

図11 野生型シトクロムb562の共鳴ラマンスペクトル
(上) 酸化型 (下) 還元型

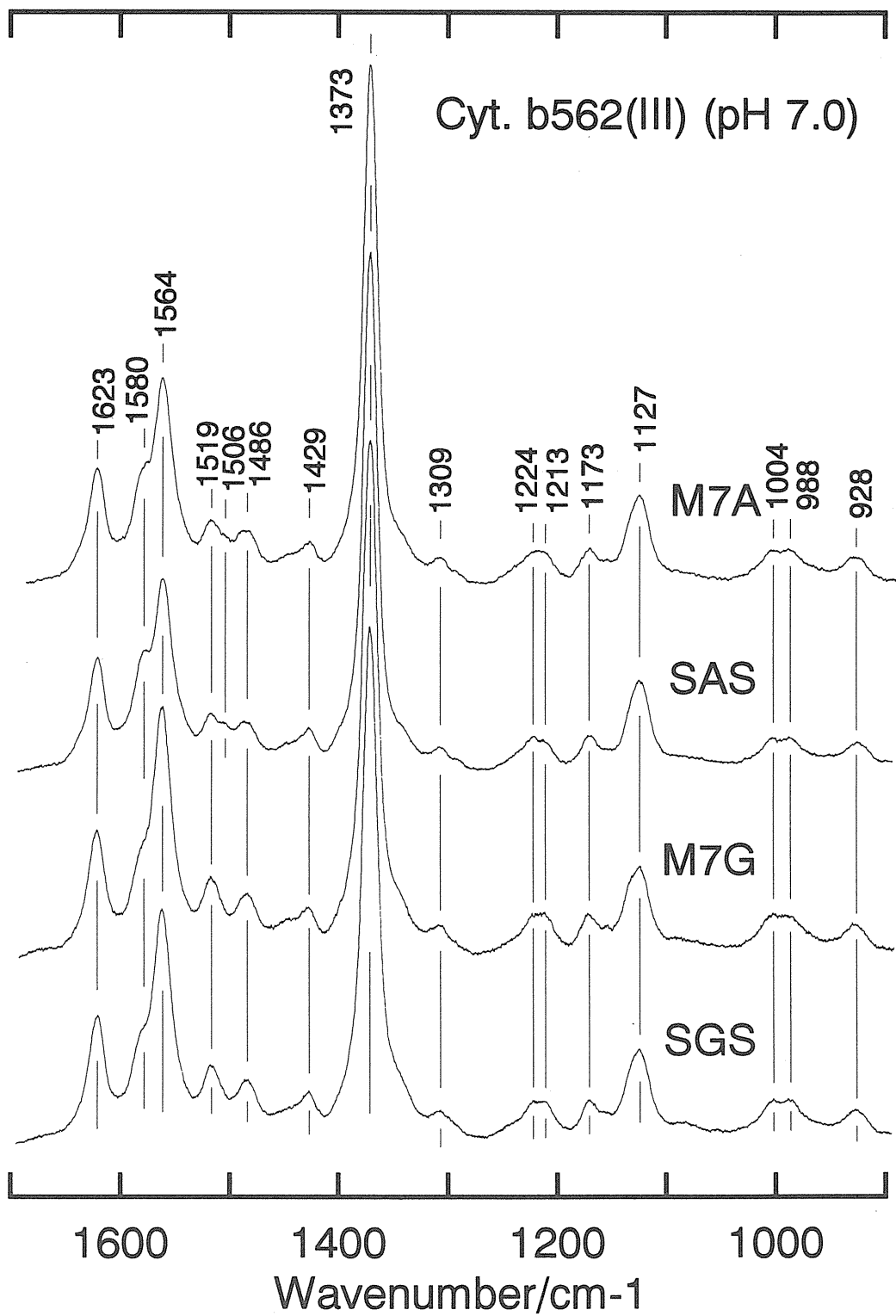


図12 酸化型シトクロムb562変異体の共鳴ラマンスペクトル (高波数側)

