

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



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

Ξ

用

朴

17
11

$\left[d \left[\mathcal{O} \right] \right] $	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 \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \$	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) α(Fe(II))2β(Mg(II))2のデータ収集	15
(5) α(Fe(II))2β(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 α(Fe(II))2β(Mg(II))2 と α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2 の構造変化	
a) α(Fe(II))2β(Mg(II))2 と deoxyHbA の構造比較	29
b) α(Fe(II))2β(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 α(^{Fe(II)})2β(^{Mg(II)})2 と α(^{Fe(II)-CO})2β(^{Mg(II)})2の構造変化

ξ 4(の構造比較	c deoxyHbA	$(I))_2\beta(Mg(II))_2$	a) α (Fe(I
:る構造変化 4	:0 結合によ	のに配位子($^{(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$	b) α(Fe(I

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) α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)})2の結晶化	
a) 硫安溶液	52
b) PEG 溶液	52
(2) α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)})2のデータ収集	54
(3) α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)})2の構造の精密化	55
3. 結果および考察	
(1) α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)})2と deoxyHbAの構造比較	59
(2) α(^{Mg(II)})2β(^{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 α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)-CO})2の構造変化	74
第4章 α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe)2のX線結晶解析	
1	80

1.	. 序篇80
2.	実験方法
	(1) α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe)2の結晶化およびデータ収集81
	(2) α(^{Mg})2β ^{E11Val→Ile} (^{Fe})2の構造の精密化83
3.	結果および考察
	(1) α(^{Mg})2β ^{E11Val→Ile} (^{Fe})2 と deoxyHbA (PEG)の構造比較91
	(2) α(^{Mg})2β ^{E11Val→Ile} (^{Fe})2 に配位子 CO 結合による構造変化 94
	(3) α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-CO)2 と α(Mg(II))2β(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		11	13
-----------	------	-------	--	----	----

- (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

P50: 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)(O₂), Fe(TPivPP)(2-MeIm)(O₂) : (1and 2-methylimidazole)-meso-tetra

 $(\alpha, \alpha, \alpha, \alpha$ -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 α(M)2β(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。 α(Fe(II))2β(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(Fe³⁺)、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) α(^{Ni(II)})₂β(^{Fe(II)-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 へ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 へムの性質に 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(Amone 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 α (Fe(II))₂ β (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 α (Mg(II))₂ β (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、 α (Mg(II))₂ β (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 B1、B2 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 α 1 β 1間の接触(これは α 2 β 2間と等価)、他方は α 1 β 2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、 α 1 β 2 (α 2 β 1) 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) 。

4



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 Ca 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、 $\alpha1\beta1$ 二量体(ダイマー)が $\alpha2\beta2$ 二量体に対し、 $12 \sim 15^{\circ}$ 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 $\alpha1\beta2$ 間および $\alpha2\beta1$ 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。 $\alpha1\alpha2$ 間および $\beta1\beta2$ 間でもそれぞれ接触部位はずれているが、 $\alpha1\beta1$ 間や $\alpha2\beta2$ 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、 α 1 β 1 サブユニットを重ね合わせたときの deoxy 型 の α 2 β 2 位置を破線で描いてある。 α 2 β 2 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。叉、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 のへリックス部分 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 へリックスはへムに近付き、 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 へ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 Cy 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、Cy 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) α(Fe(II))2β(Mn(II))2 混成 Hb

 $\alpha(Fe(II))_{2}\beta(Mn(II))_{2}$ 混成 Hb は Amone *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。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mn(II))_{2}$ 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。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mn(II))_{2}$ 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 (α 1β2) 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。

α(Fe(II)-CO)2β(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) α(Fe(II))2β(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。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Co(II))_{2}$ 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、 $\beta(Co)$ 鎖の中心金属の位置がわずかな変化し ており、 $\alpha(Fe)$ 鎖の変化はない。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Co(II))_{2}$ 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 原子からへ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 $\alpha 2\beta 1$ 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。 α (Fe(II)-CO)₂ β (Co(II))₂ 構造の場合 α 鎖の CO 分子の占有率は $\alpha 1 = 60$ %, $\alpha 2 = 55$ % 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 原子がへ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

 α (Fe(II)- O₂)₂ β (Ni(II))₂

 α (Fe(II)-O₂)₂ β (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。 α (Fe(II)-O₂)₂ β (Ni(II))₂の構造は Fe²⁺ 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。

α (Ni(II))2 β (Fe(II)-CO)2

 $\alpha(^{Ni(III})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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。 $\alpha(^{Ni(III})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の結晶は PEG 溶液 を用いて結晶化を行い、空間群は P21 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。 $\alpha(^{Ni(III})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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 へ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。 $\alpha1\beta2$ 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 Nɛ と Ni(II) 原子との距離は 3.2 Å でF へ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 % へムと結合 しており、X線のテーダー収集後の測定で Fe³⁺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

Τ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 α (Fe(II)-O2)2 β (Ni(II))2, α (Fe(II)-CO)2 β (Co)2 (Luisi *et al.*, 1989) と α (Fe(II)-CO)2 β (Mn(II))2 (Amone *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 O₂ の違いはあるがここに報告する α (Fe(II))₂ β (Mg(II))₂ の構造と充分比較しうる。

 α (Fe(II))2 β (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α(Fe(II))2β(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ついた、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 Na₂HPO₄ 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、 HbA2 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、HbA1 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 °C で保存する。

13

(2) α(Fe(II))2β(Mg(II))2と α(Mg(II))2β(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 8.8 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 8.8 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-O₂) (β (Fe-O₂)) 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 α(Fe(II)-O2)2β(Mg(II))2 (α(Mg(II))2β(Fe(II)-O2)2) を集め濃縮して、液体 窒素温度で保存する。 (3) α(Fe(II))2β(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。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(II))_{2}$ 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 P21, 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。α(Fe(II))2β(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 Na2S2O4, 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。

 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(II))₂の結晶は硫安溶液中の α (Fe(II)-CO)₂ β (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 Na₂S₂O₄, 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。

α(Fe(II))2β(Mg(II))2の deoxy 型と CO 型の結晶は deoxyHbA (Kavanaugh *et al.*, 1992, 空間群 P21212, a = 97.1 Å, b = 99.3 Å, c = 65.8 Å)の結晶と同型であった。

(4) α(^{Fe(II)})2β(^{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20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、 α (Fe(II))2 β (Mg(III)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 mm²)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. ($^{\circ}$ /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。軸立ての方法はボラロイドフィ ルムを用いて小さいな角度の振動写真($\Delta \omega = 1 - 3^{\circ}$)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、 α (Fe(II)₂ β (Mg(II)₂ と α (Fe(II)-CO)₂ β (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

 $\alpha(Fe(II))_{2}\beta(Mg(II))_{2} と \alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(II))_{2}$ の結晶を回転軸 c 軸に対しては $\Delta \omega = 7.0$ °, $\Delta \omega$ 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 $\Delta \omega = 4.0^{\circ}$ 、 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。

solution	crystal	space group	No. of reflections	independent reflections	R-merge ^a (%)
ASb	$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$	P21	283630	108411	7.07
	$\alpha(Fe(II)-CO)_2\beta(Mg(II))_2$	P21	297677	112896	7.79
PEG ^c	$\alpha(^{Fe(II)})_2\beta(^{Mg(II)})_2$	P21212	132210	43553	5.76
	$\alpha(^{Fe(II)-CO})_2\beta(^{Mg(II)})_2$	P21212	173737	47371	6.66

Table 2-1	
Summary of X-ray Diffraction measurements	

^aR-merge = $\Sigma | I_i - \langle I \rangle | / \Sigma | I_i |$, 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. ^bAS, ammonium sulfate. ^cPEG, polyethylene glycol.

