

不安定さを反映しているのではないかと考えられる。

これらの改変ミオグロビンの一次速度定数、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と合わせて比較した。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 を考慮に入れても、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 電極を用いて得られた電子移動速度定数と、ストップト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ることが明らかになった。Tet-E7-Mb の化学的還元速度定数がやや小さいのは、ヘム鉄に配位したテトラゾールアニオンと、還元剤の SO<sub>2</sub><sup>-</sup> との反発が原因であると考えられる。

## 6. 遠位ヒスチジン修飾改変アザミオグロビン

native Mb と同じく aquomet 型であるが酸化体におけるヘム鉄が中間スピン状態であるモノアザヘミン再構成ミオグロビン (monoaza Mb) および、遠位ヒスチジンが直接ヘム鉄に配位している hemichrome 型のジアザヘミン再構成ミオグロビン (diaz Mb) を用いて遠位ヒスチジン修飾改変ミオグロビンを作成し、その電気化学挙動を測定比較した。monoaza Mb およびその遠位ヒスチジン修飾改変ミオグロビン (CN-E7-monoaza Mb)、diaz Mb およびその改変ミオグロビン (CN-E7-diaz Mb) の Soret 帯吸収波長は遠位ヒスチジンの修飾によってブルーシフトし、その強度も小さくなることがわかった。また、CD スペクトルは遠位ヒスチジンの改変によってブロードなシグナルを示すことがわかった。

CN-E7-monoaza Mb および CN-E7-diaz

Mb のサイクリックボルタモグラムから、それぞれの酸化還元電位 ( $E^0$ ) は CN-E7-monoaza Mb が -105 mV (monoaza Mb は -180 mV)、CN-E7-diaz Mb が -10 mV (diaz Mb は -135 mV) となった。遠位ヒスチジン修飾改変ミオグロビンの酸化還元電位は修飾前の値に比べてポジティブな値を示し、またピークセパレーションも狭く電子移動が速くなることが明らかになった。

## 7. マンガンミオグロビン

ここでは、ヘムの役割を解明するため電気化学測定法及び分光電気化学測定法を用い、酸化還元中心の金属イオンを鉄からマンガンに変換し、天然ミオグロビンと電子移動速度、酸化還元電位及びジチオナイトによる化学的還元反応などを比較し、ミオグロビンの活性中心金属イオンが電子伝達に対してどのように影響するのかを調べた。

アポミオグロビンと活性中心金属マンガンを入れ換えたポルフィリンを用いて再構成することによって、マンガンミオグロビン (Mn-Mb) を合成した。精製した Mn(III)-Mb の可視スペクトルは  $\lambda = 374$  nm 及び  $\lambda = 471$  nm に極大がある。酸化体及び還元体のマンガンミオグロビンの CD スペクトルには 374 nm 及び 471 nm 付近に正のピークが見られる。天然ミオグロビンの CD スペクトルと比べると、全体的な二次構造は両者とも類似している。しかし、ソーレー帯での CD シグナルの強度はかなり弱くなっており、マンガンミオグロビンの活性中心と近接するアミノ酸残基の側鎖との相互作用が弱くなっていることがわかる。

ストップトフロー法を用い、Mn-Mb 酸

化体から還元体への UV 及び CD スペクトル変化を追跡した結果、Mn-Mb の還元二次速度定数が  $1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  である。この値は同じ条件下でのミオグロビンの値より 1/25 倍になっている。

高親水性  $\text{In}_2\text{O}_3$  電極を用いても Mn-Mb の明瞭なボルタモグラムは観察されなかったが、 $\text{In}_2\text{O}_3$  電極を用いた薄層分光電気化学セル (OTTLE) 中での Mn-Mb の電気化学的還元に伴うスペクトル変化を追求したところ、極めて長時間を要するものの印加電位に伴ってスペクトル変化が認められた。そこで、電子移動速度を可逆的に促進する電子移動媒介分子 (メディエーター) を検討した結果、Oxazine 170 perchlorate が Mn-Mb 可逆な電気化学反応に対して、極めて良い触媒効果を示した。0.00 V ~ -0.45 V vs. Ag/AgCl の間還元電位を変化させて印加した時の UV スペクトル変化を Fig. 19 に示した。440 nm において Nernst plot は傾き約 65 mV/dec の直線となり、 $E^0 = -0.32 \text{ V (vs. Ag/AgCl)}$  が得られた。

さらに、亜鉛ミオグロビンを作製してその電気化学挙動の解明を試みたが、電子移動速度が遅く明瞭なボルタモグラムを得ることはできなかった。また適当なメディエーター分子を見出すにも至らなかった。しかし極めて興味あることに、亜鉛ミオグロビン・ $\text{NADP}^+$  系は自然界の光合成反応の極めてシンプルなモデルとして機能することを見出した。すなわち、酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビン (Mb) の活性中心 (鉄プロトポルフィリン) を亜鉛プロトポルフィリン (ZnPP) に置換した亜鉛ミオグロビン (ZnPP-Mb) を再構成法で作製し、光励起した ZnPP-Mb を用いて  $\text{NADP}^+$  への電子移動反応を

試みた。犠牲試薬 (電子ドナー) としてトリエタノールアミン (TEA) を用いた。種々の条件を検討した結果、pH 8.9 の溶液中で、ZnPP-Mb /  $\text{NADP}^+$  系に光照射すると、NADPH の生成に基づく 340 nm の吸収が増加し、ZnPP-Mb から  $\text{NADP}^+$  への電子移動による NADPH の生成が確認された。

## E. 結論

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結果、いくつかの興味ある結論が得られた。それらは概略次のようにまとめられる。

1) 再構成ミオグロビンの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する。例えば、ポルフィリン骨格に一つ、および二つの窒素原子を導入したモノアザヘミン、ジアザヘミンを再構成したミオグロビンの電子移動は速くなる。一方、プロトヘムの中心金属をマンガンに置き換えたヘムを再構成したミオグロビンでは、電子移動が遅くなる。酸化還元電位については、ポルフィリン骨格からの影響に加えて、軸方向の配位子の影響が生じるが、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。

2) プロトポルフィリンの構造はヘム鉄の酸化還元電位の制御とミオグロビン還元体の酸素分子による自動酸化速度を制御する上で、重要な役割を担っている。ポルフィリンまわりの置換基を変化させてヘム鉄の電子状態が異なるヘム (diacethylheme IX、protoheme IX、deuteroheme IX、mesoheme IX) を作製し、それ

を用いて再構成したミオグロビンについて、再構成ミオグロビンの酸化還元電位は、ヘム鉄への軸方向からの寄与がほぼ同じため、ヘム自身の酸化還元電位を反映した値を示した。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る。

3) 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い。すなわち、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の存在は必ずしも必要条件ではない。第六配位場が空の CN-E7-Mb 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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- I. Taniguchi

Electron Transfer Reactions of Semi-Artificial Biomolecules

in "*Novel Trend in Electroorganic Synthesis*", S. Torii (Ed.),  
Springer-Verlag, Tokyo, pp.405-408 (1998)

- Y. Mie, K. Sonoda, S. Neya, N. Funasaki and I. Taniguchi

Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes

*Bioelectrochem. Bioenerg.*, **46**, 175-184 (1998)

- 谷口 功

生体分子機能電極界面の構築とセンシングー生物電気化学の新しい展開ー

分析フォーラムー極微分析法の最前線ー日本分析化学会編、pp. 42-51 (1999)

- I. Taniguchi, C.-Z. Li, M. Ishida, Q. Yao

Electrochemical and spectroelectrochemical properties of manganese reconstituted myoglobin

*J. Electroanal. Chem.*, **460**, 245-250 (1999).

