

ヘモグロビン単離鎖の構造ダイナミクス： α 鎖、 β 鎖および四量体との違い

(阪大院理) ○山田健太, 石川春人, 水谷泰久

【序】ヘモグロビン(Hb)は、 α 鎖と β 鎖の2種類のサブユニットが2つずつ会合した四量体で、協同的な酸素親和性を示す。一方、これを α 鎖と β 鎖に分離した単離鎖ではHb特有の協同性が見られない。このため、Hbと単離鎖での構造変化の違いを解明することは協同性発現機構を考える上で重要である。また、2種の単離鎖の性質の違いを解明することはHbが2種類のサブユニットから構成されている意味を考える上で重要である。本研究では、CO脱離に伴う単離鎖のナノ秒からマイクロ秒領域における時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、 α 鎖、 β 鎖およびHbとの比較をした。

【実験】大腸菌中で発現した組換えヘモグロビン(rHb)を精製した。これに、*p*-クロロ水銀安息香酸(PMB)を添加して、陰イオン交換カラムを用いて α 鎖と β 鎖の分離をした後に、ジチオスレイトールで処理してPMBを除去し、単離鎖を得た。試料のバッファーには、50 mM リン酸バッファー(pH 8.0)を用いた。波長 532 nm のポンプ光と波長 436 nm のプローブ光を用いて、ポンプ-プローブ法により、ナノ秒からマイクロ秒領域の時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。

【結果】図 1 に単離鎖の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。各遅延時間におけるスペクトルは、得られたスペクトルから未反応成分のスペクトルを差し引いた差スペクトルである。 α 鎖、 β 鎖ともに、鉄-ヒスチジン伸縮振動 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの低波数シフト、 γ_7 バンドの低波数シフトおよび ν_8 バンドの強度増大が見られた。これらの変化は、Hbでも見られている¹。図 2 は、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの振動数、 γ_7 バンドの振動数および ν_7 に対する ν_8 バンドの相対強度を遅延時間に対してプロットしたものである。 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの低波数シフトは、2つの指数関数の和 $[A+B\exp(-t/\tau_1)+C\exp(-t/\tau_2)]$ でうまく表すことができ、その時定数は、 α 鎖が 32 ns, 2.12 μs で、 β 鎖が 146 ns, 2.19 μs であった。また、 γ_7 バンドの低波数シフトおよび ν_7 に対する ν_8 バンドの相対強度増大は、単一の指数関数 $[A+B\exp(-t/\tau_1)]$ でうまく表すことができ、その時定数は、 γ_7 バンドについて 50 ns(α 鎖)、210 ns(β 鎖)、 ν_8 バンドについて 197 ns(α 鎖)、458 ns(β 鎖)であった。得られた各ラマンバンドの時定数を表 1 にまとめた。いずれのバンドについても、 β 鎖は α 鎖に比べてスペクトル変化が遅かった。

