

図13 S92VのKCN結合性

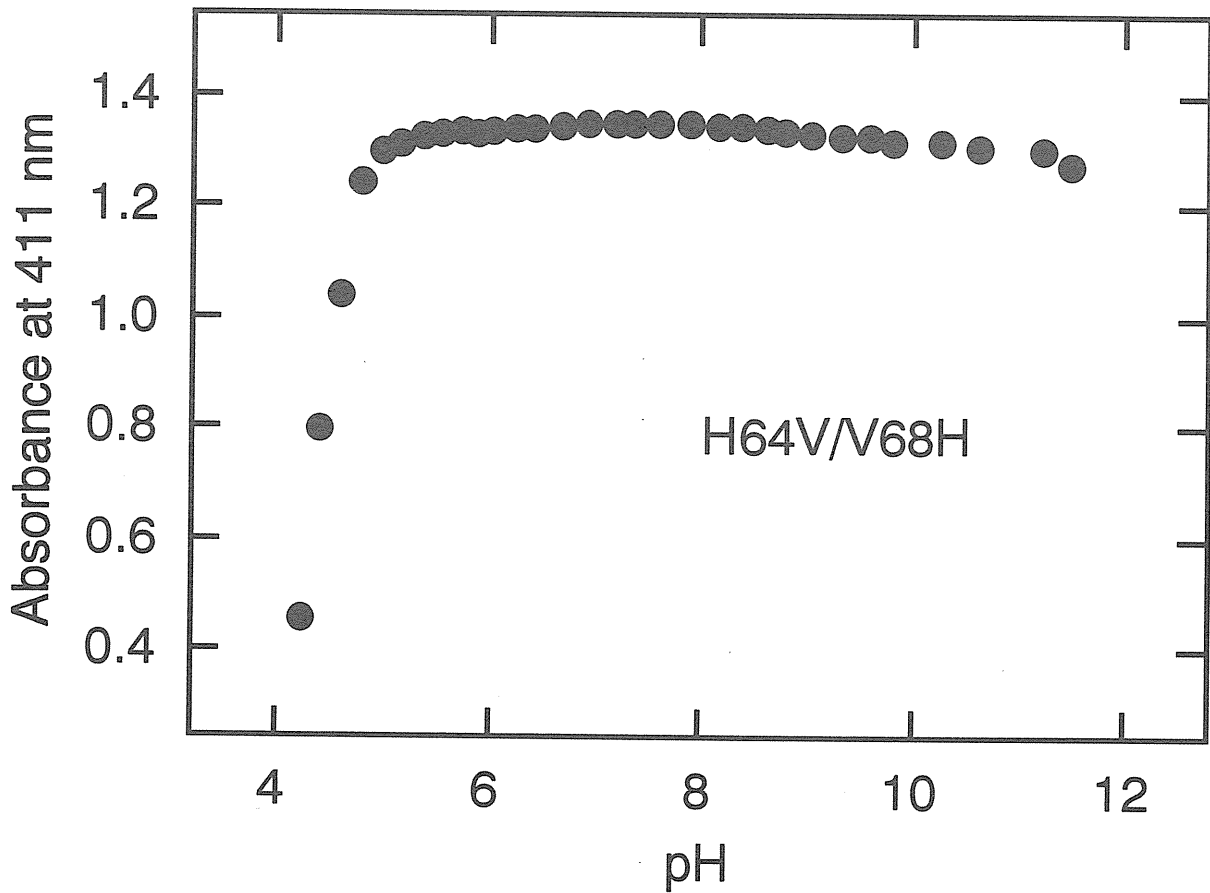
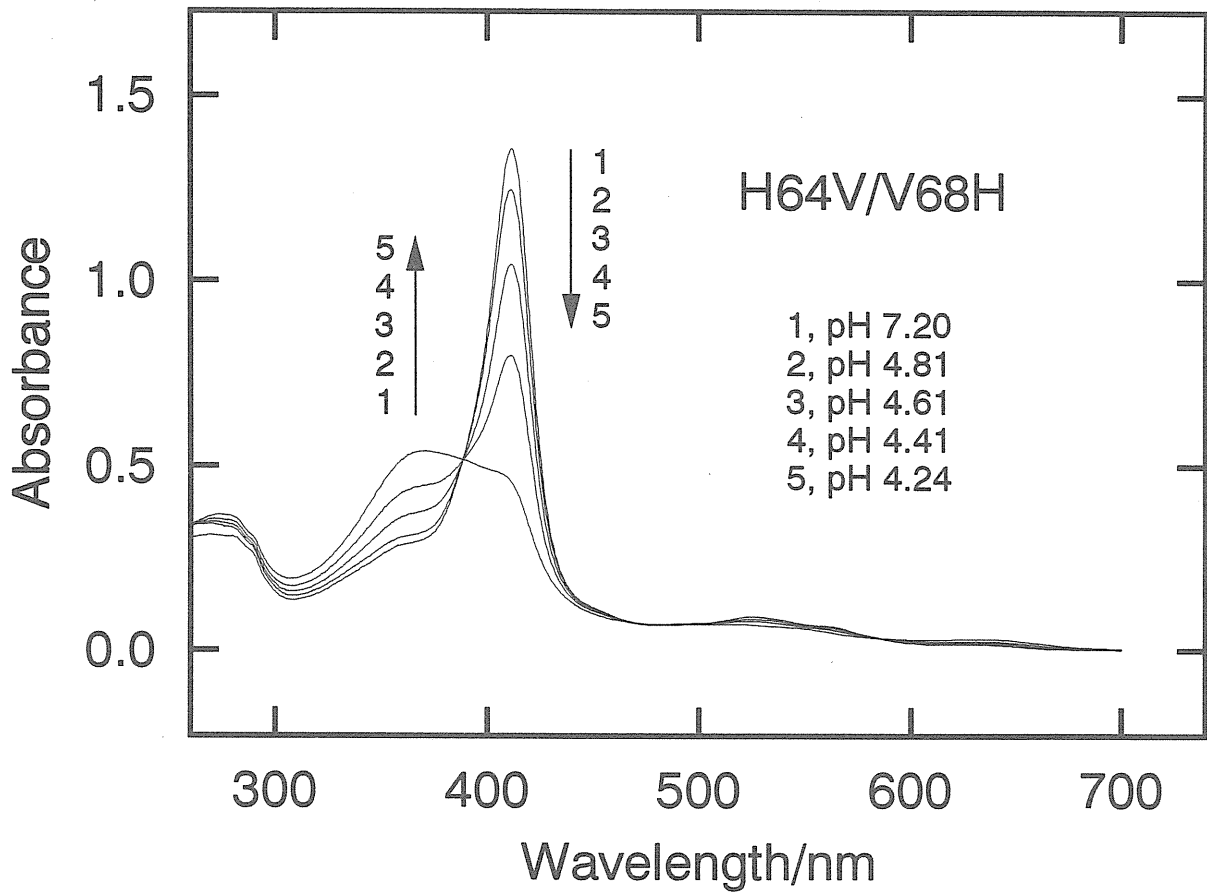


図14 H64V/V68HミオグロビンのpH依存性

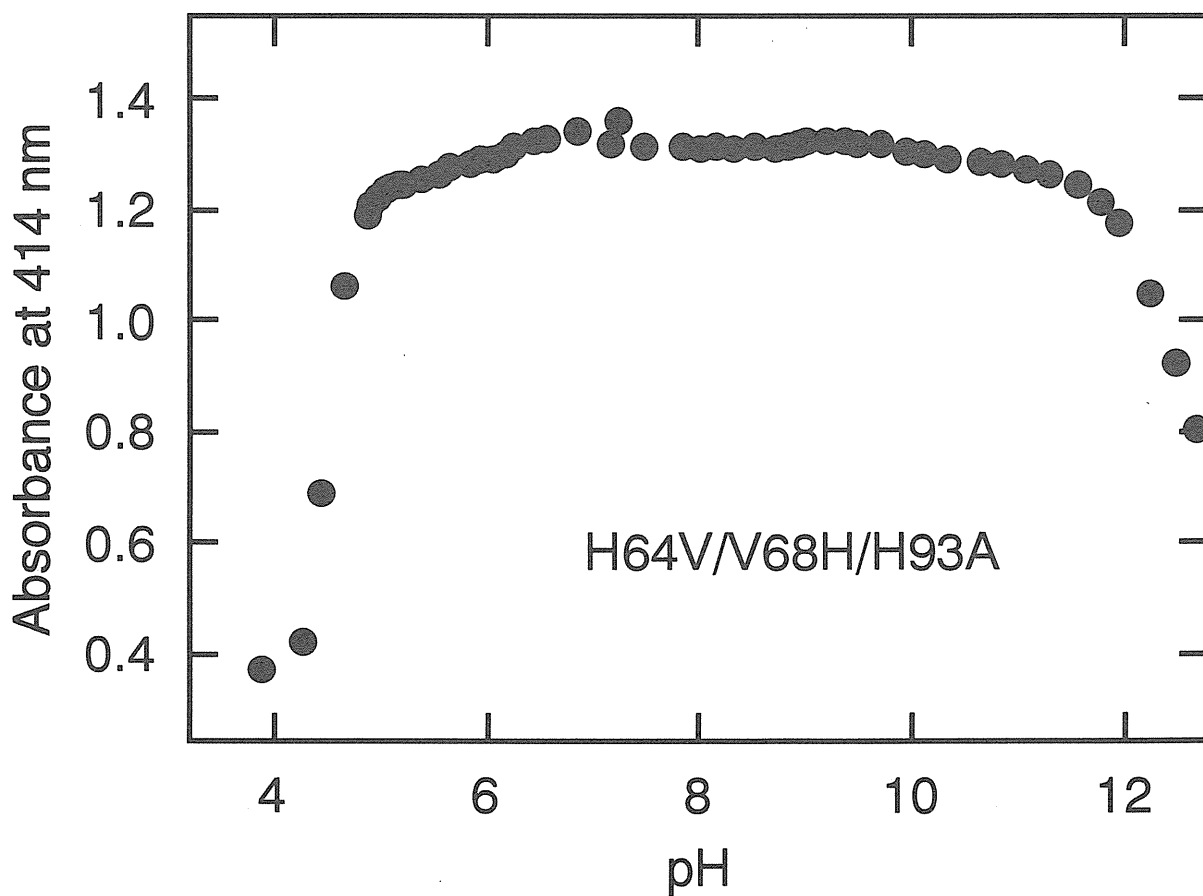
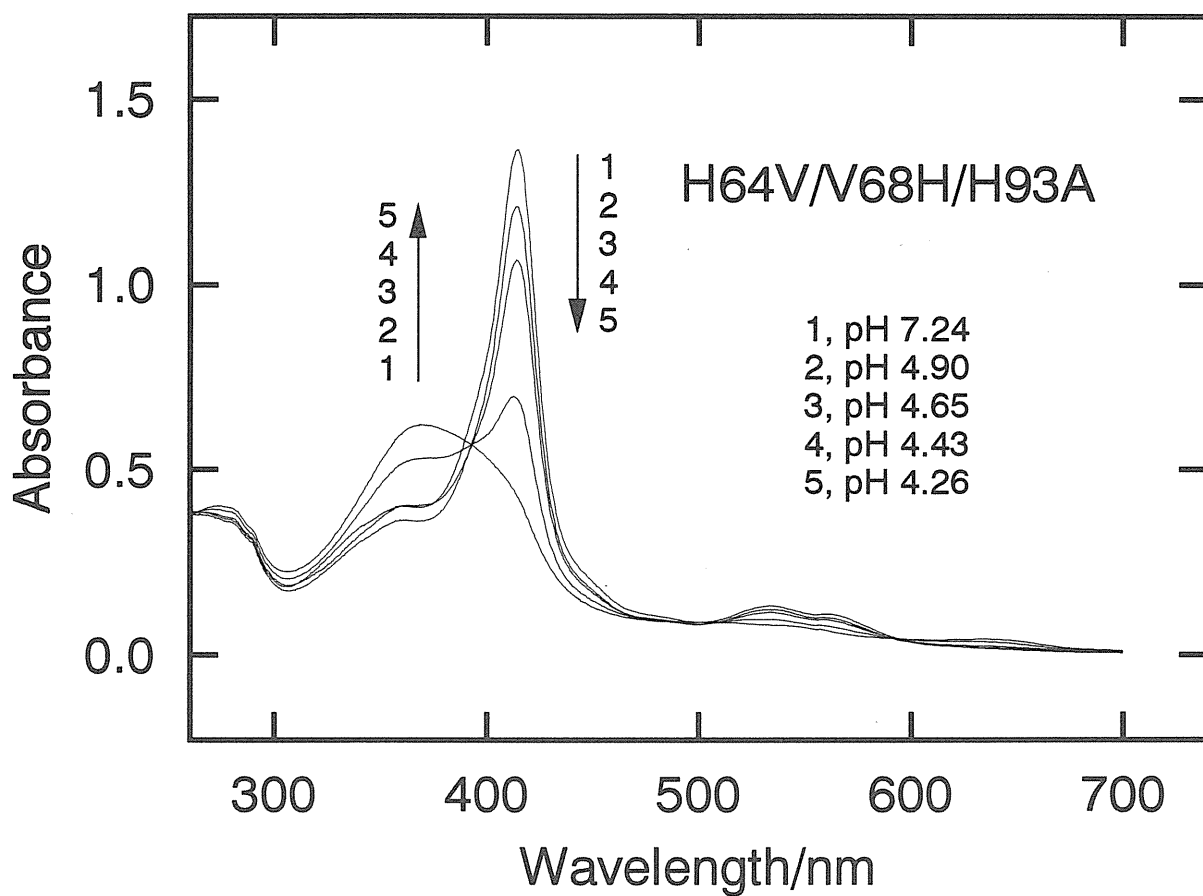


