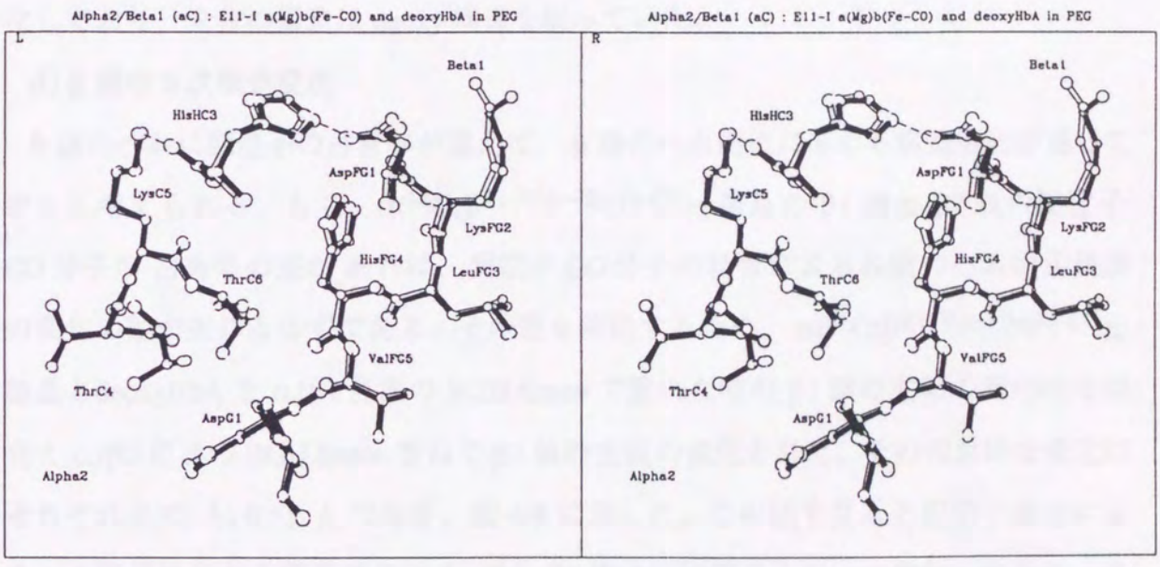

図 4-8　$\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ 構造（filled bonds）と deoxyHbA（PEG）の構造（open bonds）を α2β1 界面の switch region（α2C-β1FG）を α2 鎖（fitting error = 0.099 Å）の Cα 中心に重ねて FG コーナーの変化を立体的に示した。両構造の二量体の界面での構造変化は見られなかった。

c) α 鎖の 3 次構造変化

$\alpha^{(Mg)_2}\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)_2}$ 構造の β 鎖への配位子結合による構造変化は、α 鎖には伝わってない。α1β1 界面の BGH-frame とHeme-frame で、$\alpha^{(Mg)_2}\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)_2}$ の構造と deoxyHbA を重ねて、グラフィクディスプレーで α 鎖の構造を見るとほぼ deoxyHbA の構造と同じであり、Mg(II) で置換を行った α 鎖のヘムの構造は deoxyHbA と同じであった（表 4-4）。つまり、$\alpha^{(Mg)_2}\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)_2}$ の構造は、β 鎖に配位子 CO が結合されても、その構造変化は α 鎖まで届かず、β 鎖の中で変化しており、全体の構造は deoxy 構造を取っていた。

d) β 鎖の 3 次構造変化

β 鎖のヘムに配位子の占有率が違えば、β 鎖のヘム周辺に伝わる構造変化が違って来ると考えられる。もし、$\alpha^{(Mg)_2}\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)_2}$ 結晶の β1 鎖と β2 鎖の配位子 CO 分子の 占有率の差が あれば、配位子 CO 分子の結合による各鎖のヘム周辺残基の変化の差が生じるはずである。その差を確認するため、$\alpha^{(Mg)_2}\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)_2}$ 結晶とdeoxyHbA を α1β1 界面の BGH-frame で重ねた時の β1 鎖の主鎖の相対的な変化と α2β2 界面の BGH-frame 重ねて β2 鎖の主鎖の変化を見た。その相対的な変化はそれぞれ 0.52 Å, 0.55 Å であり、図 4-9 に示した。この図を見ると配位子結合によるヘム周辺に伝わる構造変化は β1 鎖と β2 鎖はほぼ同じくらいに変化しており、各 β 鎖に結合している配位子 CO 分子の占有率はあまり大きく違わないと言える。

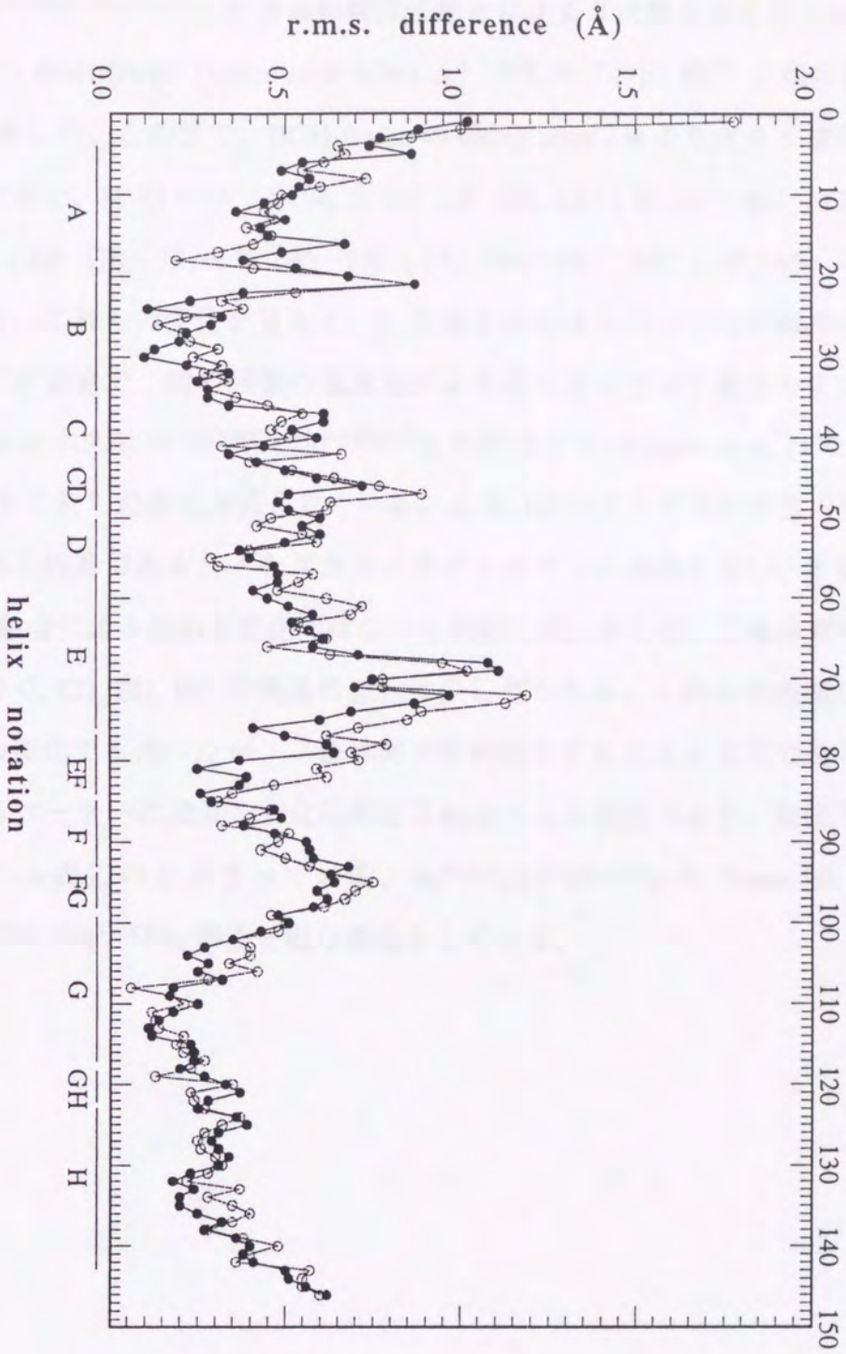

図 4-9　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ 構造と deoxyHbA 構造を α1β1 界面の BGH-frame で重ねた時の（fitting error = 0.243 Å, ——●—— ）β1 鎖の主鎖の相対的な変化と α2β2 界面の BGH-frame 重ねて（fitting error = 0.260 Å, ——○—— ）β2 鎖の主鎖の変化である。

