

The allosteric effect in hemoglobin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034923

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ヘモグロビンのアロステリック効果

課題番号 60304099

昭和62年度科学研究費補助金総合研究(A)研究成果報告書

昭和63年3月

研究代表者 森本英樹

大阪大学基礎工学部助教授

はしがき

この研究班は、1984年度に総合研究（A）の補欠として、実質半年間活動した。1985年度から1987年度まで3年間は通常の総合研究（A）として活動したが、一部分、1984年度を含めて報告する。

報告書としては、この班の研究活動を総合的に総括した文章「ヘモグロビンのアロステリック効果の研究」が主である。発表論文と口頭発表は、だいたい班員ごとにならべて、通し番号がつけてある。上記の文章と発表論文の関係を示すために、文章中に文献番号を入れた。又、班員による主要な論文7編をまとめて報告書の後ろにつけた。（発表論文のリストの中に示してあり、その順にならべてある。）上記の文章はあくまでも総括文なので、研究の具体的内容については、ひとつひとつの論文を参照していただきたい。

研究組織

研究代表者	森本英樹	大阪大学 基礎工学部	助教授
研究分担者	今井清博	大阪大学 医学部	助教授
	梶田昭彦	獨協医科大学	教授
	北川禎三	分子科学研究所	教授
	郷 信広	京都大学 理学部	教授
	高橋征三	日本女子大学家政学部	助教授
(86年度途中まで)	松川茂	金沢大学 医学部	講師
(86年度途中から)	馬渡一浩	金沢大学 医短	講師
(86、87年度のみ)	小西康子	北里大学 医学部	助手
(87年度のみ)	根矢三郎	京都薬科大学	助手
(85、86年度のみ)	今泉和彦	上越教育大学	助教授
(85、86年度のみ)	浅井博	早稲田大学理工学部	教授

研究経費

昭和60年度	3000千円
昭和61年度	2100千円
昭和62年度	1400千円
計	6500千円

発表論文

1), 2), 4), 6), 10), 13), 15) の 7 編の論文は、この冊子に収録してある。

- 1) Shibayama, N., Morimoto, H., Miyazaki, G.
Oxygen Equilibrium Study and Light Absorption Spectra
of Ni(II)-Fe(II) Hybrid Hemoglobins.
J. Mol. Biol. 192 323-329 (1986)
- 2) Shibayama, N., Morimoto, H., Kitagawa, T.
Properties of Chemically Modified Ni(II)-Fe(II) Hybrid
Hemoglobins: Ni(II) ProtoporphyrinIX as a Model for a
Permanent Deoxy-heme.
J. Mol. Biol. 192 331-336 (1986)
- 3) Shibayama, N., Inubushi, T., Morimoto, H., and
Yonetani, T.
Proton Nuclear Magnetic Resonance and Spectrophotometric
Studies of Nickle(II)-Iron(II) Hybrid Hemoglobins.
Biochemistry 26 2194-2201 (1987)
- 4) 森本英樹、柴山修哉、宮崎源太郎
混成ヘモグロビンの協同作用
蛋白質・核酸・酵素 32 557-565 (1987)
- 5) Imai, K., Yoshikawa, S., Fushitani, K., Takizawa, H.,
Handa, T. and Kihara, H.
Inference of allosteric unit in chlororuorin,
erythrocruorin, and hemerythrin on the basis of the
Monod-Wyman-Changeux model.
Invertebrate Oxygen Carriers (B. Linzen, ed.)
Springer-Verlag, 367-374 (1986)
- 6) 今井清博
血色素の協同作用
蛋白質・核酸・酵素 32 529-536 (1987)
- 7) Imai, K. et al.
The Bohr groups of human adult hemoglobin.
J. Physiol. Soc. Jap. 49 321 (1987)

- 8) Imai, K. et al.
Structural and functional consequences of amino acid substitutions in hemoglobin as manifested in natural and artificial mutants.
Protein Sequence and Data Analysis 発表予定
- 9) Matsukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y., and Kitagawa, T.
Correlation between the Iron-Histidine Stretching Frequencies and Oxygen Affinity of Hemoglobins. A Continuous Strain Model.
J. Am. Chem. Soc. 107 1108-1113 (1985)
- 10) Matsukawa, S., Mawatari, K., Shimokawa, Y., Takeda, Y., Yoneyama, Y., Itoh, M., Kurokawa, H., and Kitagawa, T.
Allosteric Mechanism Deduced from the Analysis of the Variation of Structure and Function of Abnormal Hemoglobins.
Acta Haematol. Jpn. 48 2202-2214 (1985)
- 11) Mawatari, K., Matsukawa, S., and Yoneyama, Y.
Valency Hybrid Hemoglobins with Special Attention to Subunit Organization.
Biomed. Biochim. Acta 46 S320-S324 (1987)
- 12) Matsukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y., and Kitagawa, T.
Functional and Structural Analysis on Abnormal Hemoglobins with Impaired Oxygen Binding Properties -To Elucidate the Allosteric Mechanism of Hemoglobin.
J. Protein Chem. 6 109-119 (1987)
- 13) Mawatari, K., Matsukawa, S., Yoneyama, Y., and Takeda, Y.
Assessment of $\alpha 1\beta 1$ Contact Structure of Valency Hybrid Hemoglobins by Ultraviolet Difference Spectra.
Biochem. Biophys. Acta 913 313-320 (1987)

- 14) 馬渡一浩
等電点電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによるヘモグロ
ビンの分離・分析
蛋白質・核酸・酵素 32 683-689 (1987)
- 15) 松川茂、馬渡一浩、米山良昌
酸素親和性異常ヘモグロビンの構造と機能
蛋白質・核酸・酵素 32 635-642 (1987)
- 16) Kitagawa, T.
Resonance Raman Study on the Role of the Iron-Ligand
Bond for Functional Activity of Heme Proteins
Pure Appl. Chem. 59 1285 (1987)
- 17) Ogura, T. and Kitagawa, T.
A Device for Simultaneous Measurements of Transient
Raman and Absorption Spectra of Enzymic Reactions:
Application to Compound I of Horseradish Peroxidase.
J. Am. Chem. Soc. 109 2177 (1987)
- 18) de Groot, J., Hester, R.E., Kaminaka, S. and
Kitagawa, T.
Functional Activity of Haemoglobin Adsorbed on
Colloidal Silver: A. SERRS Study
J. Phys. Chem. in press.
- 19) 北川禎三
協同作用の赤外ラマン分光法による解析
蛋白質・核酸・酵素 32 584-593 (1987)
- 20) 北川禎三
ヘムタンパク質 “生命科学の新しい展開を求めて” p.256-283
(出版科学総合研究所) (1987)
- 21) Kawamura-Konishi, Y., Kihara, H. and Suzuki, H.
Reconstitution of myoglobin from apoprotein and
heme, monitored by stopped-flow absorption,
fluorescence and circular dichroism.
Eur. J. Biochem. in press (1988)