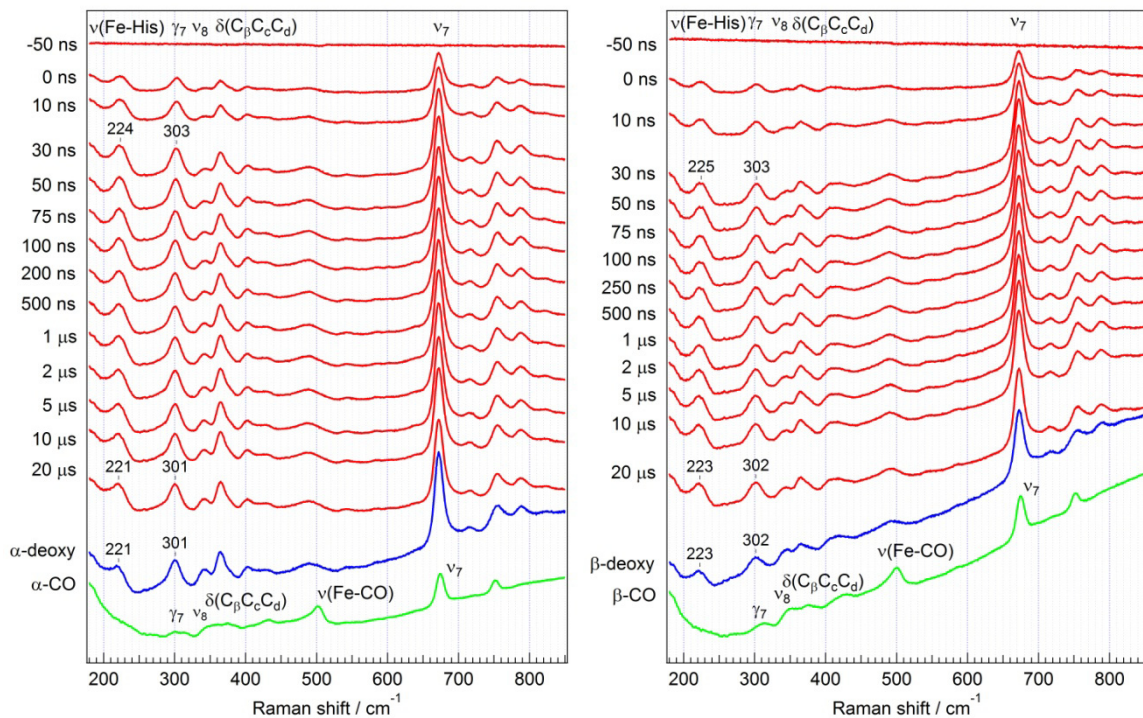


図 1. 単離 α 鎖(左)および単離 β 鎖(右)の時間分解共鳴ラマンスペクトル。

【考察】Fe-His 結合は、ヘムとポリペプチド鎖をつなぐ唯一の共有結合であり、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドは、ヘムタンパク質において、ヘム近位側構造を鋭敏に反映することが知られている。本研究では、 α 鎖、 β 鎖ともに、2段階からなる低波数シフトが見られた。これは、CO脱離に伴い単離鎖は中間体を経てヘム近位側の構造が変化することを示唆している。 α 鎖の方が β 鎖より速く低波数シフトしたことから、 α 鎖の方がより速く中間体構造へ変化し、より速くヘム近位側の構造変化が完了すると考えられる。Podstawkaらは、 γ_7 バンドはデオキシ形において単離 α 鎖の方が単離 β 鎖より、低波数側に現れることを報告した²。これは、 α 鎖の方がヘム平面のゆがみが大きいと推測されている。本研究でも、デオキシ形において α 鎖の方が β 鎖より、低波数側に現れた。一方、過渡種の γ_7 バンドはデオキシ形より高波数側に現れて、 α 鎖の方が β 鎖より速く低波数シフトした。したがって、 α 鎖の方がCO脱離に伴うゆがみの増加が速いことが考えられる。 ν_8 バンドの強度増大の時定数は、上記の2つのバンドの時定数に比べて2倍以上大きな値であることから、異なる構造変化を反映していると考えられる。しかし、 α 鎖の方が構造変化は速いという点では共通している。

ヘム面に対して、ヘムに結合したヒスチジン残基の周辺を近位側、その反対側を遠位側と呼ぶ。各サブユニットで、ヘムは2本の α ヘリックスにはさまれて存在し、1本は近位側のFヘリックスであり、もう1本は遠位側のEヘリックスである。デオキシ形 - CO形間のEヘリックスの変位は、 α 鎖よりも β 鎖の方が大きいことが知られている³。COが脱離すると、ヘムの構造変化によってE-Fヘリックスの変位が引き起こされることから、CO脱離に伴って、動きの大きい β 鎖のEヘリックスの変位が完了するのに時間がかかり、それがスペクトル変化の速度の差に現れたと考えられる。

【謝辞】本研究で用いたプラスミドは J. S. Olson 教授(Rice University)からご提供して頂き、rHb の培養方法は E. Singleton 氏(Rice University)からご教授して頂きました。

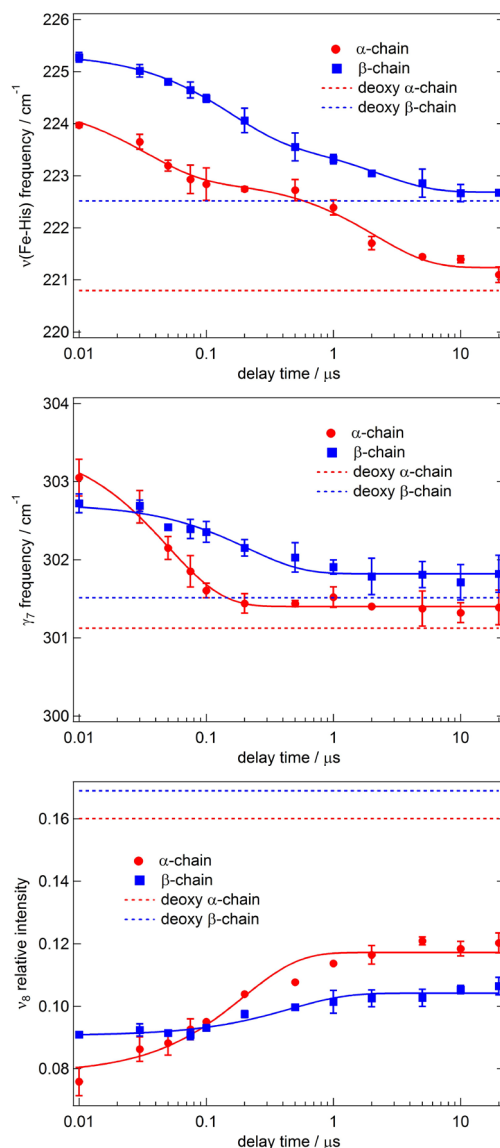


図 2. 単離鎖の $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの波数シフト(上)、 γ_7 バンドの波数シフト(中)、 ν_7 に対する ν_8 バンドの相対強度変化(下)。実線は指数関数でフィッティングしたもの、破線は対応するデオキシ形の値を示す。

表 1. 各ラマンバンドの時定数

		τ_1 / ns	τ_2 / μ s
$\nu(\text{Fe-His})$	α 鎖	32.8 ± 12.4	2.12 ± 0.56
	β 鎖	146 ± 15	2.19 ± 0.40
γ_7	α 鎖	49.9 ± 4.5	
	β 鎖	210 ± 50	
ν_8	α 鎖	197 ± 45	
	β 鎖	458 ± 128	

¹ V. Jayaraman, K. R. Rodgers, I. Mukerji, and T. G. Spiro, *Science* **269**, 1843-1848 (1995)

² E. Podstawka, C. Rajani, J. R. Kincaid, and L. M. Proniewicz, *Biopolymers* **57**, 201-207 (2000)

³ G. Fermi, M. F. Perutz, B. Shaanan, and R. Fourme, *J. Mol. Biol.* **175**, 159-174 (1984)