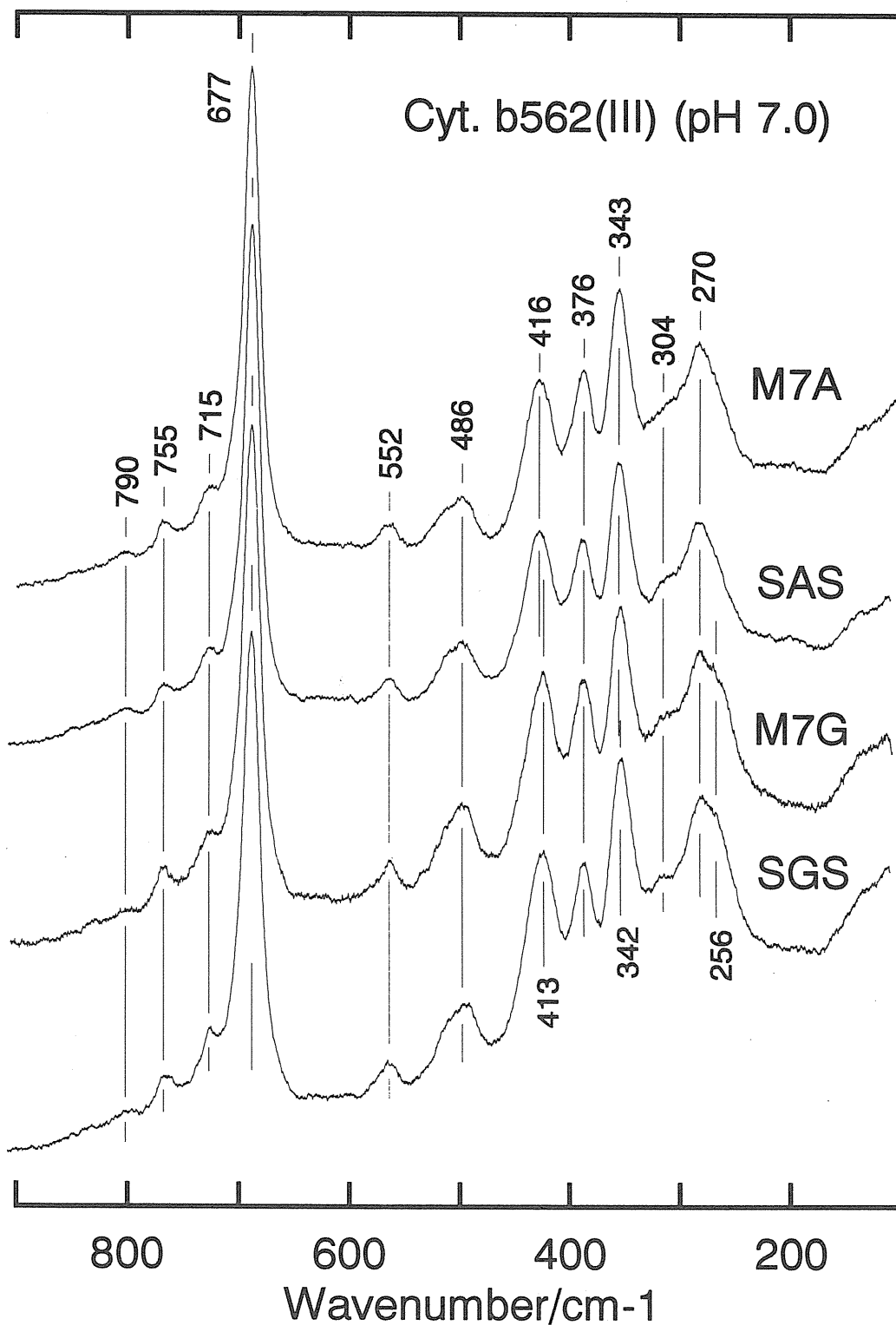


図13 酸化型シトクロムb562変異体の共鳴ラマンスペクトル（低波数側）

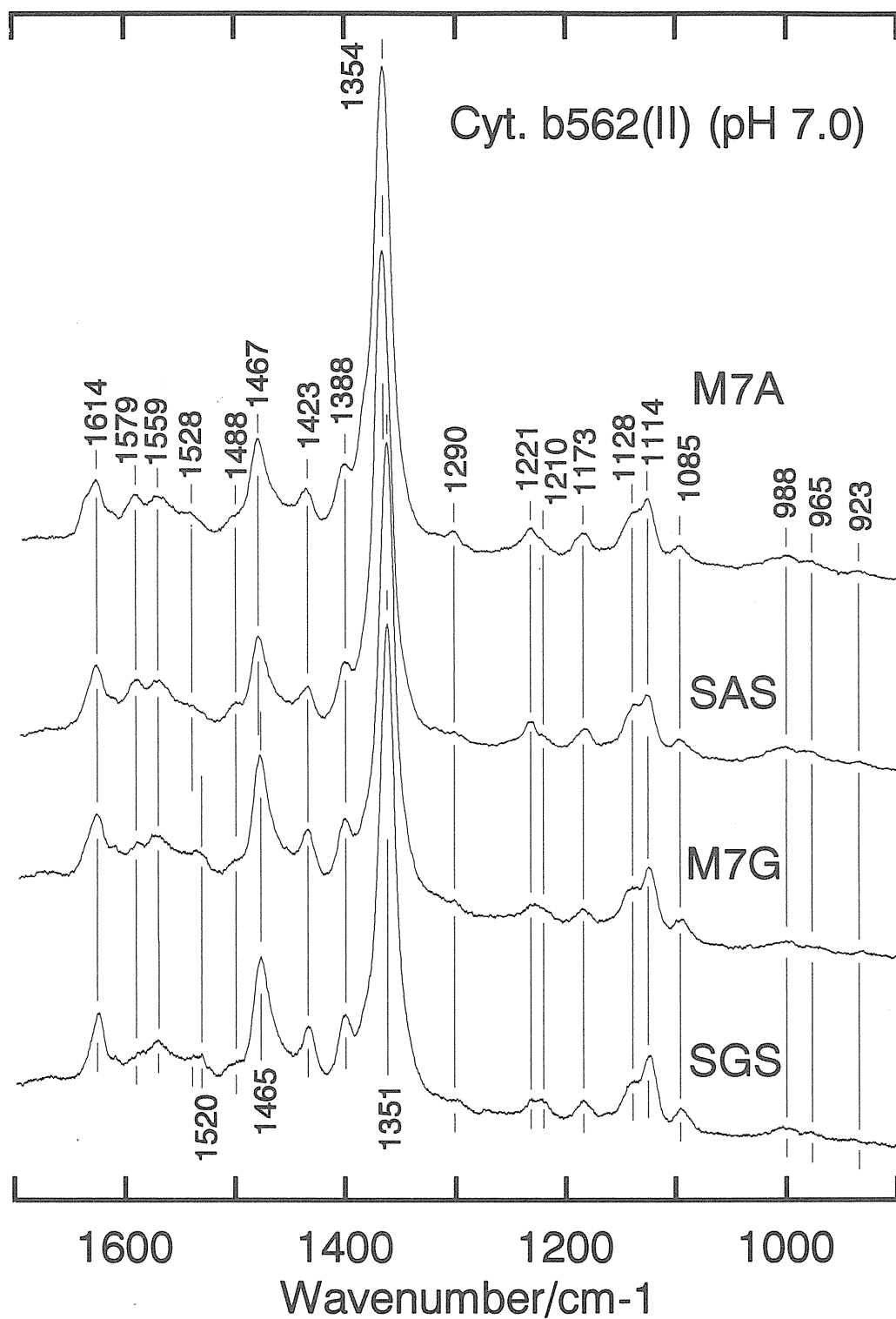


図14 還元型シトクロムb562変異体の共鳴ラマンスペクトル (高波数側)

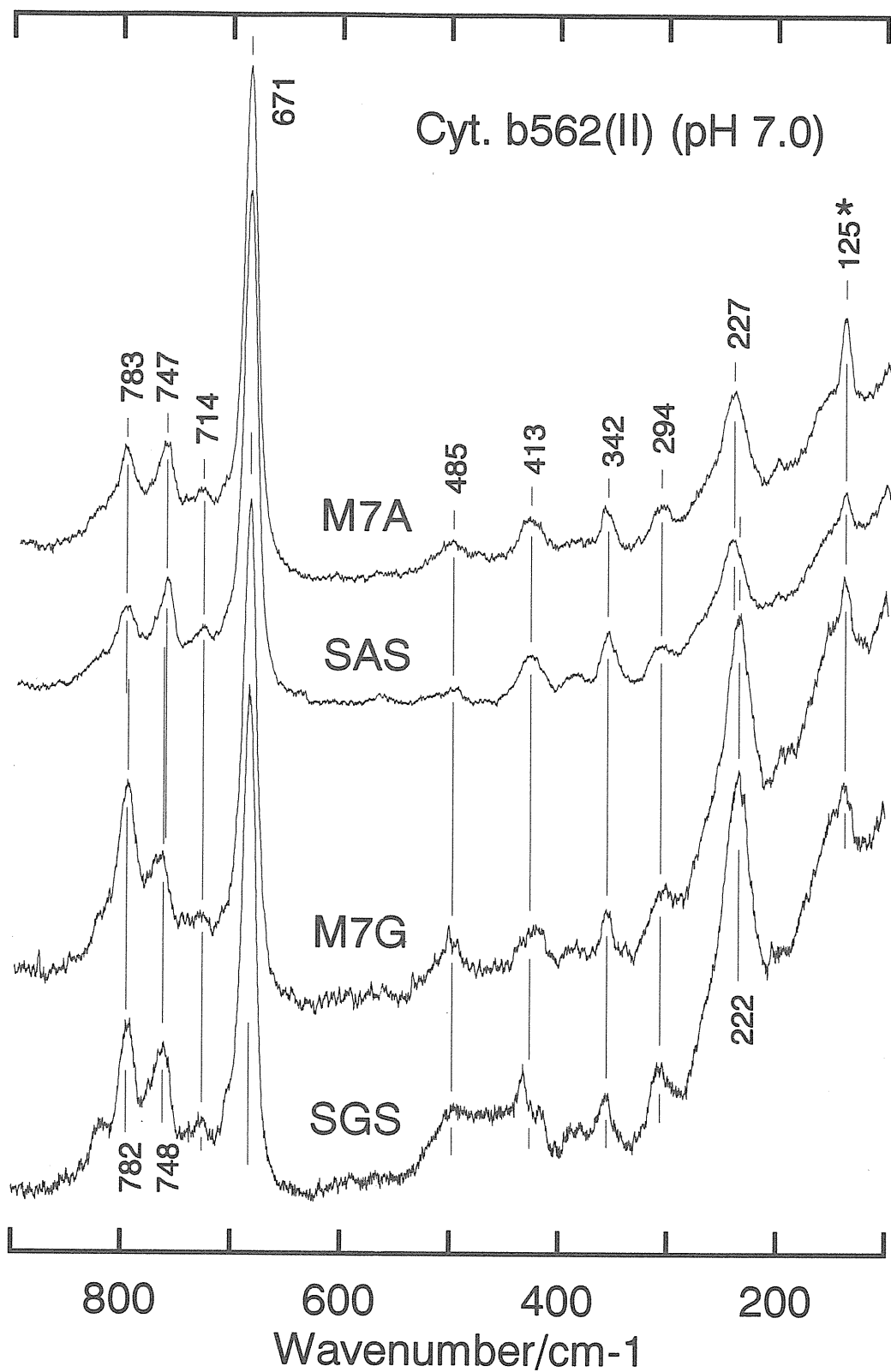


図15 還元型シトクロムb562変異体の共鳴ラマンスペクトル (低波数側)

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
－ミオグロビン変異体の電気化学的評価－

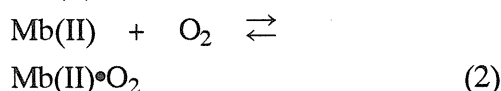
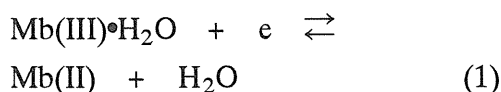
分担研究者 谷口 功 熊本大学工学部 教授