- 22) Igarashi, Y. et al.
Calcium dependent allosteric modulation of the giant hemoglobin from the terrestrial oligochate, Eisenia foetida.
Biochem. Int., 10 611-618 (1985)
- 23) Igarashi, Y. et al.
Calcium dependent allosteric modulation and assembly of the giant hemoglobin from the earthworm, Eisenia foetida.
Invertebrate Oxygen Carriers 89-92 (1986)
Ed. Linzen, B., Springer Verlag
- 24) 梶田昭彦 et al.,
無脊椎動物の血色素
蛋白質・核酸・酵素 32 496-518 (1987)
- 25) 五十嵐吉彦 et al.,
ユリミミズ(Limnodrilus gotoi) ヘモグロビンの分子構築とその生理的意義
獨協医学会雑誌 2 31-41 (1986)
- 26) Wako, H. and Go, N.
Algorithm for rapid calculation of hessian of conformational energy function of proteins by supercomputer
J. Comp. Chem. 8 625-635 (1987)
- 27) Nishikawa, T. and Go, N.
Normal Modes of Vibration in Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor and its Mechanical Property
Protein: Structure, Function, and Genetics
2 308-329 (1987)
- 28) 妹尾康喜、郷信広
ミオグロビンおよびヘモグロビンの立体構造変化の計算
蛋白質・核酸・酵素 32 716-721 (1987)
- 29) 磯貝芳徳、戸淵一孔、田頭瑞加、渡辺博明、郷信広
蛋白質立体構造要素データベース
蛋白質・核酸・酵素 32 327-338 (1987)

- 30) Isogai, Y., Toma, K., Tagashira, M., Watanabe, H.
and Go, N.
Database of Conformational Elements of Protein
Proceedings of the 13th Taniguchi Symposium (1988)
- 31) Wagner, G., Braun, W., Havel, T.F. Schaumann, T.,
Go, N. and Wuetrich, K.
Protein Structures in Solution by Nuclear Magnetic
Resonance and Distance Geometry: The Polypeptide
Fold of the Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor
Determined Using Two Different Algorithms, Disgeo
and Disman.
J. Mol. Biol. 196 611-639 (1987)
- 32) Taketomi, H., Kano, F. and Go, N.
The Effect of Amino Acid Substitution on Protein
Folding- and Unfolding-Transition Studied by Computer
Simulation
Biopolymers in press
- 33) 郷信広
コンピュータでタンパク質分子をみる
“生命科学の新しい展開を求めて” 204-219 (1987)
- 34) Higo, J. and Go, N.
Algorithm for rapid calculation of excluded volume of
large molecules
Journal of Computational Chemistry
- 35) Seno, Y. and Go, N.
Study of Dynamics Properties of Deoxymyoglobin
Based on Conformational Normal Mode Analysis
Proceedings of the 13th Taniguchi Symposium
in press

- 36) Neya, S. and Funasaki, N.
Proton NMR Study of the Cyanide Metmyoglobin
Reconstituted with meso-Tetraalkylhemins
J. Biol. Chem. 262 6725-6728 (1987)
- 37) Neya, S. and Funasaki, N.
Proton NMR study of the myoglobin reconstituted with
meso-tetra(n-propyl) hemin.
Biochem. Biophys. Acta 952 150-157 (1988)
- 38) Sakurada, J., Takahashi, S., and Hosoya, T.
Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Spatial
Relationship of Aromatic Donor Molecules to the
Heme Iron of Horseradish Peroxidase.
J. Biol. Chem. 261 9657-9662 (1986)
- 39) 高橋征三、永山国昭
NMR用対称型マイクロ試料管
日本電子ニュース 27 32-34 (1987)
- 40) Sakurada, J., Takahashi, S. and Hosoya, T.
Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on the
Iodide Binding by Horseradish Peroxidase.
J. Biol. Chem. 262 4007-4010 (1987)
- 41) Sakurada, J., Takahashi, S., Shimizu, T., Hatano, M.
Nakamura, S. and Hosoya, T.
Proton and Iodine-127 Nuclear Magnetic Resonance
Studies on the Binding of Iodine by Lactoperoxidase.
Biochemistry 26 6478-6483 (1987)
- 42) Takahashi, S. and Nagayama, K
A Novel Microcell with Symmetric Geometry.
J. Magn. Reson., to be published (1988)
- 43) Takahashi, S and Nagayama, K.
Selective Solvent Resonance Suppression: A Combination
Method of Matched and Mismatched Hard Pulse Trains.
J. Magn. Reson., Submitted for publication.

口頭発表

- 1) 森本英樹、宮崎源太郎、山田敬一、奥野洋司、板緑一也、城戸隆行、
柴山修哉、山崎哲男、広田泰久
 α 鎖又は β 鎖の鉄を、鉄属遷移金属でおきかえたヘモグロビン
日本生物物理学会第23回年会 1985年8月 北海道大学
- 2) 森本英樹、宮崎源太郎、堀洋、藤井元康、梶谷和生、伊藤愁一
 α 鎖または β 鎖のヘムをポルフィリン、金属ポルフィリンで置換した混成
ヘモグロビン
第60回日本生化学会大会 1987年10月 金沢大学
- 3) 藤井元康、堀洋、宮崎源太郎、森本英樹
鉄原子を欠くプロトポルフィリンを含む混成ヘモグロビン
日本生物物理学会第25回年会 1987年11月 徳島大学
- 4) Imai, K.
Description of hemoglobin oxygenation in terms of the Monod Wyman-
Changeux allosteric model.
日中合同生物物理学シンポジウム 1985年5月 中国無錫市
- 5) 今井清博、中馬一郎
血色素のアロステリーー —現象論と熱力学的解析—
シンポジウム「血色素の科学」 1985年5月 金沢大学

- 6) Imai, K., Yoshikawa, S., Fushitani, K., Riggs, A., Takizawa, H., Harada, T., & Kihara, H.