(5) α(Fe(II))2β(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>α(Fe(II)</u>)2β(Mg(II))2の構造の精密化

 $\alpha(Fe(II))_{2}\beta(Mg(II))_{2}$ 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 σ (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)。α(Fe(II))2β(^{Mg(II)})2の構造には 406 個 の水分子を含ま れている。

α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2の構造の精密化

α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2構造の精密化は、α(Fe(II))2β(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。α(Fe(II)-CO)2β(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 Aの 50333 反射 (F>3.0o(F)) に対し、R因子 18.5 %の構造を得た (表 2-2)。 α(Fe(II)-CO)2B(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)。

b) PEG 溶液で作った結晶の構造の精密化

α(Fe(II))2β(Mg(II))2の構造の精密化

α(Fe(II))2β(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>3.0σ(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>3.0σ(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。

α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2の構造の精密化

α(Fe(II)-CO)₂β(Mg(II))₂の精密化はα(Fe(II))₂β(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>3.0σ(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 α(Fe(II)-CO)₂β(Mg(II))₂ 構造の CO 分子 モデルと同じ方法で行った)。 α(Fe(II)-CO)₂β(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 (_____: α(Fe(II))2β(Mg(II))2, ____: α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2)。

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

 Table 2-2

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

^aTarget σ , estimated standard deviations, where $1/\sigma^2$ is used as a relative weighing factor in the minimized sum of observational functions. ^br.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. ^c1-2 neighbors, covalently atom pairs. ^d1-3 neighbors, atom-pairs separated by two covalent bonds. ^e1-4 planar neighbors, atom pairs in a planar group separated by three covalent bonds. ^fR-factor = $\Sigma \parallel F_0 \mid -F_c \parallel / \Sigma \mid F_0 \mid$, whrer F_0 is the observed structure factor and F_c is that calculated from the model. AS, ammonium sulfate. PEG, polyethylene glycol. DeMg: $\alpha(Fe(II))_{2\beta}(Mg(II))_{2}, MgCO: \alpha(Fe(II)-CO)_{2\beta}(Mg(II))_{2}.$

	AS $\alpha(Fe(II)-CO)_2\beta(Mg(II))_2$		PEG α(Fe(II)-CO) ₂ β(Mg(II)) ₂	
A CALL				
	α1	α2	α1	α2
C (ligand)	10	14	16	24
O (ligand)	15	14	17	25

Table 2-3Atomic temperature factors of the CO molecules ($Å^2$).

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 α 1 β 1 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、C α 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 $\alpha = 0.29$ Å, $\beta = 0.31$ 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へ 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 $\alpha 1\beta 1$ の BGH-frame で重ねて (fitting error 0.125 Å) $\alpha 1\beta 1$ の主鎖 (main-chain)の変化は 0.31 Å, $\alpha 2\beta 2$ の変化は 0.80 Å である。叉、 $\alpha 2\beta 2$ の BGH-frame で重ねて (fitting error 0.133 Å) $\alpha 2\beta 2 \ge \alpha 1\beta 1$ 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、 $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて $\alpha 1$ 鎖 $\ge \beta 1$ 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 2 σ より大きい変化している残基を調べると $\alpha 1$ 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。 α(Fe(II))2β(^{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。



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 α(Fe(II))2β(Mg(II))2 と α(Fe(II)-CO)2β(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 α 1β1 と α 2β2 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、 α 2β2 界面の BGH-frame (fitting error 0.082 Å) で重ねると α 2β2 と α 1β1 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。叉、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)。

	A	S	A	S	P	EG	PE	G	AS()	PEG)		
	DeMg ^a		MgCOb		DeMg ^a		MgCOb		deoxyHbA ^c		COHbAd	
	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
$M - N_{\mathcal{E}}(F8)$	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 - Pheme M - P _N	0.64 0.41	0.57 0.38	0.20 0.01	0.62 0.37	0.70 0.40	0.52 0.39	0.20 0.01	0.47 0.33	0.64(0.75) 0.40(0.47)	0.56(0.57) 0.36(0.37)	0.07 0.00	0.00
Nε(F8) - Pheme	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 _E (F8)-Fe-C(ligand)	-	-	177	-	-	163	-	172	-	-	170	170
Fe-C-O(ligand)	-	-	173	-	-	155	-	155	-	-	179	181

Table 2-4 Ligand and Heme Geometry

a-d refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha(Fe(II)_{2\beta}(Mg(II)_{2} \text{ (this work)}; b: \alpha(Fe(II)-CO)_{2\beta}(Mg)_{2} \text{ (this work)}; c: deoxy HbA (Kavanaugh$ *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.

30

b) α(Fe(II))2β(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

 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(III))_{2}$ の構造の α 1 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、 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(III))_{2}$ 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。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(III))_{2}$ 構造の α 鎖の 近位 His(F8)の NE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 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(II))₂構造の α 1 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。 α 2 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 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2\beta}(Mg(II))_{2}$ の構造を重ねて二量体の変化を見た。 $\alpha1\beta1 \ge \alpha2\beta2$ のそれぞれ の二量体の変化は 0.23 Å, 0.43 Å であり、 $\alpha2\beta2$ 界面の BGH-frame (fitting error 0.13 Å) で重ねると $\alpha2\beta2 \ge \alpha1\beta1$ の二量体は 0.23 Å ≥ 0.45 Å $\ge \alpha_{2}\sigma_{2}$ $\ge \alpha_{1}\beta_{1}$ の二量体の変化の模様を図 2-5 に立体的に示した ($\alpha1\beta1$ 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 $\alpha1C$ - $\beta2FG$ の界面 (switch region と呼ぶ) $\ge \alpha1FG-\beta2C$ 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。α(Fe(II)-CO)2β(Mg(III)2 結晶の界面を switch regionとflexible jointをα1 鎖とβ2 鎖の C へリックスの 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 $\alpha(Fe(II)-CO)_2\beta(Mg(II))_2$ (thick bonds) と deoxyHbA (thin bonds) 構造を $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて (fitting error = 0.139 Å) $\alpha 1\beta 2$ 界面を立体的に示した。ア ミノ酸残基は $\alpha 1$ 鎖 $\beta 2$ 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 ($\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint ($\alpha 1FG-\beta 2C$) にずれが少し見られ ている。



