

Title	EPRの生物物性への応用：一酸化窒素の配位した金属置換再構成ミオグロビンの光照射によって誘起された新しいEPRシグナル
Author(s)	堀, 洋
Citation	大阪大学低温センターだより. 1982, 38, p. 8-11
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/8537">https://hdl.handle.net/11094/8537</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# EPRの生体物性への応用：

## 一酸化窒素の配位した金属置換再構成ミオグロビンの照射によって誘起された新しいEPRシグナル

基礎工学部 堀 洋 (豊中 4786)

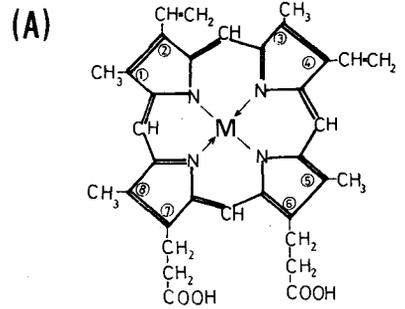
### ヘム蛋白質の“窓” — ヘム

脊椎動物の赤血球中において、酸素分子を肺から諸組織に運搬するヘモグロビン(Hb)や筋肉中においては酸素分子の貯蔵にあたるミオグロビン(Mb)等の“ヘム蛋白質”の構造と機能、及び活性中心であるヘムの電子状態の研究は、これらヘム蛋白質が酸素分子といかなる機構によって結合、解離するかを知る事を目的としてきた。ヘムとは図-1Aに示すように、ポルフィリン環の中央に鉄原子がはまりこんだ平面構造をしている。ヘムは図-1Bに示すように複雑に折りこまれたアミノ酸鎖の中に組み込まれて、“ヘム蛋白質”を作っている。

ヘム鉄は、その3d電子の示す磁性により電子常磁性共鳴(EPR)、磁化率等の磁気測定が可能である。この様な磁気測定から活性中心にある鉄の電子状態が詳細に議論できる。磁気測定によって得られた情報と、その他の生化学的諸測定及びX線結晶構造解析の結果とを対比させる事によって、ヘムあるいは配位子である酸素分子がヘム蛋白質の中でまわりの蛋白部分といかなる相互作用をしているか、即ちヘム蛋白質の構造と機能というものがいかにヘム鉄のエネルギー準位に反映されているのかを知る事ができる。

### ヘム鉄の磁性

HbやMbが酸素分子を脱着(結合、解離)する活性は、ヘム鉄が還元型( $Fe^{2+}$ )のときのみみられる。 $Fe^{2+}$ は3d<sup>6</sup>の電子配置をとる為、スピン量子数 $S=2$ の高スピンと $S=0$ の低スピンの二種類が存在する。高スピン状態では酸素分子は配位しておらず、デオキシHb、デオキシMbと言われている。この状態におけるEPRは今までに観測されていない。一方、酸素分子の配位したオキシHb、オキシMbでは低スピン状態で磁気モーメントがなく、磁気測定は



M-Protoporphyrin IX  
(M: Fe, Mn, Co)

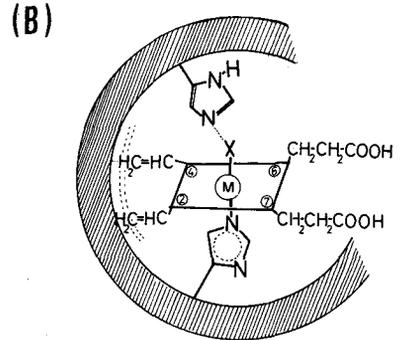


図-1

金属置換したプロトポルフィリン及びMb中でのヘムの配置を示す。

ヘムに垂直な方向に第5配位子として、蛋白質を構成しているアミノ酸のひとつであるヒスチジン(特に近位ヒスチジンという)のイミダゾールが配位しておりその反対側には第6配位子(X)が配位する。Xの更上方には、アミノ酸のもうひとつのヒスチジン(遠位ヒスチジンという)のイミダゾールが近接している。

不可能である。 $\text{Fe}^{2+}$ には酸素分子の他に一酸化窒素や一酸化炭素も配位するがEPRの観測できるのは一酸化窒素の配位した場合のみである。

HbやMbは生体外に取り出されると容易に酸化型( $\text{Fe}^{3+}$ )にする事ができる。 $\text{Fe}^{3+}$ は $3d^5$ の電子配置をとる為、配位子の結合がイオンの(弱い配位子場)であると、 $S = 5/2$ の高スピン状態となり、共有結合的(強い配位子場)である場合は $S = 1/2$ の低スピン状態となる。いずれもEPRが可能である為、電子状態の研究は $\text{Fe}^{2+}$ に較べて、はるかによく進んでいる。