研究要旨

ミオグロビンの活性中心であるプロトヘムを、様々なヘムに置き換えた再構成ミオグロビンについて、その電気化学挙動を検討した。その結果、ヘム環境の違いはミオグロビンの電子移動や酸化還元電位に大きく影響し、特にモノアザヘミンやジアザヘミンがミオグロビンに再構成されると軸配位子の影響が重要になることがわかった。また、ポルフィリンの周辺置換基の違いはヘム自身の酸化還元電位に反映され、酸素分子によるミオグロビン還元体の自動酸化速度を制御する上で、重要な役割を担っていることが判明した。ヘム鉄への外部配位子の配位挙動は、ポルフィリン骨格の構造からもたらされるヘム鉄の電子状態やヘムとタンパクの相互作用、すなわち近位ヒスチジンとヘム鉄の幾何配置がともにミオグロビンと配位子との親和性に影響を与えた。さらに、ヘム鉄と遠位ヒスチジンの間に存在する第六配位子としての水分子の存在と電子移動速度とは直接的な関連性はむしろ小さく、ミオグロビンの早い電子移動のために第六配位場に配位子が存在することは必ずしも必要条件ではない。第六配位場が空の場合の電子移動速度定数は native Mb の値より一桁大きいことなどから、ミオグロビンの電子移動速度は電子移動の前後で、ヘム鉄の位置がどの程度変化するか（ヘム周辺の再配列）が重要な要素になることが示された。

A. 研究目的

ミオグロビン (Mb) は酸化還元中心としてヘム (ポルフィリン誘導体) を有するヘムタンパク質で、生体内では酸素貯蔵・運搬の役割を担っている。この機能は還元型のヘム鉄の第六配位座への可逆的な酸素分子の配位 (式 (1)、(2)) に由来している。第五配位座にはタンパク質からのヒスチジン (近位ヒスチジン: F-8 His) のイミダゾール環の窒素原子が配位しており、ヘムをタンパク質部分につなぎ止めている。



分子量は約 18,000 で、酸化還元反応はヘム鉄の $[\text{Fe}^{3+} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}]$ の反応に基づいている。X線構造解析によりその三次元構造 (Fig. 1) が決定されてから、ミオグロビンの機能と構造の関係を解明する研究は飛躍的に進歩した。しかしながら、 O_2 などの配位子がいかなる経路

でミオグロビンのヘム鉄のところまで到達するのか、またヘム周辺的环境がどのような機構により構造的に制御されているかなど、本質的な問題には不明な点が多い。現在では、タンパク質工学的な手法によりアミノ酸配列を換えた変異体を作製し、天然型の機能とを比較して個々のアミノ酸がミオグロビンの機能発現に果たす役割を理解しようという研究も進められている。

一方、ミオグロビンはその活性中心であるヘムが、タンパク質の疎水性ポケット中におさまり、容易にヘムを取り出したり（アポミオグロビンの作製）、また類似の人工合成ヘムを導入したり（再構成）できるという利点を持っている。合成ヘム類を用いるとヘムの置換基の位置や大きさを容易に変えられるので、天然のプロトヘムを取り除き分子形の異なる合成ヘムで再構成するとヘム-グロビン相互作用を制御した半人工ミオグロビンをつくることができる。

当研究グループはこれまで金属タンパク質の電子移動制御が可能な機能電極の開発を進めてきたが、ミオグロビンについてもその速い電子移動制御が可能な機能電極の開発に成功している。そこで、本研究では、当研究グループで開発した機能性電極を用いて、これらのミオグロビンの電子移動反応を電気化学的に制御しその特性を電気化学的な側面から評価した。

この種の機能電極を用いて電気化学的に電子移動反応を調べることは化学的な酸化還元の場合とは異なり、平衡状態 ($\Delta G^\circ = 0$) での電子移動速度を比較できる利点がある。また、分子内の酸化還元中心に外部からスルースペースまたは

スルーボンドで電子移動反応を生じ、生体系と類似の反応が生じることになり、生体分子の電子移動反応をより生体系に近い形で解析評価することも可能となる。

本研究に用いた再構成用ヘムは、ポルフィリン骨格に窒素原子を一つおよび二つ導入したモノおよびジアザヘミン、プロトヘムの2,4位置置換基であるビニル基を他の置換基に置き換えたヘムなどである。これらの合成ヘムをアポミオグロビンに導入し、ヘム周辺的环境変化がミオグロビンの電子移動反応や配位子置換反応および電気化学的挙動にどのように影響するのかについて天然のミオグロビンと比較して評価した。さらに、遠位ヒスチジンを修飾改変したミオグロビンやヘムの中心金属イオンをマンガンイオンにした改変体などについても電気化学的手法を用いてその性質を検討した。

B. 研究方法

1. 試料

1-1 ミオグロビン ウマ心筋由来（シグマ社製、HH）およびマッコウクジラ骨格筋由来（フナコシ社製、SW）のミオグロビンを、イオン交換クロマト法により精製して使用した（市販のミオグロビンにはオリゴマー成分や、酸化還元中心の欠落したアポミオグロビンなどの不純物がわずかながら含まれており、電気化学測定を精密に行うためにはこれらの成分を除去することが必要である）。溶離液にはイオン強度 $\mu = \text{ca. } 0.025 \text{ M}$ 、pH 6.3 (for horse heart), 7.6 (for sperm whale) のリン酸バッファーを用いた。

1-2 装置および方法 純水および溶離液で洗浄した樹脂（カルボキシメチルセルロース：CM-52）をカラム（ ϕ 19

× 450 mm) に詰め、半日程溶離液を流して平衡化させた後、150 mg の市販のミオグロビンを 2.0 mL の溶離液に溶かしたものを流した。流出してきたミオグロビン溶液を、UV-visible でモニターしながら純度を評価した。高純度のミオグロビンは、酸化体 (アコメト型: ヘム鉄の第六配位子が水分子) において A₄₀₉ (ソーレー帯吸収) / A₂₈₀ (タンパクによる吸収) が 5.4 になることが知られている。流出順序は、i) アポミオグロビン成分、ii) モノマー成分、iii) ダイマー、オリゴマー成分である。

精製したミオグロビン溶液を、Amicon 社の限外ろ過装置 (Model 8050) を用いて濃縮した。フィルターは同社の DIAFLO Membranes YM-10 (分子量分画 10,000) を用いた。限外ろ過装置に精製サンプルを入れ、3 気圧の N₂ ガス (高純度) 加圧下で濃縮を行った。

得られた酸化体のミオグロビンに還元剤 (dithionite) を大過剰に加えて還元体にしたデオキシミオグロビン (第六配位座は空) の UV-visible スペクトルを測定し、434 nm でのモル吸光係数値、114000 M⁻¹ cm を使用して濃度を算出した。

1-3 合成ヘム 再構成用の合成ヘム類は、当該共同研究プロジェクトの構成員である京都薬科大学薬品物理化学教室の根矢三郎助教授によって合成されたもの、および市販のポルフィリンに鉄入れおよび加水分解を行った後用いた。用いた合成ヘムの構造の例を Fig. 2 に示した。

① 鉄入れ ポルフィリン 100 mg、FeCl₃ · 6H₂O 100 mg、CH₃COOH 70 mL、CH₃COONa 30 mg をナスフラスコに入れ、攪拌子で混ぜながら 90 分程度還流し、UV ランプで照らして赤い蛍光が見えな

くなることで反応終了の確認をした。その直後に飽和 NaCl を 1 mL 加えて放冷し、析出物を水洗、乾燥した。

② 加水分解 ナスフラスコにメタノール 95 mL、鉄ポルフィリンを入れ、3 g の KOH を 5 mL の H₂O に溶かしたものを加え、攪拌子で混ぜながら 5 時間程度還流した。反応溶液を少量取り、シリカゲルのプレートにのせて乾燥し、クロロホルム:メタノール = 95:5 (体積比) で展開してスポットが全く移動しなくなることで反応終了の確認をした。反応終了後、反応液を H₂O で希釈して濃塩酸を加え、凝集物を遠心分離した。沈殿物を水洗して再び遠心分離し、この作業を 5 回ほど繰り返した。最後に生成する KCl を除去するために希塩酸を加えて遠心分離し、乾燥した。

1-4 再構成ミオグロビン 天然ミオグロビンから活性中心であるヘムを取り出し (アポ化)、上記の合成ヘムを入れ再構成したミオグロビン (Fig. 3) を、イオン交換クロマト法により精製して使用した。

① アポ化 (酸性ブタノン法) 市販のウマ由来のミオグロビンを水に溶かし、これに 0.1 M HCl を添加して pH を 2.5 にした後、メチルエチルケトンを用いてヘムを抽出した。得られたアポミオグロビンの水溶液を透析チューブに入れ、低温室 (4 °C) で冷ビストリス緩衝溶液 (10 mM, pH 6.5, ミオグロビン 0.1 g あたり 2 L) に一晚透析してメチルエチルケトンを除いた。アポミオグロビンの純度は UV-visible スペクトルから、A₄₀₉ (ソーレー帯吸収) / A₂₈₀ (タンパクによる吸収) の値で評価した。この値が 0.1 以下のものを用いた。