### 2. 学会発表

- I. Taniguchi

Electroanalytical Chemistry of Myoglobin with Modification of Distal Histidine by Cyanated Imidazole,

Pre-satellite Symposium of the 49th ISE Meeting on the New Trends  
in Electroanalytical Chemistry 1998年9月

- I. Taniguchi

Surfaces for cytochrome c electrochemistry: Effect of sulfide as an impurity in the PySH promoter solution on the structures of modified surfaces

Post-symposium of the 49th ISE meeting: Biological Electron Transfer Systems  
and Their Use in Molecular Sensing 1998年9月

- Y. Mie, K. Sonoda, and I. Taniguchi

Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes,

Post-symposium of the 49th ISE meeting: Biological Electron Transfer Systems  
and Their Use in Molecular Sensing 1998年9月

- I. Taniguchi,

Functional electrodes for probing metalloproteins and bioelectrochemical systems

International Symposium on Bioelectrochemistry  
of Metalloproteins and Sensing 1998年9月

・谷口 功

生体分子機能電極からセンシング素子・システム構築への展開

分析化学会九州支部講演会 1998年11月

・谷口 功

生体分子機能電極界面の構築とセンシングー生物電気化学の新しい展開ー

第11回分析化学フォーラム 1999年1月

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

**Table 1** Rate constants of electron transfer reactions for native and reconstituted myoglobins.

Myoglobins	DAcP IX Mb	native Mb	deutero IX Mb	meso IX Mb
$k_1^{a)}$ / s <sup>-1</sup>	23.4 ± 0.5	9.6 ± 0.2	7.1 ± 0.2	9.4 ± 0.2
$k_2^{a, b)}$ / 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	8.7 ± 0.2	3.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
$k^{0c)}$ / 10 <sup>-4</sup> cm s <sup>-1</sup>	7.5 ± 0.1	8.0 ± 0.1	1.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1
$E^{0c)}$ / mV vs. Ag/AgCl	-35 ± 5	-140 ± 5	-155 ± 5	-165 ± 5
$k^{d)}$ / 10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup>	0.44 ± 0.05	0.84 ± 0.05	1.3 ± 0.1	1.8 ± 0.1

a) The first-order ( $k_1$ ) and the second-order ( $k_2$ ) rate constants for the chemical reduction of 15 μM myoglobins with 7.5 mM dithionite (concentration are after mixing) at 20 (± 0.5) °C in a 100 mM Tris-HCl buffer solution (pH 6.5). The change in absorbance with time was monitored at the absorption peak of myoglobin in the reduced form.

b) The concentration for the dithionite radical anion as an active reducing reagent was 2.7 μM using the dissociation constant of 10<sup>-9</sup> M for 7.5 mM dithionite<sup>35)</sup>.

c) Data were obtained at an In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode with the fully hydrophilic surface at 25 °C.

d) The first-order rate constants for the autoxidation at 35 °C.

**Table 2.** Rate constants of electron transfer reactions for native and reconstituted myoglobins.

Mbs	SW			HH		
	native Mb	CN-E7-Mb	Tet-E7-Mb	native Mb	CN-E7-Mb	Tet-E7-Mb
$k_1^{a)}$ / s <sup>-1</sup>	2.6 ± 0.1	47.4 ± 5.0 (16.3 ± 5.0)	1.8 ± 0.1	5.1 ± 0.1	70.0 ± 5.0 (22.6 ± 2.0)	4.2 ± 0.1
$k_2^{a, b)}$ / 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	0.96 ± 0.05	17.6 ± 2.0 (6.0 ± 1.0)	0.67 ± 0.05	1.9 ± 0.1	25.9 ± 2.0 (8.4 ± 1.0)	1.6 ± 0.1
$k^{0, c)}$ / 10 <sup>-4</sup> cm s <sup>-1</sup>	1.0 ± 0.1	23 ± 2	ND <sup>d)</sup>	8.0 ± 0.1	25 ± 2	ND <sup>d)</sup>
Spin state <sup>e)</sup> (ferric heme iron)	high	high	low	high	high	low
Sixth coordination site (oxidized form)	H <sub>2</sub> O	Vacant	Tetrazolyl Im <sup>f)</sup>	H <sub>2</sub> O	Vacant	Tetrazolyl Im <sup>f)</sup>
$E^{0, c)}$ / mV vs. Ag/AgCl	-130 ± 5	-35 ± 2	ND <sup>d)</sup>	-140 ± 5	-38 ± 2	ND <sup>d)</sup>

a) The first-order ( $k_1$ ) and the second-order ( $k_2$ ) rate constants for the chemical reduction of 15 μM myoglobins with 7.5 mM dithionite (concentrations are after mixing) at 20 (± 1) °C in a 0.1 M Tris-HCl buffer solution at pH 6.5. The change in absorbance with time was monitored at the absorption peak of Mb in the reduced form at 434 nm. The kinetics of CN-E7-Mb showed biphasic behavior and the rate constants obtained by the data after 20 ms for Mb(HH) or 30 ms Mb(SW) are also given in parentheses.

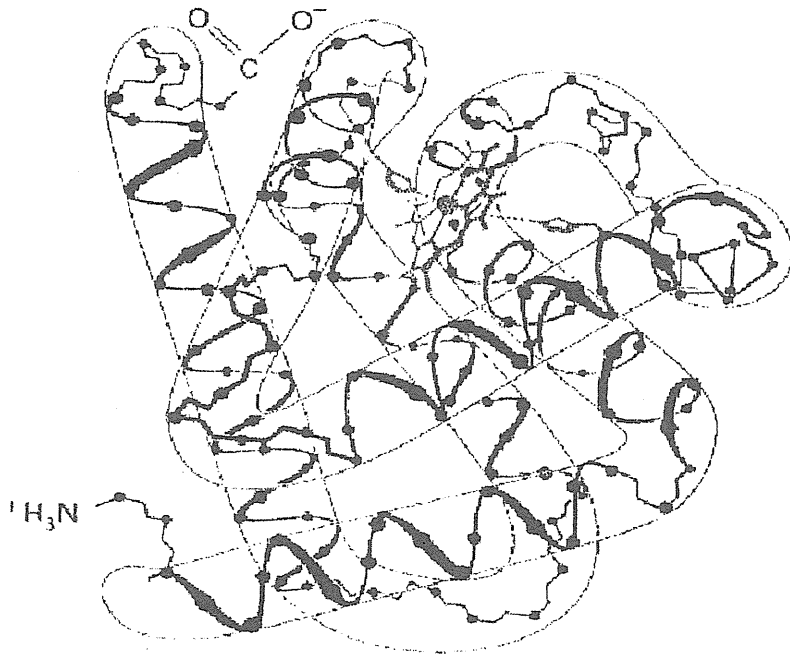
b) The concentration for the dithionite radical anion as an active reducing reagent was 2.7 μM using the dissociation constant of 10<sup>-9</sup> M for 7.5 mM dithionite.

c) Data were obtained at an In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> electrode with the fully hydrophilic surface at 25 °C.