図15 H64V/V68H/H93AのpH依存性

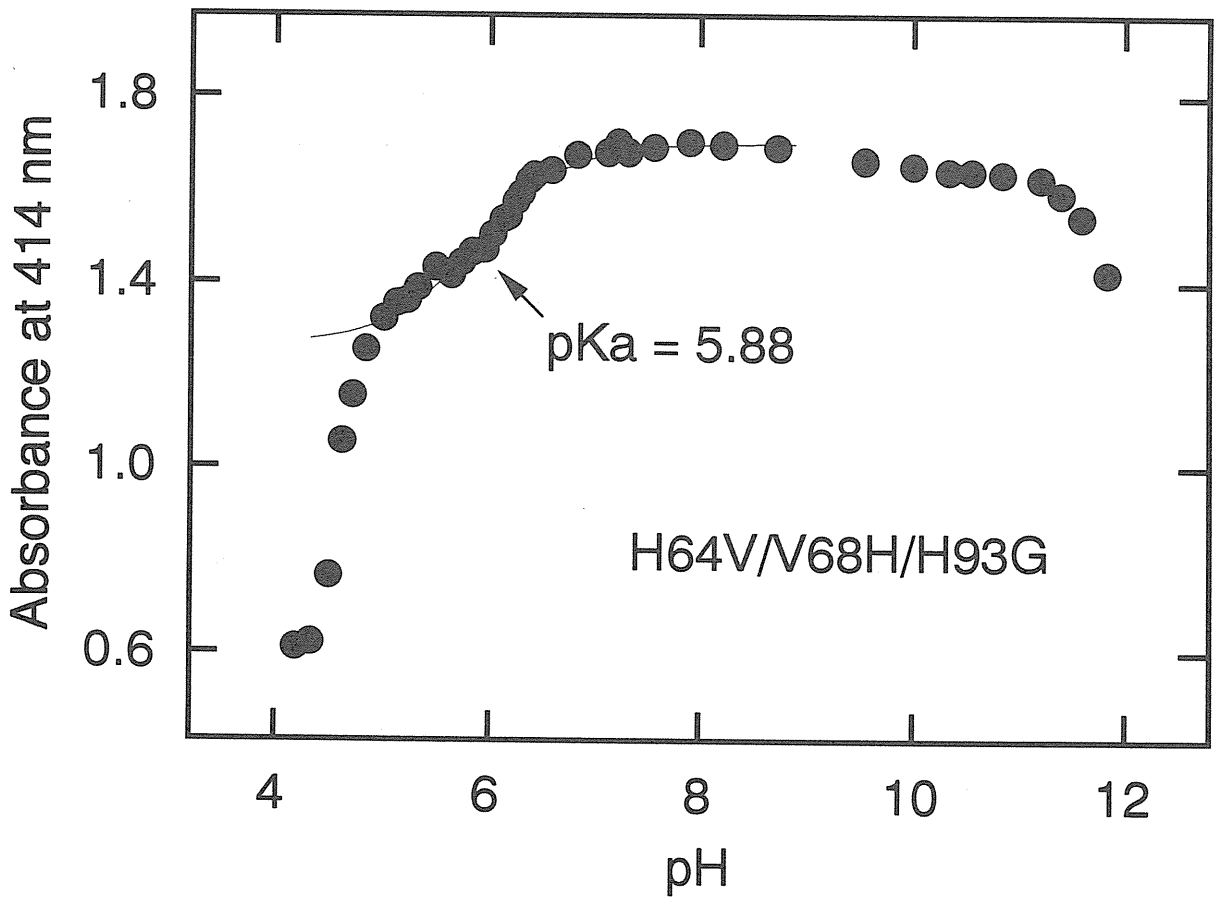
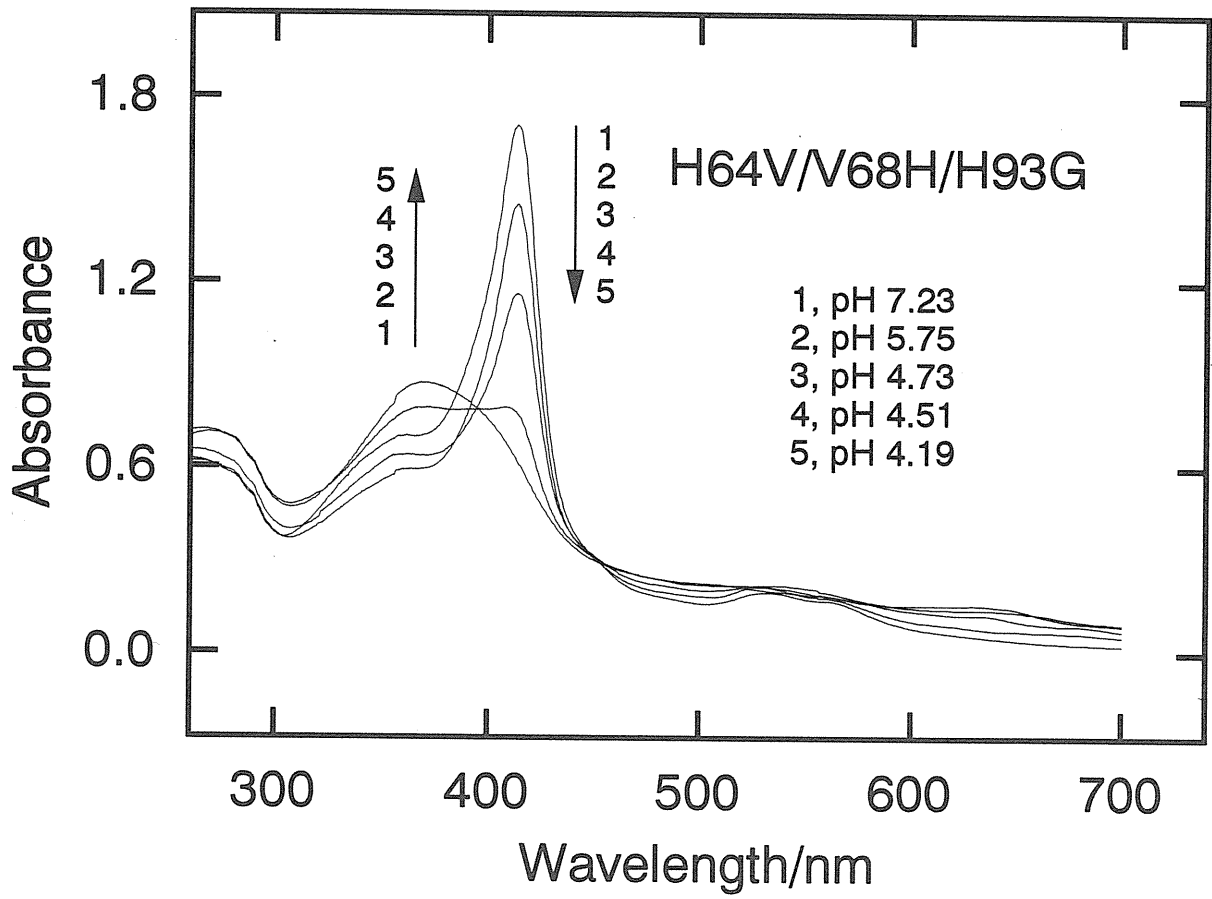


図16 H64V/V68H/H93GのpH依存性

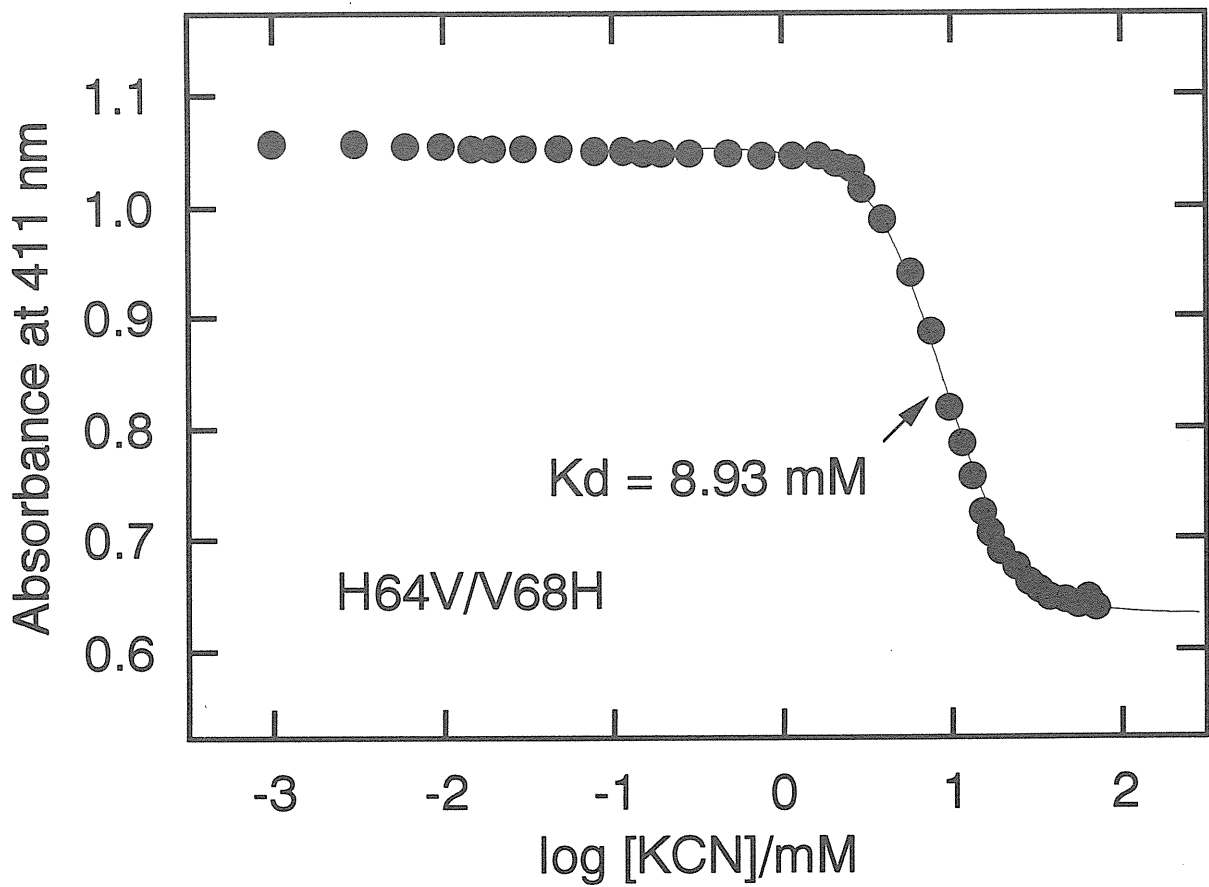
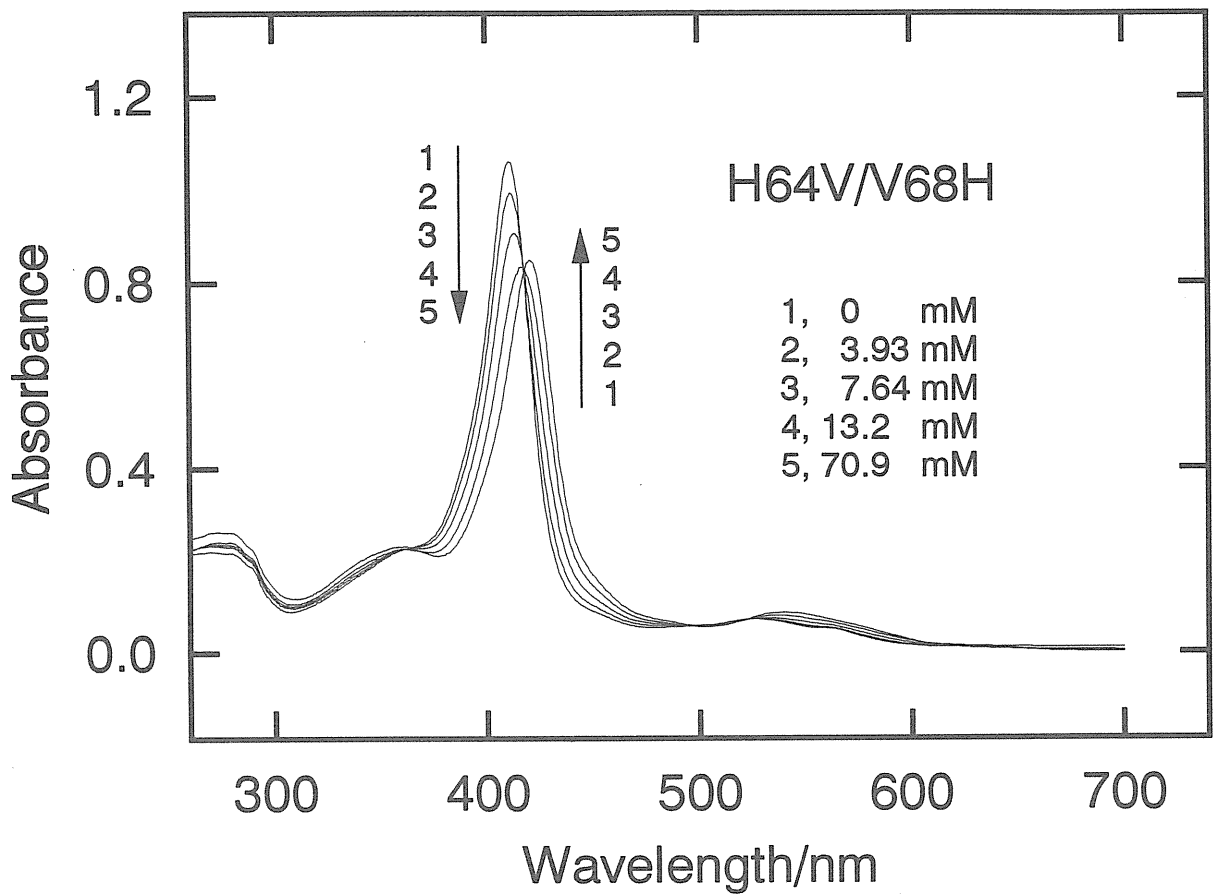


図17 H64V/V68HのKCN結合性

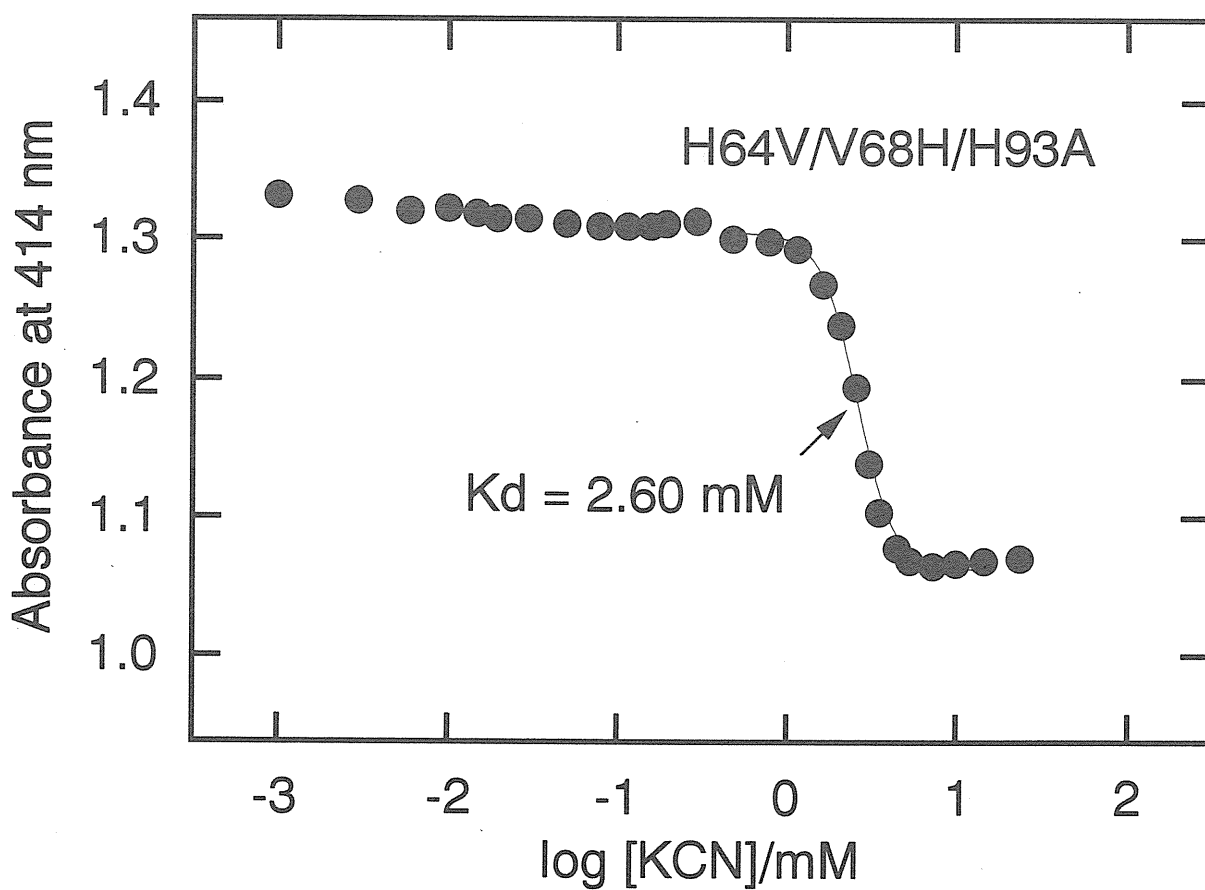
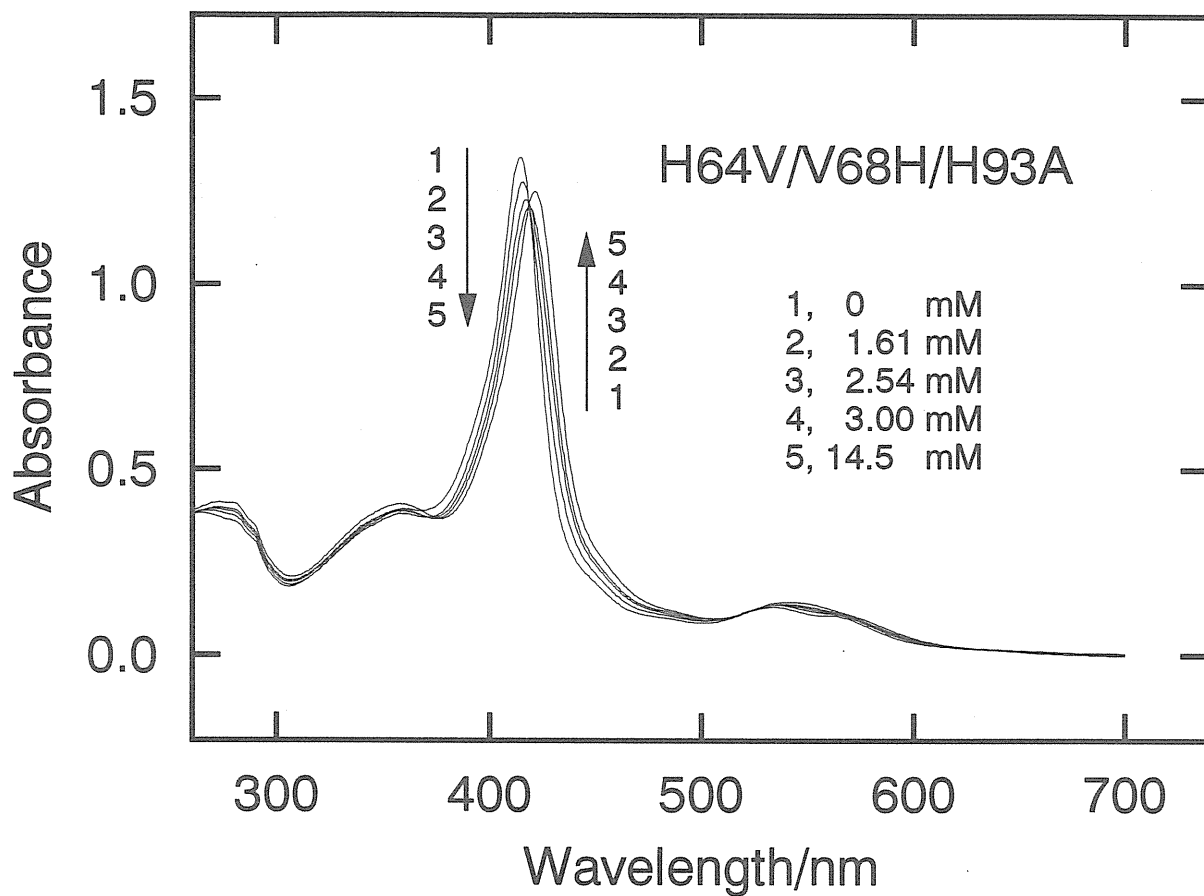