図 2-6a



図 2-6b

図 2-6 $\alpha(Fe(II)-CO)_2\beta(Mg(II))_2$ (filled bonds) と deoxyHbA (open bonds) 両構造を $\alpha 1\beta 2$ 界面の switch region (a, $\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint (b, $\alpha 1FG-\beta 2C$) の界面を $\alpha 1$ 鎖 (fitting error = 0.065 Å) と $\beta 2$ 鎖 (fitting error = 0.088 Å) の Ca 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。

<u>β鎖の3次構造変化</u>

α1β1 界面の BGH-frame で α (Fe(II)-CO)₂ β (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。 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(II))₂ の混成 Hb の溶液中の性質では、 α 鎖に配位子 CO, O₂ 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 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(III)₂ と deoxyHbA を α 1 β 1 界面の BGH-frame (fitting error 0.139) で重ねて α 1 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 へ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 (α 1 β 1 界面の BGH-frame で重ねて α 1 β 1 と α 2 β 2 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 へリックスでは 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 α (Fe(II)-CO)₂ β (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、α(Fe(II)-CO)2β(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 α(^{Fe(II)-CO})2β(^{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 α(Fe(II)-CO)2β(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 α(Fe(II))2β(Mg(II))2 と α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2 の構造変化

a) α(^{Fe(II)})2β(^{Mg(II)})2と deoxyHbAの構造比較

α 鎖へム面の変化

PEG 溶液中の両構造も硫安溶液の構造と同じように、 $\alpha 1\beta 1$ 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) $\alpha 1\beta 1$ と $\alpha 2\beta 2$ 二量 体の主鎖の相対的な変化は 0.23 Å, 0.34 Å であった。叉、 $\alpha 2\beta 2$ の BGH-frame

(fitting error 0.149 Å) で重ねると $\alpha 2\beta 2$ と $\alpha 1\beta 1$ 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 α (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。 α (Fe(II) $_2\beta$ (Mg(II)) $_2$ の構造は deoxyHbA とほぼ同一の構造である。

b) α(Fe(II))2β(Mg(II))2 に配位子 CO 結合による構造変化

α 鎖へム面の変化

 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(III))_{2}$ 構造の $\alpha 1$ 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 $\alpha(Fe)$ の位置と似ている。配位子結合に伴うへ ムの構造は表 2-3 に表した。 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2}\beta(Mg(III))_{2}$ 構造の α 鎖の F8 His のイミダーブ ルの Ng2 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 Pc-PN は deoxyHbA の方に近い構造である。



図 2-9 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(II))₂の構造の α 1 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 2 σ の点がつないである。 α 2 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 α (Fe(II))2 β (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 α(Fe(II)-CO)2β(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。叉、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 であり叉、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 α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2と非常によく似ている。そして、図 2-10には α(Fe(II)-CO)2β(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 Ca 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)。

っまり、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。

42



図 2-10 $\alpha(Fe(II)-CO)_2\beta(Mg(II))_2$ (thick bonds) と deoxyHbA (PEG, thin bonds) 構造 を $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて (fitting error = 0.149 Å) $\alpha 1\beta 2$ 界面を立体的に示した。 アミノ酸残基は $\alpha 1$ 鎖 $\beta 2$ 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 ($\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint ($\alpha 1FG-\beta 2C$) にずれが少し見ら れている。









図 2-11 $\alpha(Fe(II)-CO)_{2\beta}(Mg(II))_{2}$ (filled bonds) と deoxyHbA (open bonds) の両構造 を $\alpha 1\beta 2$ 界面の switch region (a, $\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint (b, $\alpha 1FG-\beta 2C$) を $\alpha 1$ 鎖 (fitting error = 0.073 Å) と $\beta 2$ 鎖 (fitting error = 0.086 Å) の C α 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。

<u>β 鎖の3次構造変化</u>

PEG 溶液で結晶化を行った α (^{Fe(II)-CO})₂ β (^{Mg(II)})₂の構造を、deoxyHbA と α 1 β 1 界面 の BGH-frame で 重ねて β 1 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。 α (^{Fe(II)})₂ β (^{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

 α (Fe(II)-CO)₂β(Mg(III)₂ と deoxyHbAを α 1β1 界面の BGH-frame で重ねて α 1 鎖の主鎖 の変化を見た(図 2-12)。 BGH-frame の fitting error が 2 σ (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。

 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(II))₂ と T(α -oxy)Hb の構造を比較して見ると α 1 β 1 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 α (Fe(II)-CO)₂ β (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 α (Fe(II)-CO)₂ β (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。 α (Fe(II)-CO)₂ β (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 へ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。



の構造を重ね deoxyHbA の $\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame 中心で α (Fe(II)-CO)2 β (Mg(II))2 , COHbA , T(a-oxy)Hb て α1 鎖の主鎖の変化である。 2-12 :X

48



図 2-13 α1β1 界面の BGH-frame で α(Fe(II)-CO)2β(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、 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(III)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。叉、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) α(Fe(II))2β(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) α(Fe(II)-CO)2β(Mg(II))2の界面はT構造であった。

3) α(Fe(II)-CO)₂β(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) α(Fe(II)-CO)₂β(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

Τ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 O2 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 α (Ni(II))₂ β (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。 α (Mg(II))₂ β (Fe(II)-CO)₂ を硫安溶液で結晶 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。 α (Mg(III)₂ β (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、 α (Mg(III)₂ β (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) α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)})2の結晶化

a) 硫安溶液

 $\alpha(^{Mg(III})_{2}\beta(^{Fe(III})_{2})_{2}$ の混成 Hb の試料の調製は第2章で述べてある。 $\alpha(^{Mg(III})_{2}\beta(^{Fe(III})_{2})_{2}$ の結晶は硫安溶液中の $\alpha(^{Fe(III})_{2}\beta(^{Mg(III})_{2})_{2}$ 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、 $\alpha(^{Mg(III})_{2}\beta(^{Fe(III})_{2})_{2}$ 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。 $\alpha(^{Mg(III})_{2}\beta(^{Fe(III})_{2}CO)_{2}$ 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叉、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 $\alpha(^{Mg(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の結晶は、PEG 溶液の CO 型 $\alpha(^{Fe(II)-CO})_{2\beta}(^{Mg(II)})_{2}$ 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 P21212 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 $\alpha(^{Mg(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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 α(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)-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 P2₁2₁2, a = 98.59 Å, b = 101.01 Å, c = 67.09 Å の単結晶である。

(2) α(^{Mg(II)})2β(^{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。

solutio	n 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	130	341-313
			с	60	
PEG	$\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2$	429.7	с	120	336-316
	(-IHP)		b	40	
PEG	$\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2$	429.7	с	120	320-298
	(+IHP)		b	40	

Table 3-1Data Collection of $\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2 Hb$

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

solution	n crystal	space group	No. of reflections	independent reflections	R-merge ^a (%)
AS	$\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II))_2$	P21	209163	90366	6.87
PEG	$\begin{array}{c} \alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)}-CO)_{2} \\ (-IHP) \end{array}$	P21212	137526	44611	6.14
PEG	$\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ (+IHP)	P21212	146785	47975	5.31

Table	3-2	
Summary of X-ray Diffre	action	measurements

^aR-merge = $\Sigma | I_i - \langle I \rangle | / \Sigma | I_i |$, 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. AS, ammonium sulfate. PEG, polyethylene glycol. IHP, inositol hexaphosphate, - : in the absence of IHP, + : in the presence of IHP.