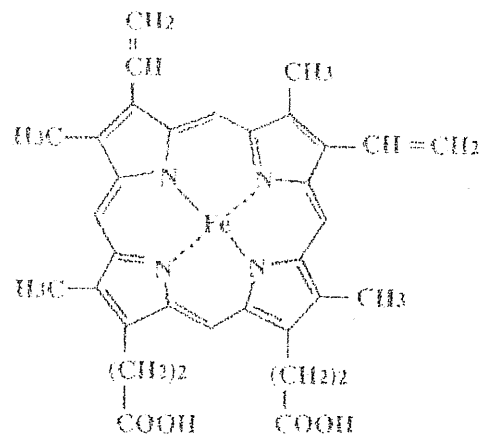
d) ND: not determined in the present study.

e) As a predominant state. See the text.

f) Tetrazolyl imidazole of distal histidine (see Fig. 1).



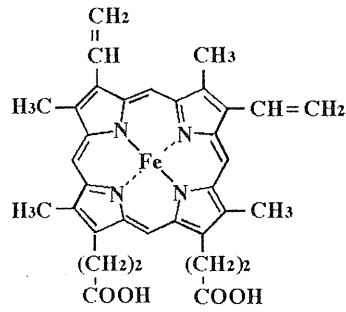
M.W.	ca. 19,000 (Sperm Whale) ca. 18,000 (Horse Heart)
Amino Acid residues	153
Redox center	Heme b (protoheme) $\text{Fe}^{3+} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$
Isoelectric point	8.25 (Sperm Whale) 6.8 (Horse Heart)
Size	ca. $45 \times 35 \times 25 \text{ \AA}$



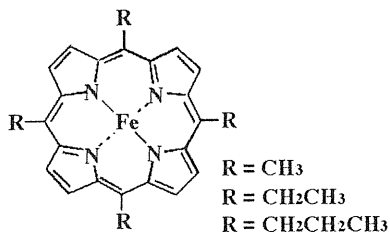
Heme b ( protoheme )

Fig. 1 Profile of myoglobin.

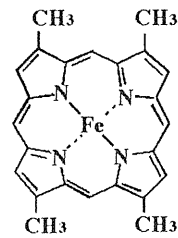




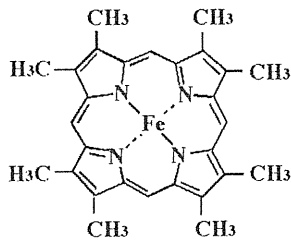
**hemin**  
(protoporphyrin IX)



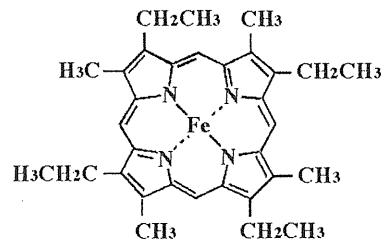
**tetraalkylhemin**  
(*meso*-tetraalkylporphyrin)



**1, 4, 5, 8-tetramethylhemin**  
(1, 4, 5, 8-tetramethylporphyrin)



**octamethylhemin**  
(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-octamethylporphyrin)



**etiohemin**

Fig. 2 Structures of modified hemes for reconstitution.

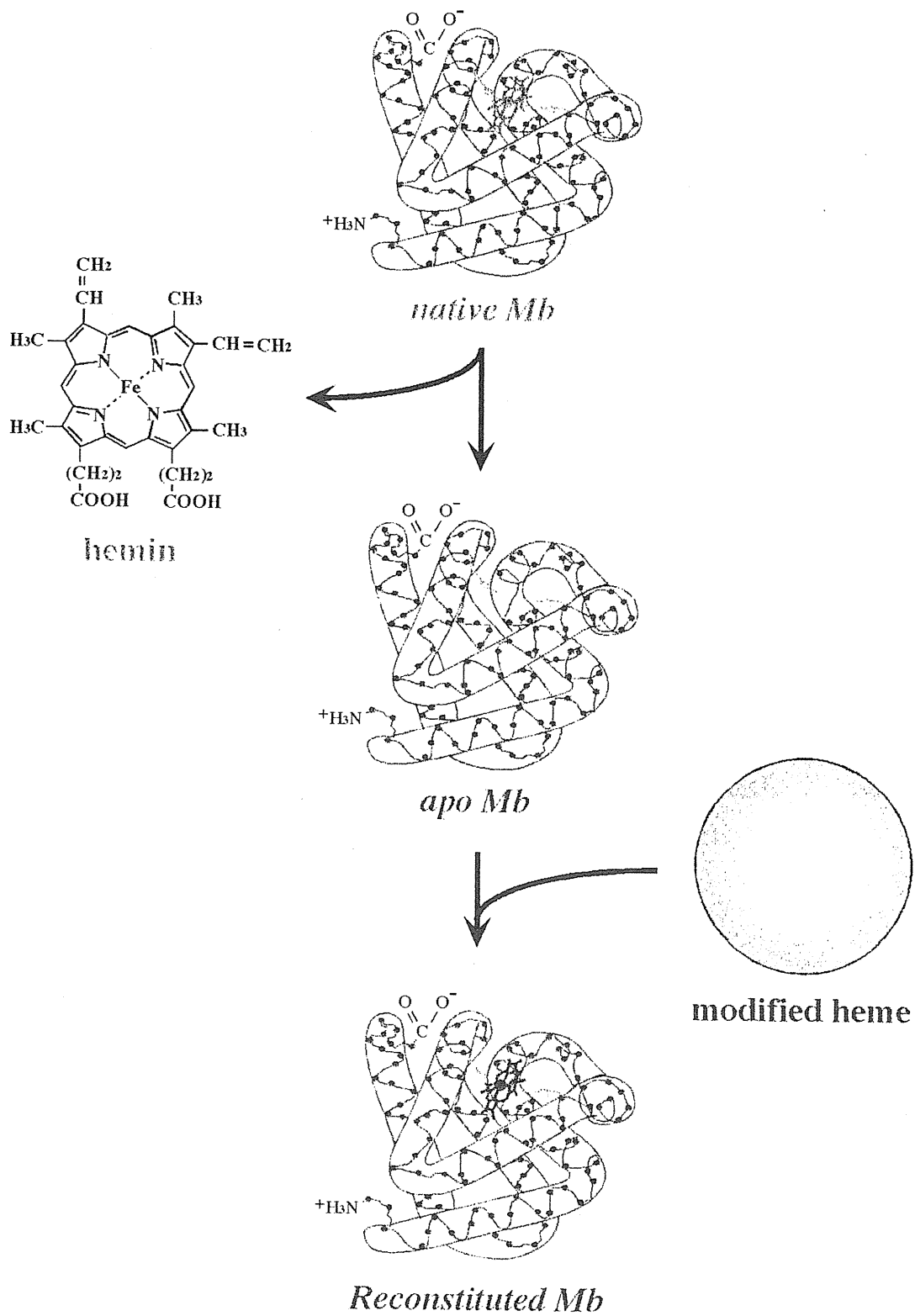


Fig. 3 Preparation of apomyoglobin and reconstituted myoglobin.