図18 H64V/V68H/H93AのKCN結合性

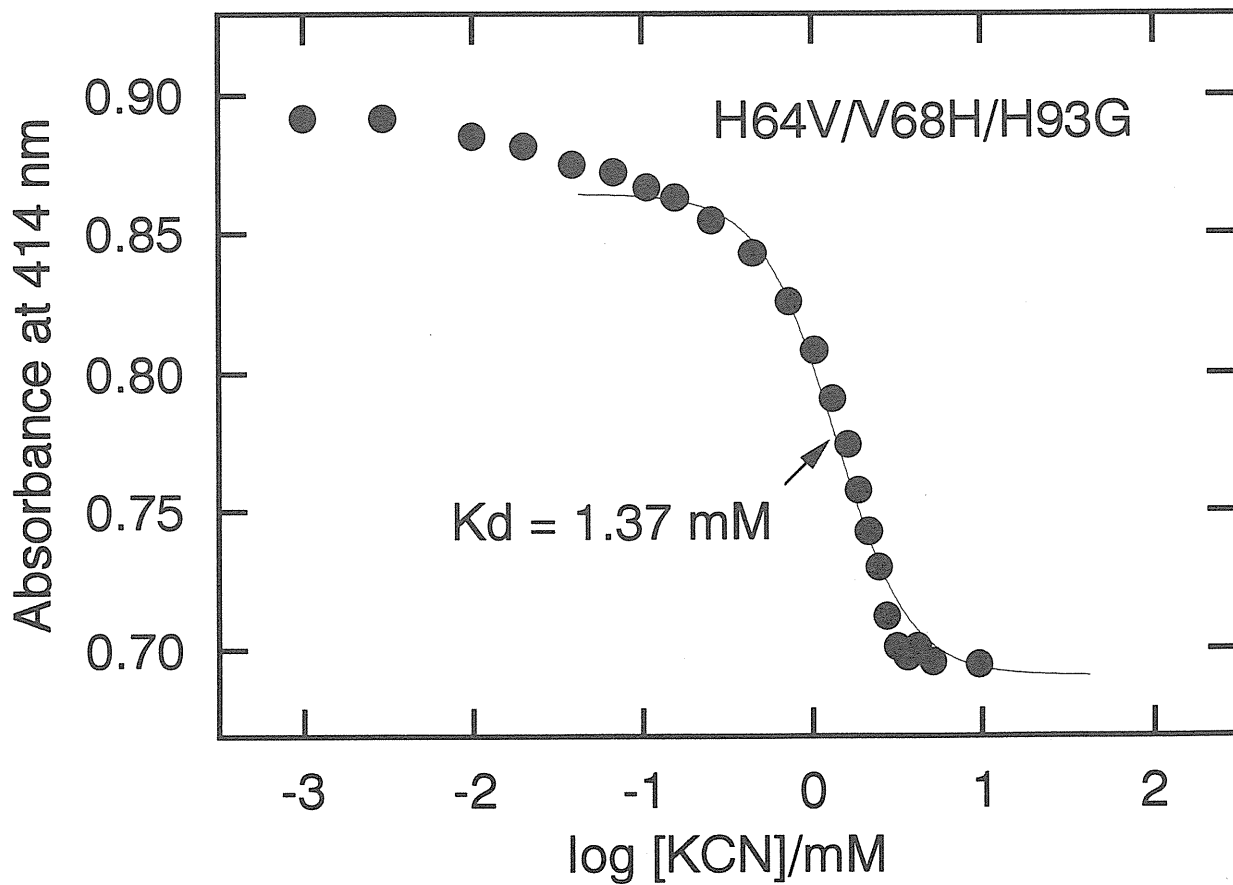
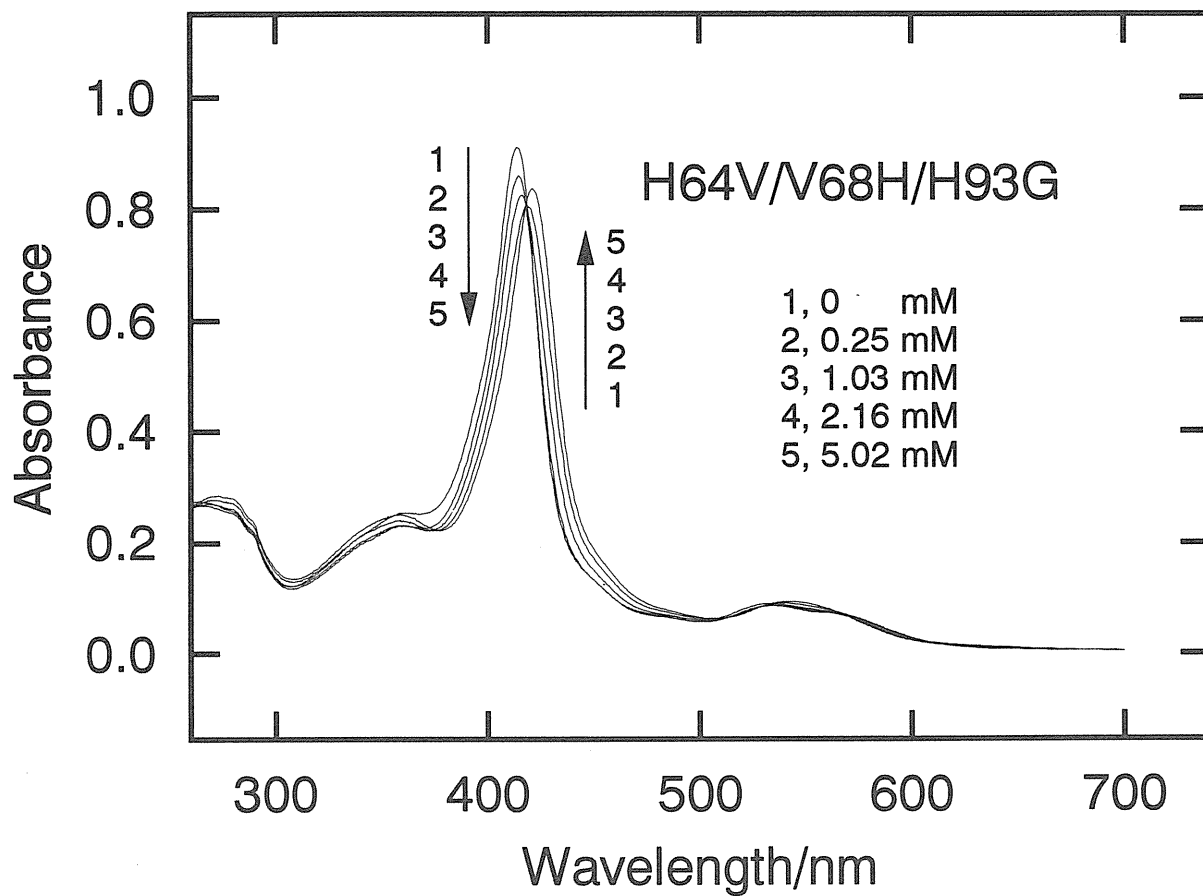