Inference of allosteric unit in chlorocruorin, erythrocrucorin, and hemerythrin on the basis of the Monod-Wyman-Changeux model.

Symposium on Invertebrate Oxygen Carriers, Tutzing, West Germany
July 29-Aug. 1, 1985

- 7) Fushitani, K., Imai, K., & Riggs, A.F.

Oxygenation equilibria of whole molecules, isolated constituent subunits and of the subunit trimer of hemoglobin from *Lumbricus terrestris*.

Symposium on Invertebrate Oxygen Carriers, Tutzing, West Germany
July 29-Aug. 1, 1985

- 8) 今井清博、吉川信也、伏谷建造、Riggs, A.、滝沢英郎、半田隆、木原裕
無脊椎動物酸素担体におけるアロステリック単位の推定

日本生物物理学会第23回年会 1985年8月 北海道大学

- 9) 今井清博

ヘモグロビン、クロコルオリンおよびヘムエリスリンのアロステリック効果

日本動物学会 1985年 東京大学

10) 今井清博、施子弼、長井潔

大腸菌で合成した人工変異ヘモグロビンの研究

日本生物物理学会第24回年会 1986年10月 筑波大学

11) Imai, K., & Asai, H.

Oxygen equilibria of hemoglobin in the presence of β -naphthyl
oligophosphates

International Workshop on Strategies for the Study of Hemoglobin
Intermediates, Orvieto, Italy, June, 15-19 1987

12) Imai, K., Nishimoto, S., Okada, T., Tyuma, I., Harano, T.,
& Harano, K.

On the contribution of α 89 histidine residue to the Bohr effect
of human adult hemoglobin.

9th International Biophysics Congress, Jerusalem, Israel,
August 23-28 1987

13) 石森浩一郎、森島積、常重アントニオ、今井清博

部分酵素モデルとしてのRu-Fe ハイブリッド方ヘモグロビンの高次構造と
酸素親和性

第60回日本生化学大会 1987年10月 金沢大学

- 14) Imai, K., Shih, T.B., Tame, J., Nagai, K., & Miyazaki, G.
Structural and functional consequences of amino acid substitutions
in hemoglobin as manifested in natural and artificial mutants
13th Taniguchi International Symposium on Importance of Amino
Acid Sequence Data in Biophysical Studies
1987年11月-12月 京都
- 15) 馬渡一浩、松川茂、米山良昌
Valency Hybrid ヘモグロビンの鉄-近位ヒスチジン結合様式のpH依存性
第58回日本生化学大会 1985年9月 東北大学
- 16) 松川茂、馬渡一浩、武田与吉、米山良昌、北川禎三
異常及び修飾Hbの原子価雑種のFe-His結合の共鳴ラマン分光と酸素平衡機能との関係
第58回生化学大会 1985年9月 東北大学
- 17) 馬渡一浩、松川茂、米山良昌
DesArg(α 141)-Valency Hybrid ヘモグロビンの酸素平衡機能
第59回日本生化学大会 1986年9月 関西学院大学
- 18) 馬渡一浩、松川茂、米山良昌
ヘモグロビンの紫外円偏光二色性スペクトル
第60回日本生化学大会 1987年10月 金沢大学

19) 松川茂、馬渡一浩、米山良昌

Hbの酸素結合に対する各種陰イオンの効果

第60回日本生化学会大会 1987年10月 金沢大学

20) Igarashi, Y., Kimura, K., Kajita, A.

Calcium dependent allosteric modulation of the giant hemoglobin
from the earthworm, *Eisenia foetida*

Symposium on Invertebrate Oxygen Carriers, July, 1985 Munich

21) 五十嵐吉彦、星野直美、梶田昭彦

シマミズ巨大Hbの分子構築に対するカルシウムイオンの役割

第58回日本生化学会大会 1985年9月 北海道大学

22) 野沢百合子、五十嵐吉彦、梶田昭彦

Hb A₂ の安定性について

第59回日本生化学会大会 1986年9月 関西学院大学

23) 五十嵐吉彦、杉田博昭、星野直美、木村一元、梶田昭彦

カプトガニ・ヘモシアニンの酸素平衡とCa²⁺結合

第59回日本生化学会大会 1986年9月 関西学院大学

24) 五十嵐吉彦、星野直美、木村一元、間中研一、杉田博昭、梶田昭彦

カプトガニ・ヘモシアニンのsubunit 単離とその性質

第60回日本生化学会大会 1987年10月 金沢大学

25) 小西康子、鈴木春男、木原裕

ミオグロビンの再構成反応

第38回タンパク質構造討論会 1987年10月 京都大学

26) 千葉かおり、小西康子、木原裕

Semi Hb $\beta(\alpha^0\beta^h)$ によるヘミン(CN⁻)₂の取り込み

第25回生物物理学会年会 1987年11月 徳島大学

27) 根矢三郎、舟崎紀昭

対称的なヘムを含むシアン型ミオグロビンでのポルフィリン環の動的自由回転

第14回生体分子の構造と機能に関する討論会

1987年7月 東京大学

28) Neya, S. and Funasaki, N.