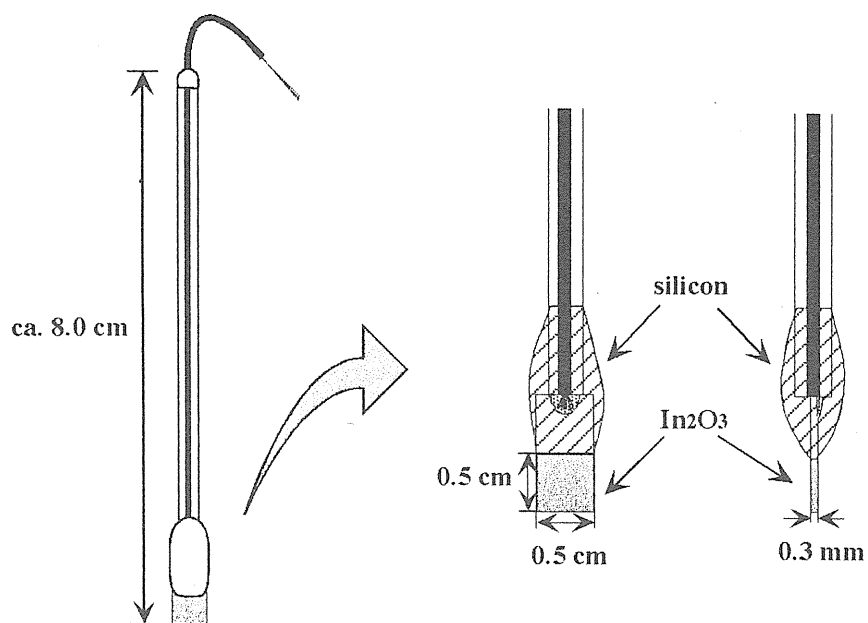


Fig. 4-(a) Working electrode (W.E.).

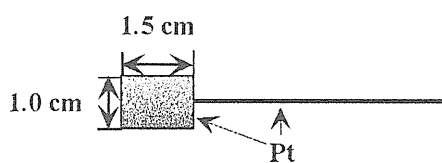


Fig. 4-(b) Counter electrode (C.E.).

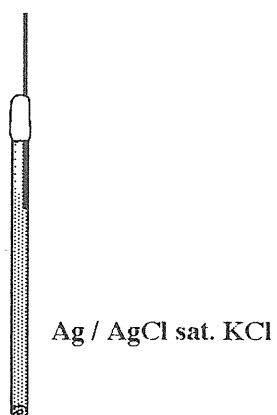


Fig. 4-(c) Reference electrode (R.E.).

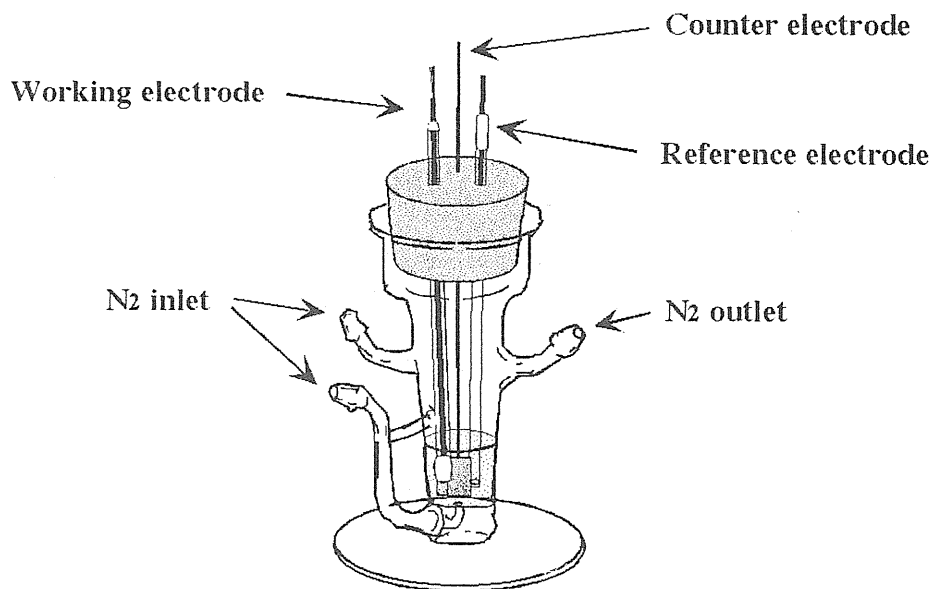
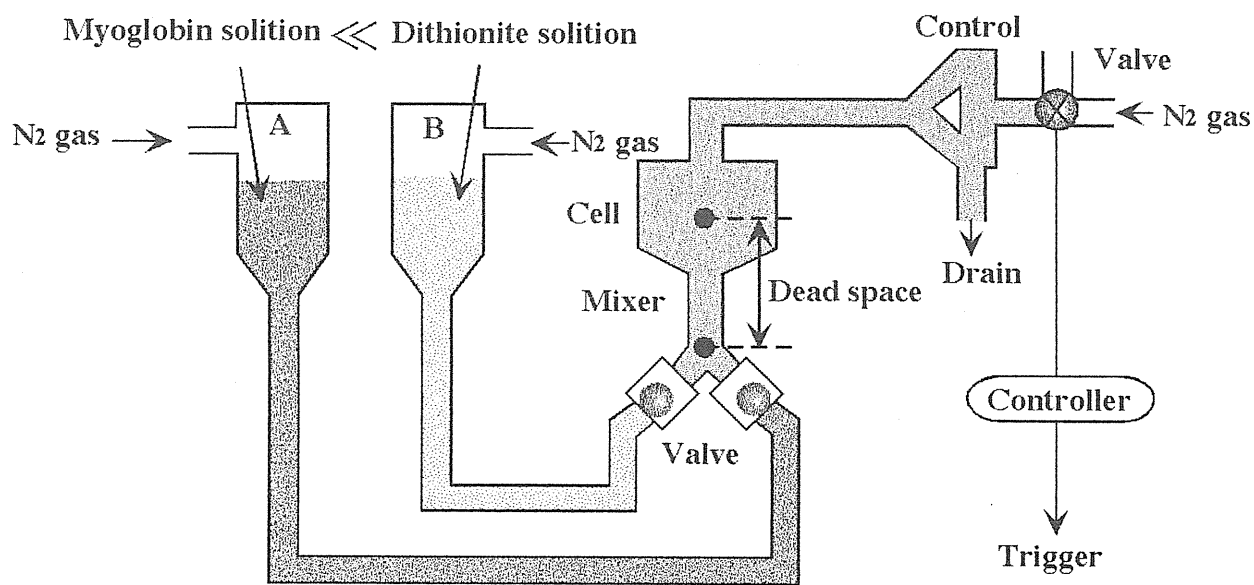


Fig. 5-(a) Cell for cyclic voltammetry.



Dead time : 8.0 msec

Fig. 5-(b) Schematic illustration of stopped flow system.