② **再構成** 再構成にあたり、ミオグロビンの 1.2~2.0 当量のヘムを用いた。上記の非水溶性ヘムを水に溶かすために、まずこれらのヘムを水と混ざり合う有機溶媒に溶かし、それをアポミオグロビン水溶液に加えた。水溶性有機溶媒としてはメチルエチルケトン、メタノール、ピリジン、ジメチルスルホキシドなどを使用した。

濃い有機溶媒による変性防止のため、アポミオグロビン水溶液に対してヘム含有有機溶媒の体積は 10% 以下になるようにして混合した。また、再構成は氷浴上で攪拌しながら行い、pH は 6.5 ± 0.2 の範囲に保った。混合液は透析チューブに詰め大過剰の冷ピストリス (10 mM, pH 6.5) で半日ほど透析して有機溶媒を取り除いた。

③ **精製** pH 6.5 の 10 mM ビストリス緩衝溶液で平衡化したカルボキシメチルセルロース (CM-52, Whatman) カラムを用いてミオグロビンを精製した。アポミオグロビンを流出させるため、流出液はピストリス緩衝溶液のリニアな濃度勾配 (10 mM ~ 100 mM) をかけたグラジエント法を用いた。アポミオグロビンに続いて再構成ミオグロビンが流出し、遊離のヘムはカラム上部に吸着して流出しない。再構成ミオグロビンを含む分画の純度は UV-visible スペクトルで確認した。一般に再構成ミオグロビンの純度は 400 nm 付近のソーレ帯と 280 nm 付近のグロビン由来吸収の高さの比 (純度指数) で評価した。

1-5 配位子置換ミオグロビンおよびオキシ型ミオグロビン

① **配位子置換ミオグロビン** ミオグロビンのヘム鉄の第六配位子を、CN、

N₃、イミダゾールなどに置換した。これらの配位子置換ミオグロビンは精製ミオグロビン (天然ミオグロビンおよび再構成ミオグロビン) に、配位子溶液を過剰に加えて調製した。

② **オキシ型ミオグロビン** 酸化体ミオグロビンに大過剰のダイチオナイトを加えて deoxy 型ミオグロビンとし、これを 10 mM トリス緩衝溶液 (pH 7.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラムに通して余分なダイチオナイトを除いた。流出液について紫外可視吸収スペクトルを測定し、オキシ型ミオグロビンであることを確認した。

2. 電極および電気化学測定

2-1 **作用電極 (W.E.)** 厚さ 0.3 mm のガラスの両面に蒸着した酸化インジウム板に、導 (ニッケル) 線を銀ペーストで接続し、アラルダイト (エポキシ系強力接着剤) で固定し、更にシリコンでアラルダイトをコーティングして作製した (Fig. 4a)。表面張力測定 (Wilhelmy 法) を行うため、ニッケル線と酸化インジウム蒸着ガラスは垂直になるように接続した。作製した電極は生化学界面活性剤 (VISTA) で適当な時間超音波洗浄した後、Milli Q 水で 5 分毎に液を換えながら 15 分程度洗浄した後使用した。電極面積は 0.5 x 0.5 cm とした。

2-2 **対極 Counter electrode (C.E.)** 白金板 (ca. 1.5 x 1.0 cm) を用いた (Fig. 4b)。使用前にはバーナーで赤熱させて有機物を酸化処理した。

2-3 **基準電極 Reference electrode (R.E.)** 塩化カリウムで飽和した Ag/AgCl を使用した (Fig. 4c)。

2-4 **電気化学測定** 電気化学測定に

は主にサイクリックボルタンメトリー (CV) 法を用い 3 電極方式で測定した (Fig. 5a)。通常、測定溶液は高純度窒素ガスで約 60 分程度脱気して溶存酸素を除去し、窒素雰囲気下で行った。温度を一定に保つため、恒温槽を使用した。ミオグロビンの拡散係数の算出にはポテンシャルステップクロノクーロメトリー法を用いた。

2-5 ストップフロー法による還元反応速度の測定 必要に応じて、ストップフロー法を用いてミオグロビンをジチオナイト溶液で還元し、その反応速度を評価した (Fig. 5b)。

2-6 電極表面の親水性の評価 (Wilhelmy 法) 25 °C で純水の表面張力を測定することで、酸化インジウム電極の表面の親水性を評価した。25 °C で空気と接する水の表面張力は $71.96 \text{ dyn cm}^{-1}$ であり ($1 \text{ dyn cm}^{-1} = 10^{-3} \text{ N m}^{-1}$)、測定値がこの値に近いほど電極表面が水とよく馴染んでいると判断した。測定器具は生化学界面活性剤で超音波洗浄し、純水でよくすすいで使用した。

測定には Wilhelmy 法を用いた (Fig. 6)。測定用の皿に Milli Q を溢れるまで注ぎ、その後水表面をテフロン板で掃いた。電極と水表面を徐々に静かに近づけ、ギリギリ接したところの値を測定した。電極が重すぎるときは、適なおもりを天秤に加えることによって調節した。

C. D. 研究結果及び考察

1. 天然ミオグロビンの電極反応

ミオグロビンの電極反応は、これまで種々の電極系を用いて測定が試みられてきたが、電子移動速度が小さく明確なボルタモグラムを得るには至らなかった。

ミオグロビンは一般の電子伝達金属タンパク質に比べ分子サイズが大きく、レドックス中心であるヘム部位も分子中に比較的埋もれていることから、その電極上での直接電子移動は長い間不可能と考えられていた。しかし、数年前に、本研究グループによってウマ心筋由来のミオグロビンを用いて pH 6.5 の溶液中、窒素雰囲気下 In_2O_3 電極上で明瞭な酸化還元波が報告されて以来、ミオグロビンの電気化学挙動の解明は急速に進んでいる。市販のミオグロビンにはオリゴマー成分や、酸化還元中心の欠落したアポミオグロビンなどが僅かながら含まれており、これら微量の成分が電極表面に吸着するとミオグロビンの速い電子移動が妨げられる。そこでこれらの不純物をカラムクロマトグラフィーによって除去し、高度に精製されたミオグロビンと十分に洗浄して表面が親水化された In_2O_3 電極を使用してタンパク質の電極表面への強い吸着を防ぐことによって、明瞭なボルタモグラムの測定が可能となった (Fig. 7)。

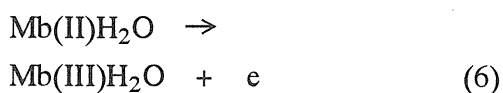
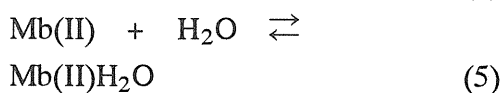
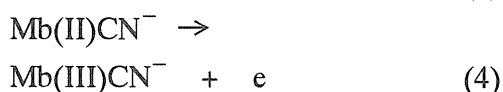
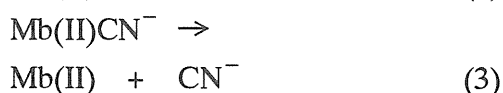
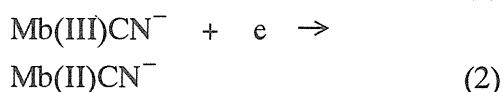
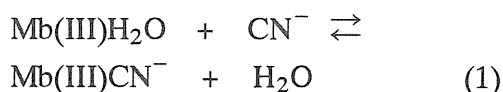
電極表面での電子移動速度に対する不均一電子移動速度定数 k^0 は pH 依存性が認められ、pH 6.5 付近で最大の値を示すが、等電点が異なるウマ ($\text{pI} = 6.8$) およびクジラ ($\text{pI} = 8.25$) ミオグロビンともに k^0 の pH 依存性に大きな変化はない。このことは、馬とクジラのミオグロビンのアミノ酸配列は 18 カ所異なるが、ミオグロビンの酸化還元中心であるヘム近傍のアミノ酸配列が類似していることから、ミオグロビンの電極反応には分子全体のアミノ酸配列よりはむしろヘム付近の局部的電荷が影響を与えていることを示唆している。また、ミオグロビンの電子移動速度が電極表面の親水性に大きく