Dynamic Free-Rotation of the Prosthetic Group in the Cyanide

Metmyoglobin Reconstituted with meso-Tetraalkylhemin

International Symposium on Bioorganic and Bioinorganic Chemistry

1987年7月 京都大学

29) 根矢三郎、舟崎紀昭

¹H-NMRで見た meso- テトラプロピルヘミンを含むミオグロビンの構造

第26回NMR討論会 1987年11月 大阪千里協栄ホール

30) 根矢三郎、舟崎紀昭

合成ヘミンを用いたヘム-グロビン相互作用の分子設計

日本生物物理学会第25回年会 1987年11月 徳島大学

ヘモグロビンのアロステリック効果の研究

はじめに

タンパク質分子の機能は、目的に合わせて調節される必要があることが多い。環境の変化がタンパク質分子の高次構造を通して活性を大巾に変化させることで実現されている調節法がある。この活性調節のメカニズムについてあまりたくさんのはわかっていないが、多くの事例に共通のメカニズムがあると考えられている。アロステリック蛋白質とよばれるのは、このような蛋白質のことである。

1965年モノー達によって酵素のアロステリック効果を説明する2状態モデルが提出された。これはX線結晶解析で示されたヘモグロビン分子の対称性をみごとに取り入れ、アロステリック効果を記述する最も単純な、最も洗練されたモデルである。ヘモグロビンにおいても、アロステリック効果（ヘム間相互作用、ボーア効果、DPG効果）を理解する基礎となってきた。しかし、いったん定量的立場に立つと、このモデルはヘモグロビンのアロステリック効果を統一的に記述することはできない。個々の発表される論文の多くは2状態モデルに基づいた解析なり、解釈なりをしながら、それでは説明しきれないという結論になっていることが多い。

ヘモグロビンの研究の歴史は長い。あらゆる手段が動員されつくしているといつてよい。それにもかかわらず、今、研究班を組織し、協力して研究を進めてきたのはなぜか？ それは、アロステリック効果のメカニズムをタンパク質分子の構造のレベルで解明したいからであるが、それとともにアロステリック効果のメカニズムの研究を2状態モデルの上に積み上げてよいのかどうか、全くはっきりしていないのが実情だからである。この研究班の活動の主要な目標は2状態モデルの当否について答えることであつた。厳密な意味での2状態モデルが成立っていないことはもともとわかっているので2状態モデルの修正でまかなうか、別のモデルが必要かという風に問題を設定した。そして、現象が2状態モデルとどのようにはずれるのか、具体的にできたら定量的に表現しようと試みた。

以下にこの約4年間ヘモグロビンのアロステリック効果のメカニズムを明らかにするためにおこなつてきた研究を9項目にわたつて報告し、最後に2状態モデルをめぐる私共の認識をまとめておきたい。

(I) ヘモグロビン分子の構造変化にともなって変化する諸物理量
の間の相関を求める。

酸素の結合とリンクしているヘモグロビン分子の高次構造の変化は色々な物理化学的手段で検出される。それらは、ヘモグロビン分子の特定の部位の状態の変化を検出するものである。それらの変化の間の定量的相関関係が2状態モデルの当否を判断するのに重要であると考えた。2状態モデルの通りならば、当然非常によい定量的相関が期待できる。

まず、現在までの膨大なデータをこの観点から整理しなおすための研究会を行なった。

多数の量の間相関を調べるためには一つのパラメータを動かして他の量の変化を見ることになる。そのような変化の軸となるようなパラメータとして、本来は酸素の結合量(飽和度)をとるべきである。もちろん、そのような実験を行なった論文も少なからず発表されているが、そのほとんどが、2状態モデルとの小さな差しか検出していない。それは、酸素結合の中間的な状態においても、平衡状態にあるヘモグロビン溶液では、その中に4コとも酸素を結合したオキシヘモグロビンと1コも酸素を結合していないデオキシヘモグロビンがほとんどで酸素結合の中間段階の分子(酸素分子を1コ、

2コ、3コ結合したヘモグロビン)の濃度は低いため、どのような変化量も酸素結合量と比例する関係に近いことが期待される。当然酸素結合の中間段階の分子のみから出るシグナルを検出できればよいのであるが、構造上の解釈まで含めて受け入れられているデータはない。ここに酸素結合の中間段階をモデルで実現する方法がとられる理由がある。これについては、デオキシヘムのモデルの項で述べる。

酸素飽和度を変化する諸量を比較する軸に使いえないので、考えたのがデオキシヘモグロビンの構造が色々な化学修飾したヘモグロビンや、異常ヘモグロビンでどう変化するかをデオキシヘモグロビンに1コ目の酸素が結合する親和性(酸素平衡定数)の変化を軸に整理するという方法である。次のような量について定量的データが得られた。

- (1) ヘムの吸収スペクトルと光学活性
- (2) 近位ヒスチジンとFeの伸縮振動の共鳴ラマン線
- (3) 近位ヒスチジンのNH基のプロトンNMR
- (4) $\alpha 1 \beta 2$ 界面のデオキシ構造の時に存在する水素結合のプロトンNMR
- (5) $\beta 93$ システインの反応性
- (6) トリチウム交換速度法

(7) アロマトミックアミノ酸に由来する紫外の差スペクトル、光学活性。

構造変化を示すパラメータを比較するのだから(イ)同じ条件下でのデータがほしい。(ロ)変化の中間段階のデータがほしい。

(ハ)測定されたパラメータと構造との関係がほしい。という要求がある。しらべる前から予期していたことではあるがこの条件をすべてみたすデータの組み合わせはほとんどないので、にかよった条件下でデータを比較し、変化の中間段階を推定したりする。(ハ)についてのある程度のあいまいさは許す(たとえば(6)トリチウム交換反応のように反応速度があまりに大きく変化しているものでは、解釈の仕方、どのようなデータにもなってしまう。)ことまでして、次のような一応の結論を得た。(A)ヘム近傍の変化を表すもの(前記(1)、(2)、(3))はおおむね同期して変化する。(B)ヘム近傍以外のタンパク部分の構造変化を示すパラメータにはヘム近傍の変化と同期しないものがある。

以上のような状況の中で、今まで行われてきた測定法も含めて条件を揃えて実験を進める必要があった。松川、馬渡は異常ヘモグロビンと原子価混成ヘモグロビンを使って、この線に沿った実験を進めた。そして、 $\beta 93$ システインへの4・PDS(4,4'-Dithio-*pyridine*)の結合のみかけの速度定数 K_{app} とデオキシヘモグロ