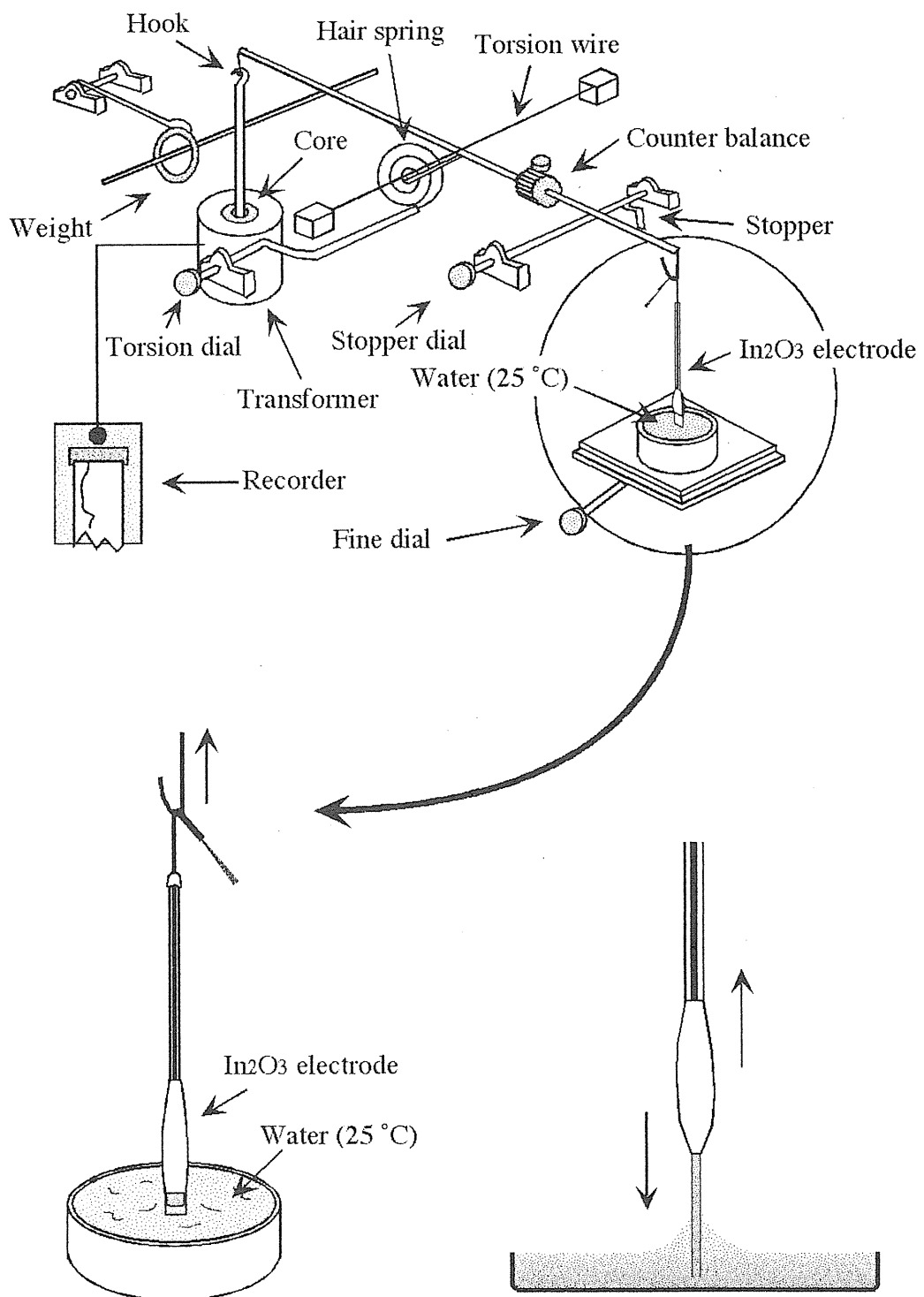
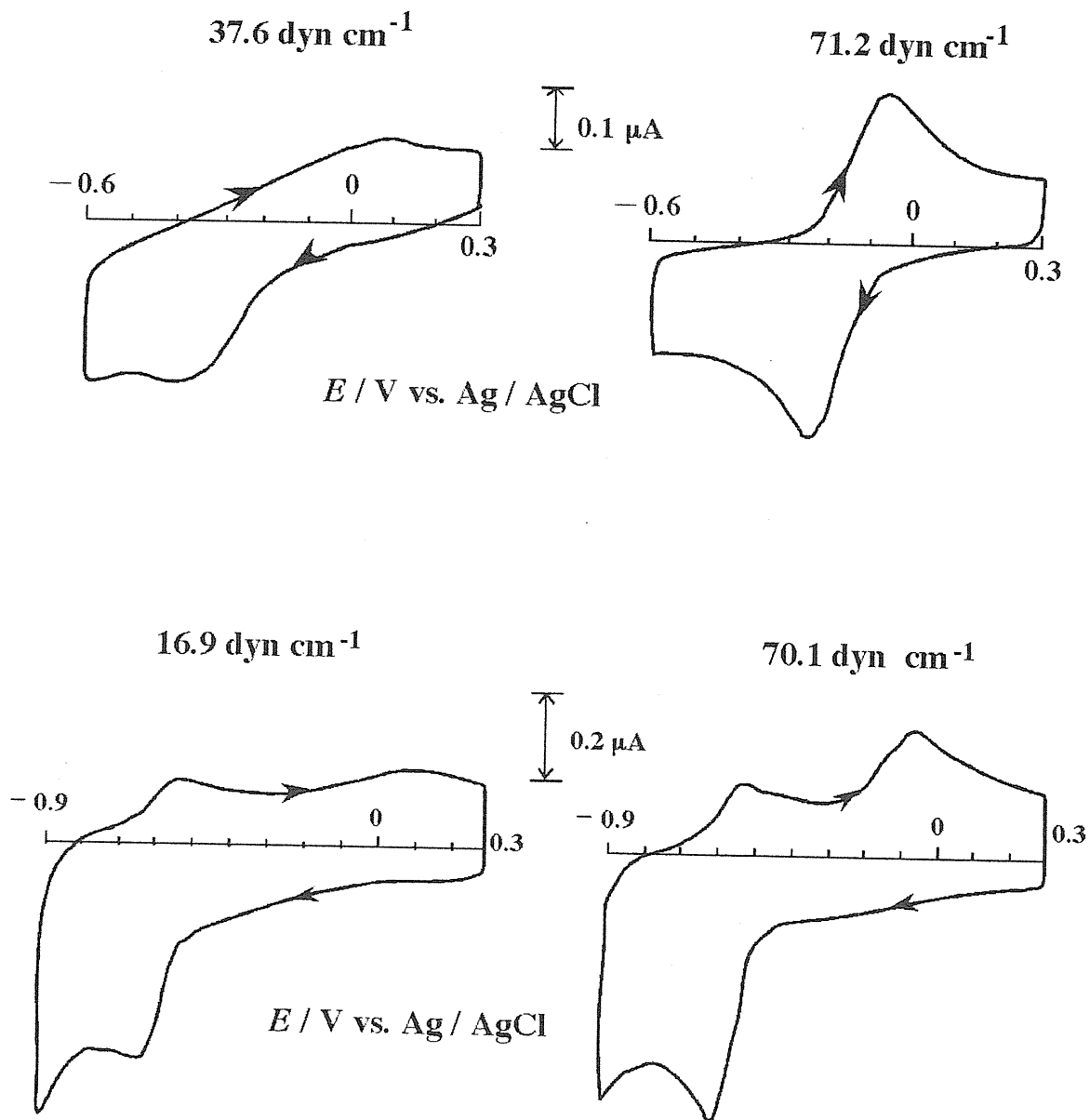
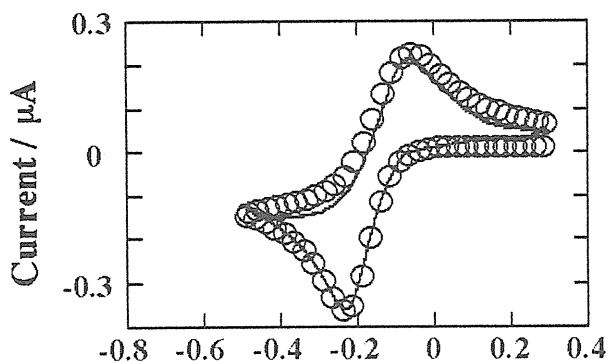


Fig. 6 Schematic illustration of Wilhelmy method ( Vertical plate method ) to estimate the hydrophilicity of electrode.



