

## T構造ヒトヘモグロビンにおける 複数酸素分子侵入経路の理論的解析

(名大・VBL<sup>1</sup>, 名大院・情報科学<sup>2</sup>, JST-CREST<sup>3</sup>, 京大・ESICB<sup>4</sup>)  
高柳 昌芳<sup>1,2,3</sup>、栗崎 以久男<sup>2,3</sup>、平尾 昌吾<sup>2</sup>、長岡 正隆<sup>2,3,4</sup>

### Theoretical study on multiple oxygen entry pathways in T-state human hemoglobin

(Venture Business Laboratory, Nagoya University<sup>1</sup>, Graduate School of Information Science,  
Nagoya University<sup>2</sup>, JST-CREST<sup>3</sup>, ESICB, Kyoto University<sup>4</sup>)

Masayoshi Takayanagi<sup>1,2,3</sup>, Ikuo Kurisaki<sup>2,3</sup>, Shogo Hirao<sup>2</sup>, Masataka Nagaoka<sup>2,3,4</sup>

**【背景】** 赤血球中に存在するヒトヘモグロビン (HbA) はサブユニット4つ ( $\alpha\cdot\beta$  鎖各2本) で構成される四量体ヘムタンパク質であり、各サブユニットは酸素分子 ( $O_2$ ) をヘムに結合することで  $O_2$  運搬機能を発揮している。 $O_2$  結合部位の空洞 (ヘムポケット) はサブユニット内部に埋没しており、 $O_2$  の侵入・離脱は熱ゆらぎによって一時的に形成される経路を通過している。ヘムポケット—溶媒間の  $O_2$  侵入・離脱経路を知ることは HbA の  $O_2$  運搬機能を原子レベルから理解する上で重要である。

$O_2$  移動経路には主に2つの説がある。1つは遠位ヒスチジン近傍を通過してヘムポケットから直接溶媒へとつながるヒスチジンゲート (His gate) 説。もう1つはサブユニット内の多数の疎水性空洞を経由する疎水的複数経路説である。多くの実験研究は His gate 説を支持しているが[1]、分子シミュレーションによる研究は疎水的複数経路説を支持している[2]。我々は、これまでにリガンド分子のダイナミクスがタンパク質構造に与える影響についての研究を行ってきており[3-5]、本研究では高濃度  $O_2$  溶液内 HbA のアンサンブル MD 計算を行うことで HbA への  $O_2$  侵入過程を解析し、 $O_2$  移動経路を特定することで上記の2つの説を検証した[6]。

**【計算手順】** 水溶媒 (TIP3P) ボックス内に T 構造四量体 HbA ( $O_2$  未結合の HbA、PDB ID: 2DN2) と 120 分子の  $O_2$  を配置し初期構造を生成した。そして HbA 構造を拘束したまま高温条件 (750 K、NVE 一定) で 300 ps の MD 計算を実行することでランダムな  $O_2$  分布を生成し、次いで生体内と同様の条件 (310 K、1 atm、NPT 一定) で 100 ps の平衡化 MD 計算を実行した。最後に HbA の拘束を解除して 310 K、1 atm、NPT 一定条件で 8 ns の MD 計算を実行した。以上の平衡化を含む MD 計算を異なる初期速度から 128 本実行し、8 ns  $\times$  128 MD の MD トラジェクトリデータを得た。

**【結果】** 外部からヘムポケットへの  $O_2$  侵入経路を特定するために、MD トラジェクトリから 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ns の7つの時間ステップにおいて HbA 各サブユニット近傍 4.0 Å に位置する  $O_2$  重心座標を抽出し Ward 法による階層的クラスタリングを実行した。ヘムポケットに到達した  $O_2$  の各クラスタ通過頻度を球で、クラスタ間通過頻度を円筒で描画することでヘムポケットへのリガンド移動経路を可視化しリガンド侵入経路の分類と各経路を経由した  $O_2$  侵入頻度の算出を行った (図1)。