図19 H64V/V68H/H93GのKCN結合性

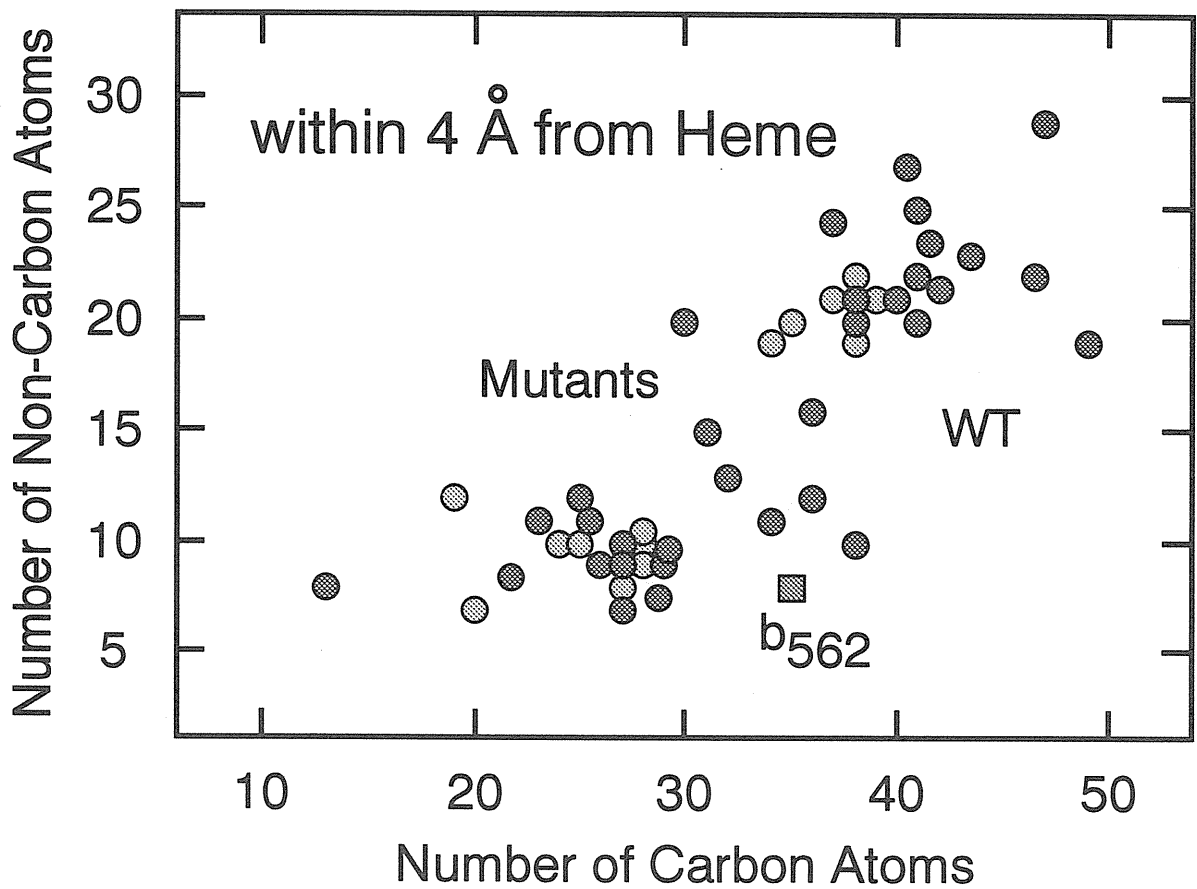


図20 ヘムから4 Å以内に存在する炭素原子数と非炭素原子数の相関

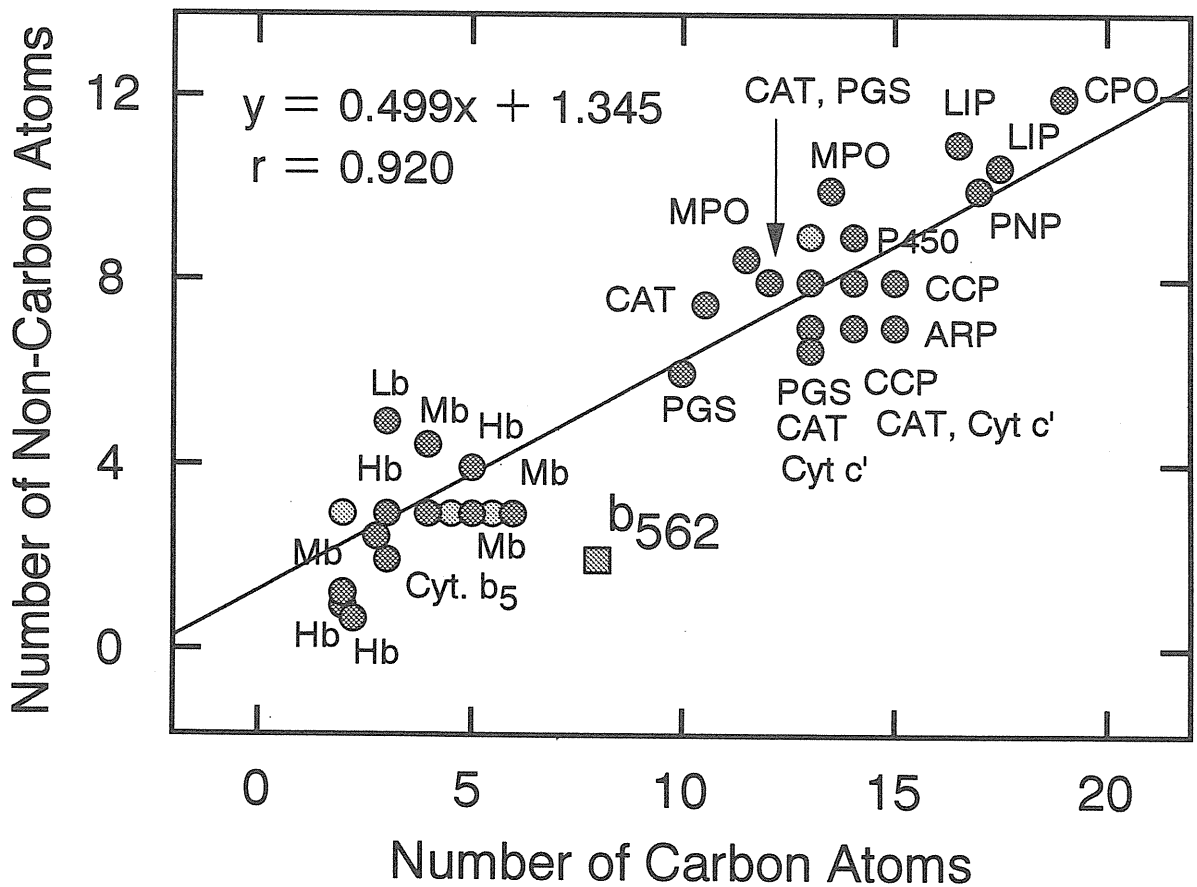


図21 プロピオン酸酸素から4 Å以内に存在する炭素原子数と非炭素原子数の相関

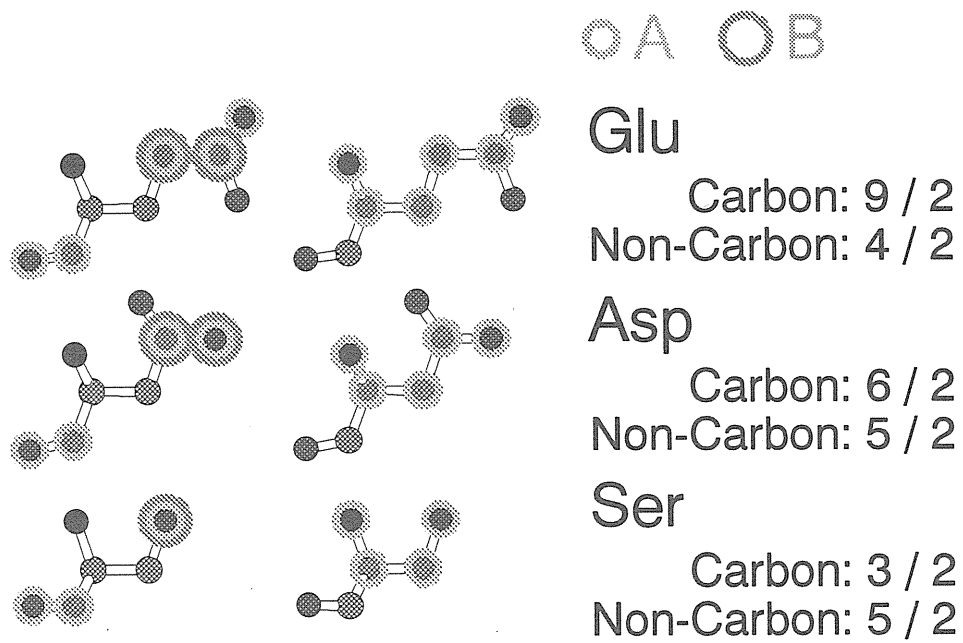


図22 シトクロム変異体の作成戦略

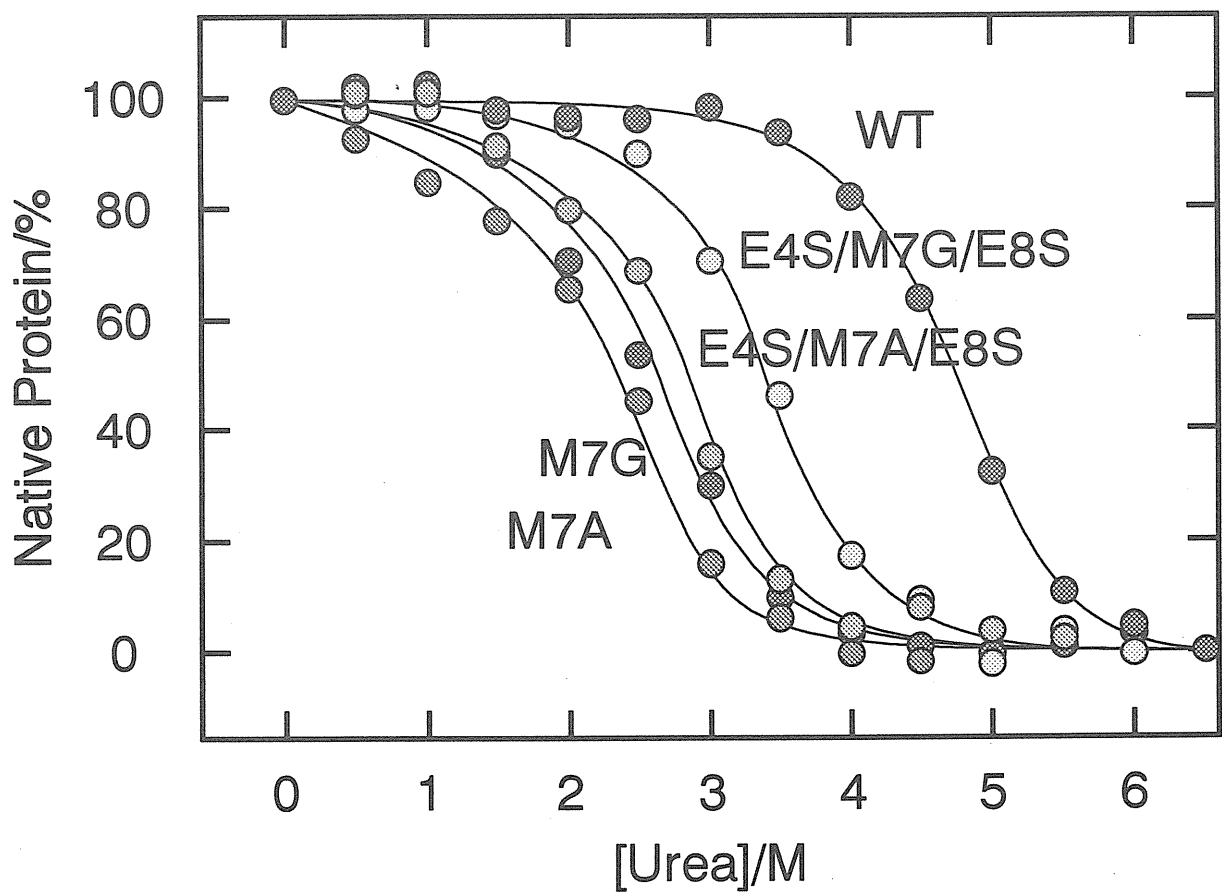


図23 シトクロムb562の尿素変性

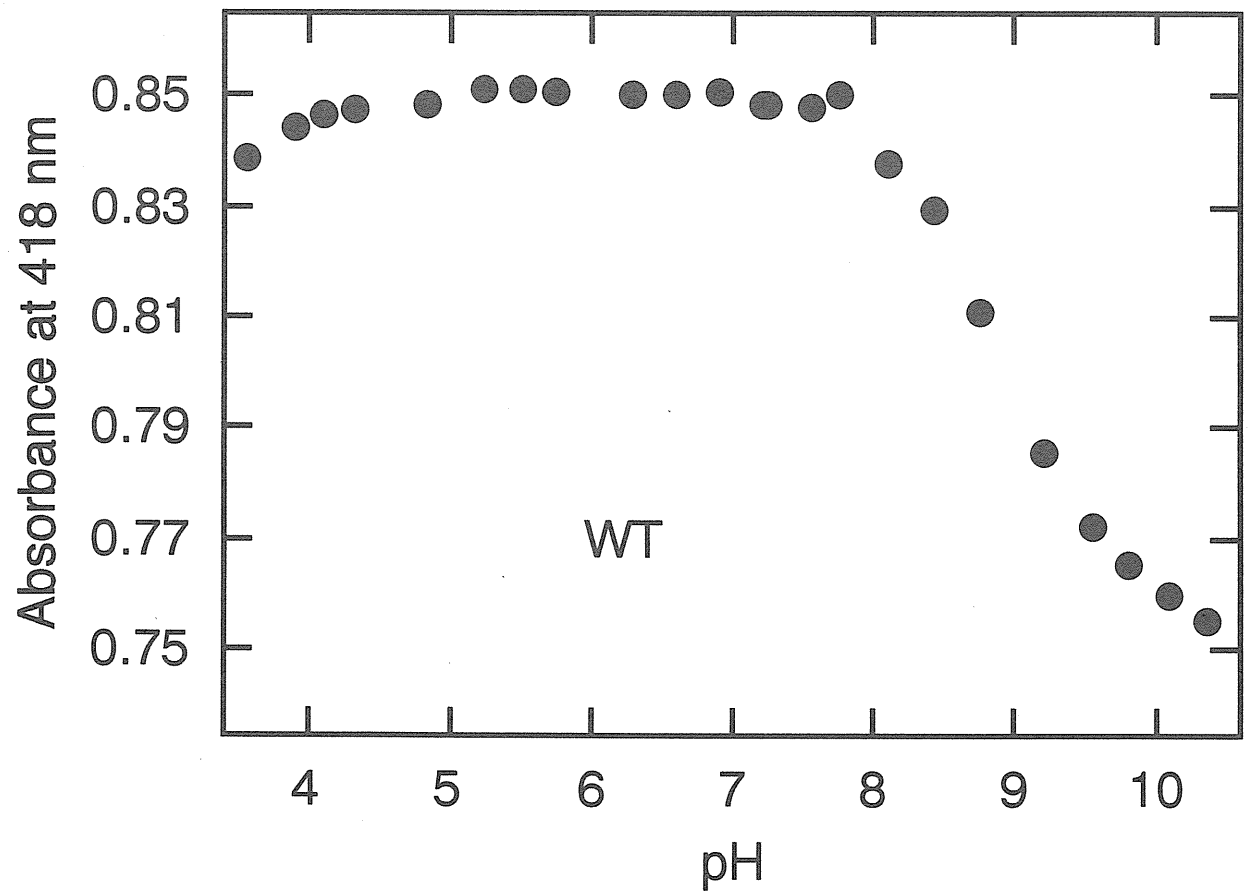
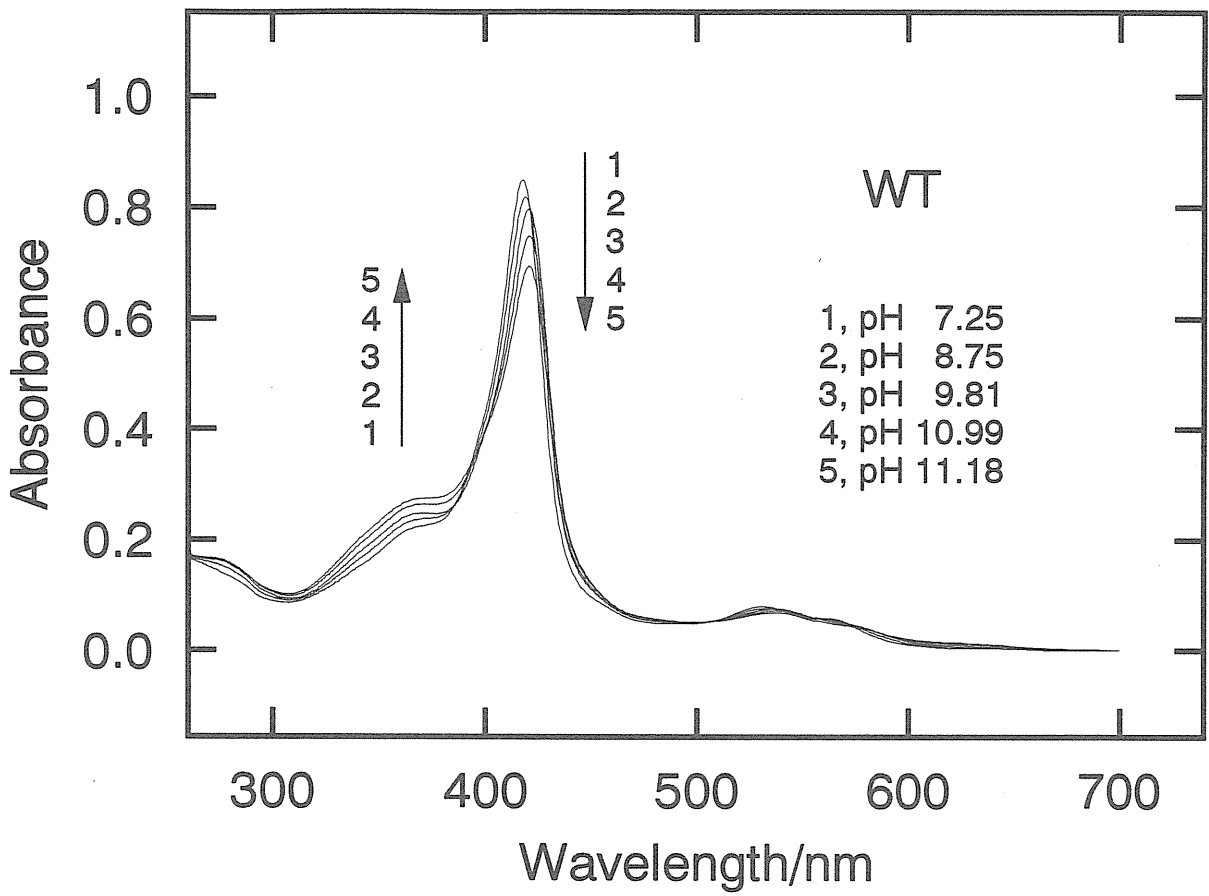


