

3P081 アカガイ二量体ヘモグロビンの構造ダイナミクス：四量体ヘモグロビンとの比較

(¹ 阪大院理、²KAIST)

○三城佑樹¹、石川春人¹、Srinivasan Muniyappan²、Hyotcherl Ihee²、水谷泰久¹

[序] アカガイ二量体ヘモグロビン (HbI) は *Scapharca inaequalvis* (アカガイ属フネガイ科) がもつヘモグロビンであり、四量体であるヒトのヘモグロビン (HbA) とは異なり、同一のサブユニットによって形成されるホモ二量体である。HbI と HbA とともに、酸素を始めとするリガンドに対する正の協同性を示す点は共通しているが、リガンドの結合・解離に伴う構造変化の仕組みには相違点があると考えられている。HbA の場合は主に四次構造変化が寄与しており、リガンドの解離によるヘムのドーミングが引き金となってヘリックスが動き、各サブユニットの界面を通してリガンド解離の情報がヘムに伝えられる。一方、HbI の場合は互いのヘムのプロピオン酸基が水分子を介して水素結合によって相互作用しており、ヘム間の情報伝達に役割を果たしていると考えられている[1]。これは、HbA の各サブユニットのヘム間の距離が離れているのに対し、HbI の場合は比較的接近しているためとされている。今回、我々は HbI の時間分解可視共鳴ラマンスペクトルを測定し、HbI と HbA の構造ダイナミクスを比較したので報告する。

[実験] HbI を大腸菌で発現させ、培養を行った。イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、HbI の精製試料を得た。時間分解可視共鳴ラマンスペクトルの測定は、繰り返し周波数 1 kHz の Q スイッチレーザーを用いたポンプ・プローブ法で行った。波長 532 nm のポンプ光 (パルスエネルギー 500 μ J、パルス幅 20 ns) を用いてリガンドを解離させ、波長 436 nm のプローブ光 (パルスエネルギー 1 μ J、パルス幅 30 ns) を用いてヘム由来の共鳴ラマンスペクトルを得た。また、測定におけるリガンドは一酸化炭素 (CO) とし、用いた HbI の精製試料のヘム濃度はおよそ 50 μ M とした。

[結果] 図 1 に CO 脱離に伴う HbI の時間分解可視共鳴ラマンスペクトルを示す。左に示している時間は遅延時間であり、COHbI としているものはプローブ光のみを照射して得られた CO 結合形のスペクトルである。-50 ns と 0 ns におけるスペクトルは、生スペクトルから COHbI のスペクトルに係数を乗じて差し引いた差スペクトルとして表している。スペクトルの時間変化の特徴は以下のとおりである。リガンド解離後 50 ns で 209 cm^{-1} 付近に観測された $\nu(\text{Fe-His})$ バンドは、ナノ秒領域で 206 cm^{-1} 付近までシフトし、20 μ s で 205 cm^{-1} 付近までシフトした。次に、リガンド解離後 50 ns で 367 cm^{-1} 付近に観測された $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\epsilon\text{C}_\delta)$ バンドは、20 μ s で 372 cm^{-1} までシフトした。さらに、 ν_{16} バンドでは時間の経過とともに強度の低下が見られ、 ν_{32} バンドでは強度の増加が見られた。図 2 に示すように、 $\nu(\text{Fe-His})$ および $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\epsilon\text{C}_\delta)$ バンドの波数変化、 ν_{32} と ν_{16} バンドの強度比変化を遅延時間に対してプロットし、単一の指数関数 $A \times \exp(-t/\tau) + C$ でフィッティングしてバンドの波数変化と強度比変化の時定数 τ を求めた。

[考察] HbA に比べて HbI では、時間変化を示すバンドの数が多く、かつその変化が遅い時間まで続いているのが特徴である。HbA と HbI の構造を比較すると、サブユニットの構造はよく似ているが、サブユニットの会合の仕方が全く異なる。つまり、HbA では、ヘムから離れた位置でサブユニット間が接触し会合しているが、HbI ではヘム同士が向かい合うように会合している。このような会合様式の違いから考えると、上記の HbI のスペクトル変化の特徴は、サブユニット間の相互作用がヘムにより直接的に作用していることを反映していると考えられる。

$\nu(\text{Fe-His})$ バンドの波数シフトと ν_{32} バンドの強度変化はほぼ同じ時定数を示した。 ν_{32} バンドはヘム側鎖のビニル基の振動モードに帰属されていて[2]、この強度変化はビニル基周囲のタンパク質構造変化を反映していると考えられる。一方、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの振動数は近位ヒスチジン周辺