影響されることも明らかになってきている。

2. ミオグロビンの電極反応に対するヘム鉄の第六配位子の影響

メトミオグロビンと比較して、 CN^- 、 N_3^- およびイミダゾールをミオグロビン溶液に加えると UV-visible スペクトルのソーレー帯の吸収波長はシアノミオグロビン、アジドミオグロビンおよびイミダゾールミオグロビンのそれらと一致し、配位子置換ミオグロビンはリガンド溶液を加えるだけで容易に調製できる。そこで、メトミオグロビンの酸化還元中心であるヘム鉄の第六配位子としての水分子を、他の配位子 (CN^- 、 N_3^- 、イミダゾール) と入れ替えた場合の電気化学挙動を検討した。

シアノミオグロビンの酸化還元電位はメトミオグロビン ($-140 \text{ mV vs. Ag / AgCl}$) より、はるかに卑な電位 (約 $-600 \text{ mV vs. Ag / AgCl}$) であることが示された。一般に反応は次のような反応式で進むと考えられる。



ここで、 $\text{Mb(III)H}_2\text{O}$ は第六配位座に水分子の配位したメトミオグロビン (metMb)、 Mb(II) は五配位型のデオキシミオグロビン (deoxyMb) である。シアノミオグロビン (鉄 (III)) が還元されて鉄 (II) 状態になると (2) 式)、ある速度で CN^- の脱離が起こる (3) 式)。このため溶液中にはシアノミオグロビンとミオグロビンの二つの還元種が存在することになり、(4) 式および (6) 式の酸化反応による二つの酸化ピーク電流が観察される。電位の掃引速度を速くして (3) 式が右に進んでしまう前に酸化すると、(6) 式によるミオグロビンの酸化電流は観測されなくなる。従って、電気化学測定において、測定タイムスケールを変化させる (電位掃引速度を変化させる) ことで、配位子の脱離速度などを解析することができる。

アジドミオグロビンやイミダゾールミオグロビンのボルタモグラムもシアノミオグロビンと同様な波形となる。アジドミオグロビンは約 $-500 \text{ mV vs. Ag / AgCl}$ に、イミダゾールミオグロビンは約 $-240 \text{ mV vs. Ag / AgCl}$ にレドックス波が観察された。還元反応に伴う配位子の脱離の速度は、レドックス波形の電位掃引速度依存性から、例えば 5°C では CN^- : 0.025 s^{-1} , $\text{Im} : 0.3 \text{ s}^{-1}$ などの値が得られた。脱離速度は、 $\text{CN}^- \ll \text{N}_3^-$, Im と推察される。 N_3^- , Im はヘム鉄 (II) との親和性が低く、 25°C ではアジドおよびイミダゾールミオグロビン還元体の再酸化ピークは全く見られないが、温度を下げてリガンドの脱離速度を遅くすると再酸化電流が観測される。

3. アザミオグロビン

ポルフィリン骨格に1つおよび2つの窒素原子を導入したモノアザおよびジアザヘミンを再構成したアザミオグロビンについて、その電子移動反応を native ミオグロビンと比較した。

3-1 スペクトル特性 再構成したアザヘムミオグロビンの UV-visible スペクトルは native ミオグロビンに比べソーレー帯の吸収位置が若干ブルーシフトした。

円偏光二色性 (CD) スペクトルは、220 nm 付近のタンパクの α ヘリックスに由来する負の CD シグナルには、native ミオグロビンとアザミオグロビンとでほとんど違いは見られないが、ヘム由来の 400 nm 付近のソーレー帯シグナルにおいては、モノアザミオグロビンのそれが native およびジアザミオグロビンに比べて小さくなった。一般にヘム CD スペクトルは、ポルフィリンの π - π^* とヘム近傍のアミノ酸残基の芳香族側鎖の π - π^* 遷移との相互作用によることが知られている。このことから、モノアザヘミンをアポミオグロビンに再構成したモノアザミオグロビンでは、ヘム周囲のコンフォメーションがある程度変化していることがわかる。このモノアザミオグロビンのヘム鉄は native ミオグロビンと同じ第六配位に水分子を持つアコメト型 (aquomet type) であることが知られている。

一方、ジアザミオグロビンのヘム鉄の第六配位には水分子は配位しておらず、遠位側のヒスチジン (F7-His) のイミダゾール環の窒素原子が配位したヘミクロム型 (hemichrome type) の配位構造をとっており、ヘム鉄のスピンの状態は低スピンを基底状態にもつスピン平衡系 ($S = 1/2$

$\Rightarrow S = 5/2$) にあることが知られている。

3-2 電極反応 メトミオグロビン同様にアザミオグロビンも pH 6.5 の溶液中、窒素雰囲気下、高親水性表面を有する In_2O_3 電極上で明瞭な酸化還元波が観測された。ピーク電流はアザミオグロビンの濃度および電位掃引速度の 1/2 乗に比例し、電極反応が拡散律速 (k^0 値が 10^4 cm s^{-1} 以上で電子移動速度がはやいことを意味している) であることが確認された。サイクリックボルタンメトリーおよびポテンシャルステップクロノクーロメトリーから算出した拡散係数 (D) は 25 °C で、モノアザミオグロビンおよびジアザミオグロビンそれぞれ、ca. $9.0 (\pm 1.0) \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ca. $1.0 (\pm 1.0) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ となりこれらの値は報告されているマッコウクジラミオグロビンの $D = 1.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ とよく一致している。

得られたアザミオグロビンのボルタモグラムから、デジタルシミュレーション法を用いて電子移動速度定数 k^0 を算出したところ (Fig. 8)、モノアザミオグロビンでは、 $k^0 = \text{ca. } 2 \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ となり native ミオグロビンと同様な値を示した。一方、ジアザミオグロビンの k^0 値は ca. $2 \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ を示し、native およびモノアザミオグロビンよりも桁も大きな値で、native のシアノおよびイミダゾールミオグロビンと同様な値となった。

ヘミンとモノアザヘミンおよびジアザヘミンのメタノール中でのサイクリックボルタモグラムを比較すると、モノアザヘミンの酸化還元電位はヘミンに比べて約 70 mV、ジアザヘミンは約 140 mV ポジティブにシフトしている (Fig. 9a)。また、大過剰量のイミダゾールを加えて、軸方向のリガンドとして配位させた場合、

モノアザヘミンはヘミンよりも約 120 mV、ジアザヘミンは約 240 mV ポジティブな酸化還元電位を示した。同様な酸化還元電位のポジティブシフトがテトラアザポルフィリンについても見られ、ポルフィリン環への四つの窒素原子の導入によってその電位は 400 mV ポジティブにシフトすることが知られている。このようなレドックス電位のポジティブシフトは主として、メソ位への窒素原子の導入による面内リガンドの π -acceptor 性の増加によるものと考えられており、結果としてモノアザヘミンおよびジアザヘミンの還元型が大きく安定化することとなった。

しかしながら大変興味深いことに、ボルタモグラムから評価された酸化還元電位 (E^0) は、モノアザミオグロビンは -0.18 V vs. Ag/AgCl (Sat. KCl)、ジアザミオグロビンは -0.135 V vs. Ag/AgCl (Sat. KCl) となった (Fig. 9b)。native ミオグロビンの $E^0 = -0.14$ V vs. Ag/AgCl (Sat. KCl) と比較すると、モノアザミオグロビンは約 40 mV ネガティブな電位、ジアザミオグロビンは 5 mV ポジティブな電位を示した。モノアザヘミンの酸化還元電位から予測されたポジティブシフトとは反対に、モノアザミオグロビンの酸化還元電位は native ミオグロビンよりも 40 mV 程ネガティブにシフトしている。モノアザミオグロビンの活性中心の配位構造は native ミオグロビンと同じであり (アコメト型) ポルフィリン骨格への窒素原子導入による面内配位子場の増強だけではこのネガティブシフトは説明できず、モノアザヘミンがアポミオグロビンに再構成されたとき、その酸化還元電位を考えるに当たり、軸配位子としての近位ヒスチジン

(F8-His) を含むヘム環境を考慮しなければならないことがわかる。

一方、ジアザミオグロビンの酸化還元電位は -0.135 V vs. Ag/AgCl (Sat. KCl) であり、モノアザミオグロビンよりも 45 mV ポジティブな値を示した。このシフトは、ジアザヘミン自身の酸化還元電位が、モノアザヘミンに比べて 70 mV ポジティブにシフトしていることから期待されるものよりも小さなものであった。この結果は、ジアザミオグロビンにおいてもその酸化還元電位には軸方向のリガンドを含むヘム周辺が重要であるということを示している。