#### ヘム鉄を他の金属に置換してみる

ヘムは化学的処理によって、蛋白質本体から容易に取りはずしたり、再び結合させる事が出来る。又、ヘム鉄の鉄を他の金属に置換した金属ポルフィリンを作り、これをヘムを抜いた蛋白(アポ蛋白という)に再結合させ人工の再構成ヘム蛋白質を合成することも可能である。この様な金属置換した再構成ヘム蛋白質の諸性質を研究する事は、活性中心ヘムの役割を理解する有効な手段となる。現在、様々な金属置換ヘム蛋白質が再構成されている。例えば鉄を二価のコバルト( $\text{Co}^{2+}$ )に置換した $\text{Co}^{2+}$ ポルフィリンを持つHbやMbは適当な条件下で可逆的に酸素分子と結合する。又、活性のある状態でEPRが測定可能であり、天然の材料では知り得なかった活性中心に関する情報が得られる。又、二価のマンガン( $\text{Mn}^{2+}$ )に置換したHbやMbも再構成されている。Mnの場合、酸素分子は結合しない。電子配置は $3d^5$ で、 $S = 5/2$ の高スピン状態のみとり得る為、 $\text{Fe}^{3+}$ 高スピンの類似物として様々な情報が得られている。

#### 光照射後に現われた奇妙なEPRシグナル

EPRの観測可能なこれらの金属置換ヘム蛋白質に一酸化窒素( $\text{NO}$ )が配位すると、EPRが観測できなくなる事は古くから知られていた。 $\text{NO}$ は電子スピン $S = 1/2$ を持つので配位する事によって金属の $S = 5/2$ (又は $S = 1/2$ )との相互作用が非常に大きくなる為であると考えられている。では、これらの相互作用を弱めてやれば何が観測されるのであろうか。かつて筆者らは、 $\text{NO}$ の配位した $\text{Fe}^{3+}$ Mb( $\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}$ Mb)を液体ヘリウム温度で光照射すると $g = 5.8$ 附近に本来の $\text{Fe}^{3+}$ Mb高スピンの $g = 6$ のシグナルより線幅の大きいEPRシグナルが観測される事、同温度における光吸収スペクトルは、光照射によって $\text{Fe}^{3+}$ Mb高スピンとは類似はしているが少し異なるスペクトルに変化する事を報告した。これは、光照射によって $\text{NO}$ が“光解離”し極低温では $\text{H}_2\text{O}$ も $\text{NO}$ も再配位しない5配位構造が安定に存在していると解釈した。ところが、このEPRスペクトルをより注意深く測定してみると、 $g = 5.8$ の小さい吸収の他に、今まで報告されていない零磁場から約4000 Gaussにわたる幅広い吸収が観測されたのである(図-2A)。マイクロ波出力の依存性、温度依存性からみて、零磁場附近の吸収、 $g = 5.8$ 及び幅広い吸収は、それぞれ異なる挙動を示す。又、 $\text{NO} \cdot {}^{57}\text{Fe}^{3+}$ Mbを使って、メスバウアー測定も行ってみた。光照射前の $\text{NO} \cdot \text{Fe}^{3+}$ Mbに特徴的なスペクトルは、4.2 Kで光照射すると確かに吸収は減少したが、“光解離種”の吸収は確認されなかった。しかし、弱い外部磁場を加えると弱い磁気相互作用が現われた事から、“光解離種”の基底状態は少なくとも半整数のスピンを持つと考えられる。メスバウアー分光法は鉄の原子核とそれを直接取り巻く核外場の相互作用を示すので、“光解離種”が半整数のスピン、例えば $S = 5/2$ を持つとしても不思議ではない。光吸収スペクトルの立場は、ポルフィリン環の $\pi$ 電子系の影響をみているのであるから、 $\text{NO}$ が“光解離”した後は、5配位構造の高スピンであることは充分考えられる。それに対して、EPRの立場は、鉄の原子核をとりまく不