図24 野生型シトクロムb562のpH依存性

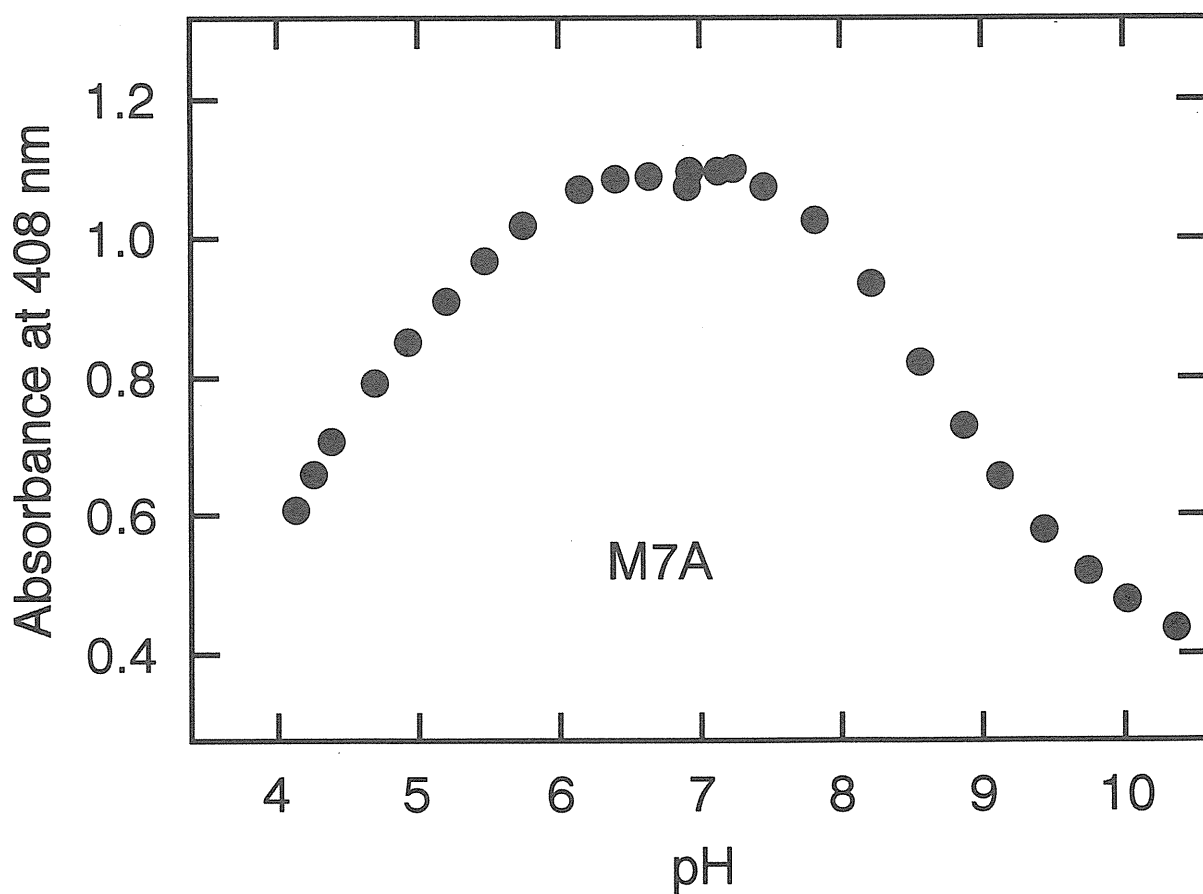
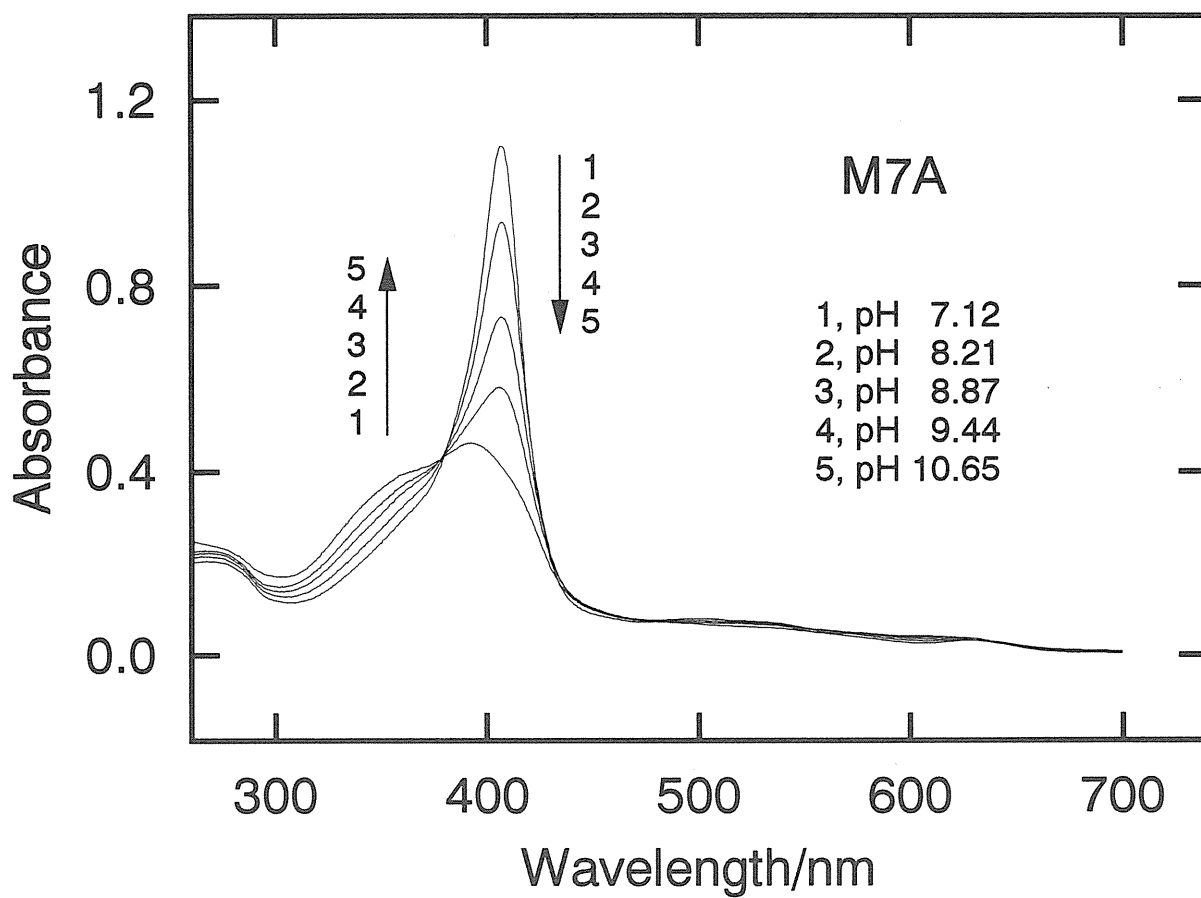


図25 M7AのpH依存性

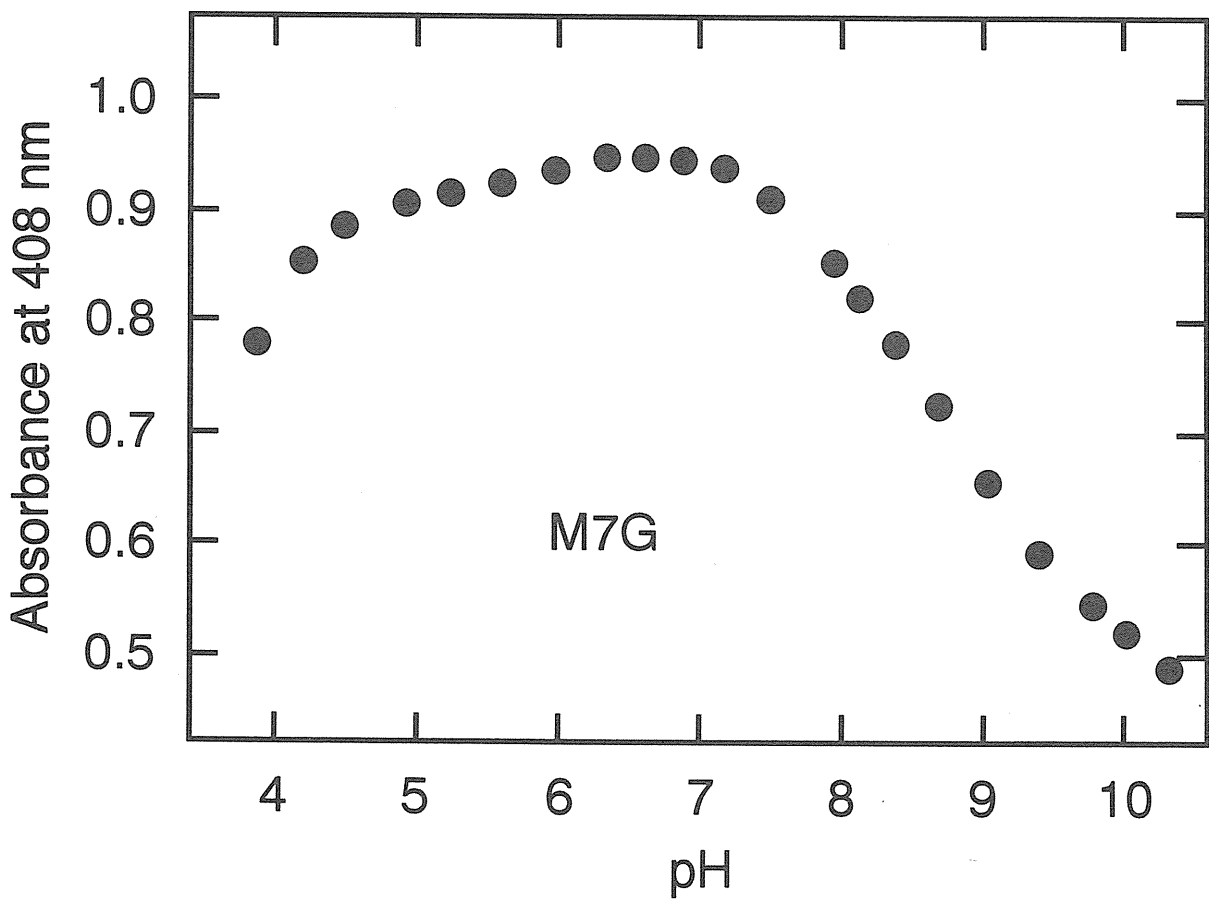
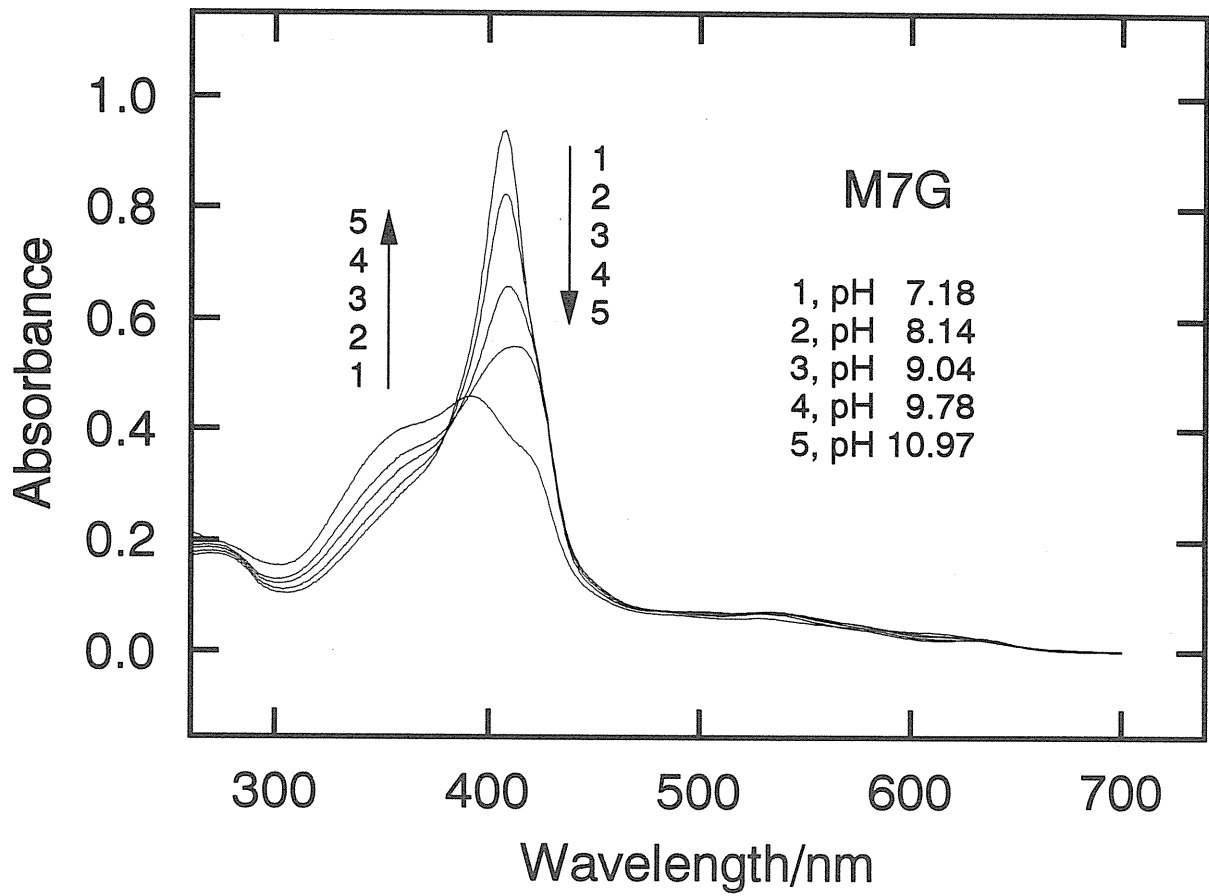


図26 M7GのpH依存性

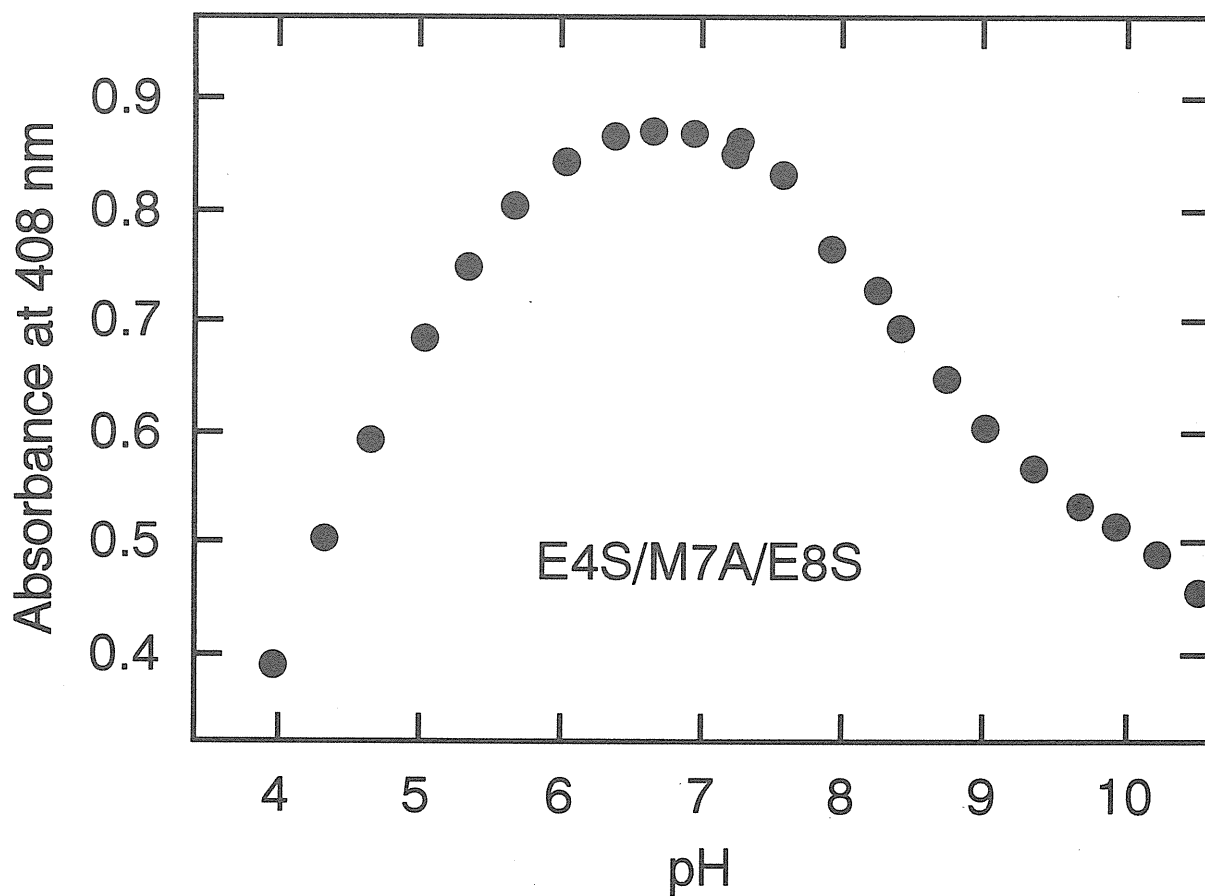
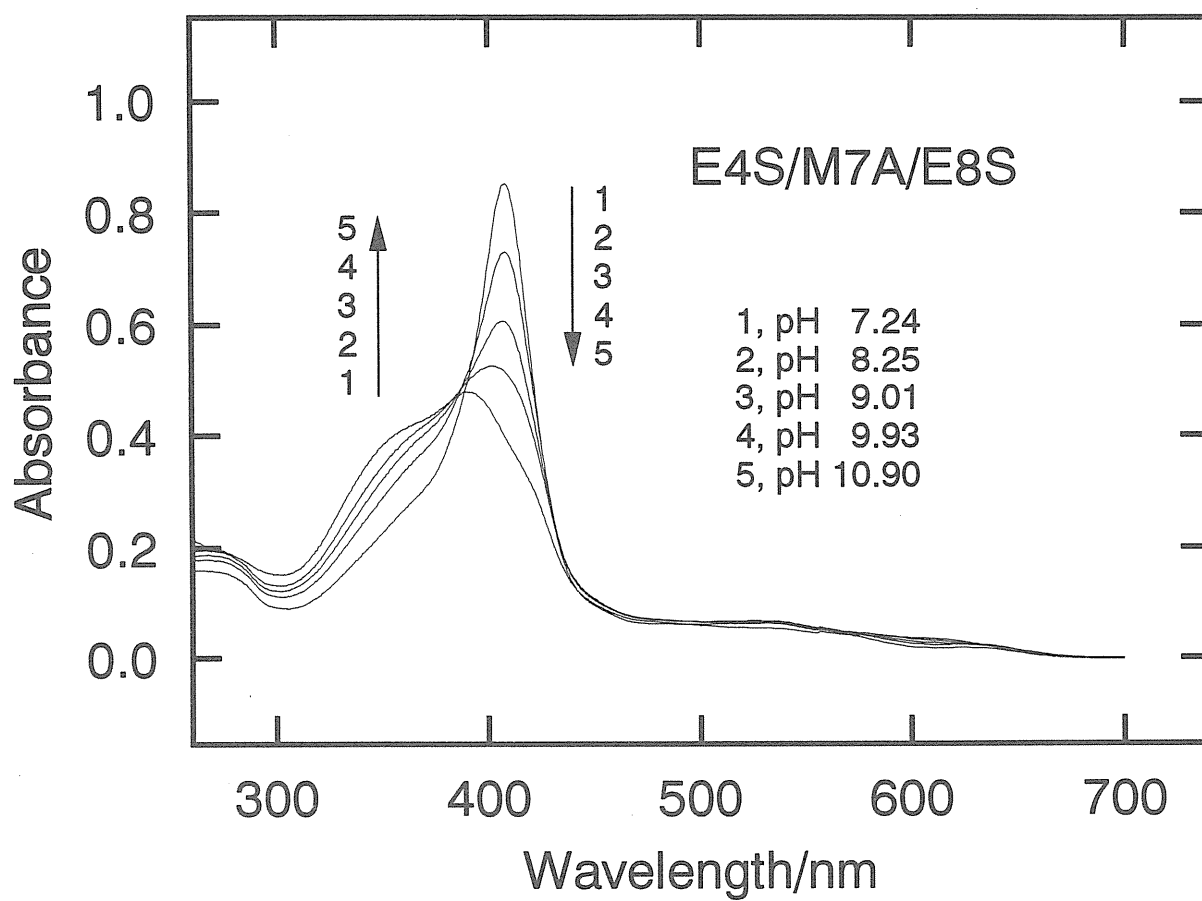