3-3 配位子置換反応 再構成アザミオグロビン (aza-Mbs) のヘム鉄の第六配位子に CN^- を配位させたシアノアザミオグロビン (CN-monoazaMb) の電気化学挙動を、native シアノミオグロビン (CN-Mb) と比較した。CN-Mb と CN-monoazaMb のサイクリックボルタモグラムを比較すると、どちらのシアノミオグロビンも CN^- からヘム鉄へ供与されるネガティブチャージのために、酸化還元電位はネガティブ方向へ大きくシフトした。一方、CN-Mb は還元後、 CN^- の脱離が起こり生成した deoxyMb から metMb への再酸化電流が -0.05 V 付近 (pH 6.8 の場合) に観察されるが、CN-monoazaMb では CN^- は還元型の monoazaMb にも強く結合しており、用いた測定の間スケール内では還元体の monoazaMb からの CN^- の脱離は観測されなかった。電気化学測定により得られたこの結果は、他の方法で得られている monoazaMb および native Mb の CN^- 解離定数 (0.002 s^{-1} for monoazaMb, 0.14 s^{-1} for native Mb at pH 7.0) とよく一致している。

ジアザシアノミオグロビン (CN-diaza Mb) のボルタモグラムから、native Mb 及び monoazaMb の場合と同様に、CN⁻ の配位により酸化還元電位はネガティブ方向にシフトするが、そのシフトの大きさは native Mb や monoazaMb に比べて小さくなっている。また、CN⁻ の還元型 diazaMb に対する親和性は native Mb に比べて大きくなっており、monoazaMb 同様に測定時間スケール内では還元体の diazaMb からの CN⁻ の脱離は観測されなかった。

3-4 pH の影響 monoazaMb および diazaMb の電子移動反応に及ぼす溶媒の pH の影響を native Mb の場合と比較した。電子移動反応速度の尺度としてのボルタモグラムのピーク分離幅 (ΔE) を、native Mb, monoazaMb および diazaMb について、種々の pH で測定したところ、どのミオグロビンも pH 6.5 付近で最も ΔE が狭く速い電子移動反応が生じ、最もきれいな酸化還元応答が得られた (Fig. 10)。この pH 依存性の原因は明らかではないが、アコメト型のヘム構造を有するミオグロビンに特徴的な挙動である。

4. 2位および4位置換ヘム再構成ミオグロビン

天然 Mb の酸化還元中心であるプロトヘム IX はポルフィリンの 2, 4 位にビニル基がついたものであるが、この他に IX 型のヘムとして、2, 4 位にアセチル基を持つジアセチルヘム IX、2, 4 位に水素を持つデュートロヘム IX、2, 4 位にエチル基を持つメソヘム IX 等がある (Fig. 11b)。これらのヘムは 2, 4 位の置換基の電子吸引性及び電子供与性の違いにより、ポルフィリン環および鉄の電子状態が異

なっており、メソヘム IX (meso IX) < デュートロヘム IX (deutero IX) < プロトヘム IX (protoheme IX) < ジアセチルヘム IX (DAcP IX) の順にポルフィリンの acidity (酸性度) は大きくなっている。ここでは、これらのヘムを再構成したミオグロビンの電極反応を検討した。

4-1 スペクトル特性 Meso IX、deutero IX、protoheme IX、DAcP IX のメタノール中で測定した UV-visible スペクトルを示した (Fig. 11a)。Soret 帯の位置において、protoheme IX に比べて DAcP IX はレッドシフト、deutero IX および meso IX はブルーシフトしているが、これはポルフィリンの酸性度を反映している。酸性度の大きい deutero IX の方が meso IX よりも Soret 帯吸収位置が若干ブルーシフトしているが、これは deutero IX ではポルフィリンの π 電子の広がりがより少ないため、ポルフィリンの HOMO が不安定になり置換基効果を打ち消していると考えられる。

再構成したミオグロビンの UV-visible スペクトルもヘム自身の UV-visible スペクトルを反映しており、native Mb (protoheme IX Mb) に比べ、DAcP IX Mb はレッドシフト、deutero IX Mb、meso IX Mb はブルーシフトした Soret 帯吸収波長を示した。これらの再構成ミオグロビンの Soret 帯の CD シグナル (Fig. 12) はすべてプラス側に出ており、そのシグナルの大きさはそれぞれ UV-visible スペクトルの吸収極大の強度を反映していることがわかった。

4-2 電極反応 メタノール中で測定したヘムのサイクリックボルタモグラムから、それぞれヘムの酸化還元電位は DAcP IX が -255 mV、protoheme IX が

-305 mV、deutero IX が -373 mV、meso IX が -393 mV vs. Ag/AgCl であり、ポルフィリンの酸性度を反映した電位の順になることがわかった (meso IX < deutero IX < protoheme IX < DAcP IX)。

これらのヘムを用いて再構成したミオグロビンのサイクリックボルタモグラムを測定した結果、窒素雰囲気下、高親水性表面を有する In₂O₃ 電極上で明瞭な酸化還元波が観測された (Fig. 13)。ピーク電流はミオグロビン濃度および電位掃引速度の 1/2 乗に比例し、電極反応が拡散律速であることが確認された。それぞれの酸化還元電位は DAcP IX Mb が -35 mV、native Mb が -140 mV、deutero IX Mb が -155 mV、meso IX Mb が -165 mV であることがわかった。ここでもポルフィリンの酸性度を反映した電位の順になっており、meso IX Mb および deutero IX Mb は native Mb に比べて還元されにくいことが明らかになった。

得られたこれらのサイクリックボルタモグラムから、デジタルシミュレーション法を用いて不均一電子移動速度定数 (k^0 値) を算出したところ (Fig. 13, Table 1)、DAcP IX Mb が $7.5 (\pm 0.3) \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ 、deutero IX Mb が $1.8 (\pm 0.3) \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ 、meso IX Mb が $5.8 (\pm 0.3) \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ であり、native Mb の $8.0 (\pm 0.3) \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ に比べてどれも小さな値を示し、特に deutero IX Mb は電子移動は遅いことが明らかになった。なお、ここで用いた酸化インジウム電極は極めて高い表面親水性を持つもので、native Mb の k^0 値 ($8.0 \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$) は従来の値よりもさらに大きくなっている。

4-3 配位子置換反応 上記の種々の IX 型のヘムで再構成したミオグロビン

のヘム鉄の第六配位子に CN⁻ を導入したシアノ型再構成ミオグロビンの Soret 帯の吸収波長はどの場合も aquomet 型の Soret 帯吸収波長に比べてレッドシフトした。電極反応は、CN⁻ からヘム鉄へ供与される負電荷によって、aquomet 型ミオグロビンよりも大きくネガティブな電位で酸化還元波を示した。

5 °C で測定して得られたサイクリックボルタモグラム (pH 7.5) から、デジタルシミュレーション法を用いて電子移動速度定数 (k^0)、および CN⁻ の解離速度定数 (k_f) を算出した。 k^0 値は CN-DAcP IX Mb が $3.0 (\pm 0.3) \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ 、CN-native Mb が $2.0 (\pm 0.3) \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ 、CN-deutero IX Mb が $1.0 (\pm 0.3) \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ 、CN-meso IX Mb が $2.0 (\pm 0.3) \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ となった。

一方、還元体ミオグロビンからの CN⁻ の脱離速度定数 k_f 値は CN-DAcP IX Mb が $7.0 (\pm 0.5) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、CN-native Mb が $2.8 (\pm 0.5) \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ 、CN-deutero IX Mb が $1.6 (\pm 0.5) \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ 、CN-meso IX Mb が $2.1 (\pm 0.5) \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ であった。ヘム鉄 (II) への CN⁻ の親和力はこの k_f 値によって評価でき、CN⁻ との親和性は DAcP IX Mb > deutero IX Mb > meso IX Mb > native Mb の順に小さくなることが明らかになった。

DAcP IX Mb の場合は、その活性中心である DAcP IX の pK₃ (ポルフィリン環のピロール窒素における 3 番目のプロトン化) が他の 3 つのヘムに比べて特に小さく (Fig. 11b)、ポルフィリン周辺置換基の電子吸引性が大きく影響して、マイナス電荷を持つ CN⁻ がヘム鉄により結合しやすくなり、親和性が大きくなったと考えられる。一方、deutero IX Mb、meso

IX Mb および native Mb については、活性中心の pK_3 の値は互いにほぼ同じで、ヘム鉄の電子状態よりも、タンパク質の立体構造を反映したものと考えられる。すなわち、ポルフィリンの電子状態やヘムとタンパクの相互作用、すなわち近位ヒスチジンとヘム鉄の幾何配置が、ミオグロビンと配位子との親和性に大きく影響することが示唆された。