ピンへの1コ目の酸素結合の平衡定数 K_1 との関係が $\ln K_{app}$ と $\ln K_1$ とがほぼ直線関係にあることを示した^{10,15)}。 $\alpha_1\beta_2$ 界面の状態を示す288nm付近の差スペクトルの大きさも、 $\ln K_1$ とほぼ直線関係にあることも示した^{11,13)}。一方、北川の協力によって測定されたFe-近位ヒスチジンの伸縮振動の変化は $\ln K_1$ とは直線関係からはずれて、酸素親和性の高いところで変化が大きくなっている^{9,10,12,16,19)}。同じFe-ヒスチジンの伸縮振動数の変化を柴山、森本、北川がFe-Ni混成ヘモグロビンを使って α 鎖のFeについてだけ測定した結果酸素親和性の高い型と低い型の2状態的变化を示すことが明らかとなった。²⁾(金属置換混成ヘモグロビンについては、後ほど更に詳しく論ずる。)これらのデータと文献上のデータと合せて考えると「デオキシヘモグロビンにおいて1コ目の酸素結合の親和性が 0.01 mmHg^{-1} から 0.1 mmHg^{-1} 位までの変化の時は、ヘム近傍のパラメータはあまり変化せずタンパク質部分のパラメータのみ変化する。」と結論することができる。

(I I) 2 状態モデルのパラメータ

2 状態モデルは 3 つのパラメータを使って酸素平衡曲線を表わす。

6) (K_T : 低酸素親和性である T 状態の酸素平衡定数、 K_R : 高酸素親和性である R 状態の酸素平衡定数、 L : デオキシヘモグロビンにおける T 状態と R 状態の濃度比) 比較的以前から、ヒトのヘモグロビンの酸素親和性には、それ以上高くはなれないという上限があり、それが K_R となると考えられて来た⁶⁾。単離した α 鎖や β 鎖の酸素親和性もこれに近い。しかし今までは、2, 3 の酸素親和性の低い異常ヘモグロビンの例だけだった酸素親和性低い方の側についても、金属置換混成ヘモグロビンの中で低い親和性を示すものがみな同じ位の値に収斂していくことから上限と同じように下限も存在していることが明らかになった⁴⁾。

一方で松川と協力者^{10, 12, 15)}、今井によって⁶⁾、酸素平衡曲線を 2 状態モデルで解析すると、 K_R があまり変化せず、 K_T と L の間にも関係があって、実質 1 個のパラメータで酸素平衡曲線が表現できる場合が多いことが示された。たしかに K_R が溶液の条件によってだんだんと変化するような条件の範囲があるようにはみえない。それは酸素平衡曲線のヒルプロットが、上側の漸近線に近づくのは、飽和度で 99% をこえる位からであり、酸素親和性が下がると、純

酸素を使っても測定できない範囲に入ってしまうことによる見かけ上の問題かもしれない。もし、そうだとすれば、これは酸素平衡曲線の最大勾配の点が50%飽和より上にあるという、いわゆる酸素平衡曲線の非対称性の問題と関連することになる。また金属置換混成ヘモグロビンの中でも、ある程度以上酸素親和性が低くなると K_T も条件に依存しなくなるわけで⁴⁾、上記のLと K_T の関係も成立たなくなる。このように K_R が K_T に比べて変化しないようにみえること、Lと K_T が一定の関係をもっていること、どちらについても今のところその意味はあきらかでない。

(I I I) デオキシヘム (酸素の結合していないヘム) のモデル

森本と協力者によって、 α 鎖か β 鎖のFeのみを他の金属イオンに置き変えた金属置換混成ヘモグロビンの研究がすすめられた⁴⁾。これは、大きくわけて2つの意味がある。1つは、この研究がヘムの中心金属の電子状態とグロビンの構造との相互作用を研究する有力な手段となっていることである。この点については、(V) でとりあげる。もう1つは、金属置換混成ヘモグロビンの研究から金属プロトポルフィリンの中には、デオキシヘムのよいモデルになるものがわかってきたことである。(I) でも述べたが、ヘモグロビンの酸素結合の中間段階のモデルが必要であるが、そのためには、酸素の脱着がなく、かつ構造上デオキシヘムと等価であるようなデオキシヘムのモデルや、酸素の脱着がなく、かつ構造上酸素の結合しているオキシヘムと等価であるようなオキシヘムのモデルが必要となる。従来からオキシヘムのモデルとしては $\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-$ -プロトポルフィリンが使われて来たが、デオキシヘムのよいモデルはみつかっていなかった。鉄属遷移金属イオンを Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mn^{3+} 、 Co^{3+} 、 Cr^{3+} 、 VO^{2+} 、 Mg^{2+} (Ca^{2+} のかわり) と研究は進んでいるが Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} のプロポルフィリン錯体は酸素親和性の低い構造を安定化し、パートナーのヘム

の酸素親和性は非常に低くなり、デオキシヘムのモデルとして使えることがわかった。その中でも Ni^{2+} -プロトポルフィリンが特にくわしく調べられた^{1,2,3)}。よいデオキシヘムのモデルという規準は、そのモデルを使ったことの分子内の酸素結合機能への影響がデオキシヘムそれ自身にどれだけ近いかで判断する。この規準で Ni^{2+} -プロトポルフィリンは、通常の正常ヘモグロビン中だけでなく¹⁾、化学修飾をほどこしたヘモグロビンの中でも、デオキシヘムとしてふるまうことが明らかとなった²⁾。

α 鎖中の Ni^{2+} -プロトポルフィリンは、タンパク部分がデオキシヘモグロビン型構造の時は、近位ヒストジンとの結合がきれて4配位構造となり、タンパク部分がオキシヘモグロビン型構造の時は、4配位構造と5配位構造のまざりとなる。この変化は、吸収スペクトルの大きな変化を伴うので、 Ni^{2+} -プロトポルフィリンは、よいデオキシヘムのモデルであるばかりか、 α 鎖ヘムポケットの使いやすい状態識別のマーカーとなっている。

(I V) Ni-Fe 混成ヘモグロビン

デオキシヘムのモデルとしての Ni^{2+} -プロトポルフィリンを使ったヘモグロビンの酸素結合の中間段階の研究が進められた。そして、 $\alpha_2 (\text{Ni}^{2+}) \beta_2 (\text{Fe}^{2+})$ において2状態モデルでは全く解釈することができない現象がみつかった。このヘモグロビンでは $\beta (\text{Fe}^{2+})$ への酸素の結合はもう1コの $\beta (\text{Fe}^{2+})$ の酸素の結合の親和性を変えない。($\beta - \beta$ 間のヘム間相互作用がない。)しかし、一方で $\alpha (\text{Ni}^{2+})$ の状態を示す吸収スペクトルは、 β 鎖への酸素の結合量にほぼ比例して変化する¹⁾。NMRで、 $\alpha 1 \beta 2$ 界面の状態をみると $\alpha 1 \beta 2$ 界面も変化する³⁾。このことは $\alpha_2 (\text{Ni}^{2+}) \beta_2 (\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2)$ という状態が測定手段によって全く違った状態にみえるということであり、また、サブユニット間の相互作用として、相互作用のある組み合わせや、ない組み合わせを考える必要があり、とても2状態モデルの修正で説明できる現象ではない。