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ の β 鎖の配位子結合による 3 次構造変化を、deoxyHbA と α1β1 界面の BGH-frame（fitting error 0.243 Å）で重ねて、β1 鎖の主鎖の変化として図 4-10 に表した。この図で、BGH-frame の fitting error 2 σ より大きく変化している残基を調べると、N（1～3），A（4, 5, 16），B（20, 21），C（37～40），CD（46），E（62～75），EF（78～79），F（90～93），FG（94～98），HC（145,146）の残基が変化している。これらの変化を見ると、N-末端をから A ヘリックスの前半の一部の残基は非常に不安定で、他の残基の温度因子より高くなっており動きやすい残基である。Luisi *et al.* (1990) の $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の結晶と Liddington *et al.* (1992) の T-met Hb 結晶でもこれらの変化が見られている。A, B, EF ヘリックスの残基の変化は、分子表面にある残基であることをグラフィクディスプレー確認を行い、β 鎖の配位子 CO 分子の結合による伝わる変化ではないと判断した。そして、二量体間の接触している界面の C, CD, FG, HC の残基の変化は少し見られる。これらの残基の変化は、4 次構造の変化でも述べたが、二量体間の相対的なずれによる変化である。その外の E, F, FG コーナーの残基の変化は配位子結合による変化であり、配位子結合により変化はヘム周辺のとどまっている。$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ や T-met Hb の変化も $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ 構造と似た変化をしている。

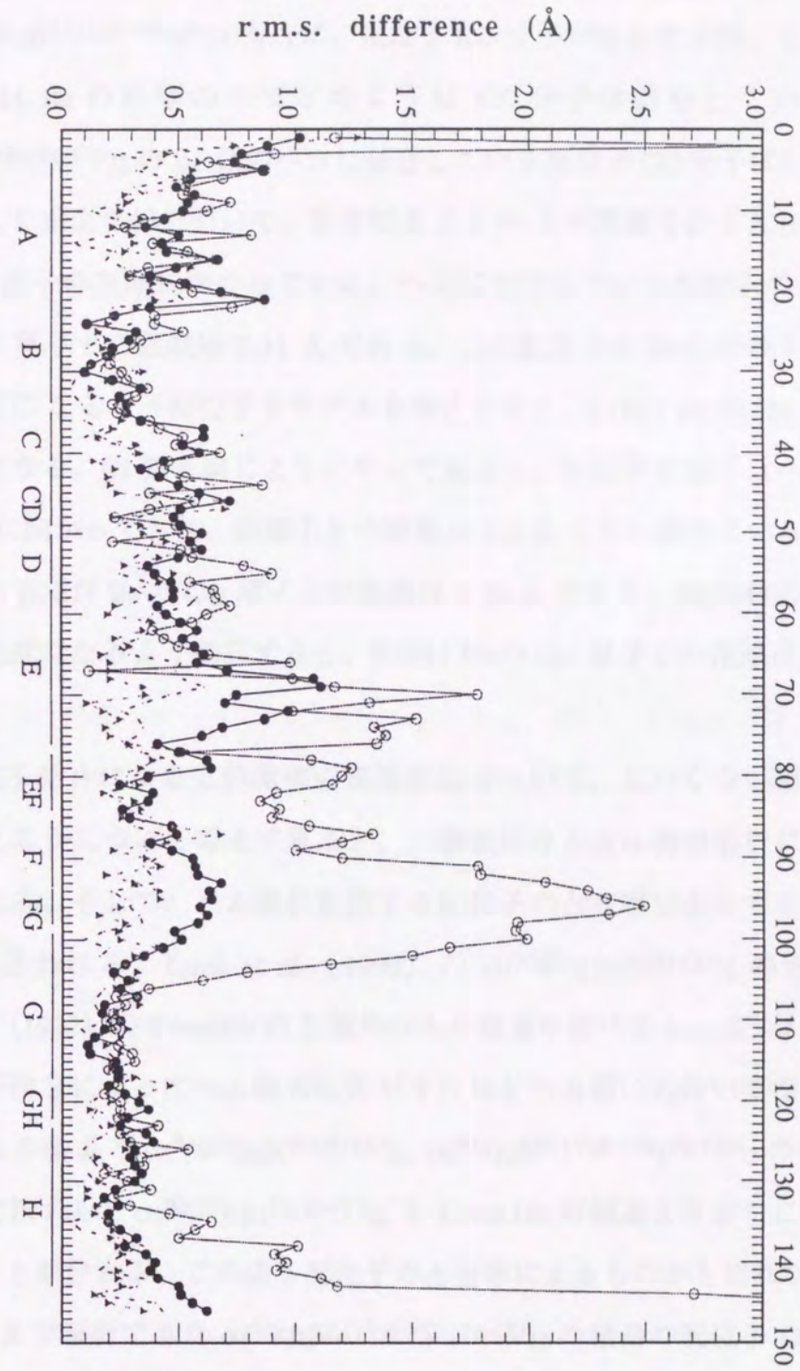

図 4-10 deoxyHbA（PEG）を中心として $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}_2$（ ——●—— ），$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$（ ----▲---- ），T-metHb（ ·-·-·-·-· ），COHbA（ ——○—— ）の構造をそれぞれ α1β1-BGH frame で重ねて β1 鎖の主鎖の変化を示した。

e) β 鎖の立体障害（E11）による配位子の位置

deoxy 型 $\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ 構造に、配位子 CO 分子が結合する時、立体障害であるβ鎖の E11 Ile の影響の中でどのように CO 分子は結合しているか。$\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ のβ1 鎖のヘムに結合している配位子 CO 分子は、C 原子からヘム面に対して垂直な線を引いて、面を切る点と Fe との距離を計ると 0.7 Å であり、ヘムの Nd 原子の方向に向かっている。ヘムに結合している配位子の O 原子とβ1E11 Ile の $C\delta_1$ 原子との距離は 3.31 Å である。この配位子を Fe-C-O の 3 つの原子をヘム面に垂直になるよう配位子をモデルを修正すると、β1E11 Ile の $C\delta_1$ 原子との距離は 3.0 Å になる。β2 鎖も同じようにやって見ると、配位子 C 原子はヘム原子の Nc 原子の方向に向かっており、鉄原子との距離は 0.2 Å くらい離れている。この配位子の O 原子とβ2E11 Ile の $C\delta_1$ 原子との距離は 3.20 Å であり、Fe-C-O の 3 つの原子をヘム面に垂直になるよう修正すると、β2E11 Ile の $C\delta_1$ 原子との距離は 2.8 Å になる。

これらの配位子結合による立体障害の構造変化について、どのくらい細かいな構造変化まで言えるかについて考えて見ると、一番気になる点は構造解析に分解能であると考えられる。そして、ヘム鉄に配位する配位子の占有率によっても大きく変わって行くと思われる。Luisi *et al.*（1990）の $\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ の構造と、Liddington *et al.*（1992）の T-metHb のβ鎖のヘムの構造を調べると、表 3-4 に示したように、配位子結合によってヘム鉄の位置がそれほどヘム面に近付いてないことが分かる。これらの結晶と $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$, $\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ の構造の鉄原子の動きを比較すると $\alpha^{(Ni(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ と T-met Hb の構造よりさらにヘム面に近付いていることが分かる。この差も配位子の占有率によるものかも知れない。

分解能 1.9 Åまで解析できた $\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ の結晶の配位子 CO 分子の電子密度図（2Fo-Fc, Fo-Fc）を見ながら位置を決定するのは非常に難しいことであった。そして、この条件で配位子結合に立体障害であるβ鎖の E11 Ile の影響と配位子の関係を述べるとしたら、Fe(II) 原子と配位子はヘム面に対し垂直には配位できない。そして、立体障害が大きければ大きいほど配位子は E11 Ile 方から見て遠い方向に行くことになると言える。これ以上、これについて細かく言おうとしたら、分解