4-4 pH の影響 サイクリックボルタモグラムから得られたピークセパレーション（酸化ピーク電位と還元ピーク電位の差）を pH に対してプロットすると、ピークセパレーション値は pH 6.0 付近で最も小さくなった。このピークセパレーションは電子移動速度に対応しており、ピークセパレーションが狭いほど電子移動が速いことを意味する。ミオグロビンの UV-visible スペクトルや CD スペクトルは pH を変化させて (pH 5.5 ~ 7.5) 測定しても変わらないため、この pH 範囲内でミオグロビンの構造的な変化はない。一方、aquomet 型のミオグロビンの場合 pH 6.0 ~ 6.5 付近で最も電子移動が速い。この pH 依存性は電極反応においてのみ観察され、化学的還元反応の電子移動速度ではこの pH 領域で変化しないので、電極表面の性質に関連した挙動と考えられる。すなわち、再構成ミオグロビンと native Mb では、それぞれヘムポケット内の活性中心が異なるだけであるので、その分子表面は互いに類似しており、 In_2O_3 との相互作用も似ていると考えられる。 In_2O_3 電極の pI 値が約 5.5 であることから、pH 6.0 付近で電極表面は若干ネガティブである。また、ミオグロビンの pI は 6.8 であり、pH 6.0 付近でミオグロビンの表面電荷はややポジティブであ

る。これらのことから、この条件でミオグロビンと電極との相互作用が強くなり、電子移動が速くなったものと考えられる。 k^0 値の pH 依存性はアコメト型のミオグロビンに特有のもので極めて興味深い。

4-5 自動酸化反応 ミオグロビンのヘム鉄 (II) に酸素分子が結合した oxy 型ミオグロビンの安定性は、酸素貯蔵能力を決定する重要な要因である。そこで、ポルフィリン周辺置換基の違いが oxy 型ミオグロビンの安定性に及ぼす影響を見るために、oxy 型ミオグロビンの自動酸化速度を比較した。oxy 型ミオグロビンは 35 °C、pH 7.0 において徐々に酸化されて aquomet 型ミオグロビンとなる。UV-visible スペクトルで自動酸化反応をモニターしていくと、Soret 帯吸収波長は等吸収点をもってだんだんブルーシフトする。この変化の様子を一次プロットすると直線が得られる。

一次速度定数として DAcP IX Mb は $4.4 (\pm 0.5) \times 10^{-5} s^{-1}$ 、native Mb は $8.4 (\pm 0.5) \times 10^{-5} s^{-1}$ 、deutero IX Mb は $1.3 (\pm 0.1) \times 10^{-4} s^{-1}$ 、meso IX Mb は $1.8 (\pm 0.1) \times 10^{-5} s^{-1}$ という値が得られた。deutero IX Mb、meso IX Mb の値は native Mb の値よりも大きく、容易に自動酸化が起こることがわかった。従って deutero IX Mb、meso IX Mb の oxy 型の安定性は native Mb よりも小さく、また前述のように還元電位は native Mb よりもネガティブであることから、ミオグロビンとしての本来の機能（還元されやすく、一方自動酸化されにくい）という点で考えると都合が悪い。

一方 DAcP IX Mb は native Mb に比べて自動酸化されにくいことが明らかになった。また酸化還元電位は native Mb に比

べてポジティブであり、更に電子移動速度も native Mb とほとんど変わらないということから、native Mb よりもミオグロビンの機能をより発揮できる。一般にミオグロビンの活性中心の pK_3 が小さい程、そのミオグロビンの酸素親和性は小さい。これは、酸素-ヘム鉄の共有結合には π 結合と σ 結合が関与しているが、 pK_3 が小さいヘムでは鉄原子にある π 結合性のローブが電子吸引性置換基によって小さくなると考えられ、鉄と酸素との π 結合が弱まり、酸素親和性が低下するからである。DACP IX と同等の pK_3 値を持つジホルミルヘム (2, 4-diformylheme) を有する再構成ミオグロビンでは、その酸素親和性は native Mb に比べて 2 倍以上小さい。DACP IX Mb の場合もその酸化還元中心の pK_3 が小さいために酸素親和性が小さいと考えられ、ミオグロビンの機能性として大きなマイナス要素になるものと思われる (Table 1)。

4-6 ストップフロー法による還元反応 電気化学的手法を用いて酸化還元反応を行い、その結果からデジタルシミュレーション法によって求めた不均一電子移動速度と、溶液中での化学的還元反応速度を比較するために、大過剰のダイチオナイトを用いてストップフロー測定を行った。

DACP IX Mb、native Mb、deutero IX Mb、meso IX Mb の化学的還元反応の一次プロットから算出したこれらのミオグロビンの一次速度定数および二次速度定数を、電気化学的手法によって得られた電子移動速度および酸化還元電位、そして自動酸化速度等と比較検討した。native Mb、deutero IX Mb、meso IX Mb については、ダイチオナイト還元反応において酸化還

元電位の違いによる driving force (ΔG°) を考慮に入れても、 In_2O_3 電極を用いて得られた電子移動速度定数と、ストップフロー測定によって得られた化学的還元速度定数には相関性があり、ミオグロビンの電子移動速度はヘム構造により変化することが明らかになった。

一方 DACP IX Mb は k^0 値が native Mb とほとんど変わらないにも関わらず、化学的還元反応速度定数が大きい。これは他の 3 つのミオグロビンに比べて大きくポジティブな酸化還元電位を持つために、ダイチオナイト還元反応の driving force が大きいことが原因であると考えられる。

5. 遠位ヒスチジン修飾改変ミオグロビン

酸化還元中心であるプロトヘムはそのままにして、ミオグロビンのタンパク部分を構成するアミノ酸の 64 番目である遠位ヒスチジン (His-E7) を修飾改変したミオグロビンについて述べる。

native Mb の場合、ヘム鉄と遠位ヒスチジン (His-E7) の間には第六配位子として水分子が配位している。この native Mb に臭化シアン (BrCN) を加えて反応させると、遠位ヒスチジンがシアノ化されて、第六配位子の水分子がなくなり空の状態となり、ヘム鉄が 5 配位型 high-spin である改変ミオグロビン (CN-E7-Mb) ができる。さらにこの改変ミオグロビンにアジドイオンを加えると、遠位ヒスチジンと結合していた CN と環化反応し、ヘム鉄が 6 配位型のテトラゾールミオグロビン (Tet-E7-Mb) が形成される (Fig. 14)。そこで、これらの改変ミオグロビンの電気化学挙動の native Mb との違いを比較した。

5-1 スペクトル特性 改変ミオグロビン（酸化体）の UV-visible スペクトルの Soret 帯吸収波長はクジラ由来、ウマ由来のミオグロビンともに、CN-E7-Mb が 394 nm、Tet-E7-Mb が 420 nm となり、改変ミオグロビンが生成していることが示された。CN-E7-Mb の Soret 帯吸収波長は native Mb に比べてブルーシフトしており、また吸収強度も小さくなっている。これは 5 配位型のヘム構造を持つものに見られる特徴であり、CN-E7-Mb が 5 配位型で、第六配位場に水分子がないことを示している。

CN-E7-Mb は、遠位ヒスチジンのシアノ化イミダゾールの加水分解が起こり、UV-visible スペクトルは徐々に native Mb のスペクトルへ戻る。更に CN-E7-Mb 溶液を N₂、O₂、He など bubbling するとより native Mb に戻り易くなることから、UV-visible スペクトルやサイクリックボルタモグラムより明らかになった。この CN-E7-Mb の安定性はクジラ由来のものの方がウマ由来のものより大きい、つまりクジラ由来ミオグロビンの方が加水分解が起こりにくいことがわかっている。これはミオグロビンのヘムポケットを構成するアミノ酸配列の違いが原因となっている。Mb (HH) は 45 番目のアミノ酸がリジン (Lys) であるのに対し、Mb (SW) はアルギニン (Arg) であるが、この Arg のグアニジル基とシアノ化イミダゾールの静電的相互作用によって CN-E7-Mb は安定化され、更にクジラ由来の場合には水分子が遠位ヒスチジンに接近しにくく、シアノ化イミダゾールの加水分解が遅くなることが原因として考えられる。

一方、Tet-E7-Mb の Soret 帯吸収波長は

native Mb に比べてレッドシフトしており、吸収強度は小さい。このことから、テトラゾールアニオンが第六配位子としてヘム鉄に配位しているような環境にあることが示唆される。