$\alpha_2 (\text{Fe}^{2+}) \beta_2 (\text{Ni}^{2+})$ については、酸素平衡曲線が条件によっては、ヘム間相互作用を示すので¹⁾、 $\alpha_2 (\text{Ni}^{2+}) \beta_2 (\text{Fe}^{2+})$ の場合ほどには2状態モデルとの矛盾があらわではない。しかし、pH 6.5では酸素平衡曲線はヘム間相互作用がないのに、 $\alpha 1 \beta 2$ 界面のNMRシグナルは変化することや、一酸化炭素が結合した後、

界面のNMRシグナルは変化しないのに、 β 鎖の近位ヒスチジンのシグナルは変化することなど、 α_2 (Ni^{2+}) β_2 (Fe^{2+}) の場合と同じである³⁾。Ni-Fe混成ヘモグロビンを化学修飾してデオキシヘモグロビンのままで構造変化させ、1コ目の酸素結合の平衡定数 K_1 パラメータの関係を出すこともおこなわれた²⁾。 α_2 (Fe^{2+}) β_2 (Ni^{2+}) を使ったFe-近位ヒスチジンの共鳴ラマンスペクトルの変化については、(I)ですでに述べた。 α_2 (Ni^{2+}) β_2 (Ni^{2+}) の吸光スペクトルの変化の場合も、他の例と同じように、変化は、酸素結合の親和性の高い所で主におこる。デオキシヘモグロビンの酸素結合の親和性の低い状態から親和性を高くしていくとき、はじめのうちは変化がおこらないということであり、酸素の結合を構造変化させる手段とした場合(酸素親和性は変化せずに α (Ni^{2+}) の吸収スペクトルは変化した)ときわだつた対比となっている。

(V) 金属置換混成ヘモグロビンから見た中心金属とグロビンの相互作用

鉄属遷移金属イオンを使った混成ヘモグロビンの研究の結果は、逆側のFeサブユニットの酸素結合の親和性は、使用した金属イオンの3d電子のd γ 軌道に入っている個数が多い方が低く、その中では3d電子の個数が多い方が低く、更にその中で2価イオンの方が3価イオンより低いという規則でならんでいたが⁴⁾、最近になってかならずしもこれにのらないデータが出てきた。金属イオンの入っていないプロトポルフィリンを使った混成ヘモグロビンでは α 鎖にプロトポルフィリンを入れたときの β 鎖の酸素結合の親和性は最も低いグループに属するが、 β 鎖にプロトポルフィリンを入れたときの α 鎖は、中間よりやや高い目になることがわかった。又、Mg²⁺の場合は、 α 鎖に入れても、 β 鎖に入れても逆側のFeサブユニットの酸素結合の親和性は、最も低いグループに属することが明らかとなった。したがって、d γ 電子の個数がグロビンとの相互作用を決めているという仮説は正しくないことになった。ヘモグロビンのX線結晶解析のデータをもとにして、ヘム面と近位ヒスチジンまでの距離が長ければデオキシ型構造で、みじかければオキシ型構造であるという考え方が、X線結晶解析のグループから提案されている。

金属ポルフィリンのX線結晶解析のデータから、金属イオンに配位する塩基までの距離を調べてこの仮説が金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線を説明するか検討してみると、多くの場合妥当であることがわかる。しかし、 Co^{2+} の場合あまり塩基とポルフィリンの距離が長くないが、 β 鎖 Co^{2+} の α 鎖ヘムの酸素結合の親和性は低いこと、 β 鎖プロトポルフィリンの α 鎖ヘムの酸素結合の親和性は高いこと、 β 鎖 Ni^{2+} は5配位であるが、 Ni^{2+} -ポルフィリンのX線のデータは(5配位のものがないので、6配位のデータで代用すれば)塩基との距離は長くないのに α 鎖ヘムの酸素結合の親和性は低いことなど、 β 鎖を置換した混成ヘモグロビンをめぐって矛盾がめだつ。 α 鎖と β 鎖についてある程度別のメカニズムを考えることが必要なのであろう。又、 α 鎖、 β 鎖どちらかにはヘムが入っていない混成ヘモグロビンであるセミヘモグロビンの場合も近位ヒスチジンが最も束縛されていない状態であるのに、酸素結合の親和性は高いという問題点もある。

金属ポルフィリンと塩の結合の安定性(平衡定数)と逆側のサブユニットのヘムの酸素結合の親和性には直接の相関をみつけることはできなかった。英国ケンブリッジのX線結晶解析のグループにより、森本の協力者達の作った混成ヘモグロビンのX線結晶解析が進行中であり、その結果が次の見通しを出すものと期待している。

(V I) ボーア効果

血液の生理的pHであるpH 7.4付近ではプロトンは酸素結合に阻害的に働く、これがボーア効果であり、酸素の結合にともなって放出されるプロトンが存在するということである。このプロトンの結合部位をボーアグループとよぶ。ボーアグループとして β 146のヒスチジンと α 鎖のアミノ末端の α アミノ基は同定され受け入れられて来たが β 146ヒスチジンについては、条件によってはボーア効果に寄与していないという説もある。どちらにせよボーアグループとしては上記2つ(4量体当り4個所)ではボーア効果全体を説明できず、新しいボーアグループの探索が続いている。大江と梶田は重水素置換法を使って、デオキシヘモグロビンと一酸化炭素ヘモグロビン中のプロトンの交換のおこる全ヒスチジンを摘定し、両者のpK値から新しくいくつかのヒスチジンをボーアグループとして提唱した。その中で α 89のヒスチジンが計算上ボーア効果への寄与が非常に大きいことになっている。今井は、これを酸素平衡曲線によって確認する作業をおこなった。まず、 α 89ヒスチジンと相互作用していると考えられている β 139リジンの変異した異常ヘモグロビンであるHb Tokoname (β 139 Lys \rightarrow Thr)の酸素平衡曲線の測定をしたがボーア効果は正常だった。次に α 89ヒスチジンが

