

氏名・(本籍)	すず き とも ひこ 鈴木 知彦
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理第 822 号
学位授与年月日	昭和61年1月29日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和56年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	オキシミオグロビンの安定化機構に関する比較生化学的研究
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦 教 授 竹 内 拓 司 助 教 授 四 釜 慶 治

論 文 目 次

第一章 序論

第二章 マッコウクジラ・オキシミオグロビンの安定性

第一節 序論 第二節 材料と方法

第三節 結果 第四節 考察

第三章 サメ・オキシミオグロビンの精製と性質

第一節 序論 第二節 材料と方法

第三節 結果と考察

第四章 サメ・オキシミオグロビンの安定性

第一節 序論 第二節 材料と方法

第三節 結果 第四節 考察

第五章 総合考察

謝辞

引用文献

論文内容要旨

第一章 序論

ミオグロビン (Mb) は心筋や骨格筋などの赤筋中に存在し、酸素分子の貯蔵及び拡散に重要な働きをしているヘム・タンパク質である。脊椎動物のミオグロビンは、約 150 個のアミノ酸残基から成り、 α -ヘリックスに富む共通した折りたたみ構造をとっている。ミオグロビンのヘム鉄は、通常二価と三価の状態を取りうるが、このうち、酸素分子を可逆的に結合できるのは鉄が二価の時のみである。しかしながら生理的に最も重要であるオキシミオグロビン (MbO_2) は、容易に鉄三価のメトミオグロビン (metMb) となり、酸素結合能を失って生理的に不活性な状態になってしまう。この反応は自動酸化反応と呼ばれ、 O_2^- の生成を伴って次式で表わされる。



ここで k_{obs} は見かけの一次反応速度定数である。このオキシミオグロビンの自動酸化反応は、 H_2O 分子或は OH^- イオンによる求核置換反応である、と考えられている。

本研究の目的は、オキシミオグロビンの安定化機構に対するタンパク質側の寄与を、自動酸化反応の pH 依存性を通じて、比較生化学的に解析することにある。そのために先ず、ミオグロビンの基準標品であるマッコウクジラのオキシミオグロビンを用い、その安定性を速度論的に検討した。その結果、この速度論は、他の種類のミオグロビンのヘム環境を探る上で有効な手段となることがわかった。そこで、数種類のサメからオキシミオグロビンを単離精製し、その安定性を詳細に比較検討した。

第二章 マッコウクジラ・オキシミオグロビンの安定性

第一節 序論

マッコウクジラ・ミオグロビンはその構造が最も詳細に研究されているミオグロビンである。1981 年にはオキシミオグロビンの中性子線回折が行われ、結合している酸素分子が遠位 (E7) ヒスチジンのイミダゾール基と水素結合していることが初て明らかにされた。本章では、このマッコウクジラ・オキシミオグロビンを用いて、その安定性に対する pH 依存性を速度論的に解析した。

第二節 材料と方法

オキシミオグロビンは DEAE-Sephadex A-25 及び CM-cellulose によるイオン交換クロマトグラフィー等によって精製した。自動酸化速度は 0.1 M 緩衝液中、25 °C、pH 5-13 の範囲で測定した。

第三節 結果

マッコウクジラ・オキシミオグロビンの自動酸化反応の速度式は

$$-d [\text{MbO}_2] / dt = k_{\text{obs}} [\text{MbO}_2] \quad [2]$$

で表わされる。自動酸化速度は、水素イオン濃度の増加と共に顕著に増大した。この自動酸化反応の pH 依存性は、次のような反応機構で解析された。すなわち、ある一つの解離基 AH が自動酸化に関与しており、その解離状態によって二つの状態、A (AH) 及び B (A⁻) が生じ、それらはモル分率 α 及び β ($= 1 - \alpha$) で平衡関係にある。そしてそれぞれの状態は、H₂O 分子或は OH⁻ イオンによって求核置換され metMb に変わる。また H₂O による求核置換には、H⁺ によって触媒される過程も存在する。従って、式〔2〕の一次反応速度定数は次式で与えられる。