図27 E4S/M7A/E8SのpH依存性

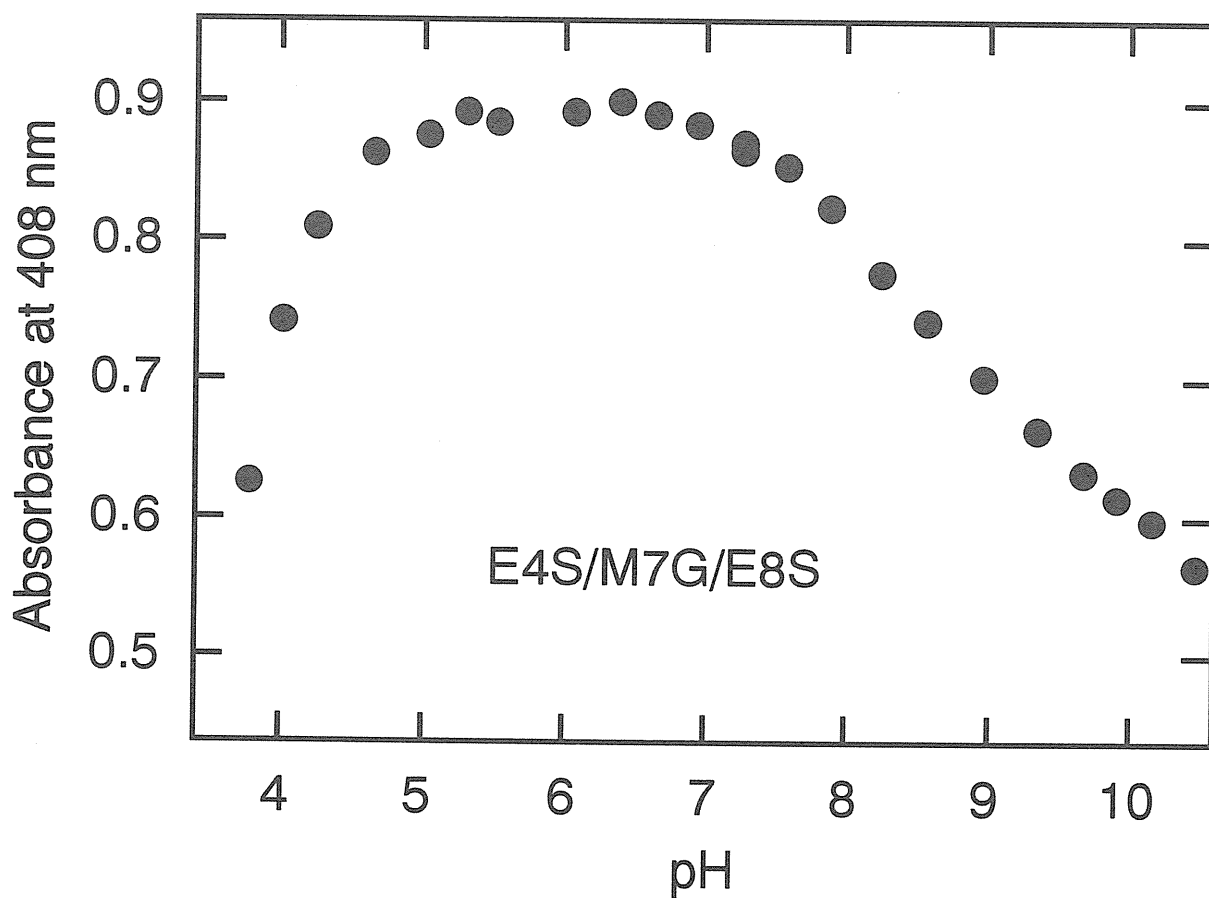
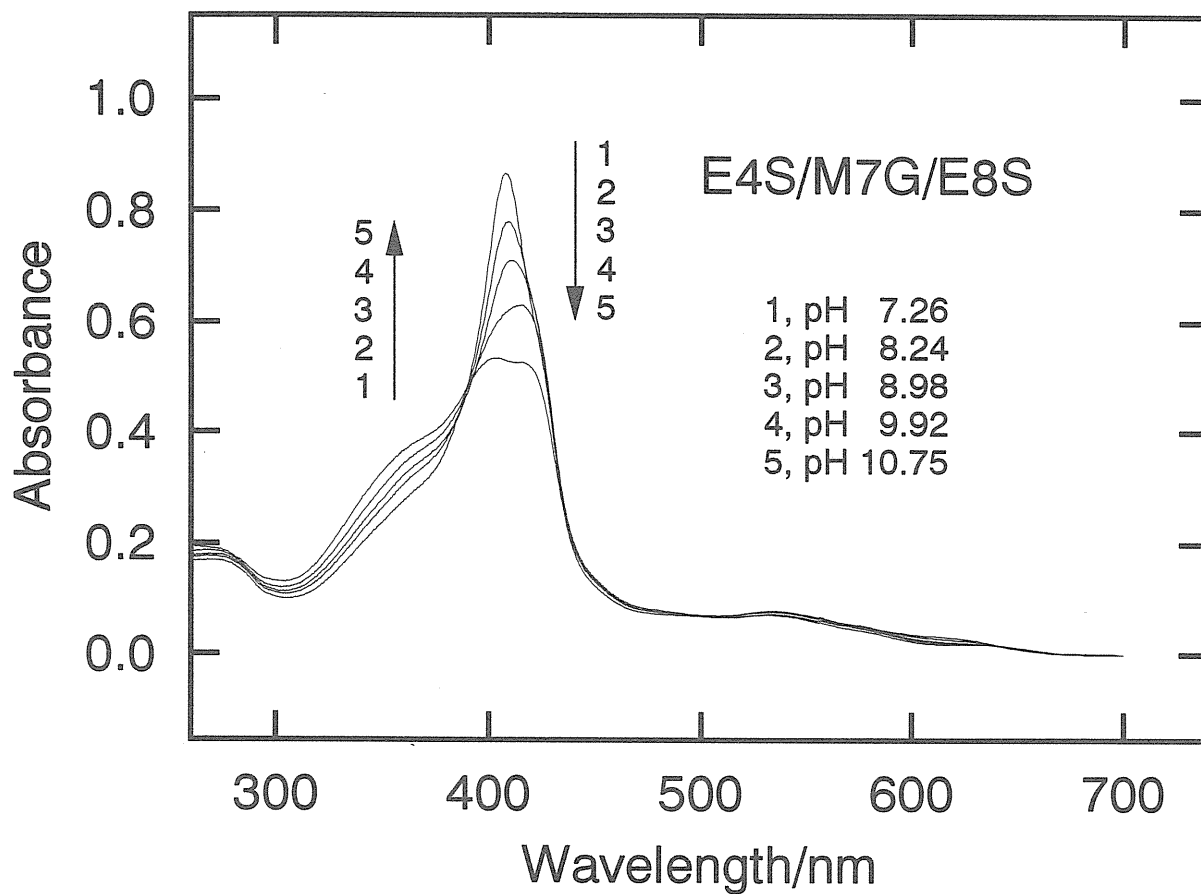


図28 E4S/M7G/E8SのpH依存性

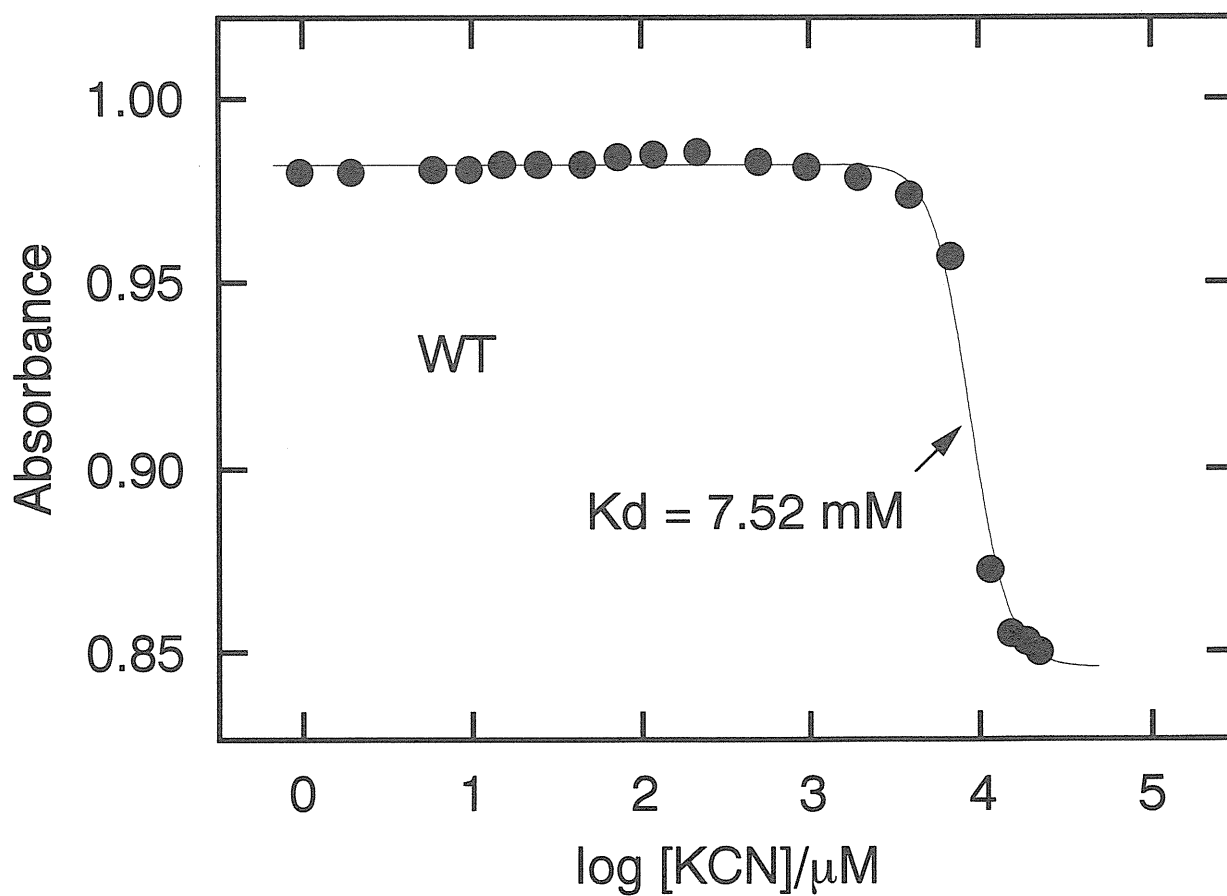
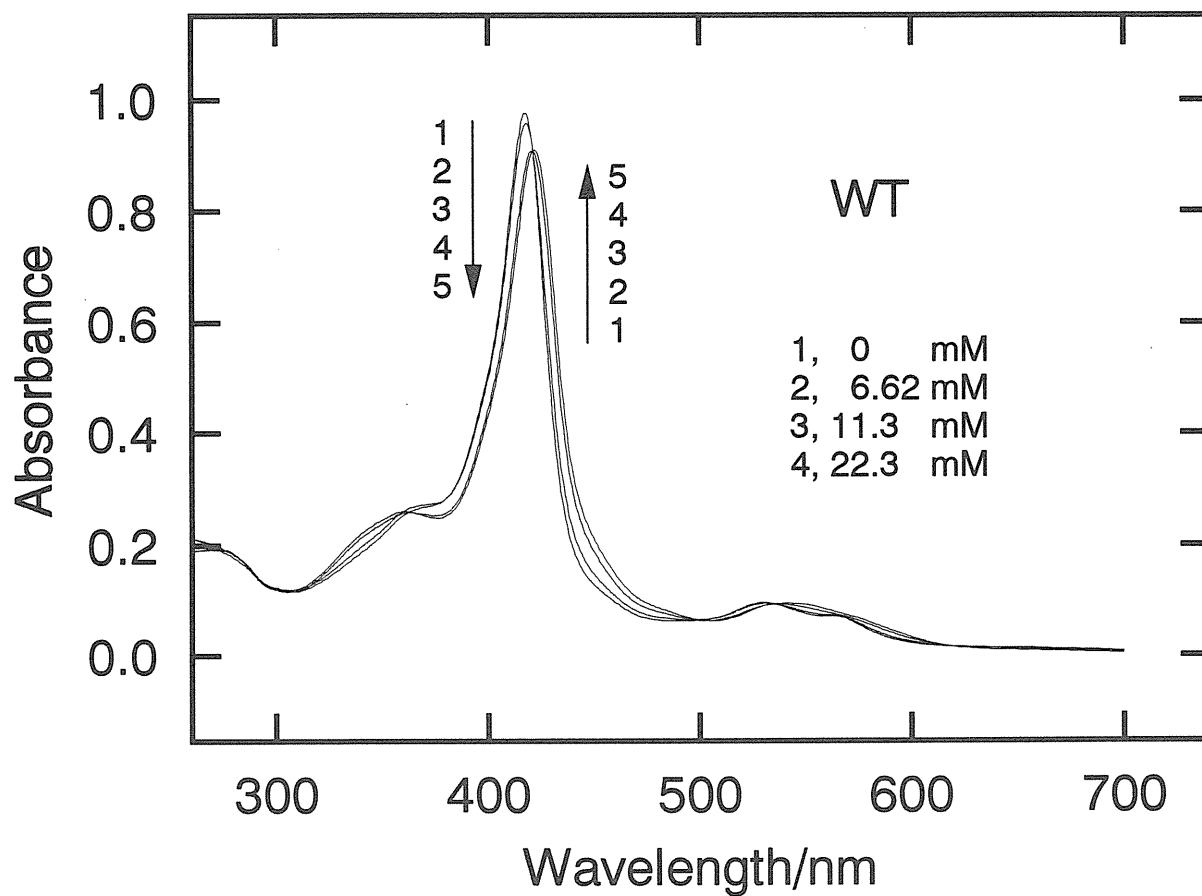