(3) α(Mg(II))2β(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 σ (F)) に 対し、R 因子 17.7% の構造を得た (図 3-2,表 3-3)。 $\alpha(Mg(II))_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ の構造に は 385 個 の水分子を含まれている。

b) CO型(-IHP)

-IHPの α(Mg(II))2β(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、α(Mg(II))2β(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 PROLSO 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 α(Fe(II)-CO)2β(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。 α(Mg(II))2β(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 A の 35686 反射 (F>3.0 (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 σ (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。





Parameter	Target $(\sigma)^a$	r.m.s. ∆ ^b deoxyMg	r.m.s. ∆ ^b MgCO (-IHP)	r.m.s. ∆ ^b MgCO (+IHP)
Bonding distances (Å) bond lengths (1-2 neighbors) ^c bond angles (1-3 neighbors) ^d planes (1-4 neighbors) ^e	0.020 0.030 0.050	0.017 0.031 0.047	0.018 0.034 0.043	0.020 0.036 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 multiple-torsion contacts possible H-bonding contacts	0.500 0.500 0.500	0.174 0.270 0.166	0.172 0.308 0.194	0.172 0.307 0.189
Conformational torsion an peptide plane $(0,180^{\circ})$ staggered $(\pm 60,120^{\circ})$ orthonormal $(\pm 90^{\circ})$	gles (deg) 3.0 15.0 20.0	2.1 16.2 32.2	2.0 20.4 32.1	2.5 20.2 33.6
Isotorpic temperature facto main chain (1-2 neighbors) ^c main chain (1-3 neighbors) ^d side chain (1-2 neighbors) ^c side chain (1-3 neighbors) ^d	ors (Å ²) 1.000 1.500 1.000 1.500	0.966 1.496 1.199 1.959	0.877 1.404 1.027 1.693	0.909 1.420 1.098 1.742
Final R-factor ^f (%) No. of water molecules in Resolution range (Å) $F > 3$	model 30 (F)	17.7 385 10 -1.7	18.3 274 10-1.9	19.6 214 10-1.9

Table	3-3		
	Table	Table 3-3	Table 3-3

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

^aTarget σ , estimated standard deviations, where $1/\sigma^2$ is used as a relative weighing factor in the minimized sum of observational functions. ^br.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. ^c1-2 neighbors, covalently atom pairs. ^d1-3 neighbors, atom-pairs separated by two covalent bonds. ^e1-4 planar neighbors, atom pairs in a planar group separated by three covalent bonds. ^fR-factor = $\Sigma \parallel F_0 \mid -|F_c| \mid / \Sigma \mid F_0 \mid$, whrer F_0 is the observed structure factor and F_c is that calculated from the model. deoxyMg: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$, MgCO: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$. IHP, inositol hexaphosphate, - : in the absence of IHP, + : in the presence of IHP.

3. 結果および考察

(1) α(^{Mg(II)})2β(^{Fe(II)})2と deoxyHbAの構造比較

 $\alpha 1\beta 1$ 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 $\alpha 1\beta 1$ と $\alpha 2\beta 2$ 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。 $\alpha (Mg)$ 鎖は 5 配位であり、 へムの構造は 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) α(^{Mg(II)})2β(^{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

 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 構造の β_{2} 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。叉、ヘムの構造は表 3-4 に示した。ヘムの構造を見 ると、 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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。 $\alpha(^{Ni(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の β 鎖の Fe 原子の位置を調べて見ると、 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ と 違って deoxyHbA と COHbA の中間くらいにある。 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の β 鎖のヘム doming は deoxyHbA と似ている。叉、 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の β 鎖の 近位 His(F8)の Ng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, $\alpha(^{Ni(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$, 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、 α 1β1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。 $\alpha(^{Ni(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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。 $\alpha(^{Mg(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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 $\alpha(^{Ni(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ と $\alpha(^{Mg(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 構造の β_{2} 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。 β_{1} 鎖のヘム 周辺の電子分布もこれと同じである。

	deoxyMg ^a		(-IHP) Ig ^a MgCO ^b		(+IHP) MgCO ^b		(+ Ni	(+IHP) NiCO ^c		HbAd	COH bA ^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)
$M - N_{\varepsilon}(F8)$	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)
$N_{\varepsilon}(E7) - O(ligand)$	-	-	-	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 - Pheme M - P _N	0.71 0.46	0.58 0.39	0.71 0.44	0.14 -0.04	0.70 0.42	0.19 0.01	0.19 0.09	0.32 0.15	0.75 0.47	0.57 0.37	0.07 0.00(-0.1)	0.00
NE(F8) - Pheme	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 _E (F8)-Fe-C(ligand)	-	-	-	165	-	163	-	172	-	-	170(173)	170(171)
Fe-C-O(ligand)	-	-	-	147	-	155	-	155	-	-	179(175)	181(171)

Table 3-4Ligand and Heme Geometry

a-e refer to coordinates and their soueces. a: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)})_2$ (this work); b: $\alpha(^{Mg(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ (this work); c: $\alpha(^{Ni(II)})_2\beta(^{Fe(II)-CO})_2$ (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.

61

b) 4次構造変化

 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の $\alpha 1\beta 1$ と $\alpha 2\beta 2$ の二量体の相対的な変化を調べて見ると、 deoxyHbA と $\alpha 1\beta 1$ のBGH-frame (fitting error 0.251 Å) で重ねて $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 2$ 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。叉、 $\alpha 2\beta 2$ の BGH-frame (fitting error 0.287 Å) で重ねた時の $\alpha 2\beta 2$ は 0.49, $\alpha 1\beta 1$ 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 ($\alpha 1\beta 1$ のBGH-frame, fitting error 0.196 Å) $\alpha 1\beta 1$ 変化は0.37 Å, $\alpha 2\beta 2$ 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 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ と deoxyHbA の $\alpha1\beta1$ 界面の BGH-frame で重ねた 時の (fitting error は 0.251 Å) $\alpha2\beta1$ 界面 (図 3-4a) と $\alpha1\beta2$ 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 $\alpha1\beta1$ -BGH-frame に重ねると $\alpha2\beta2$ 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 ($\alpha2C-\beta1FG$) の界面を $\alpha2$ 鎖 C α 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 $\alpha1\beta1$ -BGH-frame に重ねた時の $\beta1$ 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 β HC3 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。