$$k_{\text{obs}} = (k_{\text{O}}^{\text{A}} [\text{H}_2\text{O}] + k_{\text{H}}^{\text{A}} [\text{H}_2\text{O}] [\text{H}^+]) (\alpha) \\ + (k_{\text{O}}^{\text{B}} [\text{H}_2\text{O}] + k_{\text{H}}^{\text{B}} [\text{H}_2\text{O}] [\text{H}^+] + k_{\text{OH}}^{\text{B}} [\text{OH}^-]) (\beta) \quad [3]$$

$$\text{ここに} \quad \alpha = [\text{H}^+] / ([\text{H}^+] + K_1), \quad \beta = 1 - \alpha \quad [4]$$

である。

ここで K_1 は解離基 AH の解離定数を表わし、また二状態の各々について k_{O} は H₂O による自発的な置換反応の速度定数、 k_{H} はプロトンにより触媒される置換反応の速度定数、 k_{OH} は OH⁻ による置換反応の速度定数を表わしている。自動酸化には二つの異なるタイプのプロトンが関与しており、その一つは式〔3〕における“触媒プロトン”であり、他方は式〔4〕における“平衡プロトン”である。式〔3〕を用いて Curve Fitting を行い、解離定数及び各素反応速度定数を求めた。

第四節 考 察

マッコウクジラ・オキシミオグロビンの安定性に関与している $\text{p}K_1 = 6.3$ を示す解離基 AH としては、64番目 (E 7) の遠位ヒスチジンが最有力と思われる。なぜなら、この残基のみがヘム鉄に結合している酸素分子に直接影響を与えることができるからである。

求められた各素反応速度定数を比較すると、水素イオンによって触媒される素過程が、水中で自発的に起こる素過程を上まわって、自動酸化反応の大部分を推し進めていることを示していた。もし 25℃において 1M のプロトンを含む溶液中で反応が起こった場合、オキシミオグロビンの半減期は 16 - 93 ms であることが計算される。これらの結果は、水素イオンが触媒する自動酸化反応は実際にはかなり速い反応であるが、生体内では水素イオン濃度が極端に低いために自動酸化が抑えられているということを示している。

従って、式〔3〕を使い、他の種類のオキシミオグロビンの安定性を定量的に解析することは、結合酸素の安定化機構を理解するために非常に有効な手段になると思われる。

第三章 サメ・オキシミオグロビンの精製と性質

第一節 序 論

魚類のミオグロビンは、N-末端がアセチル化されており、他の脊椎動物と比較して 4 - 6 残基程短いグロビン鎖を持っているが、その三次構造はマッコウクジラ・ミオグロビンと良く似ていることが報告されている。本章では、先ず三種類のサメからミオグロビンを精製し、その分光学的性質をマッコウクジラ・ミオグロビンと比較した。次に、部分アミノ酸配列を決定すること

によって、それぞれの遠位（E7）アミノ酸を同定した。

第二節 材料と方法

ネコザメ、エイラクブカ、ヒョウザメの各ミオグロビンは、その表層血合筋から、DEAE-cellulose 等によって精製した。E-セグメントを含むトリプシンペプチドを高速液体クロマトグラフィーで単離精製し、そのアミノ酸配列は手動エドマン法で決定した。

第三節 結果と考察

精製された三種類のサメ・オキシミオグロビンと、これまでに報告されているホ乳類のオキシミオグロビンの分光学的性質とを比較すると、それらはいずれも同一の性質を持っていた。

一方、メトミオグロビンについては、ネコザメのものがマッコウクジラと同一であったのに対して、ヒョウザメやエイラクブカのスペクトルは大きく異なっていた。このメトミオグロビンの典型的な二つの型は、 r -band と CT-band の吸光係数の比（ r/CT ）によって、明瞭に分けることができる。これは、ヘム近傍に大きな差異があるためと推定されたが、事実、遠位（E7）アミノ酸として、ネコザメ・ミオグロビンはヒスチジン残基を、エイラクブカ・ミオグロビンはグルタミン残基を含んでいた。