能をもっと高くして配位子の位置を正確に決めなければならない。

(3) $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の比較

a) β 鎖ヘムの変化

両結晶の β 鎖に配位子結合した時のヘムの構造を表 4-4 に示した。Fe 原子の動きやヘムの doming と傾きなどは、ヘムの構造はほぼ同じであり、β 鎖の配位子結合の立体障害である β67(E11) Val を Ile でアミノ酸の置換行ってもヘムの変化は全く見られなかった。両結晶のヘムの構造は β 鎖の Fe 原子のみ R 状態に近い変化をしており、他は T 構造である。

b) 4 次構造変化

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の 4 次構造変化の変化である二量体間の相対的な変化は α1β1 の BGH-frame BGH-frame （fitting error 0.106 Å）で重ねると α1β1 と α2β2 二量体間の主鎖の相対的な変化はそれぞれ 0.17 Å, 0.25 Åであった。又、α2β2 の BGH-frame （fitting error 0.105 Å）で各二量体間の変化は 0.18 Å, 0.24 Åとなり、両者の二量体間の変化は fitting error を考えると両構造の 4 次構造変化はほぼ同じであった。図 4-11 にはその二量体間、α1β2 界面の相対的な変化を立体的に示した（α1β1 界面の BGH-frame ）。図 4-12a, 12b には α1β2 界面の switch region（α1C-β2FG）と flexible joint（α1FG-β2C）の界面の変化をそれぞれ表しているが、2 つの変化は同じであり、界面への塩橋は切れておらず deoxy 構造を安定化しており、4 次構造の変化は同じであった。

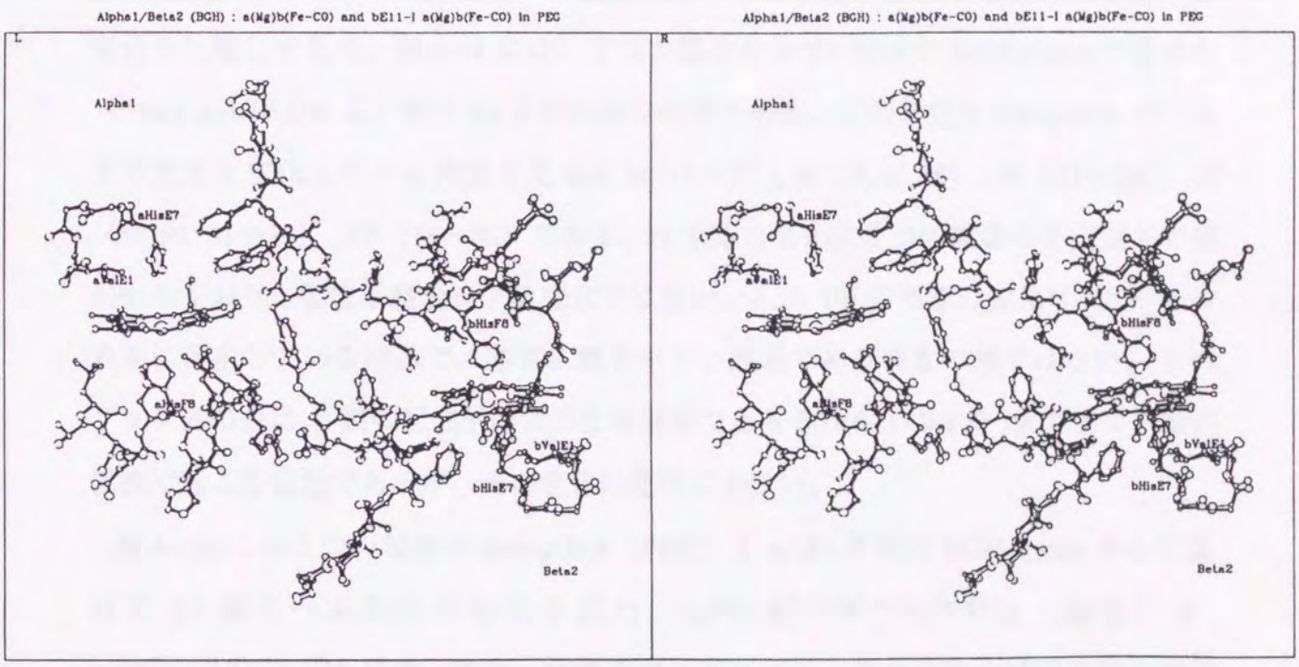

図 4-11　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ （thick bonds）と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ （thin bonds）を α1β1 の BGH-frame （fitting error 0.106 Å）で重ねた時の α1β2 界面の相対的な変化である。アミノ酸残基は α1 鎖 β2 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を示した。switch region（α1C-β2FG）と flexible joint（α1FG-β2C）の界面では両側のサブユニットがだいたい同じだけ動いている。

c) α 鎖の 3 次構造変化

2 つの結晶を α1β1 界面の BGH-frame で重ねて α1 鎖のヘム周辺の構造を図 4-13 に示した。両構造は全く同じ構造を持っており、ヘムの構造も deoxyHbA とほぼ同じであった（表 4-4）。

d) β 鎖の 3 次構造変化

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の β 鎖に配位子結合により起こる変化を比較して見た。図 4-14 には、2 つの構造を α1β1 界面の BGH-frame で重ねた（fitting error 0.106 Å）時の β1 主鎖の変化の差である。この変化を fitting error の 2σ より大きく変化している残基を見ると N（1～3），A（5, 6, 16），B（21～24），E（58,59, 61～71），EF（78～80）である。N 末端の変化は 2 つの構造の不安定さで差が生じており、配位子結合による変化ではない。A, B, EF の残基の変化は Hb 分子の表面に存在している残基で、非常に動きやすい残基であり有意の差ではない。E ヘリックスの差は β 鎖の配位子結合の立体障害である β67(E11) Val を Ile でアミノ酸の置換で起こる変化であるが、その変化は意外に小さい。

図 4-15a には 2 つの構造を deoxyHbA（PEG）と α1β1 界面の BGH-frame 中心で重ねて β1 鎖のヘム周辺の変化を見た。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$（緑色）と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造（黄色）の構造変化は F ヘリックスの変化はほぼ同じ変化を見せているが、E ヘリックスの変化が少し異なっているように見える。図 4-15b はヘム面の上から見た図で、β1 鎖の E11（Ile, Val），E7 His, CD1 Phe の変化を示した。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造（黄色）の E11 Val の $C\gamma_2$ 原子と、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ 構造の E11 Ile の $C\gamma_1$ 原子は、同等の原子の位置になっているが、両構造での動きを見ると、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ の方の動きがやや大きく変化している。これは E11 Ile が Val より $-CH_3$ 基を長くなっており、Ile の $C\delta_1$ 原子は配位子 CO 分子と一番近い原子であり、配位子結合に立体障害を Val より大きくさせていると考えられる。

表 4-5 には、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ を β 鎖のヘム中心から周辺の残基（E11 Ile, E7 His, CD1 Phe）の原子までの距離と、deoxyHbA（PEG）と β 鎖の Heme-frame で重ねて E, F ヘリックスの主鎖変化を示した。表 3-5 に示してある

$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ 構造と比較して見ると、E11 Ile(Val) のヘム中心からの距離は Cα の変化は等しく見えるが、側鎖は Ile の方が少し Val よりヘム中心から遠く変化している。E7 His の距離は、主鎖の変化は Val の場合の方が Ile の場合より遠く離れているが side chain 変化はほぼ同じ変化をしめしている。そして、E, F ヘリックスの全体の変化は Heme-frame で見るとほぼ等しい変化をし示しており、β67(E11) Ile で立体障害を大きくしても E ヘリックスでの影響はほぼ同じであると考えられる。Nagai *et al.*（1987）によると HbA βE11-Val を Ile で置換すると酸素親和性が非常に低くなり、酸素分子がヘムに配位し難くなりと報告しているが、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe-CO})_2$ の構造では図 4-5 に示したように CO ははっきり配位しており、酸素親和性は pH 7.4, 100 mM Cl^-, 25 °C の条件で P_{50} は 177 mmHg を示しており、同じ条件で $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ は 68 mmHg でありせいぜい約 2.5 倍しか違いはない（Miyazaki）。

Table 4-5

A comparison of the distance between neighboring atoms of the CO molecule and heme centers plus r.m.s. differences of E and F helices referred to deoxy HbA under the superposition of the hemes in the β subunit of intermediate and end-state hemoglobins

atoms		MgCO[a] (Å)	MgCO(E11-Ile)[b] (Å)	Mg(E11-Ile)[c] (Å)	deoxy HbA[d] (Å)
E11 Val -	C_α	6.50	6.46	5.83	5.65
or Ile	C_β	5.88	6.08	5.27	5.05
	$C_{\gamma 1}$	5.90	4.81	4.05	5.24
	$C_{\gamma 2}$	4.76	6.46	5.56	3.81
	$C\delta 1$		5.18	4.23	
E7 His -	C_α	8.50	8.04	8.01	7.96
	C_β	7.90	7.55	7.56	7.47
	C_γ	6.57	6.48	6.12	6.03
	$C_{\delta 2}$	5.36	5.15	5.11	5.04
	$N_{\varepsilon 2}$	4.52	4.84	4.01	3.94
F8 His -	C_α	6.73	6.72	7.00	6.94
	C_β	5.88	5.84	6.25	6.20
	C_γ	4.44	4.43	4.80	4.75
	$C_{\delta 2}$	3.34	3.28	3.71	3.67
	$N_{\varepsilon 2}$	2.27	2.31	2.65	2.59
CD1 Phe -	C_ζ	6.04	6.17	6.38	6.30
E-helix mean		1.08	0.98	0.00	0.00
F-helix mean		0.37	0.37	0.00	0.00

a-d refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha_{(Mg(II))_2}\beta_{(Fe(II)\text{-}CO)_2}$ (this work); b: $\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile}{}_{(Fe\text{-}CO)_2}$ (this work);, c: $\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val\text{-}Ile}{}_{(Fe)_2}$ (this work), d: deoxy HbA (Kavanaugh *et al.*, 1992) were taken from the Brookhaven data base.