図 3-4a





図 3-4 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ (thick bonds) と deoxyHbA (thin bonds) 構造を $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて $\alpha 2\beta 1$ 界面 (a) と $\alpha 1\beta 2$ 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 ($\alpha 1C-\beta 2FG$, $\alpha 2C-\beta 1FG$) と flexible joint ($\alpha 1FG-\beta 2C$, $\alpha 2FG-\beta 1C$)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 $\alpha 2\beta 1$ 界面の switch region ($\alpha 2C-\beta 1FG$) を $\alpha 2$ 鎖 (fitting error = 0.058 Å) の Ca 中心 に重ねて $\beta 1$ 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

 $\alpha 1\beta 1$ 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、 $\alpha 1$ 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。 $\alpha (Mg(III))_2\beta (Fe(II))_2$ 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) $\geq \alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2, \alpha(Ni(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2, T-met Hb, COHbA O)$ 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 α(Mg(II))2β(Fe(II)-CO)2の構造変化を BGH-frame の fitting error の 2 σ (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。 α(^{Ni(II)})2β(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 α(Mg(II))2B(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 α(^{Mg(II)})2β(^{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、α(^{Mg(II)})2β(^{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 α(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)-CO})₂ (_____), α(^{Ni(II)})₂β(^{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 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}, \alpha(Ni(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}, T-met Hb,, deoxyHbA, COHbA の構造をヘム面の中心からヘム周辺の残基の原子との距離とヘムを重ねた時の(Heme frame) E, F ヘリックスの主鎖の deoxyHbA からの平均変化(r.m.s.) とを示した。まず、<math>\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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。 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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。 $\alpha(Ni(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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、 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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。

T	a	b	le	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

atom	s	MgCO ^a (Å)	NiCO ^b (Å)	T-met Hb ^c (Å)	deoxy HbAd (Å)	COHbA ^e (Å)
E11 Val -	Cα	6.50	5.89	6.08	5.65	6.86
	CB	5.88	5.55	5.51	5.05	6.07
	C _{y1}	5.90	5.58	5.55	5.24	5.99
	C _{Y2}	4.76	4.43	4.31	3.81	4.87
E7 His	Cα	8.50	8.15	8.00	7.96	8.53
	C _β	7.90	7.63	7.49	7.47	7.92
	Cy	6.57	6.25	6.03	6.03	6.54
	C ₈₂	5.36	5.21	5.08	5.04	5.39
	$N_{\epsilon 2}$	4.52	4.23	3.93	3.94	4.44
F8 His	- Cα	6.73	6.65	6.63	6.94	6.53
	CB	5.88	5.98	5.85	6.20	5.66
	Cy	4.44	4.55	4.41	4.75	4.24
	C ₈₂	3.34	3.38	3.32	3.67	3.09
	N _{E2}	2.27	2.38	2.26	2.59	2.08
CD1 Phe	- Cζ	6.04	6.05	6.07	6.30	5.60
E-helix r	nean	1.08	0.68	0.56	0.00	2.02
F-helix r	nean	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 $\alpha1\beta1$ の BGH-frame で重ねて $\beta1$ 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 El1 Val の影響で配位子 CO は El1 Val から遠い方向に行くと報告されている。 α(Mg(II))2β(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Nd (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、Ell Val の Cy2 原子と配位子 CO の O 原子間の距離が 2.83 A 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。B2 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 A 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 Cy2 原子と配位子 O 原子の距離が 2.92 A 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Cy2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 α(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)-CO})₂ (緑色), α(^{Ni(II)})₂β(^{Fe(II)-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。

I DO THE OWNER WATER OF THE OWNER OF



図 3-8 α(Mg(II))2β(Fe(II)-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

 $\alpha(Ni(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 構造と $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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) $\alpha(Ni(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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ほ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 $\alpha(Ni(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 $\alpha(Ni(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 K1 (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、α(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)-CO})₂ に IHP を加えて結晶化して構造を解析を行い、-IHP のα(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)-CO})₂ 構造と構造変化を比較した。

(4) +IHP と -IHP 分子による α(Mg(II))2β(Fe(II)-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 (α 1C- β 2FG)とflexibe joint (α 1FG- β 2C)の界面の変化(α 2 β 1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 α (Mg(II))2 β (Fe(II)-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)。

74



図 3-9 $\alpha(Mg(II))_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ の-IHP (thick bonds),+IHP (thin bonds) 両構造を $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて (fitting error = 0.098 Å) $\alpha 1\beta 2$ 界面を立体的に示した。ア ミノ酸残基は $\alpha 1$ 鎖 $\beta 2$ 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 ($\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint ($\alpha 1FG-\beta 2C$)の界面の相対的な 変化も見られていない。









図 3-10 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の-IHP (filled bonds), +IHP (open bonds) 両構造 を $\alpha 1\beta 2$ 界面の switch region (a, $\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint (b, $\alpha 1FG-\beta 2C$)の界面 を $\alpha 1$ 鎖 (fitting error = 0.0064 Å) と $\beta 2$ 鎖 (fitting error = 0.073 Å)の Ca 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 3-11 $\alpha(^{Mg(II)})_{2}\beta(^{Fe(II)-CO})_{2}$ の-IHP (filled bonds), +IHP (open bonds)の両構 造を $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて (fitting error = 0.098 Å) $\alpha 1$ 鎖 (a) と $\beta 1$ 鎖 (b) の へ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。



α(Mg(II))2β(Fe(II)-CO)2 の -IHP, +IHP の両構造を α1β1-BGH frame で重ね 2 (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 つの構造は同じである。 図 3-12 N

78

今回の $\alpha(Mg(III)_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 $\alpha(Mg(III)_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2}$ 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、 $\alpha(Ni(III)_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2}$ の構造のヘム周辺の構造変化が $\alpha(Mg(III)_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2}$ 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) α(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)})₂ Hb の deoxy 型と CO 型の結晶 α 鎖の Mg-ppIX は 5 配位で あ b deoxyHbA ヘムとほぼ同じで構造であった。

2) α(^{Mg(II)})₂β(^{Fe(II)-CO})₂の構造のα1β2(α2β1)界面の構造は deoxy 構造であった。
 3) α(^{Mg(II)})₂β(^{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) α(Mg(II))2β(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) α(^{Mg(II)})2β(^{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へリックスよりEへリックスの変化が大きく、酸素親和性の制御する重要なへリックスはEへリックスであると考えられる。

79

第 4 章

α(Mg)2BE11Val→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) α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe)2 の結晶化およびデータ収集

 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ 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。 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe)_{2}$ Hb の deoxy 型と CO 型の結晶 化は第3章の $\alpha(Mg(II))_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2}$ 混成 Hb とほぼ同じ条件で行い、 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe)_{2}$ 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。

α(Mg)₂β^{E11Val→IIe}(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α(Mg(II))₂β(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)。

The surger is T (2) and (7) T (2) by a share \$ is 100 by surgery \$) in the sharehoused and the \$ the ments of the \$ the surgery \$ and the

solution	crystal	camera radius(mm)	rotation axis	rotation range	E=2.5 Ge.V
PEG	$\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val-Ile}(Fe)_2$	429.7	с	120	295-286
			a	40	
PEG	$\alpha(Mg)_2\beta E11Val-Ile(Fe-CO)$	2 429.7	с	120	280-265
			а	40	

	Table	4-1	
Data Collection	of $\alpha(Mg)_2$	BEIIVal-Ile	(Fe-CO)2 Hb

PEG, polyethylene glycol.