の環境に敏感であることが知られている。両者の変化速度が似ているということは、近位ヒスチジンとビニル基周辺に共通の三次構造変化があることを示している。

CO 脱離後 0 ns から 20 μs の間に、HbI では $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\epsilon\text{C}_\delta)$ バンドに 5 cm^{-1} の波数シフトが観測された。これは、HbA の対応する値 (1 cm^{-1}) に比べ大きい。これは、CO 脱離後プロピオン酸基の環境が大きく変化することを示唆する。サブユニット界面で、ヘムはプロピオン酸基を互いに向けており、その間には水分子が分布している。CO 結合形とデオキシ形の結晶構造では、プロピオン酸基周辺の水分子に分布の違いがみられる[1]。したがって、観測された $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\epsilon\text{C}_\delta)$ バンドの波数シフトは、タンパク質の構造変化に伴う水分子の分布変化による可能性がある。ヘムのプロピオン酸基はヘム間の情報伝達に重要であると考えられているが、本研究から四次構造変化に先立って周辺との相互作用に変化があることが明らかになった。

$\nu(\text{Fe-His})$ バンドには時定数 $0.56\ \mu\text{s}$ で 1 段階の時間変化が観測された。溶液の時間分解 X 線小角散乱の実験から、HbI では $1.4\ \mu\text{s}$ の時定数でサブユニットに三次構造変化がみられることが報告されている[3]。本研究で観測された $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの変化はこれよりも速いことから、バンドのシフトはヘム周辺の局所的な構造変化を反映していると考えられる。また、HbA ではそれぞれサブマイクロ秒と $\sim 10\ \mu\text{s}$ の時間帯で二段階のシフトが観測されており、後者は四次構造遷移によるものである。HbI の四次構造遷移に対するシフトは観測されず、これは 2 種類の四次構造の間で、Fe-His 結合の強さにほとんど違いがないことを示している。HbA では、2 種類の四次構造間の遷移で Fe-His 結合にかかる張力が変化して、これが酸素親和性を制御している。HbI において四次構造遷移に対応する波数シフトがみられないことは、2 種類の四次構造で Fe-His 結合にかかる張力に差がないことを意味する。これは HbA とは異なる機構で酸素親和性が制御されていることを示唆している。

[参考文献]

[1] Knapp, J. E.; Royer, W. E. Jr. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4640–4647.

[2] Choi, S.; Spiro, T. G.; Langry, K. C.; Smith, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4337–4344.

[3] Choi, J.; Muniyappan, S.; Wallis, J. T.; Royer, W. E.; Ihee, H. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 109–114.

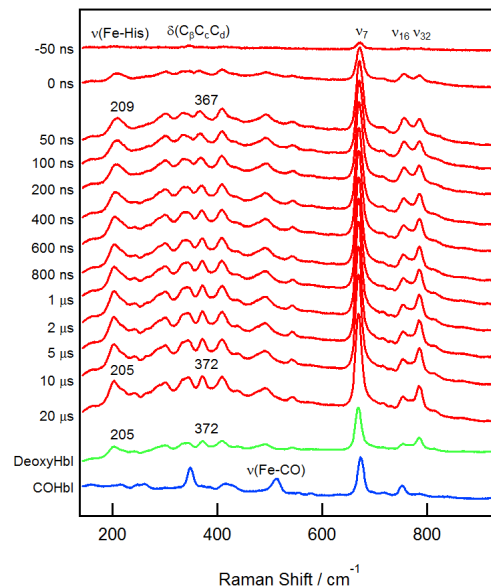


図 1. HbI の時間分解可視共鳴ラマンスペクトル

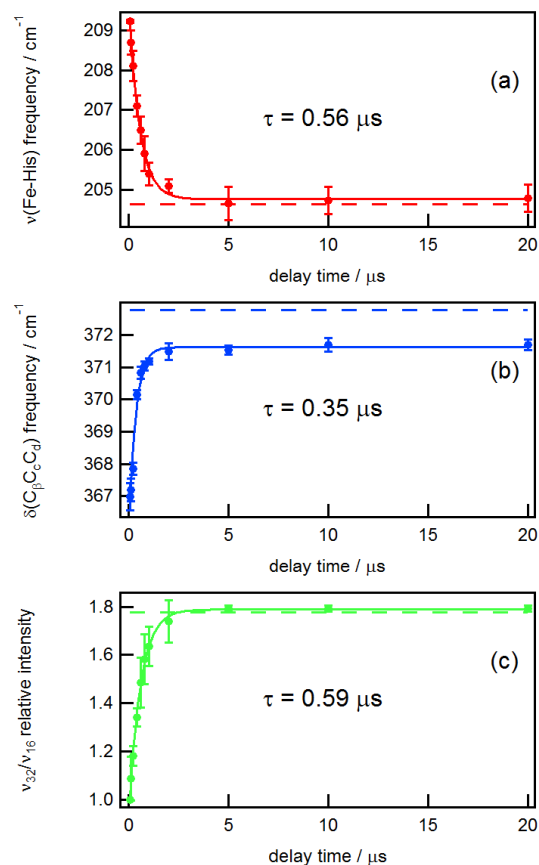


図 2. 遅延時間に対するラマンバンドの変化。(a) $\nu(\text{Fe-His})$ バンド波数、(b) $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\epsilon\text{C}_\delta)$ バンド波数、(c) ν_{32} バンドの ν_{16} バンドに対する強度比。いずれも、破線はデオキシ形の値を示す。