不対電子及び“光解離”したNOの不対電子の挙動を反映するので話しが単純ではない。

光照射でNOはどこへゆくのか

光照射によってNOが“解離”するとはどういう事か、“光解離”の意味を考えてみよう。NOが完全に解離し、 $Fe^{3+}$ イオンと全く相互作用がなくなるならば、光照射後のEPRスペクトルは $Fe^{3+}Mb$ のそれになるはずである。この“光解離種”は、液体窒素温度まで昇温すると光照射前の $NO \cdot Fe^{3+}Mb$ にもどっている事からみて、 $Fe^{3+}Mb$ に配位したNOは光照射によって $Fe^{3+}$ イオンから少し遠のき、その結果、 $Fe^{3+}-NO$ のスピンの交換相互作用が弱まる。言いかえれば、強い交換相互作用の為、今まで測定できなかったEPRシグナルが光照射によって相互作用が弱まり測定にかかるようになったと解釈してはどうだろうか。Mbの立体構造からながめると、遠位ヒスチジン等のヘム周辺のアミノ酸残基の存在が光照射で離れようとするNOを押えているとすれば納得がゆくのではなからうか。これを解くひとつのカギとして、遠位ヒスチジンの欠除したある種のHbを使って同様の光解離実験をしてみた。零磁場吸収及び4000ガウスにわたる幅広い吸収は全く観測されず $g \sim 6$ 附近の本来の $Fe^{3+}$ 高スピンのシグナルが現われた事から、遠位ヒスチジンのない場合は、“解離”したNOがMbの場合より更に鉄原子から遠くにいてると推測されよう。

零磁場吸収の原因を解くかも知れないひとつの実験として金属置換がある。 $Fe^{3+}Mb$ と類似したデオキシ $Mn^{2+}Mb$ にNOを配位させて、液体ヘリウム温度で光照射したときのEPRスペクトルを図-2Bに示す。鉄の場合と同様のスペクトルが、零磁場附近と約4000ガウスにわたって観測され、しかも零磁場附近のシグナルに $^{59}Mn$ の核スピンの影響かと思われる分裂が現われた。一方、 $NO \cdot Co^{2+}Mb$ でも、やはりわずかであるが零磁場附近に吸収が観測され、更に $g = 4.3$ 及び $g = 2$ のまわりに幅広い複雑な吸収が観測された(図-2C)。“光解離種”のEPRパターンは $Co^{2+}$ の場合他の $Fe^{3+}$ 、 $Mn^{2+}$ の場合と大きく異なっているのは、 $Co^{2+}$ が $S = 1/2$ のスピンの持つことの反映であろうか。ところで“光解離”したNOのEPRシグナルが $g \sim 2$ を中心に幅広く現われる現象は、還元鉄( $NO \cdot Fe^{2+}Mb$ )においても観測される。それは“光解離種”のスピンの状態は $Fe^{2+}$ 高スピン( $S = 2$ )と

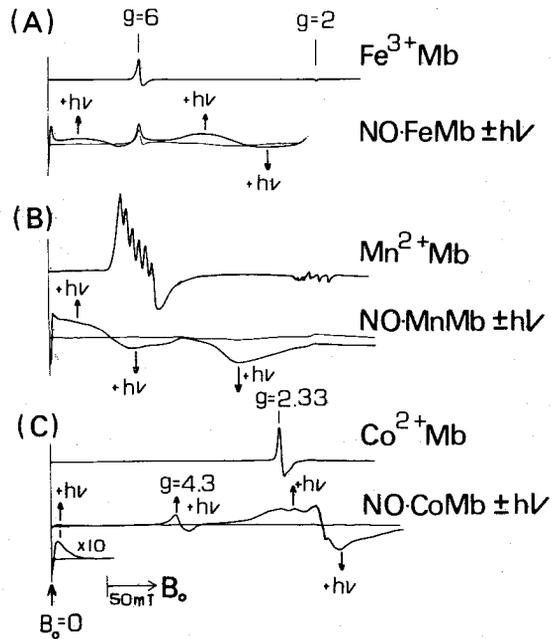


図-2.

液体ヘリウム温度における各金属置換MbのEPRスペクトル及び、NO複合体の光照射によって現われたEPRスペクトルを示す。

考えられており、 $\text{Fe}^{2+}$  の EPR は観測されない訳で、零磁場吸収もみられないという結果は納得できるのではなからうか。

大変複雑な結果を「話題提供」として限られた紙面で記述してみたが、現在、これらの EPR シグナルが本当のところ何であるかはっきりしていない。

読者諸兄の有益な助言、協力を期待したい。