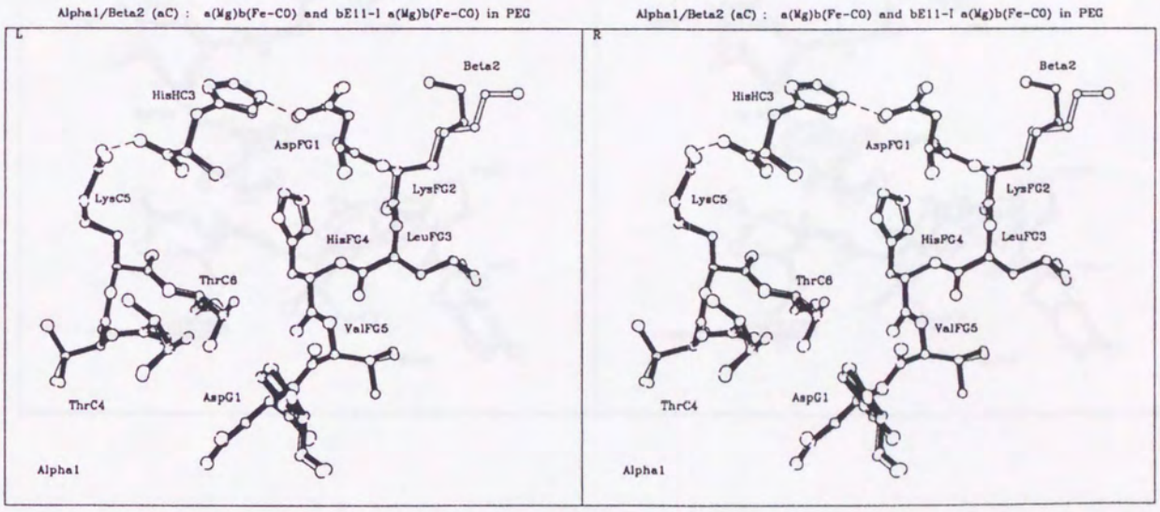
Alpha1/Beta2 (aC) : a(Mg)b(Fe-CO) and bE11-I a(Mg)b(Fe-CO) in PEG
L
Beta2
HisHC3
AspFG1
LysFG2
LysC5
HisFG4
LeuFG3
ThrC6
ValFG5
ThrC4
AspG1
Alpha1
Alpha1/Beta2 (aC) : a(Mg)b(Fe-CO) and bE11-I a(Mg)b(Fe-CO) in PEG
R
Beta2
HisHC3
AspFG1
LysFG2
LysC5
HisFG4
LeuFG3
ThrC6
ValFG5
ThrC4
AspG1
Alpha1

図 4-12a

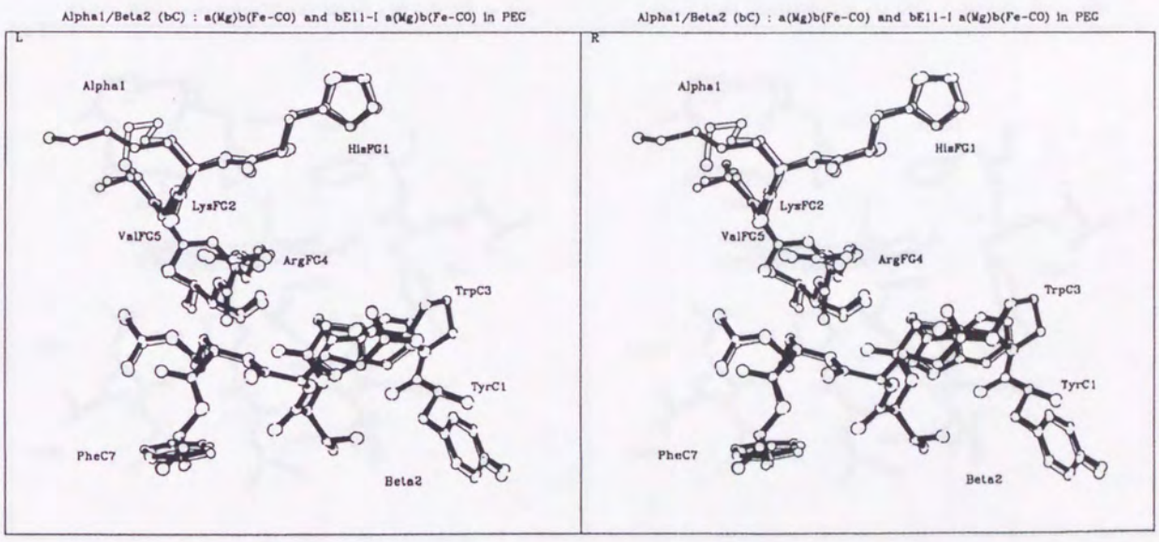

図 4-12b

図 4-12 $\alpha_{(Mg)_2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}{}_{(Fe\text{-}CO)_2}$（open bonds）と $\alpha_{(Mg(II))_2}\beta_{(Fe(II)\text{-}CO)_2}$ の（filled bonds）を α1β2 界面の switch region（a, α1C-β2FG）と flexible joint（b, α1FG-β2C）を、α1 鎖（fitting error = 0.064 Å）と β2 鎖（fitting error = 0.073 Å）の Cα 中心に重ねて、FG-corner の変化を立体的に示した。界面での構造変化は見られなかった。

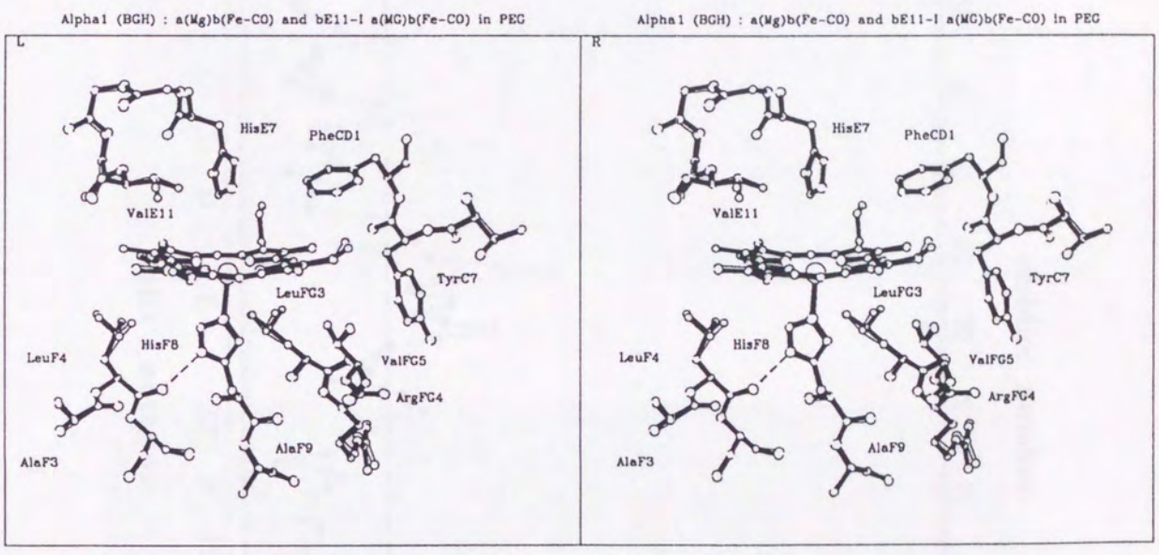

図 4-13　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ 構造（open bonds）と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造（filled bonds）を α1β1 の BGH-frame （fitting error 0.106 Å）で重ねてα1 鎖のヘム周辺の変化を立体的に示した。