チロシンになっているイヌのヘモグロビンのボーア効果を調べたが、微妙な差しかみとめられなかった。そこで、変異グロビンを遺伝子操作した大腸菌に作らせる手法で、 $\alpha 89$ ヒスチジンをグルタミンに置換したヘモグロビンを作り、酸素平衡曲線を測定した結果、ボーア効果が25%減少していることがわかった。この結果は、定量的にみると、大江、梶田の測定から予想されている値の半分以下位にしか対応しないが、 $\alpha 89$ ヒスチジンがボーア効果に寄与していることはほぼ確実となった。

$\beta 146$ ヒスチジンのボーア効果に対する寄与をめぐる論争を解決するためNMRグループと重水素交換法による摘定をするグループが協力しておこなう実験が提案されたが実行にはいたらなかった。

(VII) $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用

酸素、一酸化炭素を結合したヘモグロビンでは 10^{-6} M 位の濃度で 4 量体 $\alpha_2 \beta_2$ の 2 量体 $\alpha \beta$ への解離がみられる。 $\alpha_2 \beta_2$ の $\alpha \beta$ への解離は、立体構造上 2 通り可能であるが、実際はそのうち片方のみおこる。その 2 量体の α 鎖と β 鎖の組み合わせを $\alpha 1 \beta 1$ と呼び、もう一方を $\alpha 1 \beta 2$ 、とか $\alpha 2 \beta 1$ とか呼ぶ。

ヘモグロビンは、4 量体全体が機能上の最小単位であり、 $\alpha 1 \beta 1$ 2 量体にはヘム間相互作用はないとされている。ヘムからヘムへの相互作用の筋道という意味では、4 量体中でも、 $\alpha 1 \beta 2$ 、 $\alpha 2 \beta 1$ の組み合わせが強調されて、 $\alpha 1 \alpha 2$ 、 $\beta 1 \beta 2$ の相互作用がこれを補い、 $\alpha 1 \beta 1$ の間には直接の相互作用はほとんどないという考えが大勢をしめている。

$\alpha 1 \beta 1$ 2 量体の酸素結合機能にヘム間相互作用のないことは、オキシヘモグロビンの 2 量体への解離と、2 量体の 4 量体への結合の双方の速度定数の測定、ヘモグロビン、単離 α 鎖、単離 β 鎖の酸素平衡曲線、フラッシュ法により作られたデオキシ 2 量体の一酸化炭素結合の速度論的研究等から導き出されている結論であり、実際に 2 量体についての酸素平衡曲線の測定は化学修飾したヘモグロビンをイオン強度の強い溶液中で測定した例があるのみである。又、

4量体中での $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用が弱いと考えるのはオキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンとで、界面の構造があまり変化しないこと、 $\alpha 1 \beta 1$ 界面に置換のある異常ヘモグロビンには、酸素平衡曲線に異常のあるものはすくないこと等から出された結論である。これらのことは、ヘモグロビンのアロステリック効果のメカニズムを考えるのに、重要な枠組みを与えていると受け取られている。

小西は従来から単離サブユニットから4量体を構成する過程を速度論的に研究し、光吸収スペクトルやCDスペクトルの変化を4量体構成の各段階へ帰属させてきた。そのながでヘムに由来するCDバンドで $\alpha 1 \beta 1$ 2量体ができるにともなって変化するものがある。今回は、このCDバンドを、構成する単離サブユニットと4量体の差CDスペクトルとして測定した。単離サブユニットとしては、 α 鎖と β 鎖のそれぞれのC末端からアミノ酸を0コ、1コ、2コ切断した3種類のものを使い、合計9種類の組合せについて測定をおこなった。その結果、差CDスペクトルのピークが433nm付近のものと437nm付近のものに分類された。これらの化学修飾がヘモグロビンの構造に及ぼす影響はよく調べられている。そのデータから判断すると、433nmにピークをもつものが低い酸素親和性構造（無修飾のものはこちらに入る。）に、437nmにピークをもつものが高酸素親和性構造に、おおむね対応していることがわ

かった。この結果は、差CDスペクトルに示される酸素親和性と相関している構造は、 $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用の結果もたらされていることを示している。先にとりあげた $\alpha_2 (Ni^{2+}) \beta_2 (Fe^{2+})$ において、 β 鎖への酸素の結合にほぼ比例して、 α 鎖の Ni^{2+} -プロトポルフィリンの光吸収スペクトルが変化することをのべたが、この変化が $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用を介するのか、 $\alpha 1 \beta 2$ 相互作用を介するのが問題となる。($\beta 1 \beta 2$ の相互作用がないので、 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 1 \beta 2$ 両相互作用が共存するとは考えにくい。) $\alpha_2 (Ni^{2+}) \beta_2 (Fe^{2+} - CO)$ を1M $MgCl_2$ のもとで2量体にした時の $\alpha (Ni^{2+})$ の吸収スペクトルは、単離 $\alpha (Ni^{2+})$ のスペクトルとは大きく異なることを考えると、 $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用によって、 β 鎖の変化が α 鎖に伝わっていると結論するのが妥当のようである。これらは、 $\alpha 1 \beta 1$ 相互作用は弱いとする考え方に再検討を迫るものである。

(VIII) ヒトのヘモグロビンとちがった構造をもつ酸素運搬体の酸素平衡機能²⁴⁾

無脊椎動物には哺乳類のヘモグロビンとは全く異なった分子状酸素の運搬体タンパク質をもつものがある。

Fe^{2+} -プロトポルフィリンを使っており、進化の起源も共通ではあるが、集合しているサブユニットの数が百以上にまでなる分子量の非常に大きい巨大ヘモグロビン^{22,23,25)}、ポルフィリンなしのFeの鎖体をもつヘムエリスリン⁵⁾、銅の鎖体をもつヘモシアニン等である。これらの酸素運搬体の酸素結合機能の研究が梶田と協力者、今井と協力者によっておこなわれた。ヒトのヘモグロビンのときと同様に2状態モデルが適用可能かどうか検討された。いずれの場合も厳密な意味での2状態モデルは適用できないこと、ヒトヘモグロビンとちがって Ca^{2+} が共通して酸素結合機能に影響するが、影響のしかたには色々あること等が示された。いずれの場合も哺乳類のヘモグロビンに比べ、構造上格段に複雑な系であり、これらの結果をアロステリック効果のメカニズムの研究に結びつけて考えるのは、今のところむずかしい段階である。