第四章 サメ・オキシミオグロビンの安定性

第一節 序 論

オキシミオグロビンの安定化機構をより詳細に理解するためには、マッコウクジラ・オキシミオグロビンの解析をもとに、他の動物から得られたオキシミオグロビンの安定性を比較検討することが重要であると思われる。本章では、遠位ヒスチジンを持つネコザメのミオグロビンと、遠位にグルタミン残基を持つエイラクブカのミオグロビンの安定性に対する pH 依存性を速度論的に解析した。

第二節 材料と方法

各オキシミオグロビンは、第三章に述べた方法により調製した。自動酸化反応は、0.1 M 緩衝液中、25℃の条件下で測定した。

第三節 結 果

ネコザメ・オキシミオグロビンの自動酸化速度は、マッコウクジラと比較すると、全 pH 領域で約 10 倍程高い値を取っているが、その pH 依存性は極めて良く類似していた。加えて、このミオグロビンは、自動酸化の酸触媒残基として提案されている遠位ヒスチジンを持つので、その pH 依存性は式〔3〕を用いて解析された。

一方、エイラクブカ及びヒョウザメいずれの場合にも、その自動酸化速度は水素イオン濃度の増加と共に増大したが、pH 6 以下ではそれぞれ一定の値に飽和する傾向を示した。この点は、マッコウクジラやネコザメの場合とは著しく異なっている。これは、エイラクブカ・ミオグロビンの遠位（E7）アミノ酸、ヒスチジンではなくグルタミンに置換されているという、構造的な差異に起因しているものと思われる。

エイラクブカやヒョウザメのオキシミオグロビンの自動酸化反応は、最終的に次のように説明された。すなわち、ミオグロビン分子中のある解離基 XH の解離状態によって、オキシミオグロビンには A' (XH), B' (X⁻) の二状態が生じ、それらはモル分率 α' 及び β' ($= 1 - \alpha'$) で平衡関係にある。そして、それぞれが H₂O 分子或は OH⁻ イオンによって O₂⁻ を核置換して metMb に変わる。従って、その一次反応速度定数 k_{obs} は次式で与えられる。

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{O}}^{\text{A}'} [\text{H}_2\text{O}] (\alpha') + (k_{\text{O}}^{\text{B}'} [\text{H}_2\text{O}] + k_{\text{OH}}^{\text{B}'} [\text{OH}^-]) (\beta') \quad [5]$$

$$\text{ここに } \alpha' = [\text{H}^+]^n / ([\text{H}^+]^n + K_a^n), \beta' = 1 - \alpha' \quad [6]$$

である。

ここで K_a は解離基 XH の解離定数を表わす。式 [5] は、“触媒プロトン”を含まないという点で式 [3] とは根本的に異なっている。式 [5] を用いて、各素反応過程の速度定数、解離定数及び n 値を求めた。

第四節 考察

ネコザメ・オキシミオグロビンの安定性に関与している $\text{p}K_1 = 7.25$ の解離基は、マッコウクジラの場合と同様、遠位 (E7) ヒスチジンであろう。ネコザメ・ミオグロビンの k_{O}^{A} と k_{O}^{B} の値は、マッコウクジラの場合よりも十倍程高い値として求めたが、これは、ネコザメ・ミオグロビンのヘムポケットが、かなり開いた構造になっていて H₂O 分子の攻撃を受けやすいためと考えられる。

非解離性のグルタミン残基を遠位アミノ酸として持つエイラクブカやヒョウザメの場合には、その自動酸化速度は水素イオンによっては触媒されなかった。このことから、自動酸化を促進する触媒基としての遠位ヒスチジンの役割が間接的に証明された。

