

氏名・(本籍)	すが 菅	わら 原	よし 芳	あき 明
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理博第	691	号	
学位授与年月日	昭	和	56年	1月28日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻			
学位論文題目	オキシミオグロビンの安定化機構			
論文審査委員	(主査) 教授 小西和彦 教授 柴岡孝雄 助教授 四釜慶治			

論 文 目 次

第一章 序 論

第二章 材料及び方法

第三章 結 果

1. 8M 尿素中での MbO₂ の自動酸化
2. 8M 尿素中での MbO₂ の変性
3. 8M 尿素中における MbO₂ の自動酸化反応論

第四章 考 察

第五章 要 約

謝 辞

引用文献

図の説明

図 表

論文内容要旨

第一章 序論

ミオグロビンの生理的役割は分子状酸素を可逆的に結合し、赤筋中の好氣的代謝を維持することである。しかしながら、分子状酸素を結合したミオグロビン(オキシミオグロビン, MbO₂)はO₂⁻の生成を伴って鉄三価のミオグロビン(メトミオグロビン, metMb)に酸化され、その酸素結合能を失う。

このミオグロビンの自動酸化反応に影響を及ぼす種々の要因、水素イオン濃度、酸素分圧、温度、イオン強度等が多くの研究者によって検討されて来たが、その中でも水素イオン濃度は特に顕著な効果を示す。即ち、MbO₂の自動酸化速度は水素イオン濃度の増加と共に著しく増大し、pH 9付近に最小値を持つ。このpH依存性の速度論的並びに熱力学的解析から、この反応は水溶液中のH₂O分子及びOH⁻イオンによってMbO₂からO₂⁻が置換される反応であることが明らかとなった。更に、この過程には二つのアミノ酸残基、distal His (His-64) と Tyr-103 が関与し、かつ水素イオンが触媒的に作用していることが明らかとなった(Shikama & Sugawara 1978, Sugawara & Shikama 1980)。一方、MbO₂は種々の変性条件下にさらされると、その自動酸化速度は著しく増大することが知られている。この事実は、オキシミオグロビンの安定性に蛋白部分の立体構造が大きく寄与していることを示唆するものである。

そこで、本論文では、ミオグロビン-酸素錯体の安定化機構における蛋白部分の役割を理解する目的で、まず、native MbO₂を8M尿素中で変性させながら、その自動酸化速度と変性速度とを同時に測定し、その速度論的考察から反応過程で一時的に生成する変性オキシミオグロビンの自動酸化速度を推定した。次に、得られた結果をnative MbO₂の自動酸化反応と比較検討し、ミオグロビンが分子状酸素を安定に結合し得る分子内機構について考察した。

第二章 材料及び方法

MbO₂標品はShikama & Sugawara (1978)の方法に従ってウシ心筋より単離精製した。

8M尿素中でのMbO₂の自動酸化反応は、0.05 M buffer (pH 4.8—13.1)中で、25 μMのMbO₂を用いて25±0.1°Cで観測した。自動酸化速度はMbO₂のα-maximum, 581nmの吸光度変化から一次反応速度定数として求めた。又、8M尿素中でのMbO₂の変性速度は222 nmの円偏光二色性(CD)及び蛍光強度変化から一次反応速度として求めた。なお、尿素は20% methanol水溶液中で再結晶し、P₂O₅上で真空乾燥したものをを用いた。

第三章 結果

1. 8M尿素中でのMbO₂の自動酸化

8M尿素中でのMbO₂の自動酸化反応はnative MbO₂に比較して著しい速度増大を示した。

例えば、25°C、pH 6.5 では、native MbO₂ の自動酸化速度が $2.0 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ ($t_{1/2} = 1.4 \text{ day}$) であるのに対して、8M 尿素中では $6.5 \times 10^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ($t_{1/2} = 1.1 \text{ hr}$) であった。更に広い pH 領域 (4.8-13.1) に渡って検討を加えると、得られた自動酸化速度は pH 9 では native MbO₂ の 5 倍、他の領域では 1,000 倍にも達し、かつ顕著な pH 依存性を示すことが明らかとなった。

このように 8M 尿素中での MbO₂ の著しい自動酸化速度の増大は、蛋白部分の立体構造の破壊によって引き起こされると考えねばならない。従って、その pH 依存性を真に理解するには、変性過程の pH 依存性までも含めて調べる必要がある。そこで、次に 8M 尿素中での MbO₂ の変性反応について検討した。

2. 8M 尿素中での MbO₂ の変性

8M 尿素中での MbO₂ の変性過程を定量するために、まずその円偏光二色性及び蛍光強度について検討した。その結果、円偏光二色性では、完全な α -ヘリックス構造の破壊に伴う過程が反映されるのに対し、蛍光強度では、N 末近くの二個の Try 残基 (Try-7, 14) による変性初期の局所的構造変化が反映されると考えられた。そこで、8M 尿素中での変性反応は 222nm の円偏光二色性によって、pH 4.8—13.1 の領域に渡って観測することとした。