	Ta	ble	4-2		
Summarv	of X-ray L	Diffre	action	measu	rements

solution	crystal	space group	No. of reflections	independent reflections	R-mergea (%)
PEG	$\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val-Ile}(^{Fe})_2$	P21212	139758	46481	5.80
PEG	$\alpha(Mg)_2\beta E11Val-Ile(Fe-CO)_2$	P21212	147883	49029	4.91

^aR-merge = $\Sigma | I_i - \langle I \rangle | / \Sigma | I_i |$, 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) α(Mg)2βE11Val→lle(Fe)2 の構造の精密化

a) deoxy 型

 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe)_{2} の精密化は、deoxyHbA(PEG)の座標を基にして精密化を$ $行った。<math>\beta$ 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、 β 67(E11) Valを含むへ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) β 67(E11) Valの C γ 2 から -CH3 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 β 67(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>3.0\sigma(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、 β 1 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、 β 67(E11) Ile の電子分布がはっきり見えている。



図 4-1 α(^{Mg})₂β^{E11Val→IIe}(^{Fe})₂のβ67(E11) Val を IIe 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 -CH3 基がヘムポケットの方に延びている。



図 4-2 α(^{Mg})2β^{E11Val→IIe}(^{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) IIe の電子密度がはっきり見えて いる。 b) CO 型

α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-CO)2の精密化は-IHPのα(Mg(II))2β(Fe(II)-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 α(Mg(II))2β(Fe(II)-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 B67(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 Cγ2 から-CH3 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 α(Mg(II))2β(Fe(II)-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 α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-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、 B1 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 B2 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、B1 鎖 のC=23 \dot{A}^2 , O=24 \dot{A}^2 で、 β 2 鎖はC=42 \dot{A}^2 , O=43 \dot{A}^2 であった。この温度因子 を α(Mg(II))2β(Fe(II)-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 α(^{Mg})₂β^{E11Val→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 $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_2$ 構造を、 $\beta67(E11)$ 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 1.3 σ ,赤色: Fo-Fc contoured level 2.8 σ の positive 電子密度図)を $\beta1$ 鎖のヘム面の上から見ている。 $\beta67(E11)$ Val の Cy2 から -CH3 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 $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(^{Fe-CO})_2$ の構造の精密化終了後の $\beta1$ 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、 $\beta67(E11)$ Ile と配位子 CO 分子の電子密度図ははっきり見えている ($\beta2$ 鎖のヘム周辺の電子密度 分布も $\beta1$ 鎖とほぼ同じである)。

Parameter	Target(σ) ^a	r.m.s. ∆ ^b Mg(E11-Ile)	r.m.s. ∆ ^b MgCO(E11-Ile)
Bonding distances (Å)			1.50
bond lengths (1-2 neighbors) ^c bond angles (1-3 neighbors) ^d planes (1-4 neighbors) ^e	0.020 0.030 0.050	0.020 0.034 0.047	0.019 0.035 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)	0.500	0.100	0.170
multiple-torsion contacts possible H-bonding contacts	0.500 0.500 0.500	0.183 0.298 0.200	0.172 0.317 0.208
Conformational torsion an	gles (deg)		
peptide plane $(0,180^{\circ})$ staggered $(\pm 60,120^{\circ})$ orthonormal $(\pm 90^{\circ})$	3.0 15.0 20.0	2.2 19.1 31.6	2.3 20.3 32.7
Isotorpic temperature facto	ors (Å ²)		
main chain (1-2 neighbors) ^c main chain (1-3 neighbors) ^d side chain (1-2 neighbors) ^c side chain (1-3 neighbors) ^d	1.000 1.500 1.000 1.500	0.904 1.400 1.034 1.670	0.874 1.367 1.051 1.689
Final R-factor ^f (%) No. of water molecules in Resolution range (Å) $F > 3$	model 80 (F)	19.2 203 10 -1.9	19.1 274 10-1.9

 Table 4-3
 Summary of Least-Squares Refinement Parameters and Statistics of Data Processing

^aTarget σ , estimated standard deviations, where $1/\sigma^2$ is used as a relative weighing factor in the minimized sum of observational functions. ^br.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. ^c1-2 neighbors, covalently atom pairs. ^d1-3 neighbors, atom-pairs separated by two covalent bonds. ^e1-4 planar neighbors, atom pairs in a planar group separated by three covalent bonds. ^fR-factor = $\Sigma \parallel F_0 \mid -IF_c \parallel / \Sigma \mid F_0 \mid$, where F_0 is the observed structure factor and F_c is that calculated from the model. Mg(E11-IIe), $\alpha(^{Mg})_2 \beta^{E11Val-IIe}(^{Fe})_2$; MgCO(E11-IIe), $\alpha(^{Mg})_2 \beta^{E11Val-IIe}(^{Fe-CO})_2$.

3. 結果および考察

(1) α(Mg)2β^{E11Val→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 α 1β1 と α 2β2 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。叉、 α 2β2 界面の BGH-frame (fitting error 0.123 Å) で重 ねると α 2β2 と α 1β1 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。 $\alpha(Mg)$ 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 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe)_{2}$ と deoxyHbA を $\beta1$ 鎖の Heme-frame で重ねて (fitting error 0.094 Å) β 67(E11) の動きを比較して見た。 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe)_{2}$ の 構造の β 67(E11) Ile の C $_{\delta1}$ と、 β 63(E7) His のイミダーゾルの N $_{E2}$ 原子との距離は β 1=3.57 Å, β 2=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、 β 67(E11) Ile の side-chain がヘムポッケトの 外側に (ヘムの pyrrole の NA と NB 原子 を平行にする方向) やや移動している。この β 67(E11) Ile の side-chain の変化は β 2 鎖にも β 1 鎖と同じように生じている。

	Mg(E11-Ile) ^a		MgC	MgCO(E11-Ile) ^b		t Hbc
	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
$M - N_{\varepsilon}(F8)$	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	-	-
$N_{\varepsilon}(E7)$ - O(ligand)	-	-	-	3.30	-	-
$N\varepsilon(E7)$ - C(ligand)	-	-	-	3.61	-	-
Distances to planes (Å)						
M - Pheme	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
$N_{\epsilon}(F8) - P_{heme}$	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 _E (F8)-Fe-C(ligand)	-	-	-	169	-	-
Fe-C-O(ligand)	-		-	158	-	-