還元体におけるそれぞれの UV-visible スペクトルは deoxy 型のスペクトルと互いによく似ており、遠位ヒスチジンの修飾がヘム鉄に影響を及ぼすのは酸化体においてのみであると考えられる。

これらの改変ミオグロビン（酸化体）の CD スペクトルから、 α -ヘリックスシグナルを表す 250 nm 以下の短波長の CD スペクトルは 3 つとも同じであり、タンパクの全体的な構造は互いに似ていることがわかる。長波長側の Soret 帯 CD シグナルは、CN-E7-Mb のものはクジラおよびウマ由来のミオグロビンともに native Mb に比べて強度が小さくなっている。Soret 帯における CD シグナルは、ヘムポケット内でのヘムとアミノ酸との相互作用を反映しており、CN-E7-Mb の CD シグナルが小さいことは、この改変ミオグロビンの酸化還元中心であるプロトヘムと近傍のアミノ酸残基との相互作用が native Mb に比べて弱いことを示唆している。一方、Tet-E7-Mb の Soret 帯における CD シグナルは、アジドイオン (N₃⁻) を第六配位子としているアジドミオグロビン (N₃-Mb) のものと似ていることがわかった。

それぞれの還元体（長波長側）の CD スペクトルは、UV-visible スペクトルの場合と同様に、いずれもほとんど同じで、これらの修飾改変ミオグロビンのヘム環境に違いがあらわれるのは、酸化体においてのみであることがわかる。

5-2 電極反応 クジラ由来およびウマ由来の native Mb では、窒素雰囲気下、親水性の高い In_2O_3 電極上で可逆な酸化還元波が得られる。同様に、CN-E7-Mb についても高親水性の In_2O_3 電極で明瞭な酸化還元波が観察された。ピーク電流はミオグロビン濃度および電位掃引速度の $1/2$ 乗に比例し、電極反応が拡散律速であることが確認された。サイクリックボルタンメトリー及びポテンシャルステップクロノクーロメトリーから算出した拡散係数 (D) は 25°C で $0.9 (\pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (CN-E7-Mb (SW))、 $1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (CN-E7-Mb (HH)) であり、この値は報告されているマッコウクジラ Mb の $D = 1.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ とよく一致した。

CN-E7-Mb と native Mb のサイクリックボルタモグラムより、それぞれの酸化還元電位は CN-E7-Mb (SW) が -35 mV 、CN-E7-Mb (HH) が -38 mV となり、それぞれ native Mb の値 (native Mb (SW) が -130 mV 、native Mb (HH) が -140 mV) に比べて 100 mV 程ポジティブな値を示した (Fig. 15)。aquomet 型 native Mb では第六配位場に水分子が配位しており、この水分子がへム鉄に対して電子供与的な役割を果たしているのに対し、CN-E7-Mb の場合は第六配位場が空であるため、このような酸化還元電位のポジティブシフトが起こると考えられる。

Tet-E7-Mb と native Mb のサイクリックボルタモグラムはクジラ由来、ウマ由来いずれの場合にも改変ミオグロビンについては明瞭な再酸化波が得られず、低温および掃引速度を上げて測定しても、きれいなレドックス波は得られなかった。低温で測定した Tet-E7-Mb (HH) と

N3-Mb (HH) のサイクリックボルタモグラムの形状は互いによく似ており (Fig. 16)、還元電位が native Mb に比べて大きくネガティブな値を示した。Tet-E7-Mb は還元されるとテトラゾールアニオンが外れることが示唆され、また軸配位を含む環境が電位に影響すると考えられる。

明瞭な酸化還元波が得られた CN-E7-Mb と native Mb について、デジタルシミュレーション法を用いて不均一電子移動速度定数 (k^0) を算出した (Fig. 17)。それぞれ k^0 は native Mb (SW) が $1.0 \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ 、CN-E7-Mb (SW) が $2.3 \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ 、native Mb (HH) が $8.0 \times 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ 、CN-E7-Mb (HH) が $2.5 \times 10^3 \text{ cm s}^{-1}$ であり、CN-E7-Mb の k^0 は native Mb の値より一桁大きく、電子移動が速いことが明らかになった (Table 2)。この様に、CN-E7-Mb ではその酸化還元中心であるへム鉄は 5 配位型 high-spin であるにも関わらず、native Mb に比べて k^0 は著しく大きい。ミオグロビンの電子移動反応について、これまでへム鉄のスピンの状態が最も重要な要素の一つであると考えられており、CN-Mb や cytochrome c のような金属タンパク質で起こる酸化型 low-spin から還元型 low-spin への電子移動反応、つまり酸化還元反応においてへム鉄のスピンの状態の再配列が起こらない場合に、速い電子移動が起こることがわかっている。

CN-E7-Mb の電子移動が速い理由についても同じように考えられる。CN-E7-Mb の場合は第六配位座が空であるために、同じく第六配位座に何も存在しない deoxy 型のミオグロビンとへム鉄がほぼ同じ位置にあると考えられる。CN-E7-Mb の X 線解析はまだ行われていないが、遠位側から引っ張る配位子がない分、

native Mb よりもヘム鉄の位置はヘム平面から離れていると考えられる。従って酸化還元反応においてヘム鉄がほとんど動くことがない（酸化体 high-spin \rightleftharpoons 還元体 high-spin）ので電子移動が速いと考えられる (Fig. 18a)。

一方 native Mb では第六配位場に水分子が存在しており、Fig. 18b のようにヘム鉄に結合して引っ張っているような環境にある。X 線解析により、酸化体におけるヘム鉄とヘム平面との距離は 0.04 nm、還元体では 0.055 nm と測定されており、酸化還元反応において水分子の出入りを伴い、ヘム鉄が動く必要があるために電子移動が遅くなると考えられる。

5-3 ラマンスペクトル CN-E7-Mb のスピン状態は EPR 測定によって、酸化体および還元体の両方について 5 配位型であることが明らかになっている。これより native Mb、CN-E7-Mb ではそれぞれ 1560 cm^{-1} (high-spin 状態)、 1570 cm^{-1} にあらわれ、Tet-E7-Mb および CN-native Mb では 1580 cm^{-1} (low-spin 状態) にあらわれることがわかった。native Mb および CN-E7-Mb では両方とも酸化還元反応において酸化体 high-spin \rightleftharpoons 還元体 high-spin でありスピン状態は変化しないにも関わらず、電子移動速度に大きな違いがあらわれるということから、電子移動速度の違いはヘム鉄のスピン状態のみによるものではないことが考えられる。native Mb の場合では、酸化体 aquomet Mb からヘム鉄が 5 配位型である還元体 deoxy Mb へと還元反応が起こる際に、第六配位子として存在している水分子が放出され、鉄イオンの移動が起こり、CN-E7-Mb に比べて余分な再配列エネルギーが必要となるため、電子移動が遅く

なると考えられる。これまでの経験により、例えば 5 配位型の Mn-Mb では第六配位場に水分子が配位していないために電子移動が遅いと考えられていたが、同じ 5 配位型である CN-E7-Mb の電子移動が速いという結果から、水分子を含めて第六配位子の存在が電子移動が速いため条件ではないことが示された。

5-4 pH の影響 native Mb と CN-E7-Mb のサイクリックボルタモグラムから得られたピークセパレーションを pH に対してプロットすると、酸化還元中心が aquomet 型である native Mb では pH 依存性があるのに対し、第六配位場が空である CN-E7-Mb では pH によってほとんど変化しなかった。aquomet 型のミオグロビンにはすべてピークセパレーションに pH 依存性があり、第六配位座に水分子が存在していないミオグロビンでは pH によって電子移動速度が変わらないことがわかっている。第六配位子が存在しない CN-E7-Mb が pH 依存性を示さないことは、この一般的な事実と一致している。

5-5 ストップフロー法による還元反応 電気化学的手法を用いて酸化還元反応を行い、その結果からデジタルシミュレーション法によって求めた不均一電子移動速度と、溶液中での化学的還元反応速度を比較するために、大過剰のダイチオナイトを用いてストップフロー測定を行った。ストップフロー測定により解析した、ダイチオナイトによる native Mb、CN-E7-Mb および Tet-E7-Mb の還元反応の一次プロットから、native Mb、Tet-E7-Mb では直線、CN-E7-Mb では biphasic な直線が得られた。この CN-E7-Mb について得られた biphasic な挙動の原因は明確ではないが、CN-E7-Mb の