図29 野生型シトクロムb562のKCN結合性

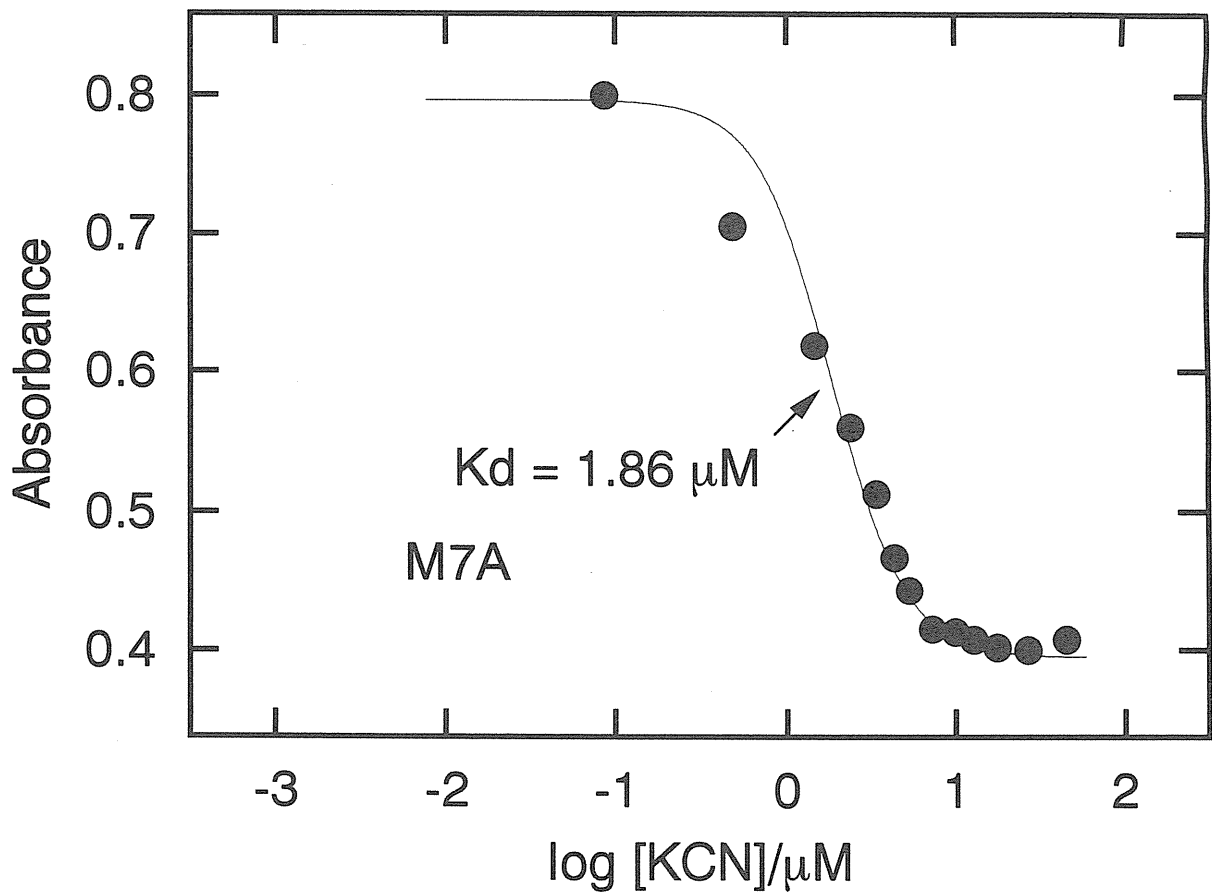
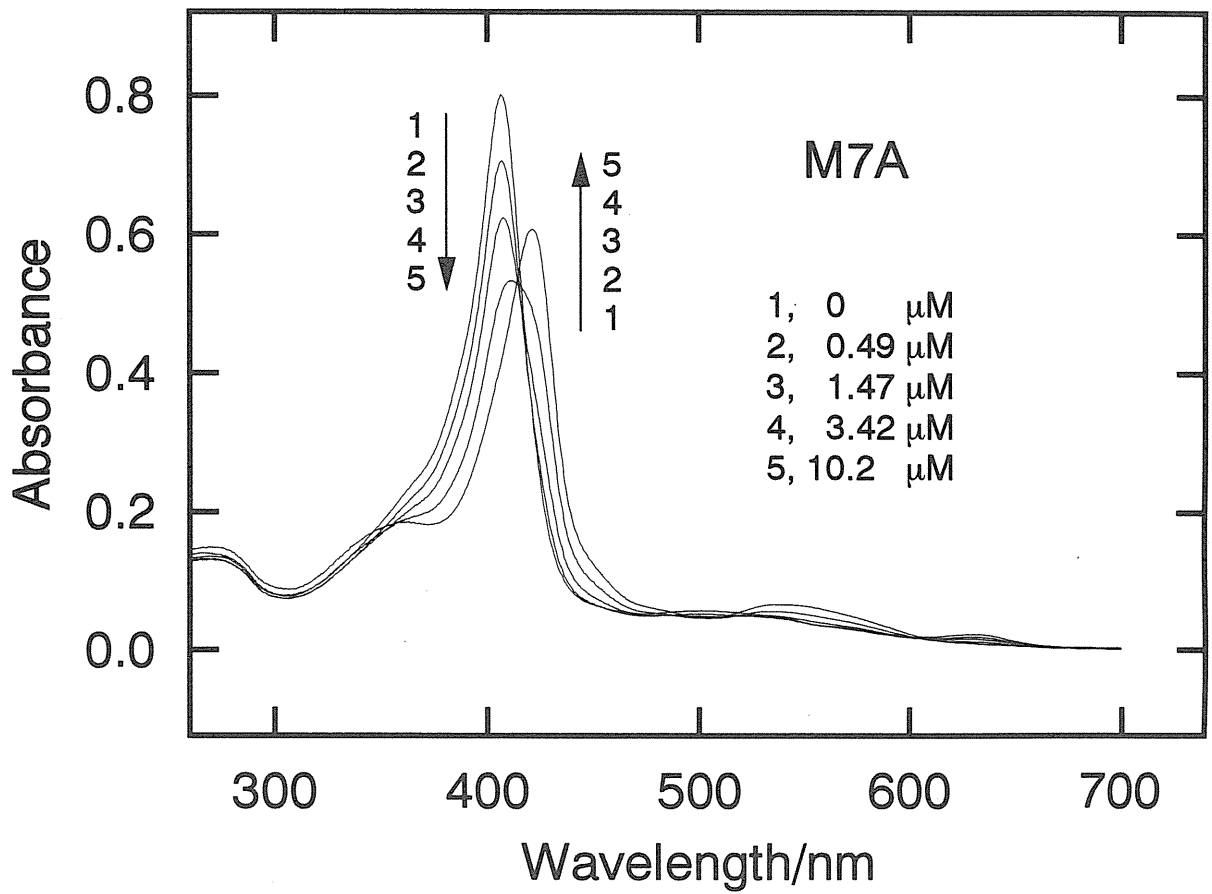


図30 M7AのKCN結合性

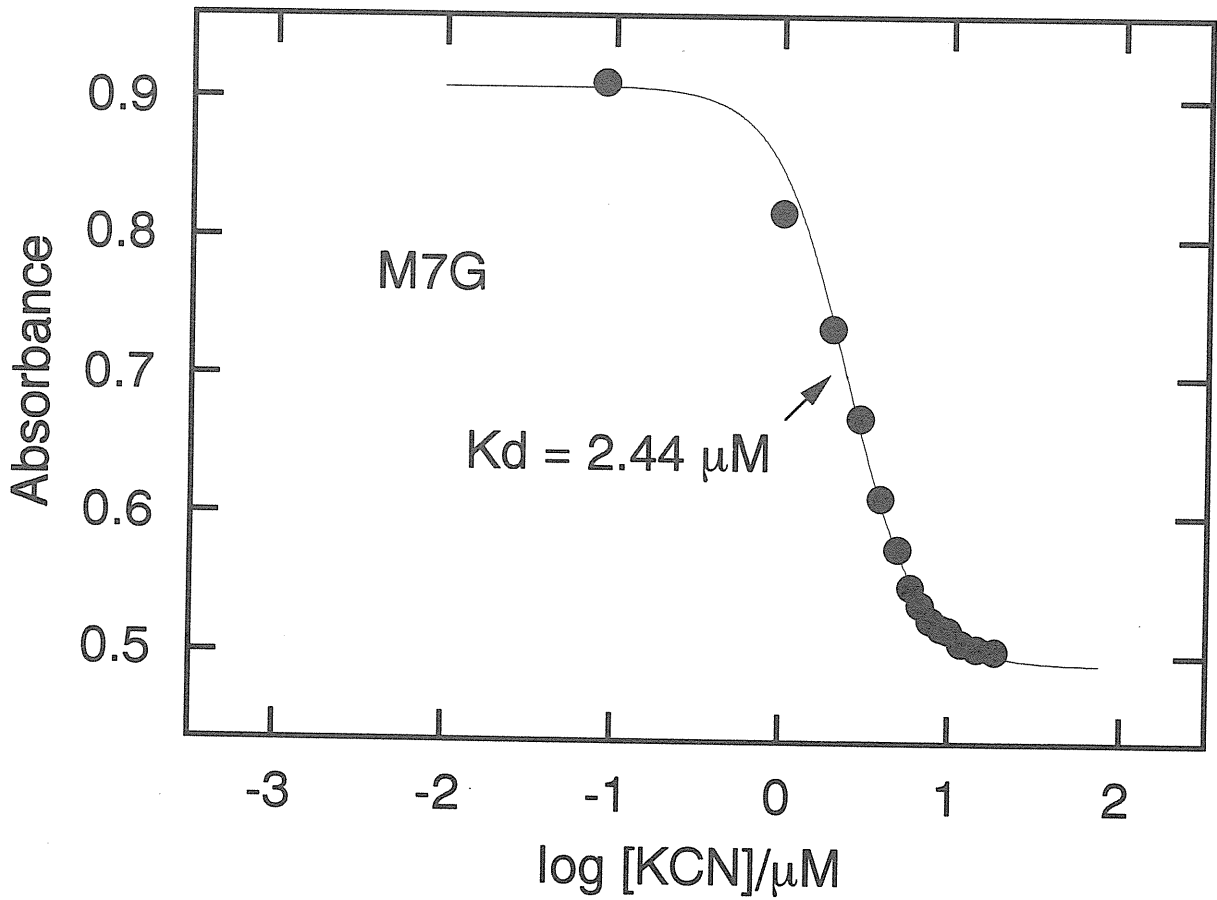
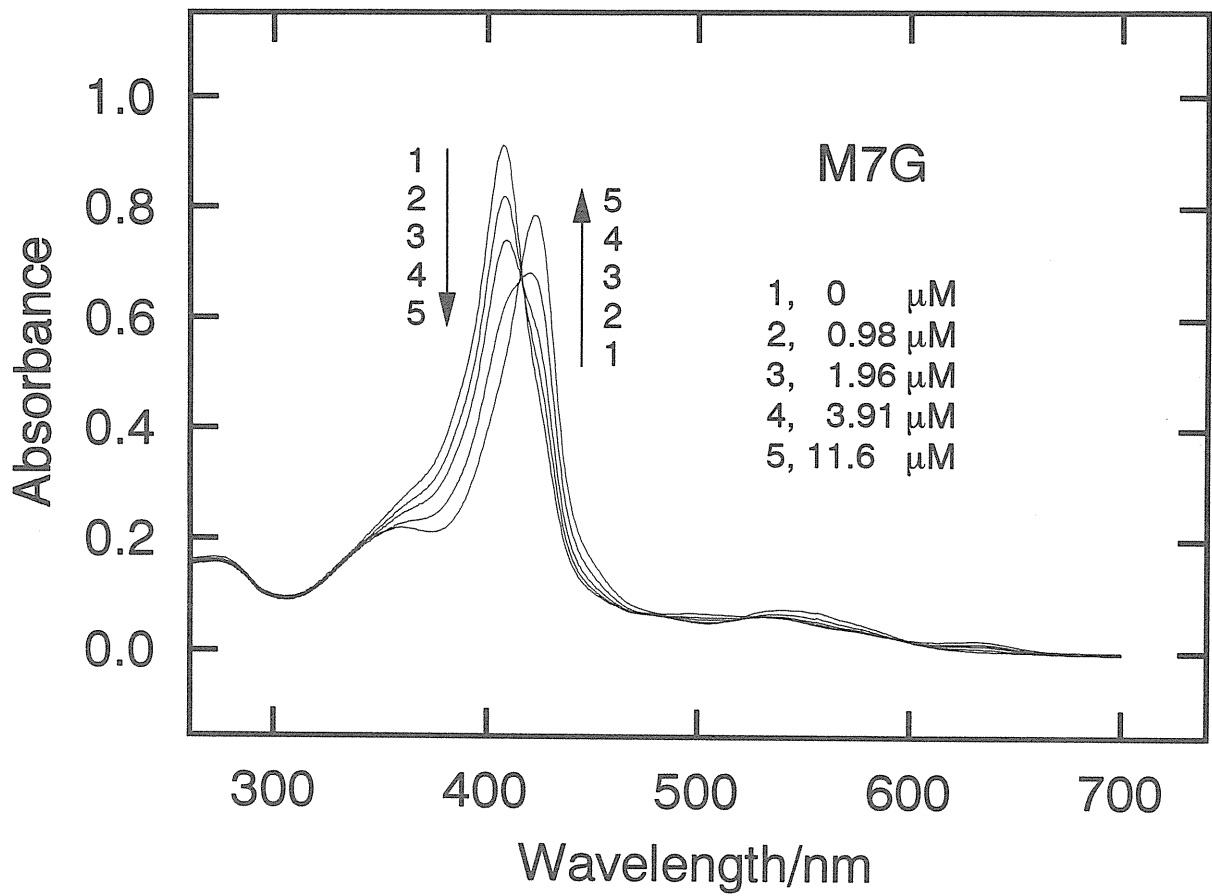