8M 尿素中での変性速度は、測定されたすべての pH 領域に渡って自動酸化速度よりも常に大きく、かつ自動酸化速度の pH 依存性は変性の pH 依存性によって規定されていることが明らかとなった。この事から考えて、8M 尿素中で観測される自動酸化速度から真の自動酸化速度を求めるためには、そこに含まれている変性過程の pH 依存性を何らかの形で補正する必要がある。そこで、8M 尿素中で同時に進行している自動酸化反応と変性反応との関係を速度論的に考察した。

3. 8M 尿素中における MbO₂ の自動酸化反応論

8M 尿素中での MbO₂ の自動酸化反応は次の二つの反応経路により進行するものと考えられる。一つは、native MbO₂ の蛋白変性がまず起こり、その結果、酸素を結合した状態の変性オキシミオグロビン (denatured MbO₂) が生成され、次にこの denatured MbO₂ が自動酸化を受けて、結局 denatured metMb となる経路である。他の一つは、native MbO₂ が蛋白変性を受けずに自動酸化され、次に、この metMb が蛋白変性を受けて、結局は denatured metMb となる経路である。しかしながら、前節で述べた様に 8M 尿素中で引き起こされる MbO₂ の著しい自動酸化速度の増大は、反応の大部分が前者の経路を取って進行していることを示している。そこで、本論文では、denatured MbO₂ の自動酸化速度を上記素反応過程の一つとして、8M 尿素中で観測された overall の自動酸化速度と変性速度から直接に求め得る関係式を導出することに成功したものである。

その結果、25°C、pH 6.5 では、native MbO₂ の自動酸化速度が $2.0 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ ($t_{1/2} = 1.4 \text{ day}$)

であるのに対し、denatured MbO₂では4.0 hr⁻¹ (t_{1/2}=10 min)と200倍も早くなり、かつ、その速度は広い領域6-12に渡ってpHに依存しない一定の値を取ることが明らかとなった。

第四章 考 察

本論文では、MbO₂の安定化機構における蛋白部分の役割を理解するために、その立体構造を8M尿素中で完全に壊した変性オキシミオグロビン (denatured MbO₂) の自動酸化速度を求めた。その解析の過程では、観測される overall の自動酸化速度と変性速度との大きさの関係が極めて重要であった。

その結果、ミオグロビンの蛋白部分の構造崩壊によって、denatured MbO₂の自動酸化速度は native MbO₂の200倍から2,000倍も増大し、かつ native MbO₂の自動酸化機構で重要な役割を担っている水素イオンの触媒作用及びミオグロビン分子の distal His (His-64) と Tyr-103 残基の作用は完全に消失されることが明らかとなった。この事実は、distal His を通じての水素イオンの触媒能が発現出来なくなったこと、及び heme pocket によって形成されている疎水的環境の破壊、或は distal His の立体配置の破壊によって、或はその両者によって、自動酸化を引き起こす H₂O 分子や OH⁻ イオンが Fe (II) - O₂ 結合を一層容易に攻撃出来るようになったことを示していると結論された。

論文審査の結果の要旨

菅原芳明提出の論文は、ヘム蛋白質であるミオグロビン分子が酸素を可逆的に結合して、安定な酸素錯体を形成する分子内機構を明らかにすることを目的としたものである。

本論文では、まずオキシミオグロビン (MbO_2) を変性剤である 8M 尿素中に入れ、その蛋白部分の変性過程を 222 nm の円偏光二色性 (CD) により観測し、一方ヘム鉄が、二価の MbO_2 から、三価のメトミオグロビン (met Mb) となる自動酸化過程を α -peak (581nm) の吸光度変化から同時に観測した。次に速度論的考察から、8M 尿素中で一時的に生成する denatured MbO_2 、即ち蛋白部分の立体構造は崩壊しているが、酸素分子を結合している状態のミオグロビン分子、そのものの自動酸化速度を広い pH 領域に渡って求めることに成功した。得られた値は、未変性の native MbO_2 の自動酸化速度とは異なり、200~2000 倍の増大を示し、且つその pH 依存性は消失した。

更に、これまでの知見と関連させると、ミオグロビン分子の立体構造の破壊により、(1) distal His (His-64) を通じての水素イオンの触媒能が発現出来なくなったこと、(2)ヘム周辺の疎水的環境の破壊、或はその中に位置している distal His の立体配置の破壊によって、或はその両者によって、自動酸化反応を引き起す H_2O 分子や OH^- イオンが $\text{Fe}(\text{II})-\text{O}_2$ bonding を一層容易に攻撃出来るようになったと結論された。従って、ミオグロビンが、安定な酸素錯体を形成するためには、ヘム周辺の疎水的環境、及びその中に位置している distal His が重要な役割を荷なっていることが明らかとなった。

菅原芳明の論文は、自立して研究を行うために必要な高度の研究能力と学識とを有することを示しており、よって菅原芳明提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。