第五章 総合考察

種々の材料から調製されたオキシミオグロビンの安定性を詳細に検討した結果、その安定化機構には次の二つの要因が関与しているものと考えられる。

(1) ヘム環境

オキシミオグロビンの自動酸化は、H₂O 分子や OH⁻ イオンが FeO₂ 中心を攻撃して O₂⁻ を核置換する反応であると理解されるから、反応の場であるヘム・ポケットの環境は非常に重要である。この点に関する情報を与えてくれるのは、式 [3] と [5] から求められる k_{O} 及び k_{OH} の値である。

マッコウクジラとネコザメ・ミオグロビンでは、想定されたオキシ型の状態に関係なく、それらの k_{O} はいずれもほぼ同じ大きさの値を取っている。これはオキシミオグロビンがどの状態でも、pH に関係なくほぼ同一のヘム環境を保持していることを示す。

(2) 遠位 (E7) アミノ酸の影響

オキシミオグロビンの安定化機構に及ぼす遠位アミノ酸の影響には、次の二つの相反する効果が考えられる。先ず第一は、遠位アミノ酸が結合酸素分子と水素結合することによって、酸素分

子を安定化させるというプラスの効果である。

第二は、遠位ヒスチジンが自動酸化の酸触媒残基として働くという、ミオグロビンの安定性に対してはマイナスの効果である。自動酸化を最も促進する触媒性プロトンが、遠位ヒスチジンを經由して O_2 にわたされるというこの提案は、比較生化学的に検証された。

以上、ミオグロビンが酸素分子を安定化させ、その生理機能を果たすためには、上述したヘム環境と遠位のアミノ酸が深く関与していることが明らかとなった。一般に下等動物のミオグロビンと比較して、高等動物のミオグロビンが自動酸化に対して高い抵抗性を示すという事実は、生物が酸素分子を安定化させる機構を、進化の過程で徐々に獲得してきたことを物語るものであろう。

論文審査の結果の要旨

鈴木知彦提出の論文は、ヘム蛋白質であるミオグロビンが結合酸素を安定化する機構を、比較生化学的に解明しようとしたものである。

ミオグロビン (Mb) が酸素分子 (O_2) を可逆的に結合しうるのは、そのヘム鉄の原子価が 2 価の状態のときである。しかしオキシミオグロビン (MbO_2) は、その結合酸素によって容易に酸化されて、ヘム鉄の原子価が 3 価の状態のメトミオグロビン (metMb) となり、その酸素結合能を失ってしまう。

本研究では、まず、その分子構造が最も良く分っているマッコウクジラの MbO_2 につき、上記の自動酸化反応を pH 5 から 13 迄の広い領域に渡って詳細に測定した。そして得られた一次反応速度定数を pH に対してプロットしてみると、その自動酸化速度は、水素イオン濃度の増加と共に急激に増大した。そこで、この pH 依存性を解析した結果、酸触媒過程 (k_H) が反応の大部分を推し進めていることが分った。そしてこの過程は、結合酸素と水素結合をしている遠位 (E7) の His 残基を介して発現されるものと考えた。

ところで、数種のサメの表層血合筋から Mb を単離精製して、そのアミノ酸配列を調べたところ、エイラクブカやヒョウザメでは遠位の His がグルタミンに置換されていることが分った。そこで、これらのサメの MbO_2 の自動酸化反応を測定し、マッコウクジラの場合と比較してみた。その結果、遠位 His を持つネコザメの MbO_2 はマッコウクジラの場合と同様な pH 依存性を示したが、エイラクブカやヒョウザメの場合には、その pH 依存性は全く異なり、酸触媒項 (k_H) を欠いていることが分った。これらの知見を基にして、ミオグロビンが結合酸素を安定化する際に、遠位 His の果す役割について、分子進化の立場からも考察を加えている。

以上、本研究により、本人が自立して研究活動を行なうために必要な高度の研究能力と学識を有することが示された。よって鈴木知彦提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。