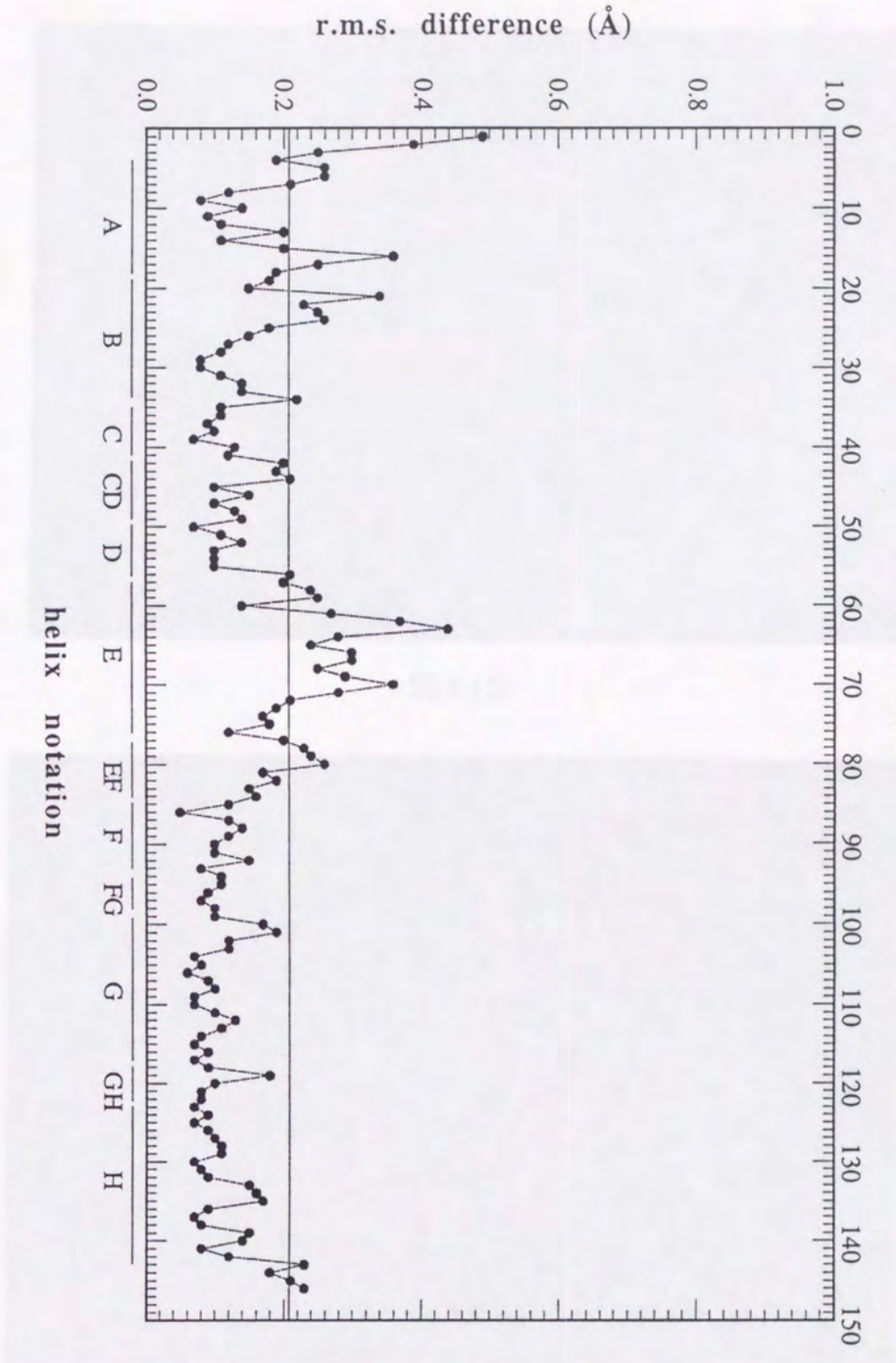

図 4-14　$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ を α1β1 の BGH-frame（fitting error 0.106 Å）で重ねた時の β1 鎖の主鎖の変化の差である。β67 E11-Ile のアミノ酸置換でＥヘリックスの変化がやや見られるがその変化はほんのわずがである。

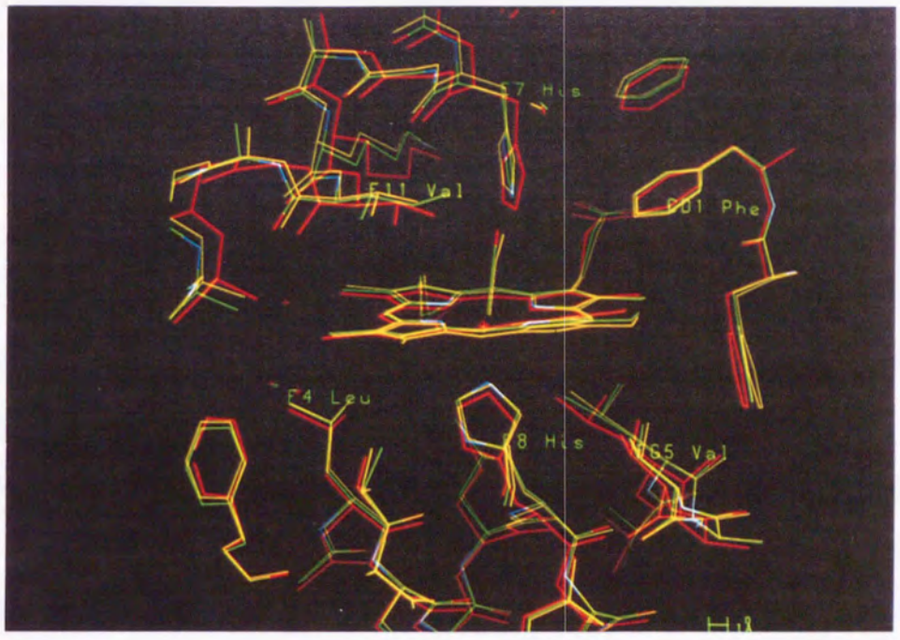

図 4-15a

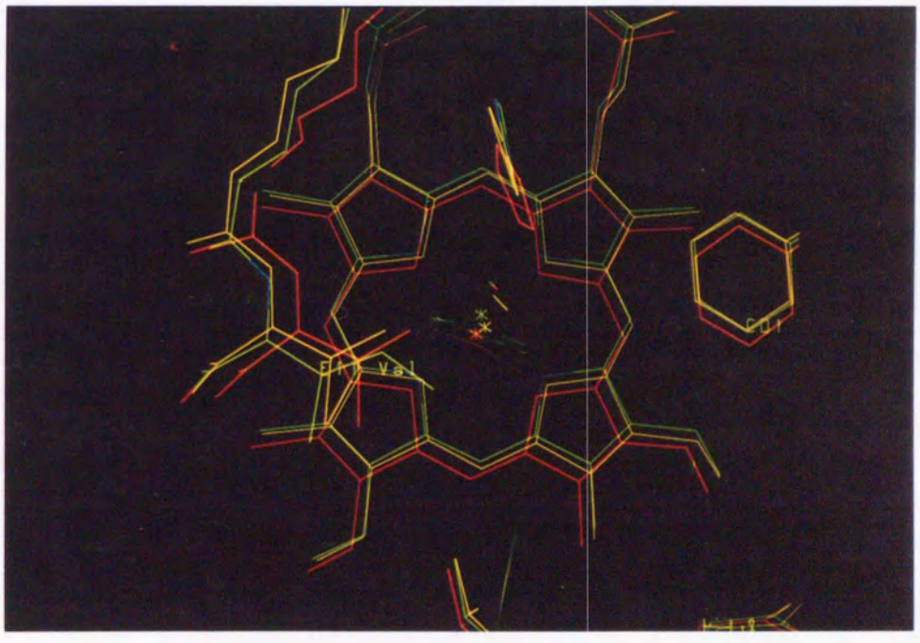

図 4-15b

図 4-15　deoxyHbA（赤色）構造を中心として $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ 構造（緑色）と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$（黄色）をそれぞれ α1β1-BGH frame で重ねて β1 鎖のヘム周辺（a）と E11 Val（b）の変化をそれぞれ示した。