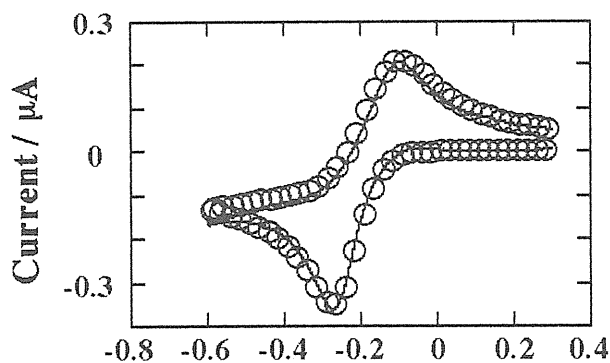
**Fig. 7** Cyclic voltammograms of 50  $\mu\text{M}$  myoglobin (upper) and cyanomyoglobin (lower) at  $\text{In}_2\text{O}_3$  electrodes with different hydrophilic surfaces in a B&R buffer solution (pH 6.5). Scan rate : 20  $\text{mV s}^{-1}$ .



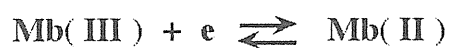
native Mb



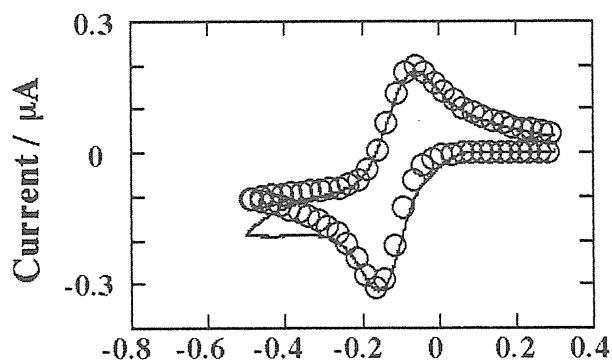
$$k^{0'} : \text{ca. } 1\text{-}3 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$$



monoaza Mb



$$k^{0'} : \text{ca. } 2\text{-}4 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$$



diaza Mb



$$k^{0'} : \text{ca. } 1\text{-}2 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$$

Potential / V vs. Ag/AgCl

Fig. 8 Cyclic voltammograms of Mbs in a bis-Tris buffer solution (pH 6.5) at a scan rate of 20 mV / s.

— : experimental curve ; ○ simulated data

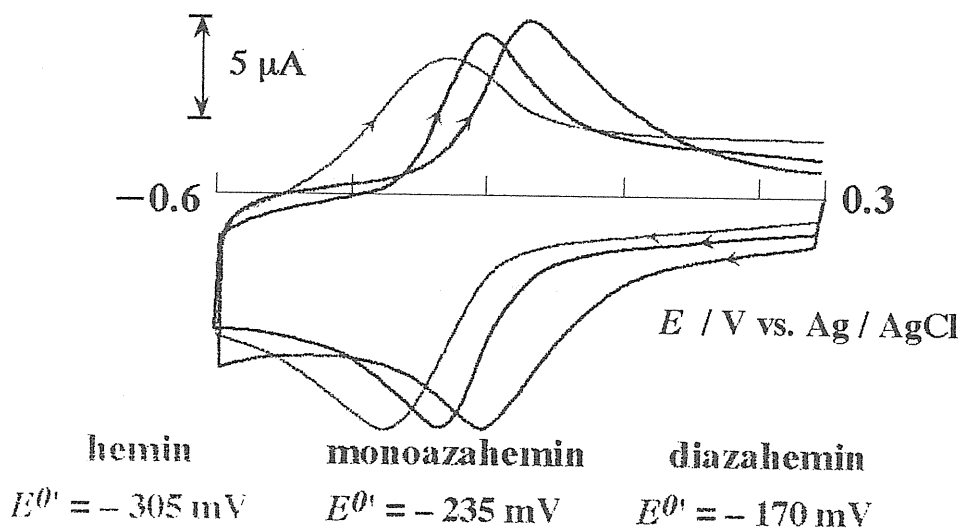


Fig. 9-(a) Cyclic voltammograms of ca 100  $\mu\text{M}$  (—) hemin, (—) monoazahemin and (—) diazahemin in methanol containing 0.1 M  $\text{NaClO}_4$  at a scan rate of  $1 \text{ V s}^{-1}$ .

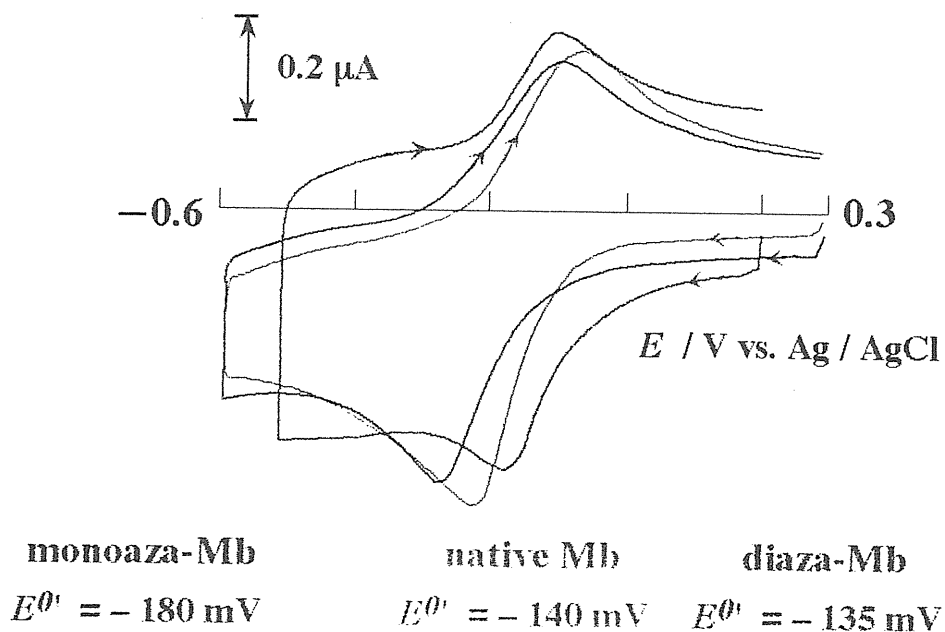
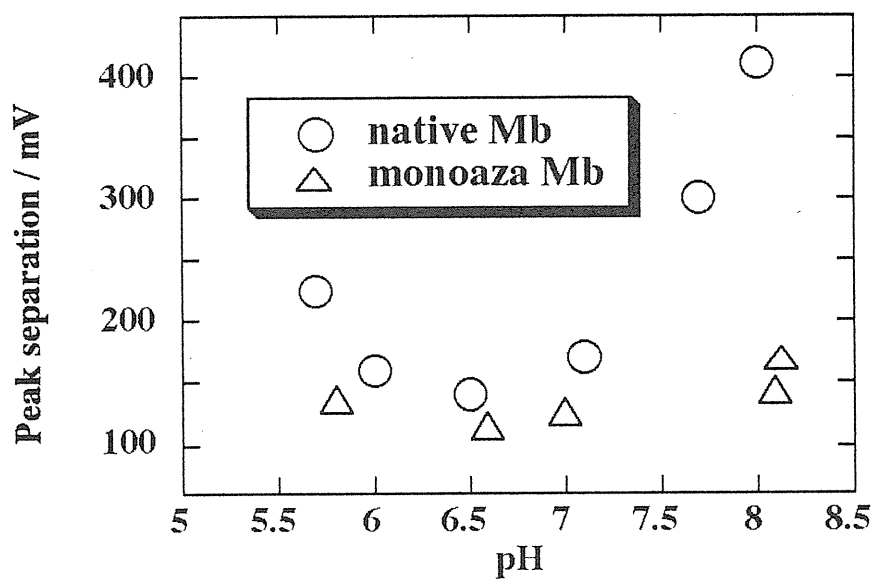
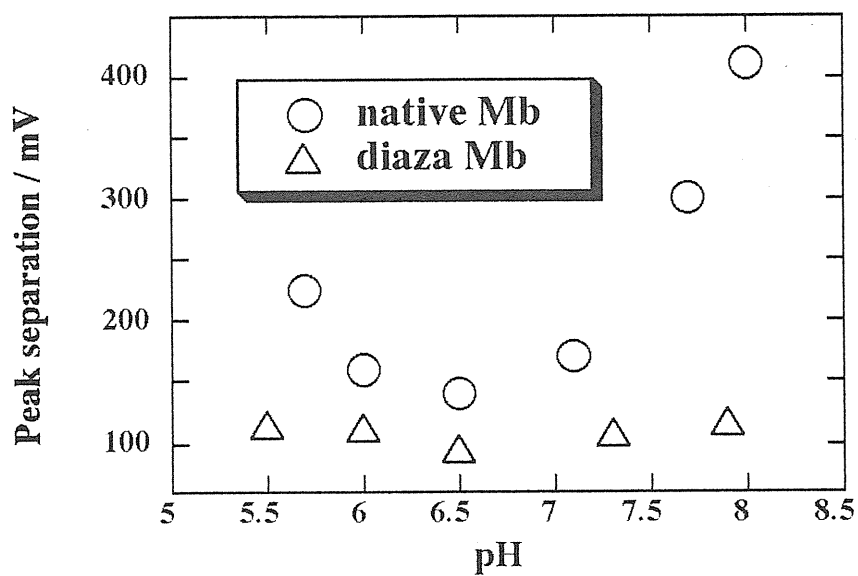