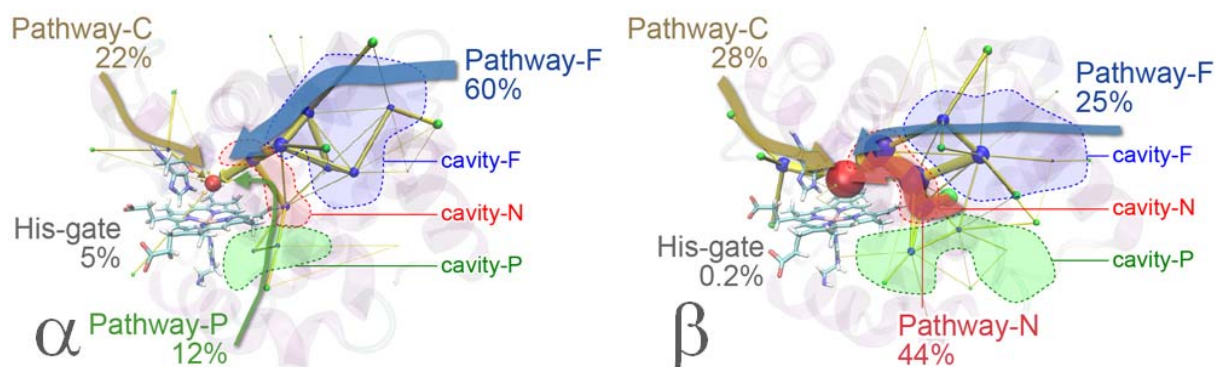


図1.  $O_2$  分布のクラスタリング解析により得られた HbA サブユニット内ヘムポケットへの  $O_2$  侵入経路。(左)  $\alpha$  鎖 (右)  $\beta$  鎖。赤色球はヘムポケットに対応するクラスタ重心、青色球はサブユニット内部のクラスタ重心、緑色球はサブユニット表面のクラスタ重心であり、ヘムポケットに到達した  $O_2$  が通過した頻度に対応して球の大きさを描画。同様にクラスタ間移動頻度に対応して黄色の円筒を描画。

内部空洞を  $O_2$  移動の挙動からヘムポケットから遠い cavity-F、ヘムポケット近傍の cavity-N、近位ヒスチジンに近い cavity-P に 3 分類した。 $\alpha$  鎖では cavity-F, cavity-N の順に經由する Pathway-F が 60%、次いで CD-corner 側から侵入する Pathway-C が 22% であった。 $\beta$  鎖では cavity-N を經由する Pathway-N が 44%、次いで Pathway-C が 28% であった。なお His-gate は  $\alpha$  鎖で 5.0%、 $\beta$  鎖で 0.2% であり、主要な経路ではない。

次に  $O_2$  侵入時定数  $k_{\text{entry}}^x$  ( $x = \alpha$  or  $\beta$  鎖) を算出し実験値との比較を行った (表 1)。 $O_2$  侵入速度が  $k_{\text{entry}}^x [O_2][Hb^x]$  と記述されると仮定し、128 MD 8 ns 時点のヘムポケット  $O_2$  侵入確率 ( $\alpha$  鎖 18%,  $\beta$  鎖 35%) より時定数を見積もった。実験値に関しては文献[7]の温度 293 K でのリガンド侵入時定数に対しアレニウスの式による温度補正を行った。得られた時定数は  $\beta$  鎖/ $\alpha$  鎖の比も含めて実験値とよく一致した。これは MD 計算による  $O_2$  侵入過程は正しく再現されていることを強く示唆しており、 $O_2$  侵入の主要な経路は His gate ではなく疎水的複数経路であると結論できる。得られた  $O_2$  分布、移動通路はアロステリック効果を含めた HbA の機能発現機構を原子レベルから解析、理解する上で重要な知見となり得るものである。

表 1. HbA サブユニットへの  $O_2$  侵入速度定数の比較

		HbA の状態	$\alpha$ 鎖 ( $\mu\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$	$\beta$ 鎖 ( $\mu\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$	$k^\beta/k^\alpha$ 比
本 MD 計算結果	$k_{\text{entry}}^x$	T 構造四量体	45	99	2.20
	$k_{\text{entry}}^x$	単量体	69	81	1.17
実験値[7]を 温度 310 K に補正	$k_{\text{NO}}^x$ *	単量体	60	131	2.18
	$k_{\text{NO}}^x$ *	R 構造四量体	48	127	2.65

\*一酸化窒素分子のヘムポケット侵入時定数

### 【参考文献】

- [1] Birukou I., Maillett D.H., Birukova A. Olson, J.S. *Biochemistry*, 50, 7361 (2011).
- [2] Shadrina, M.S., English, A.M., Peslherbe, G.H. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11177 (2012).
- [3] Takayanagi M., Okumura H., Nagaoka M. *J. Phys. Chem. B* 111, 864 (2007).
- [4] Takayanagi M., Iwahashi C., Nagaoka M. *J. Phys. Chem. B* 114, 12340 (2010).
- [5] Takayanagi M., Nagaoka M. *Theor. Chem. Acc.* 130, 1115 (2011).
- [6] Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M. *J. Phys. Chem. B*, 117, 6082 (2013).
- [7] Birukou I., Schweers R.L., Olson, J.S. *J. Biol. Chem.* 285, 8840 (2010).