Table 4-4Ligand and Heme Geometry

a-c refer to coordinates and their sources. a: $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val-Ile}(^{Fe})_2$ (this work); b: $\alpha(^{Mg})_2\beta^{E11Val-Ile}(^{Fe})_2$ (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 $\beta1$ 鎖の Heme-frame で重ねて (fitting error 0.094 Å) $\beta1E11$ 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) α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe)2 に配位子 CO 結合による構造変化

a) β 鎖へムの変化

 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2} の \beta1 鎖へム周辺の電子密度図 (2Fo-Fc) を図 4-5 に示し$ $た。 <math>\beta1$ 鎖と $\beta2$ 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。へムの構造は表 4-4 に 示しており、CO 分子が結合すると、Fe 原子は pyrole 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 N₆₂ 原子 とへム面の距離は、deoxyHbA と COHbA と中間くらいである。 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow}$ Ile(Fe-CO)₂ のへムの doming parameter の Pc-PN を見ると、deoxyHbA とほぼ同じである。 へムの傾きは deoxyHbA ($\alpha1\beta1$ の BGH-frame) と 3.31° 傾いており、Fe 間の距離は 0.55 Å であった。このへムの変化は $\alpha(Mg(II))_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 構造と非常に似ており、 $\beta67(E11)$ Ile のアミノ酸置換により配位子結合に伴うへ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

 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2} の4 次構造変化に伴う二量体の相対的な変化を調べると、$ $deoxyHbA と <math>\alpha 1\beta 1$ の BGH-frame (fitting error 0.243 Å) で $\alpha 1\beta 1$ と $\alpha 2\beta 2$ 二量体の主 鎖の変化は 0.45 Å, 0.82 Åであった。叉、 $\alpha 2\beta 2$ 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 $\alpha 2\beta 1$ 界面の相対的な構造変化を立体的に示した ($\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame)。二量体間の switch region ($\alpha 2C-\beta 1FG$) と flexible joint ($\alpha 2FG-\beta 1C$) 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 $\alpha 2$ の C $\wedge 1$ ック スの C α を中心で重ねて二量体の switch region ($\alpha 2C-\beta 1FG$)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、α(^{Mg})₂β^{E11Val→Ile}(Fe-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 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow IIe}(Fe-CO)_{2}$ (thick bonds) と deoxyHbA (PEG)の構造 (thin bonds) を $\alpha 1\beta 1$ の BGH-frame (fitting error 0.243 Å) で重ねた時の $\alpha 2\beta 1$ 界面の相対 的な変化。アミノ酸残基は $\alpha 2$ 鎖 $\beta 1$ 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を示した。各 鎖の二量体の switch region ($\alpha 2C-\beta 1FG$) と flexible joint ($\alpha 2FG-\beta 1C$)の界面の相 対的なずれが少し見られている。



図 4-8 α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-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

 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ 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。 $\alpha1\beta1$ 界面の BGH-frame とHeme-frame で、 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ 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、 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ 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、 $\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_2$ 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、 $\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_2$ 結晶とdeoxyHbA を $\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame で重ねた時の $\beta 1$ 鎖の主鎖の相対的な変 化と $\alpha 2\beta 2$ 界面の BGH-frame 重ねて $\beta 2$ 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 $\beta 1$ 鎖と $\beta 2$ 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 $\alpha(^{Mg})_{2}\beta^{E11Val} \rightarrow Ile(Fe-CO)_{2}$ 構造とdeoxyHbA 構造を $\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame で重ねた時の (fitting error = 0.243 Å, —) $\beta 1$ 鎖の主鎖の相対的 な変化と $\alpha 2\beta 2$ 界面の BGH-frame 重ねて (fitting error = 0.260 Å, —) $\beta 2$ 鎖 の主鎖の変化である。

α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-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 a(Ni(II))2β(Fe(II)-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。α(Ni(II))2B(Fe(II)-CO)2や T-met Hb の変化も α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-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 $\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_2$ (------), $\alpha(Ni(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2$ (------), T-metHb (------), COHbA (-----)) の構造をそれぞれ $\alpha 1\beta 1$ -BGH frame で重ねて $\beta 1$ 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 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow IIe}(Fe)_{2}$ 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 IIe の影響の中でどのように CO分子は結合しているか。 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow IIe}(Fe-CO)_{2} の \beta1 鎖のへムに結合している配位子 CO分子は、C原子か$ らへ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 IIe の C81 原子との距離は 3.31 Å である。この配位子を Fe-C-O の 3 つの原子をへム面に垂直になるよう配位子をモデルを修正すると、β1E11 IIe の C81 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 3.20 Å であり、Fe-C-O の 3 つの原子をへム面に垂直になるよう修正すると、β2E11 IIe の C81 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 α (Ni(II))2 β (Fe(II)-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へム面に近付いてないことが 分かる。これらの結晶と α (Mg(II))2 β (Fe(II)-CO)2, α (Mg)2 β E11Val→IIe(Fe-CO)2の構造の鉄 原子の動きを比較すると α (Ni(II))2 β (Fe(II)-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 $\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_2$ 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) α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-CO)2 と α(Mg(II))2β(Fe(II)-CO)2 構造の比較

a) β 鎖へムの変化

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 β 67(E11) Val を IIe 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

 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow IIe}(Fe-CO)_{2} と \alpha(Mg(II))_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 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 $\alpha 1\beta 1$ の BGH-frame BGH-frame (fitting error 0.106 Å) で 重ねると $\alpha 1\beta 1$ と $\alpha 2\beta 2$ 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。叉、 $\alpha 2\beta 2$ 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、 $\alpha 1\beta 2$ 界面の相対的な変化を 立体的に示した ($\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame) 。図 4-12a, 12b には $\alpha 1\beta 2$ 界面の switch region ($\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint ($\alpha 1FG-\beta 2C$)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 $\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile(Fe-CO)_2}$ (thick bonds) と $\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2$ (thin bonds) を $\alpha 1\beta 1$ の BGH-frame (fitting error 0.106 Å) で重ねた時の $\alpha 1\beta 2$ 界面の相対 的な変化である。アミノ酸残基は $\alpha 1$ 鎖 $\beta 2$ 鎖ともに C6-CD8, E7-E11, F3-FG5 を示し た。switch region ($\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint ($\alpha 1FG-\beta 2C$) 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 $\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame で重ねて $\alpha 1$ 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

図 4-15a には 2 つの構造を deoxyHbA (PEG) と $\alpha 1\beta 1$ 界面の BGH-frame 中心で重 ねて $\beta 1$ 鎖 の へ ム 周辺の 変化を見た。 $\alpha (Mg)_{2}\beta E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ (緑色) と $\alpha (Mg(II))_{2}\beta (Fe(II)-CO)_{2}$ 構造(黄色)の構造変化は F へリックスの変化はほぼ同じ変化 を見せているが、E へ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 へム面の上から見た図で、 $\beta 1$ 鎖の E11 (Ile, Val), E7 His, CD1 Phe の変化を示した。 $\alpha (Mg(II))_{2}\beta (Fe(II)-CO)_{2}$ 構造(黄色)の E11 Valの C_{Y2}原子と、 $\alpha (Mg)_{2}\beta E^{11Val \rightarrow}$ Ile(Fe-CO)₂構造の E11 Ile の C_{Y1}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、 $\alpha (Mg)_{2}\beta E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ 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 -CH3 基を長くなっており、Ile の C₈₁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、α(Mg)₂β^{E11Val→Ile}(Fe-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 $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(II)-CO)_{2}$ 構造と比較して見ると、E11 IIe(Val)のヘム中心からの距離は Caの変化は等しく見えるが、側鎖は IIe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 IIe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) IIe 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 IIe 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、 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow IIe}(Fe-CO)_{2}$ 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 CF, 25 °C の条件で P50 は 177 mmHg を示しており、同じ条件で $\alpha(Mg(III)_{2}\beta(Fe(III)_{2})_{2}\beta(Fe(III)_{2})_{2}(Fe(III)_{2})_{2}\beta(Fe(III))_{2}\beta(Fe(II))_{2}\beta(Fe(III))_{2}\beta(Fe(III))_{2}\beta(Fe$

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 HbAd (Å)
E11 Val -	Cα	6.50	6.46	5.83	5.65
or Ile	CB	5.88	6.08	5.27	5.05
	C _{y1}	5.90	4.81	4.05	5.24
	Cy2	4.76	6.46	5.56	3.81
	Cδ1		5.18	4.23	
E7 His -	Cα	8.50	8.04	8.01	7.96
	CB	7.90	7.55	7.56	7.47
	Cy	6.57	6.48	6.12	6.03
	C ₈₂	5.36	5.15	5.11	5.04
	N _{ε2}	4.52	4.84	4.01	3.94
F8 His -	Cα	6.73	6.72	7.00	6.94
	Св	5.88	5.84	6.25	6.20
	Cy	4.44	4.43	4.80	4.75
	C ₈₂	3.34	3.28	3.71	3.67
	N _{ε2}	2.27	2.31	2.65	2.59
CD1 Phe -	Сζ	6.04	6.17	6.38	6.30
E-helix mea	an	1.08	0.98	0.00	0.00
F-helix mea	an	0.37	0.37	0.00	0.00

a-d refer to coordinates and their sources. a: $\alpha(^{Mg(II)})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ (this work); b: $\alpha(^{Mg})_{2\beta}E^{11Val-IIe}(^{Fe-CO})_{2}$ (this work); c: $\alpha(^{Mg})_{2\beta}E^{11Val-IIe}(^{Fe})_{2}$ (this work), d: deoxy HbA (Kavanaugh *et al.*, 1992) were taken from the Brookhaven data base.







図 4-12b

図 4-12 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ (open bonds) と $\alpha(Mg(II))_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2}$ の (filled bonds) を $\alpha 1\beta 2$ 界面の switch region (a, $\alpha 1C-\beta 2FG$) と flexible joint (b, $\alpha 1FG-\beta 2C$) を、 $\alpha 1$ 鎖 (fitting error = 0.064 Å) と $\beta 2$ 鎖 (fitting error = 0.073 Å) の C α 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 $\alpha(Mg)_2\beta^{E11Val \rightarrow Ile(Fe-CO)_2}$ 構造 (open bonds) と $\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2$ の構造 (filled bonds) を $\alpha 1\beta 1$ の BGH-frame (fitting error 0.106 Å) で重ねて $\alpha 1$ 鎖のへ ム周辺の変化を立体的に示した。



図 4-14 $\alpha(Mg)_{2\beta}E^{11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2} と \alpha(Mg(II))_{2\beta}(Fe(II)-CO)_{2} を \alpha 1\beta 1 の BGH-frame (fitting error 0.106 Å) で重ねた時の <math>\beta 1$ 鎖の主鎖の変化の差である。 $\beta 67 E11-Ile$ 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 α(Mg)₂βE11Val→IIe(Fe-CO)₂構造 (緑色) と α(Mg(II))₂β(Fe(II)-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、 $\alpha(Mg(II))_2\beta(Fe(II)-CO)_2$ 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 へリックスの 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) α(Mg)₂βE11Val→Ile(Fe-CO)₂構造の構造変化は α(Mg(II))₂β(Fe(II)-CO)₂構造と似ており、 全体の構造はT構造であった。

2) α(Mg)2βE11Val→Ile(Fe-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), $T(\alpha$ -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。

 α (Fe(II)-CO)₂ β (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-Pheme) 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 α (Fe(II)-CO)₂ β (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 α 1 = 60%, α 2 = 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) α (Fe(II)-CO)₂ β (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 NE 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)(O₂) と Fe(TPivPP)(2-MeIm)(O₂)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-Me2Im(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-PN(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-PN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 Å², O2=29 Å²; α2:O1=40 Å², O2=29 Å²) 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、 α (Fe(II)-CO)₂ β (Mg(III)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、α(Fe(II)-CO)2β(Mg(III)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、配位子結合に伴うへ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 Ne 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。Ell 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 -CH3 基を持つが、こ の-CH3 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。叉、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 Ell 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 β E11 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、 β E11 Ile を置換して $\beta(Fe)$ 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。 $\alpha(Mg)_{2}\beta^{E11Val \rightarrow Ile}(Fe-CO)_{2}$ 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(β E11-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 C₇₁ 原子から Ile の C81 の原子がつながるか、C₇₂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 C81 の原 発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 P50 が 177 mmHg を示しており、同じ条件

116

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→IIe(Fe-CO)₂の構造は、Nagai らの deoxyHb(β E11-IIe)の構造から予測したことと異なって、 β 鎖に E11 IIe 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分子は見事にへム鉄に結合しているこ とが確認された。そして、 $\alpha(Mg(III))_{2}\beta(Fe(III))_{2}$ の構造と比較すると、E11 IIe の側鎖が立 体障害を避けて少し横にずれるだけで、E へ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 -CH₃ 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 α(Ni(II))2β(Fe(II)-CO)2の構 造について報告している。α(Ni(II))2β(Fe(II)-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 α(Mg(II))2β(Fe(II)-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 α(Ni(II))2β(Fe(II)-CO)2では 0.68 Å であり、α(Mg(II))2β(Fe(II)-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 A 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。α(Ni(II))2β(Fe(II)-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) α(Ni(II))2β(Fe(II)-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 α(Mg(II))2β(Fe(II)-CO)2 に IHP による構造変化は認められ なかったので、α(Ni(II))2β(Fe(II)-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-Pheme (Pheme: 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 α (Ni(II))2 β (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 $\alpha(^{Ni(III})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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 $\alpha(^{Ni(III})_{2\beta}(^{Fe(II)-CO})_{2}$ 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 Fe 原子の酸化の定量で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 になっでも、 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

118

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。叉、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.