Fig. 9-(b) Cyclic voltammograms of ca 50  $\mu\text{M}$  (—) native, (—) monoazahemin and (—) diazahemin reconstituted myoglobin in 50 mM bis-Tris buffer solution (pH 6.5) at a scan rate of  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .





(a) monoaza Mb



(b) diaza Mb

Fig. 10 Effect of pH on the peak separation of the voltammograms of azaMbs in bis-Tris buffer solutions at a scan rate of 20 mV / s.

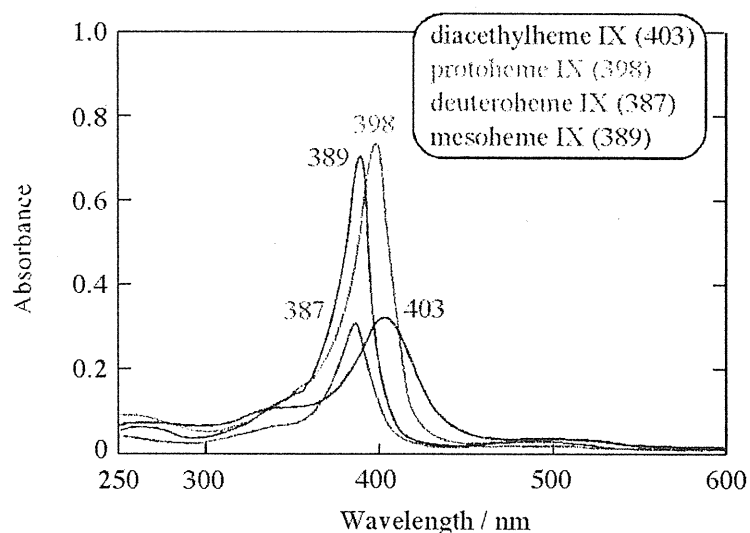


Fig. 11-(a) UV-visible spectra of 50  $\mu\text{M}$  diacethylheme, protoheme IX, deuteroheme IX and mesoheme IX in a methanol containing 0.1 M  $\text{NaClO}_4$  using a 0.1 cm cell.

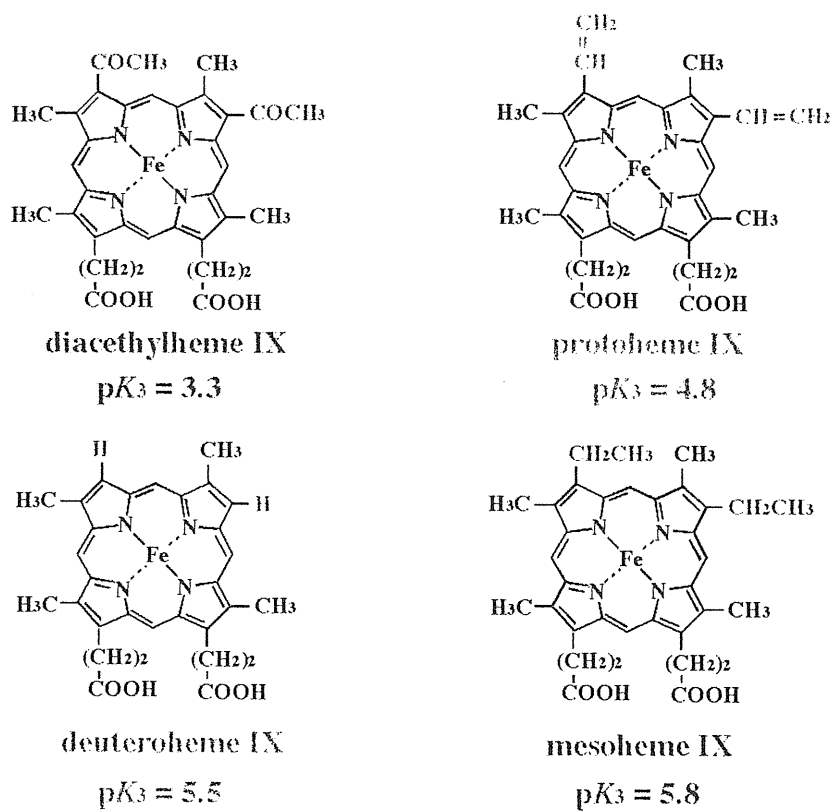


Fig. 11-(b) The  $pK_3$  values of diacethylheme IX, protoheme IX, deuteroheme IX and mesoheme IX.