図31 M7GのKCN結合性

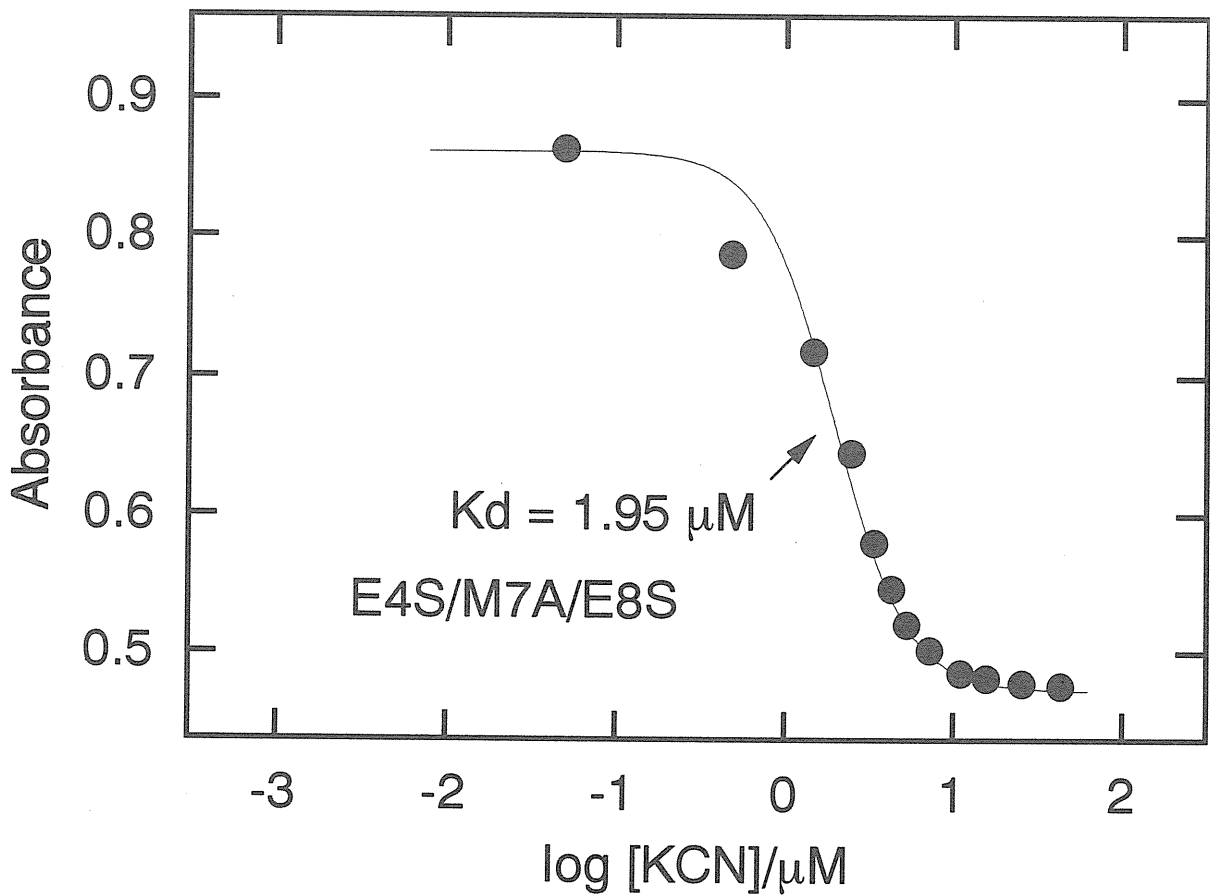
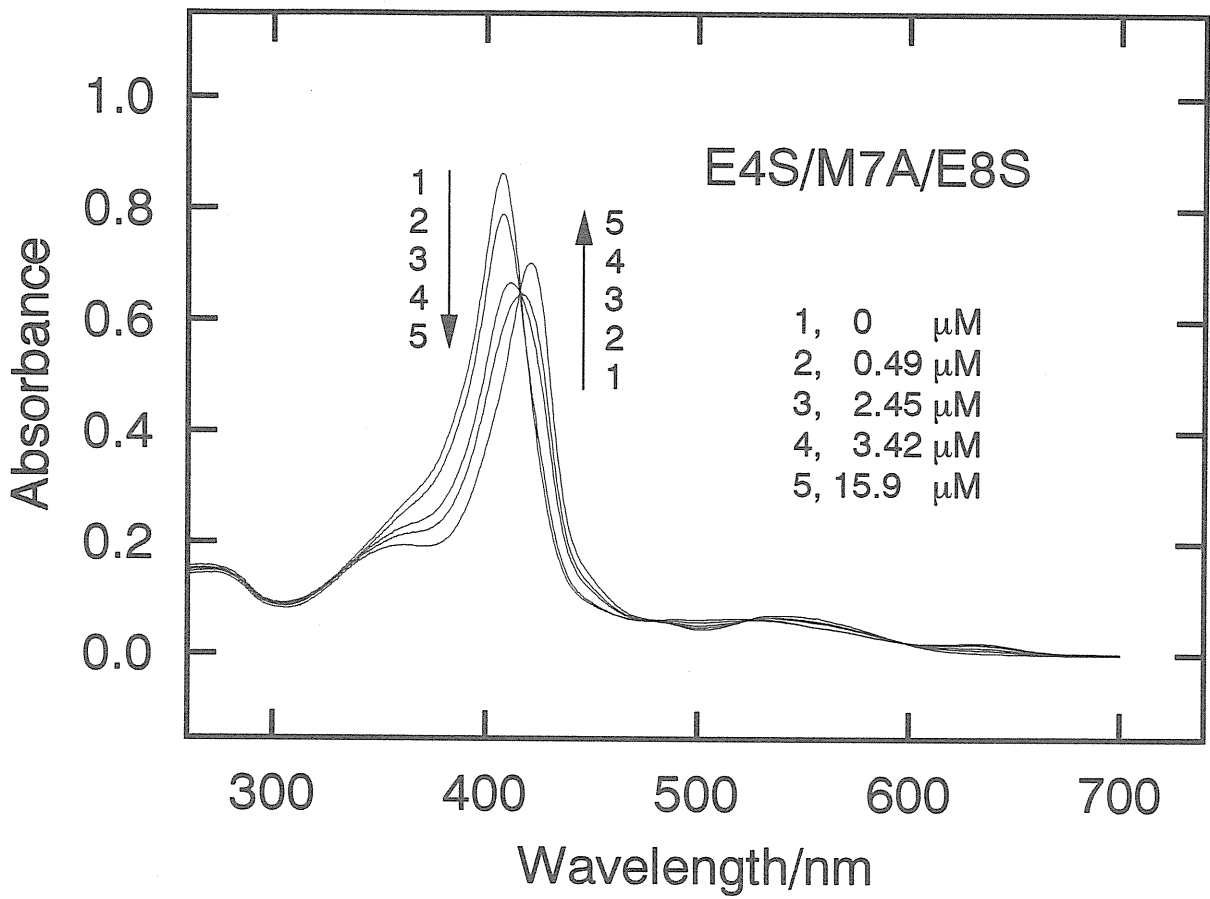


図32 E4S/M7A/E8SのKCN結合性

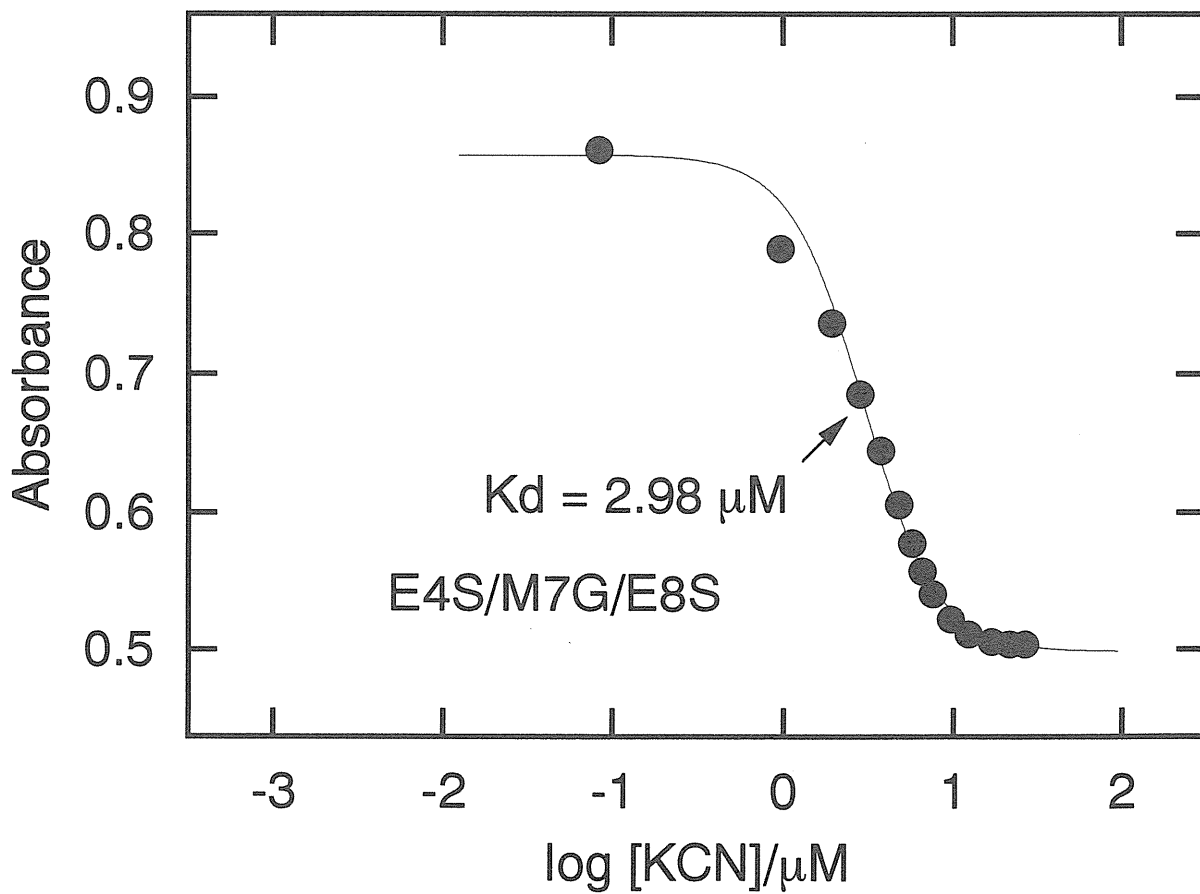
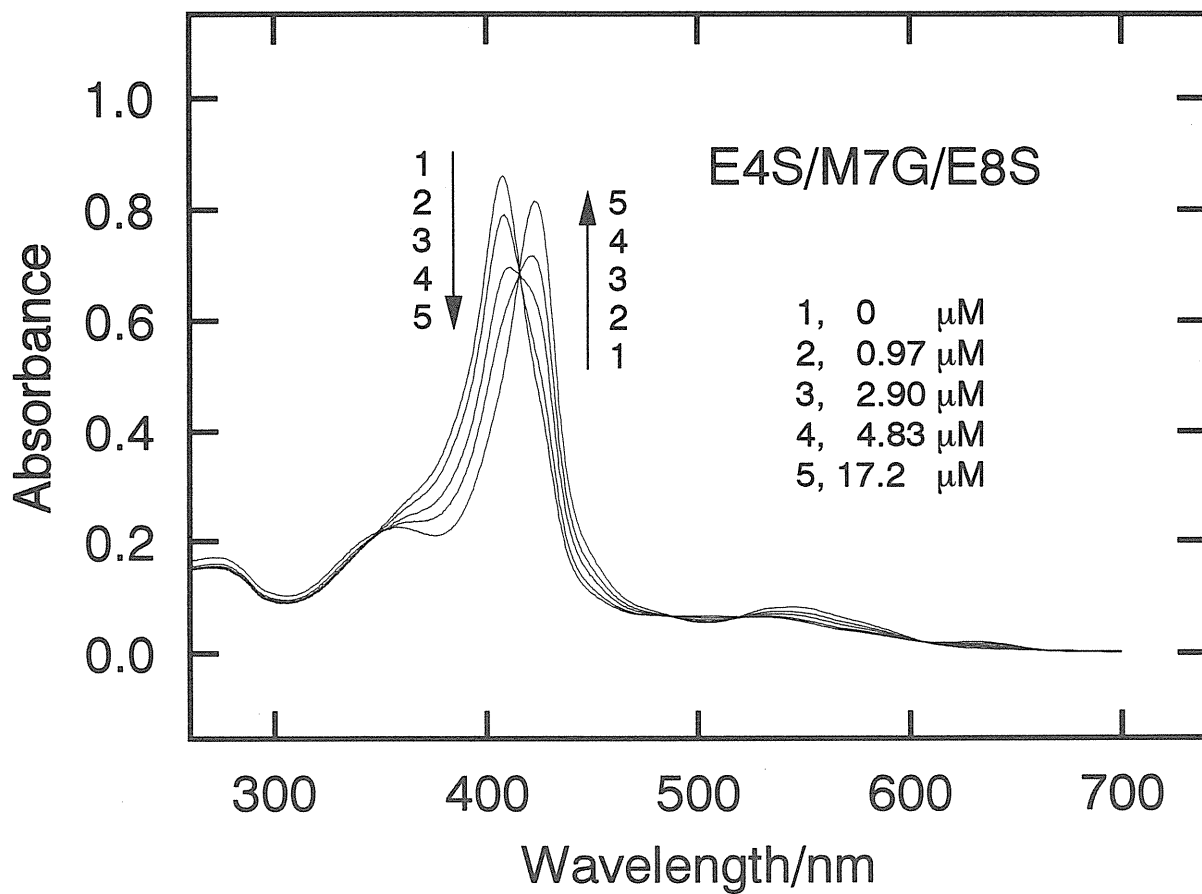


図33 E4S/M7G/E8SのKCN結合性

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書ミオグロビンの部位特異的変異による酸素結合機能の改変に関する研究
－ヘムの結合安定性および酸素結合性の評価－

分担研究者 根矢 三郎 京都薬科大学 助教授

研究要旨

筋肉にある酸素貯蔵たんぱく質ミオグロビンの酸素結合部位は鉄ポルフィリンである。ポルフィリンはピロール4分子が炭素4原子で架橋された環状有機分子で、対称的な分子構造をもつ。分担研究ではポルフィリンのピロール環を並べ替えるとミオグロビンの酸素結合特性にどのような変化が現われるかを追求すべく、コルフィセンとよばれる新規ポルフィリン構造異性体を合成した。研究のねらいは、ミオグロビンへの人工ヘムの導入による、酸素結合を制御するヘム内在性因子の追求であり、酸素結合たんぱく質の分子設計に向けた基礎的知見を蓄積するためである。コルフィセンは極端に歪んだ形をもつポルフィリン異性体である。予備実験として、コルフィセン類似の置換基パターンをもつポルフィリンでミオグロビンを再構成し、結晶構造解析を行った。つぎに、生化学研究に必要な十分量のコルフィセンを得るために有機合成法を大幅に改良した。これらの結果をもとに、合成した鉄コルフィセンアポミオグロビンと結合させると、安定なホロたんぱく質を形成した。鉄コルフィセンをもつミオグロビンには酸素結合能力がある。しかし、酸素親和性は天然たんぱく質の1/70にも低下していた。この観察は、コルフィセン鉄の配位子場の歪みが鉄と酸素分子との π 結合性を弱めることを示す。以上の結果から、ミオグロビンの酸素結合性を制御する重要因子がヘムの対称的分子形にあることが判明した。ヘム分子構造を変える酸素親和性制御法はミオグロビンに有効である。

A. 研究目的

ヘモグロビンやミオグロビンなどの酸素運搬たんぱく質は補欠分子として鉄ポルフィリンをもつ。ポルフィリンはピロール4分子がメソ位炭素原子4個で架橋された4回対称軸をもつ環状分子である（図1）。従来のポルフィリンやヘムたんぱく質の化学や生化学はすべて、この対称的な分子構造の枠内で議論されてきた。近年、有機合成の進展により、ポル

フィリンのテトラピロールを人為的に差違配列できるようになってきた。図1のコルフィセンはメソ位炭素の対角側に移動に移動したポルフィリン構造異性体である。コルフィセンは1994年に始めて合成されたが、興味深い分子構造にもかかわらず、その合成には貴重な前駆体が必要であり合成技術も難度が高い。しかも合成収率は2%と低く、試料入手は困難をきわめる。そこで、本分担研究では