(IX) 新しい方法

北川と協力者によって紫外光を励起光とする共鳴ラマンスペクトル装置¹⁹⁾の開発がおこなわれている。タンパク質分子の研究に使うものであるから、励起光としてトリプトファンやチロシン残基の吸収極大に近い200nm~240nmのレーザー光源と散乱光を分光する紫外の分光器、受けたシグナルを分析するデータ処理部よりなる。この装置ですでにウマのメトミオグロビンの共鳴ラマンスペクトルが測定され各ピークのトリプトファンとチロシンへの帰属も行われている。デオキシヘモグロビンを試料とするための工夫さえ完成すれば、すぐにもヘモグロビンの研究が始まることになる。

郷と協力者によって、タンパク質分子の構造を、回転しうる二面角を独立変数とする立体構造エネルギー関数法が発展させられてきた³³⁾。この方法はカルテシアン座標を独立変数に選ぶ方法に比べて、化学結合の原子間距離を固定しているが、変数が断然少なくてすみ、原子の数が多く、比較的長い時間の解析が必要となると考えられるヘモグロビンのアロステリック効果のシュミレーションに適した方法である²⁸⁾。上に述べたように共鳴ラマンもヘムばかりでなく、タンパク質部分を測定対象にしつつあり、デオキシヘムのモデルであるNi²⁺-プロトポルフィリン等も構造を検出するよいプロ

ープであり、両者とも高い時間分解能の測定が可能な方法なので、構造エネルギー関数法による相互作用の道筋の解析と相補うことになってほしいと期待している。

遺伝子操作技術によって任意の一次構造をもったヘモグロビンを大腸菌に作らせることが可能になった⁸⁾。大腸菌の作った一次構造に変異のある α 鎖又は β 鎖のグロビンを使って相手側のサブユニットとしては通常の α 鎖又は β 鎖を使い、4量体 $\alpha_2\beta_2$ を構成するのであるが、再構成の方法も改善されてきた。ヘモグロビンの酸素平衡曲線は広い範囲のヒルプロットをする必要があり、ごく微量の変性ヘモグロビンの混在でもヒルプロットの下側に大きく影響することが多く、サブユニットのグロビンからヘモグロビンを構成する方法は更に改善しなければならない。すでに、この方法で、前にも述べたように、 $\alpha 89$ ヒスチジンをグルタミンに変えたヘモグロビンが作られ、 $\alpha 89$ ヒスチジンがポーアグループであるという証明に使われた。その他 $\alpha 1\beta 2$ 界面の置換をもったヘモグロビンや、ヘム近傍の置換をもったヘモグロビン等作られている。今後ヘモグロビンのことについて構造にもとずいた仮説の証明には有力な手段を提供すると思われる。特に上にかいた紫外共鳴ラマン法や立体構造エネルギー関数法にとっても重要な意味を持つものと思われる。

根矢によって4回対称性を持ったヘムはグロビンの中で回転して

いることが示された。回転の相関時間が構造を敏感に反映するので、これはヘムポケットの大きさを計るプロローブとして使えるものと期待できる^{36, 37)}。

(X) 2状態モデルについて

この研究班の成果として、2状態モデルの問題点を3つにまとめておく。

(1) デオキシヘモグロビンを化学修飾したヘモグロビンや異常ヘモグロビンを使って構造変化をおこさせた時、酸素結合の親和性が低い所からだんだん高くなる順にならべると、タンパク質部分の構造変化のパラメータはヘム近傍の構造を示すパラメータに比べて早く変化する。即ち、ヘム近傍の構造変化とタンパク質部分の構造変化は2状態モデルの期待に反し、同期して変化していない。

(2) ヒトヘモグロビンの酸素結合の親和性には固有の上限 ($K \sim 4\text{mmHg}^{-1}$ (25°C)) と下限 ($K \sim 0.005\text{mmHg}^{-1}$ (25°C)) があるが、中間の状態がこの2つの状態の和では表わせない。特に酸素結合作用のないヘモグロビンが存在し、これをT状態(下限)とR状態(上限)の一定の混合で表現するのはあまりに不自然である。

(3) 中でも $\alpha_2(\text{Ni}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ は、酸素の結合には相互作用がないのに、構造を検出するパラメータは大きく変化する例をたくさん提供した。これは、角度をかえてみるとヘモグロビンの酸素結合の中間段階のモデルである $\alpha_2(\text{Ni}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2)$ が2状態モデルの枠に全くはまらない状態にあるといってもよい。

2状態モデルがなんらかの修正なしには成立たないことは既に

わかっていたことである。修正としては3状態モデルや、 α 鎖と β 鎖の機能上の違いを考慮に入れた修正等が試みられてきた。一番ゆるい表現としては「配位子結合の平衡定数は主として4次構造によって決まる。」ということになると思う。場合によっては連続的な変化をさせたりすることもできる。しかし、ここまでゆるめたとしても、上に述べた(1)は状態の数をふやせば説明できるが、(2)の不自然さは解消されないし、(3)の場合は構造変化はするのに酸素結合の親和性が変化しないということなので、2状態モデルをここまでゆるめても取り込むことには無理がある。このデータを無視しないかぎり、2状態モデル修正ではアロステリック効果のメカニズムは表現できないといわざるを得ない。しかし、膨大なヘモグロビン研究のデータと長い歴史の中ではまだ充分な説得力を持ってはいないようである。特にこの班の目標の1つに入っていた非対称ヘモグロビンの研究がほとんど進展していなかったこともあり、定量的な形で2状態モデルからのはずれを表現できていない、幸い、金属ポルフィリンの中に、 Ni^{2+} -プロトポルフィリンが α 鎖の状態を検出するのに非常によいプローブであったと同様に β 鎖の状態のよいプローブになるものもみつまっているので、今後この方向の研究の伸展が期待できると考えている。