以上のことから、$\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ 混成 Hb に β 鎖の立体障害である E11 Val を Ile で置換すると、分子全体構造はほぼ同じであり、立体障害による E ヘリックスの変化は、配位子結合のごく近傍の一部の残基のみほんのわずかな変化を与えており、Ile 残基くらいの大きさはヘム周辺の空間により吸収でれていると考えられる。

まとめ

1) $\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ 構造の構造変化は $\alpha^{(Mg(II))}{}_2\beta^{(Fe(II)\text{-}CO)}{}_2$ 構造と似ており、全体の構造はT構造であった。

2) $\alpha^{(Mg)}{}_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ 構造の β 鎖の E11 Ile くらいの大きさで立体障害を大きくさせでも、E ヘリックスに与える変化はほぼ同じであり、ヘム周辺の極く一部の残基のみ変化を与えている。

第 5 章

T構造の deoxyHb に配位子が結合した時の構造変化

(1) T構造におけるα鎖の構造変化

α鎖のみ配位子が結合した時の構造としては $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mn(II)})_2$（Arnone *et al.*, 1989），$\alpha(^{Fe(II)-O_2})_2\beta(^{Ni(II)})_2$（Luisi *et al.*, 1989），$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Co(II)})_2$（Luisi *et al.*, 1989），T(α-oxy)Hb（Liddington *et al.*, 1992）が報告されている。これらの構造は、T構造をとっており、α鎖の配位子結合に伴う構造変化はヘム周辺にとどまっている。この中間状態の Hb の構造を詳しく見ると、$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mn(II)})_2$ と $\alpha(^{Fe(II)-O_2})_2\beta(^{Ni(II)})_2$ の構造は分解能 3.0 Å と 3.5 Å の構造であり、deoxyHb との差フーリエ電子密度図で配位子結合に伴う変化を述べているが、これらの構造の精度や Fe 原子の酸化などの問題で詳しい変化を語るのは無理であると考える。しかも、構造は PDB では登録されていなかった。

$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Co(II)})_2$ の構造は分解能 2.9 Å まで構造の精密化されている。α鎖の配位子の結合によりもたらされる変化はヘム周辺にとどまっている。Fe 原子の位置を見ると Fe 原子からヘム面までの距離（$Fe\text{-}P_{heme}$）は 0.43 Å であり、配位子が結合しているのにヘム面から外れており、deoxyHbA と似た位置である。これは $\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造の Fe 原子はヘム面の平面内にあることと大きく異なる点である。配位子の占有率は α1 = 60 %, α2 = 55 % であると推定しており、配位子を deoxyHbA との差フーリエ電子密度図で見ると配位子の占有率は Mg(II)-Fe(II) 混成 Hb と比較して非常に弱くなっている。

T(α-oxy)Hbの構造は分解能 2.1 Å まで解析されており、α鎖の配位子が結合した構造の中、唯一の高分解能の構造である。この構造の配位子結合による変化を調べると（図 2-7）$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造と非常によく似た変化をしている。2 つの構造は高分解能であり、Fe 原子に配位子が結合した時の界面での 4 次構造変化はなく、deoxyHb の構造から COHbA（oxyHb）の構造に動き出して途中で止っていると言える。E ヘリックスよりF ヘリックスの方が大きく変化しているが、COHbA の構造と比べると F ヘリックスの変化も小さい変化である。配位子結合によるα鎖のE

ヘリックスの変化が小さいのは、配位子結合の遠位側残基（E7 His, E11 Val）による立体障害が小さいことを意味する。それは、deoxyHbA 構造から理解できる。deoxyHbA（Fermi *et al.*, 1984）構造のα鎖のヘムポッケト内には水分子が入っており、E7 His のイミダゾールの Nε原子と水素結合を作っている。そこへ配位子が結合すると、水分子はヘムポッケトの外側に行ってEヘリックスへの影響を小さくする。それに対し、β鎖のヘムポッケトでは、水分子がヘムポッケト外側に存在している。このことは両鎖のヘムポッケトの大きさが異なっていることを示しており、配位子結合に伴うEヘリックスでの立体障害がβ鎖よりα鎖が小さい。しだかって、配位子結合によりEヘリックスの変化はβ鎖よりα鎖が小さく変化しているだろろと考えられる。

oxyHb（Shaanan 1983）とCOHbA（Derewenda *et al.*, 1990）の構造はそれぞれ異なる配位子を持っているが分子全体の3次構造は同じであると考えられている。ただ、ヘム鉄原子に配位する酸素とCO分子の配位する角度は、電子状態の違いのため異なっている。Jameson *et al.*（1980）は酸素分子が配位している Fe(TPivPP)(1-MeIm)(O_2) と Fe(TPivPP)(2-MeIm)(O_2) の分子の結晶解析で Fe-O-O の角度は 129.0°, 131.0° であると報告している。そして、Kim *et al.*（1989）はCO分子が結合している Fe(β-PocPivP)(1, 2-Me_2Im(CO) の分子を結晶解析で Fe-C-O の角度は 172.5(6)°であると報告しており、配位子結合の角度がそれぞれ異なっていることを示した。oxyHb と COHbA 構造の配位子結合による Fe の位置を見るとFe-P_N（Fe 原子から4つの pyrrole の窒素原子の平面までの距離）の距離は 0.12 Å と -0.10 Å である。この差も Fe 原子の酸化と誤差の範囲より少し大きい。

T(α-oxy)Hb の構造のα鎖に酸素分子の結合により Fe 原子の位置を見ると Fe-P_N 間の距離は 0.18 Å であり、Fe 原子変化は oxyHb と似た位置であることが分かる。配位子酸素分子の温度因子は（α1: O1 = 16 Å^2, O2 = 29 Å^2; α2: O1 = 40 Å^2, O2 = 29 Å^2）非常に小さい値を持っており、配位子の占有率は電子密度図（Liddington *et al.*, 1990）から見て高いと考える。

Mb（ミオグロビン）のヘムポケットには水分子入っており遠位 His64 と水素結合をしている。このことは、HbA のα鎖とほぼ同じであると考えられる。Mb のヘム

鉄に配位子のない deoxyMb の場合は Fe 原子はヘム面内から外れている。配位子として、水や酸素分子あるいは CO がヘム鉄と結合している時の Fe-P_N 間を調べて見ると Takano（1977）のmetMb では 0.00 Å（分解能 2.0 Å），Phillips（1980）は oxyMb では 0.00 Å（分解能 1.6 Å），Kuriyan et al.（1986）は COMb では 0.00 Å（分解能 1.5 Å）であると報告している。Quillin et al.（1993）は遠位 E64 His を Gly64（分解能 2.2 Å），Gln64（分解能 1.8 Å），His64（分解能 2.0 Å）で替えた異常 COMb の Fe-P_N 間を調べて見ると 0.03 Å, 0.06 Å, 0.05 Å を示しており、ヘム鉄に CO 分子が結合すると Fe 原子はヘム面の中心のごく近くにあることが報告されている。この結果は、$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ で Fe の位置が pyrrole の 4 つの窒素面にごく近いこととよく一致している。

以上のことから、$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$ の構造は deoxyHb の構造から COHbA の構造に動き出して途中での構造である。T構造における α 鎖のみ配位子が結合した時の構造変化は、E ヘリックスはほとんど変化せず、F ヘリックスが主に変化している。COHbA の構造の F ヘリックスの変化と比べて約 1/3 ぐらいの変化である。この動きが制限されていることが酸素親和性を下げていると考えられる。そして、配位子結合に伴うヘム周辺の変化を見ると、ヘム周りの構造はT構造であるにも関わらず、Fe 原子のみ COHbA と似た位置である。これが deoxyHbA の α 鎖のみに配位子が結合した時の構造変化であると考える。

(2) T構造におけるβ 鎖の構造変化

Mb や Hb の β 鎖の遠位 His(E7) の Nε はヘムに結合した酸素と水素結合が弱く、あるのかないのかと言う程度である（Phillips *et al.*, 1981; Shaanan 1983）。X 線解析により、β 鎖では遠位側の残基（E7 His, E11 Val）は、酸素や一酸化炭素のヘムへの結合を障害することが報告されており、CO が配位するためには E ヘリックスはヘムから少し動く必要がある（Perutz *et al.*, 1966）。

Nagai *et al.*（1987）は HbA の βE7 His を Gln, Val, Gly と βE11 Val を Ala, Met, Leu, Ile 残基でアミノ酸を置換して、deoxy 型での構造と酸素平衡機能を調べた。βE11 Leu 置換を行った異常 Hb の構造は Leu では Val や Ile と違って Cα-Cβ と Cβ-Cγ 間の回転をしても、その残基の属しているヘリックスにぶつかることなく回転ができる

ので、配位子結合の立体障害は大きくなってないし、E7 His の動きも小さく、全体のEヘリックスにやや変化をもたらしているが、酸素親和性も HbA はほぼ同じであると報告している。E7 Gly に置換を行った異常 Hb の構造ではヘムポッケト内に大きな空間があり、酸素が結合する時の障害にはなっていないため、ヘムと Eヘリックスに変化はもたらされてない。E7 Gln の異常 Hb はヘムポケット外側にある水分子と Gln の側鎖と水素結合をしており、Gln の side-chain がヘムポケットの外側に向いている。E11 Ala は酸素親和性は HbA より高くなっており、酸素結合の障害にはなっていない。E11 Ile の異常 Hb では Val に比べて一つ余分の -CH_3 基を持つが、この -CH_3 基に相当する大きな正の電子密度がヘム鉄の方に突き出している。又、隣の E7 His も Ile に押されて動いている。Ile は酸素の結合する位置に突き出しているためこの残基が動かないと酸素が結合できない。それに伴って、酸素親和性は HbA と比べて非常に低くなっている。以上の異常 Hb の結果から、E11 Val を替えた異常 Hb は、HbA と比べて酸素親和性が大きく変わったが、E7 His を替えた異常 Hb の酸素親和性の変化は小さくなっていると報告している。特に E11 Ile の異常 Hb では酸素親和性は非常に低くなっており、構造上でも酸素分子の配位がし難くなっていると述べている。

$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の混成 Hb は酸素親和性が低い性質を持っている（Miyazaki）。Nagai らは HbA の βE11 Ile を deoxy 型で構造が解いているが、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の混成 Hb は α 鎖 Mg を置換することにより、βE11 Ile を置換して β(Fe) を deoxy 型と CO 分子を結合させた構造を決定することを成功している。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe\text{-}CO)}{}_2$ の構造は deoxyHbA と比較して、α 鎖の構造は同じであり、β 鎖のみ変わっていることで、Nagai らの構造と直接比較できる。Nagai らの deoxyHb(βE11-Ile) の構造は deoxyHbA との差フーリエ（分解能 2.45 Å）で見ると、Val の side-chain の $C\gamma1$ 原子から Ile の $C\delta1$ の原子がつながるか、$C\gamma2$ からつながるか電子密度図でみる限り良く分からない。それに比べて、$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の構造の自分自身の差フーリエ電子密度図では、deoxy 型（図 4-1）および CO 型（図 4-4）とも Ile の $C\delta1$ の原子の位置がはっきり決定することができた。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile(Fe)}{}_2$ の混成 Hb の酸素親和性は、pH 7.4, 100 mM Cl^-, 25 °C では P_{50} が 177 mmHg を示しており、同じ条件

での $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ は 68 mmHg であり、せいぜい約 2.5 倍しか違いはない（Miyazaki）。配位子の占有率は、CO 分子の電子密度図（図 4-5）と温度因子から見てほぼ 100 % であると考える。$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val\rightarrow Ile}(^{Fe\text{-}CO})_2$ の構造は、Nagai らの deoxyHb(βE11-Ile) の構造から予測したことと異なって、β 鎖に E11 Ile で置換を行い配位子結合の立体障害を大きくさせても、CO 分子は見事にヘム鉄に結合していることが確認された。そして、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ の構造と比較すると、E11 Ile の側鎖が立体障害を避けて少し横にずれるだけで、E ヘリックス全体に大きな変化は見られなかった。このことは、すきまの少ないと言われる β 鎖のヘムポッケトでも、配位子結合の立体障害である E11 に $-CH_3$ 基を 1 つ加えたぐらいは、ヘム周辺の空間に吸収されてしまうと言うことである。

Luisi *et al.*（1990）は β 鎖のみ配位子 CO 分子が結合した $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造について報告している。$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造は、全体の構造は deoxyHbA と似ており、配位子結合に伴い変化はヘム周辺のみ構造変化をもたらしていると報告している。この構造と $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の構造と比較して見ると幾つか異なる点がある。2 つの構造の配位子結合による β 鎖の F ヘリックスの変化を、deoxyHbA を中心で Heme-frame から見るとほぼ同じであるが、E ヘリックスの変化は $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ では 0.68 Å であり、$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ では 1.08 Å であり約半分ぐらいになっている（表 3-5）。Fe 原子の位置も約 0.2 Å くらいヘムの 4 つの pyrrole の窒素原子の平面から外れており（表 3-4）、Fe 原子の変化は誤差の範囲より大きい変化である。$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ の Fe 原子を含むヘム周辺の変化が小さくなっている原因は、色々と考えられる。まず、1) $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ は IHP が入っており、これらによることと 2) 配位子の占有率が低いことなどの可能性があると考えられる。1) について言えば $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ に IHP による構造変化は認められなかったので、$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)\text{-}CO})_2$ 構造の IHP の影響で Fe 原子とヘム周辺の変化が小さくなっている原因ではないと考えられる。2) については配位子の温度因子から、Luisi らは 100 % であると主張している。α 鎖のところでも議論したが、Kim *et al.*（1989）は 6 配位である Fe(β-PocPivP)(1, 2-Me2Im(CO) の単分子を結晶解析を行った結果、Fe-P_{heme}（P_{heme}: ヘムの 24 個の C 原子の平均的な面）の距離は 0.001 Å であ

り、ヘムが6配位である時にはFe原子の位置はヘム面の平面にいる。Liddington *et al.*（1992）のT-metHbの構造を配位子結合によるβ鎖のFヘリックスの変化0.56 Åであり、この変化は$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$の構造の変化とほぼ同じである（表3-5）。しかし、2つの構造の配位子が水分子とCO分子でそれぞれ異なっているにも関わらず、Eヘリクッスにもたらされる変化はほぼ同じであることは考えにくいことである。

上記の$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$の構造のFe原子の位置ととEヘリックスの変化についての疑問は、もし$\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$の配位子の占有率が低いとすれば説明できる。そして、結晶の測定の間のFe原子の酸化などの問題も、ありそうに考えられる。我々はX線のデーター収集後、Mg(II)-Fe(II)混成Hbではの酸化の定量で3％前後であることを確認している。

以上のことから、β鎖の配位子結合のE11 Valの残基の立体障害はIleになっても、Eヘリックスはあまり変化はせず、ヘム周辺の空間による吸収されていることが分かった。$\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$の構造変化は、全体としては界面での4次構造変化はなく、deoxyHbの構造からCOHbAの構造に動き出して途中で止っていると言える。そして、結合した配位子に直接接触しているごく一部の残基（Fe, E7 His, E11 Val）は、COHbAの構造とほぼ同じ変化をしている。Fヘリックスの変化はCOHbAの1/3くらいの変化をしており、配位子結合の立体障害が大きくなっているEヘリックスの変化はCOHbAの1/2くらいの変化をしている。EヘリックスがFヘリックスより大きく変化していることから、β鎖の酸素親和性にはFよりEヘリックスの変化が重要であるように考えられる。しかし、Eヘリックスの変化に対しては、COHbAの構造の精度（分解能2.7 Å）が良くないため、配位子結合によりどこまで変化を及ぼしているかの確認は困難であり、COHbAの構造を高分解能までやり直すべきであると考える。

COの結合したMg(II)-Fe(II)混成Hbの構造は、現在までの配位子の結合したT構造と比べて、Feの位置や、β鎖のE11 Valなどの重要な部位の変化の大きさに大きな違いがある。これらの違いは、構造解析の高い分解能と配位子の占有率、Fe原子

の酸化などから来るものであると考える。つまり、今まで発表されている混成 Hb の構造ではこれらの条件は充分には満たされてなかった。これに対して、Mg(II)-Fe(II) 混成 Hb の構造は、放射光を光源としたX線を用いて、今までより分解能も高く、結晶を取りまくガスのより厳密なコントロールによって、配位子の占有率はほぼ 100 % であり、Fe 原子の酸化を最小限にしている。このことから,この論文で示した CO が結合した Mg(II)-Fe(II) 混成 Hb の構造は、T構造での deoxyHb へ配位子が結合した構造を示していると考える。

謝　辞

本研究は、大阪大学基礎工学研究科及び、高エネルギー物理学研究所の放射光実験施設において行われたものです。論文をまとめるにあたり、熱心に御指導をして頂いた森本英樹先生に深く感謝の意を表します。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、及び、森本研究室の皆様に感謝を致します。又、様々な貴重な御意見をくださった自治医科大学の柴山修哉先生に感謝を致します。

そして、2年間特別研究大学院生としてタンパク分子のX線の結晶解析の研究の場を与えて頂き、御指導下さった高エネルギー研放射光実験施設の坂部知平先生を始め、結晶解析を御丁寧に教えて下さった中川敦史先生、渡辺伸久先生に感謝の意を表します。

本論文の作成に至る長い間に、研究の方法だけではなく、研究者としての生き方など、様々の方面において教え下さった森本英樹先生にもう一度感謝を致します。そして、日本の留学生活において色々な面でお世話になった豊中国際空港ロダーリクラブと大阪梅田中央ライオンズクラブの皆様に感謝致します。最後に、母国にいる母と兄弟及び、わんぱく世俸ちゃんと家内に感謝致します。

参 考 文 献

Asher, S. A. (1981). *Methods Enzymol.* **76**, 371～413.

Arnone, A., Rogers, P., Blough, N., McGourty, J. & Hoffman, B. (1986). *J. Mol. Biol.* **227**, 480～492.

Baldwin, J. M. & Chothia, C. (1979). *J. Mol. Biol.* **129**, 175～220.

Baldwin, J. M. (1980). *J. Mol. Biol.* **130**, 103～128.

Banerjee, R. & Cassoly, R. (1969). *J. Mol. Biol.* **42**, 351～361.

Banerjee, R., Stretzkowski, F. & Henry, Y. (1973). *J. Mol. Biol.* **73**, 455～467.

Blough, N. V. & Hoffman, B. M. (1984a). *Biochemistry* **23**, 2875～2882.

Blough, N. V., Zemel. & Hoffman, B. M. (1984b). *Biochemistry* **23**, 2883～2871.

Brunger, A. T. (1989). *X-PLOR* Version 3.0

Brunger, A. T. (1989). *Acta Cryst. A.* **A46**, 46～57.

Brunger, A. T., Leahy, D. J., Hynes, T. R. & Fox, R. O. (1991a). *J. Mol. Biol.* **221**, 239～256.

Brunger, A. T. (1991b). *Acta Cryst. A.* **47**, 195～204.

Brunger, A. T. (1991c). *Ann. Rev. Phys. Chem.* **42**, 197～223.

Burunori, M., Amiconi, G., Antonini, E., Wyman, J. & Winterhalter, K. H. (1970). *J. Mol. Biol.* **49**, 461～471.

Derewenda, Z., Dodson, G., Emsley, P., Harris, D., Nagai, K., Perutz, M. & Reynaud, J.-P. (1990). *J. Mol. Biol.* **211**, 515～519.

Dodson, E., Dodson, G., Hubbard, R., Liddington, R., Paoli, M. & Tame, J. (1993).

Proc. R. Soc. Lond. A **442**, 193～205.

Fermi, G. (1975). *J. Mol. Biol.* **97**, 235～256.

Fermi, G., Perutz, M. P., Shaanan, B. & Fourne, R. (1984). *J. Mol. Biol.* **175**, 157～174.

Heidner, E. J., Ladner, R. C. & Perutz, M. F. (1976). *J. Mol. Biol.* **104**, 707～722.

Hendrickson, W. (1985). *Methods in Enzymol.* **115**, 252～270.

Higashi, T. (1989). *J. Appl. Crystalloge.* **22**, 9～18.

Ho, C. & Russu, I. M. (1981). *Methods Enzymol.* **76**, 275～312.

Ikeda-Saito, M., Yamamoto, H. & Yonetani, T. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 8639～8644.

Imai, K. & Yonetani, T. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 2227～2231.

Imai, K. (1982). Allosteric effects in hemoglobin, *Cambridge University Press, Cambridge.*

Jameson, G. B., Rodley, G. A., Robinson, W. T., Gagne, R. R., Reed, C. A. & Collman, J. P. (1978). *Inorg. Chem.* **17**, 850～857.

Jameson, G. B., Molinaro, F. S., Ibers, J. A., Collman, J. P., Brauman, J. I., Rose, E. & Suslick, K. S. (1980). *J. Amer. Chem. Soc.* **102**, 3224～3237.

Kavanaugh, J. S., Rogers, P. H., Case, D. A. & Arnone, A (1992). *Biochemistry* **31**, 4111～4121.

Kilmartin, J. V. & Rossi-Bernardi, L. (1971). *Biochem. J.* **124**, 31～45.

Kilmartin, J. V., Fogg, J., Luzzana, M. & Rossi-bernardi, L. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 7039～7043.

Kim, K., Fettinger, J., Sessler, J. L., Cyr, M., Hugdahl, J., Collman, J. P. & Lbers, J. A. (1989). J. *Am. Chem. Soc.* **111**, 403～405.

Kuriyan, J., Wilz, S., Karplus, M. & Petsko, G. A. (1986). *J. Mol. Biol.* **192**, 133～154.

Liddington, R. & Waller, D. A. (1990). *Acta Cryst.* **B46**, 409～418.

Liddington, R., Derewenda, Z., Dodson, E., Hubbard, R. & Dodson, G. (1992). *J. Mol. Biol.* **228**, 551～579.

Luisi, B. & Shibayama, N. (1989). *J. Mol. Biol.* **206**, 723～736.

Luisi, B., Liddington, R., Fermi, G. & Shibayama, N. (1990). *J. Mol. Biol.* **214**, 7～14.

Maeda, T., Imai, K. & Tyuma, I. (1972). *Biochemistry* **11**, 3685～3689.

Minagawa, T. : unpublished results.

Miyazaki, G. : unpublished results.

Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. (1965). *J. Mol. Biol.* **12**, 88～118.

Mozzarelli, A., Rivetti, C., Rossi, G. L., Henry, E. R. & Eaton, W. A. (1991). *Nature* **351**, 416～419.

Nagai, K. (1977). *J. Mol. Biol.* **111**, 41～53.

Nagai, K., Luisi, B., Shih, D., Miyazaki, G., Imai, K., Poyart, C., De Young, A., Kwiatkowsky, L., Noble, R. W., Lin, S.-H. & Yu, N.-T. (1987). *Nature*, **329**, 858～860.

Perutz, M. P. & Mathews, F. S. (1966). *J. Mol. Biol.* **21**, 199～202.

Perutz, M. P. (1968). *J. Crystal Growth*, **2**, 54～56.

Perutz, M. P. (1970). *Nature* **228**, 726～739.

Perutz, M. P. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 327～386.

Phillips, S. E. V. (1980). *J. Mol. Biol.* **142**, 531～554.

Phillips, S. E. V. & Schoenborn, B. P. (1981). *Nature* **292**, 81～82.

Quillin, M. L., Robert, M. A., Olson, A. J. & Phillips Jr, G. N. (1993). *J. Mol. Biol.* **234**, 140～155.

Rivetti, C., Mozzarelli, A., Rossi, G. L., Kwiatkowski, L. D., Wierzba, A. M. & Noble, R. W. (1993). *Biochemistry* **32**, 6411～6418.

Rossi Farelli, A., Antonini, E. & Caputo, A. (1958). *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 605～615.

Sakabe, N. (1983). *J. Appl. Crystalloge.* **16**, 542～547.

Shaanan, B. (1983). *J. Mol. Biol.* **171**, 31～59.

Sibayama, N., Morimoto. H. & Miyazaki, G. (1986). *J. Mol. Biol.* **192**, 323～329.

Sibayama, N. : unpublished results.

Simolo, K., Stucky, G., Chen, S., Bailey, M., Scholes, C. & McLendon, G. (1985). *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2865～2872.

Takano, T. (1977). *J. Mol. Biol.* **110**, 537～568.

Unzai, S. (1993). unpublished results.

Ward, K., Wishner, B., Lattman, E. & Love, N. (1975). *J. Mol. Biol.* **98**, 161～171.

William E. R. Jr (1994). *J. Mol. Biol.* **235**, 657～681.

Yonetani, T., Yamamoto, H. & Woodrow, G. V. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 682～690.