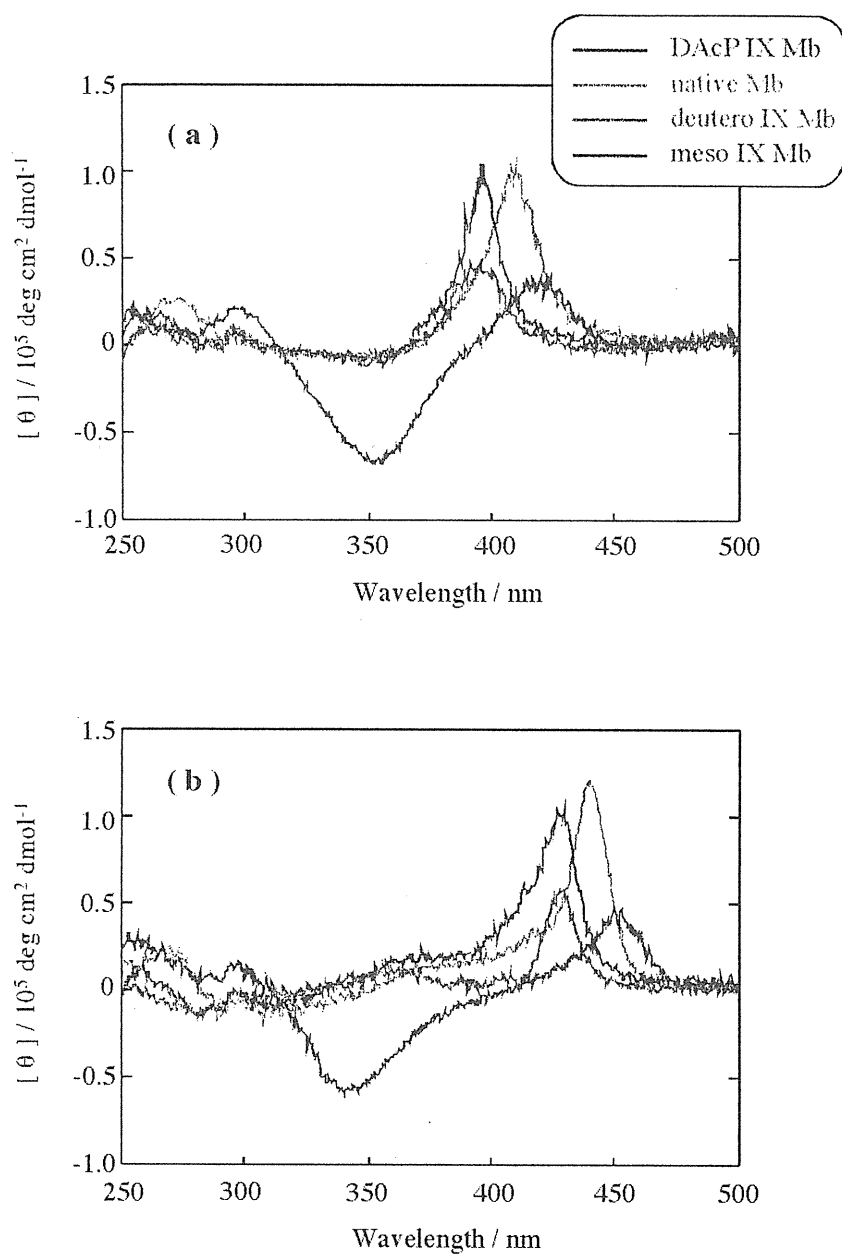


Fig. 12 CD spectra of 20  $\mu\text{M}$  native myoglobin, diacethylheme IX, deuteroheme IX and mesoheme IX reconstituted myoglobins in a 10 mM Tris-HCl buffer solution (pH 6.5) using a 0.5 cm cell, 20  $^\circ\text{C}$ . (a) : oxidized forms (b) : reduced forms

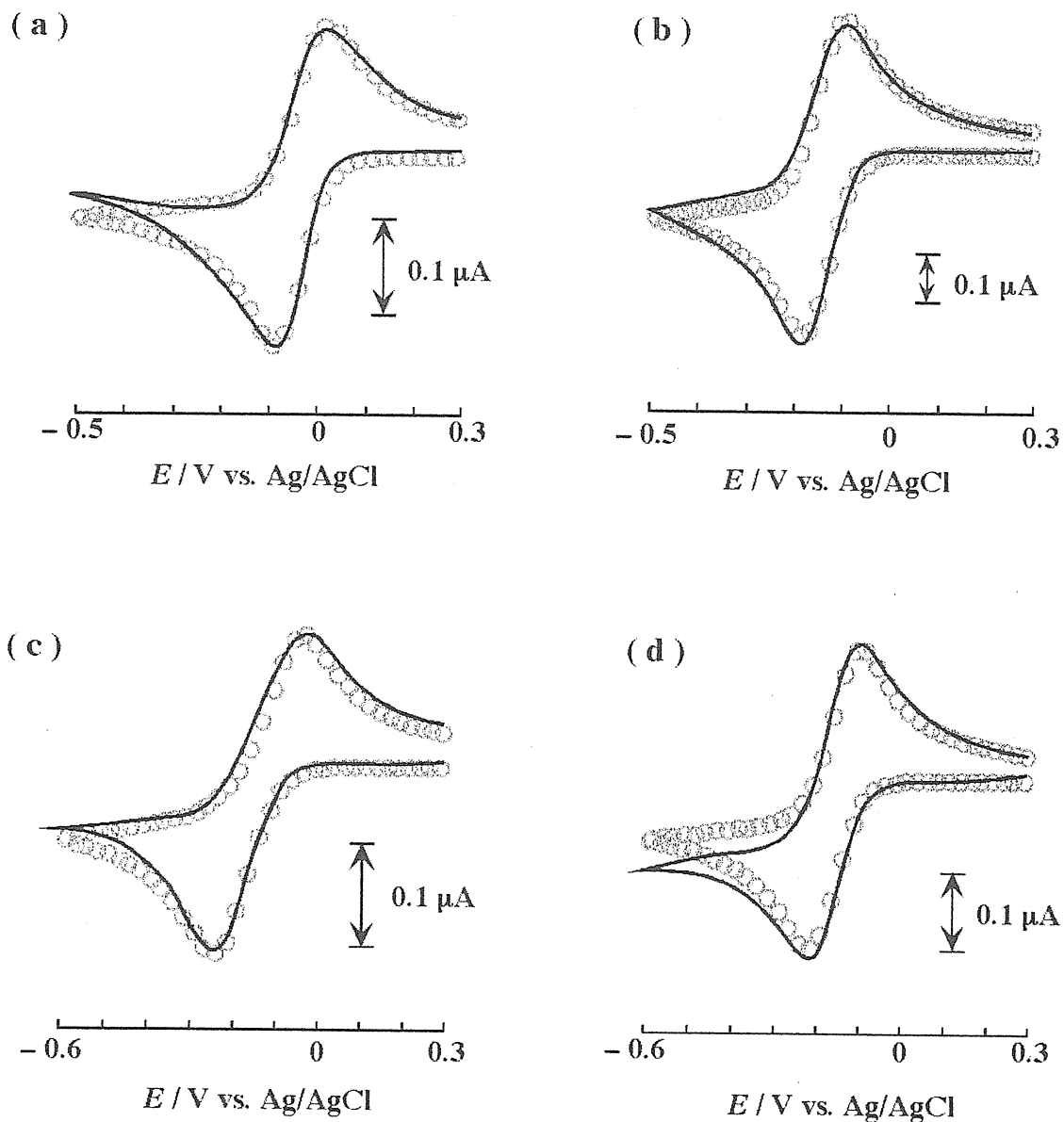


Fig. 13 Background-subtracted cyclic voltammograms of  $50 \mu\text{M}$  (a) diacetylhememe IX reconstituted, (b) native, (c) deuteroheme IX reconstituted and (d) mesoheme IX reconstituted myoglobins in a  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl buffer solution ( $\text{pH } 6.5$ ) at an  $\text{In}_2\text{O}_3$  electrode at  $25^\circ\text{C}$ , together with simulated data shown by circles at a scan rate of  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .