

## 2P106

### COリガンド光解離後に生じるヘモグロビンサブユニット構造変形の理論的解析 (名大院・情報科学、CREST-JST) ○岩橋 知令, 高柳 昌芳, 長岡 正隆

**【序】** ヘモグロビン (Hb) は  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニット (あるいは  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖)、それぞれ二つずつからなる四量体のヘムタンパク質である。Hb は酸素を吸蔵する機能を持ち肺で取り込んだ酸素を身体中の細胞へ運搬する容器の役割を担う。Hb の酸素親和性を調節するアロステリック機構の発現は、ヘムへのリガンドの吸脱着に伴って Hb の三次構造、四次構造が変化することが大きな要因となっている[1]。そこで本研究では、Hb の構造ダイナミクスを分子レベルから明らかにすることを目指して、CO を結合した Hb のサブユニットについて CO リガンドを光解離させる多数の分子動力学 (MD) シミュレーションを実行した。その結果について統計処理を行う摂動アンサンブル MD (PEMD) 法[2]による解析を行った。また、Hb サブユニットと非常によく似た構造であり、Hb によって運ばれてきた酸素を身体各所で受け取り貯蔵する機能を持つミオグロビン (Mb) についても、過去の研究結果[2]との比較のために同様の MD シミュレーションを実行し、Hb サブユニットと比較した。

**【計算方法】** ヒトヘモグロビンの四量体  $\alpha_2\beta_2$  結晶構造 (PDB ID=CO結合型: 2DN3, deoxy型: 2DN2) から取り出した  $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの構造と Mb の結晶構造 (PDB ID=CO結合型: 2MB5, deoxy型: 1BZP) とを初期構造として、周囲に水溶媒 (TIP3P: 約 3000 個) を配置することで①Hb  $\alpha$ 鎖および② $\beta$ 鎖単量体と③Mbについて、それぞれcarboxy型(co)とdeoxy型(x)の両タイプのモデル系 (Hb $\alpha$ -co、Hb $\alpha$ -x、Hb $\beta$ -co、Hb $\beta$ -x、Mb-co、Mb-x) を作成した。さらに、deoxy型の  $\alpha$  鎖については結晶構造においてヘムポケットに水分子が存在するため、ヘムポケットに水分子が存在している状態のモデル系 (Hb $\alpha$ -x-h2o) も作成し、計 7 タイプのモデル系を作成した。合計 7 タイプの各々のモデル系について構成原子群の初期速度を変えた 16 通りの平衡化を行った後、常温常圧のNPT一定条件のMD計算を 1 nsずつ行い、10 ps毎に各原子の座標・速度を出力し 1600 個の初期構造を生成した。次にCO結合型のHb $\alpha$ -co、Hb $\beta$ -co、Mb-coの各初期構造からCOリガンドを光解離させる摂動MD (PMD) と光解離させない非摂動MD (UMD) をNVE条件下でそれぞれ 1600 本ずつ 100ps実行した。ここで光解離は、ヘムの力場を基底状態であるCOが結合している六配位状態から、COが解離する電子励起状態を再現するような五配位状態へと変更し、同時に余剰エネルギーをヘムの各原子に運動エネルギーとして分配させることでシミュレートした。その後、PMDについては、リガンドの光解離から 100 ps後にCO分子を取り除いたNVE条件下でのMDシミュレーションをさらに 200 ps続けることで、COリガンドがタンパク質内部から水溶媒へと離脱した後に生じる変化を再現した。deoxy型についてはNVE一定の平衡計算を 1600 本ずつ 100 ps実行した。MDシミュレーションには AMBER 9 プログラムを用いた。

本研究では微小な変化量を調査する必要があるため、以下のように物理量  $a^i$  をアンサンブル平均して解析を行った。

$$A = \frac{1}{N_{\text{MD}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{MD}}} a^i \quad (1)$$

ここで  $N_{\text{MD}}$  はトラジェクトリ数 (本研究では  $N_{\text{MD}} = 1600$ ) を、 $a^i$  は  $i$  番目のトラジェクトリにおける物理量を、 $A$  はアンサンブル平均をとった物理量を表す。

**【結果と考察】** 各タンパク質の構造変形を捉えるために、距離  $r_{EF} = |\mathbf{r}_F - \mathbf{r}_E|$  を式 (1) の具体的な物理量  $a$  として算出した (図 1. 参照)。ここで距離  $r_{EF}$  とは、Eヘリックスを形成する初めの 4 残基の  $C_\alpha$  炭素の重心位置  $\mathbf{r}_E$  と Fヘリックスを形成する終わりの 4 残基の  $C_\alpha$  炭素の重心位置  $\mathbf{r}_F$  との距離であり、リガンド光解離による初期構造変化が生じる部位である。この距離  $r_{EF}$  を 7 タイプのモデル系すべてにおいて算出し、それぞれアンサンブル平均をとった。

Hba-co の PMD では、 $r_{EF}$  は CO リガンドの光解離の直後に 22.15 Å まで伸張後、100 ps の間収縮し続けることがわかった。その時点で CO 分子を意図的に除去したところ、引き続き 200ps でさらに大きく収縮し、300ps 経過した時点で、五配位状態の deoxy 型 (ヘムポケットが空の状態) における距離  $r_{EF}^{\text{deoxy}}$  ( $\cong 21.3$  Å) にほぼ収束した。なお、摂動を加えない 3 つの UMD において、 $r_{EF}$  は 100 ps の間ほぼ一定で、それぞれ、Hba-co:  $r_{EF}^{\text{CO}} \cong 21.95$  Å、Hba-x-h2o:  $r_{EF}^{\text{H}_2\text{O}} \cong 21.9$  Å、Hba-x:  $r_{EF}^{\text{deoxy}} = 21.32$  Å を示した。これらの結果から、ヘムポケットが空の状態の Hba 鎖 (Hba-x) において、ヘムポケットに水分子が浸入 (Hba-x-h2o) すれば、平衡状態到達後、 $r_{EF}$  の値は約 21.9 Å まで大きくなると考えられる。

以上の結果から、本研究では統計性に注意して MD シミュレーションを用いたことにより、Hba 鎖の距離  $r_{EF}$  が六配位状態 (ヘムに CO が結合している) での値から五配位状態 (CO 分子をとり除いた) での値へと緩和する様子を有意に示せたことがわかる。また、ヘモグロビンのアロステリック効果のトリガーであるヘム自身の平面型およびドーム型間の構造変化だけではなく、ヘムポケット中での CO や  $H_2O$  といった小分子の存在の有無もタンパク質の三次構造 (少なくとも距離  $r_{EF}$ ) に影響を与えることを明確に示すことができた。

当日は  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖、Mb についての結果を比較しながら、リガンド光解離によって生じる微小な構造変形の違いが Hb と Mb の機能発現にどのような相違をもたらすのかについて総合的に報告する予定である。

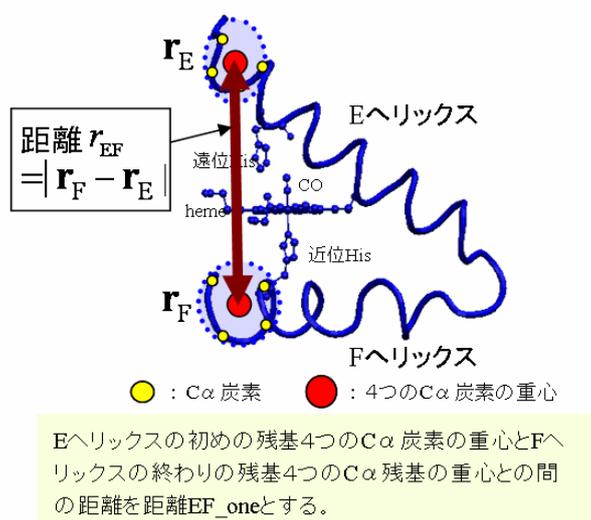


図 1. 算出した距離  $r_{EF}$  についての説明

### 【参考文献】

- [1] W. A. Eaton, E. R. Henry, J. Hofrichter, A. Mozzarelli, *Nature Struct. Biol.*, **6**, 351 (1999).  
 [2] M. Takayanagi, H. Okumura, M. Nagaoka, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 864 (2007).