

2P085

## 高酸素分圧下におけるヒトヘモグロビンに対する 酸素分子の非部位特異的アロステリック効果

(名大院情報科学<sup>\*</sup>、CREST-JST<sup>\*\*</sup>) ○高柳 昌芳<sup>\*,\*\*</sup>, 栗崎 以久男<sup>\*</sup>, 長岡 正隆<sup>\*,\*\*</sup>

### Non-site-specific allosteric effect of oxygen on human hemoglobin under high oxygen partial pressure

(Graduate School of Information Science, Nagoya University<sup>\*</sup>, CREST-JST<sup>\*\*</sup>)

○Masayoshi Takayanagi<sup>\*,\*\*</sup>, Ikuo Kurisaki<sup>\*</sup>, Masataka Nagaoka<sup>\*,\*\*</sup>

**【背景】** タンパク質アロステリーは生命活動にとって不可欠である。酸素分子 ( $O_2$ ) を運搬するタンパク質であるヒトヘモグロビン (HbA) は4つのサブユニットで構成されており、2つの四次構造状態 ( $O_2$  親和性が高い R 状態、 $O_2$  親和性が低い T 状態) によるアロステリック制御を示し、タンパク質のアロステリック構造制御のパラダイムとなっている。特に、基質分子である  $O_2$  が「部位特異的な」ホモトロピックエフェクターとして振る舞う、つまり各サブユニットのヘム鉄に  $O_2$  が逐次的に結合することで、 $O_2$  を結合しやすい R 構造をますますとりやすくなる、とする考え方が長い間広く受け入れられている。この部位特異的制御は、ヘムの構造が  $O_2$  結合によりドーム型から平面型に変化し、この変形がサブユニット全体に伝わることで三次構造変化を起こし、最終的に T 構造を安定化させるサブユニット間結合 (水素結合、塩橋) を切断することで四次構造変化に繋がるものと考えられている。しかしながら我々は、高  $O_2$  分圧環境における HbA の MD 計算結果から、部位特異的なアロステリック効果が必ずしも唯一のメカニズムではなく、「非部位特異的な」アロステリック効果が存在する可能性を示した。[1]

**【計算手順】** 水分子 (TIP3P) 約 12,000 分子の周期境界溶媒ボックス内に 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。HbA 構造を拘束したまま高温条件 (750 K、NVT 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 MD 計算による溶媒平衡化を行った。そして 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。なおヘム鉄への  $O_2$  結合は人工的に無視しており、ヘムの構造は常に 5 配位ドーム型構造を保っている。また対照計算として  $O_2$  を含まない水溶媒中での MD 計算 8 ns 128 本も同様の手順により実行した。

**【結果】** まず T-R 間四次構造変化を定量化する指標として、四量体 HbA のサブユニット重心 4 点 ( $\alpha_1$ 、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha_2$  の重心) により定義される二面角  $\chi$  (図 1) を利用できることを確認した。結晶構造における  $\chi$  は初期構造である  $O_2$  非結合時の T 構造では  $-99.5^\circ$ 、 $O_2$  結合時の R 構造では  $-89.0^\circ$  の値をとる。T から R への四次構造変化を示した MD トラジェクトリにおける  $\chi$  の変化は、switch region における  $\beta_2\text{His97}$  側鎖の  $\alpha_1\text{Thr41}$ - $\alpha_1\text{Pro44}$  間から  $\alpha_1\text{Thr38}$ - $\alpha_1\text{Thr41}$  間への移動および、 $\alpha_1\text{Tyr42}$ - $\beta_2\text{Asp99}$  等のサブユニット間塩橋の切断と連動しており、 $\chi$  が四次構造の指標であることを確認した。

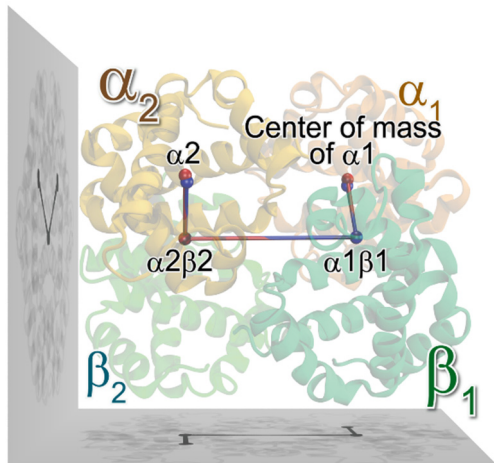


図1. 四次構造の指標となる HbA の二面角  $\chi$  をサブユニット重心により定義。青色は T 構造での  $\chi = -99.5^\circ$ 、赤色は R 構造での  $\chi = -87.8^\circ$  を示す。

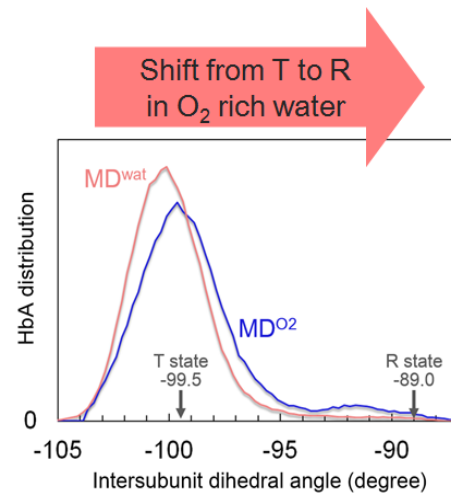


図2. 128 MD から算出された二面角  $\chi$  の分布。赤色は水溶媒中、青色は高  $O_2$  濃度溶媒中での分布。

水溶媒中 MD ( $MD^{wat}$ ) および高濃度  $O_2$  溶媒中 MD ( $MD^{O_2}$ ) の各 128 本の MD トラジェクトリに対し 7-8 ns の間における  $\chi$  の分布を算出した(図2)。T 構造付近における  $MD^{O_2}$  の分布は  $MD^{wat}$  の分布よりも R 構造側に偏っている。また R 構造に変化したトラジェクトリ (7-8 ns での  $\chi$  の平均値が  $-95^\circ$  以上と定義) は 128 本中  $MD^{wat}$  で 4 本、 $MD^{O_2}$  で 10 本であり、 $MD^{O_2}$  で R 構造側に小さなピークが見られることと対応している。この結果は、高  $O_2$  濃度溶媒中では HbA の四次構造の平衡が R 構造側に偏ることを示している。

ヘムへの  $O_2$  結合無しに R 構造への偏りがみられた結果は、非部位特異的なアロステリック制御の存在を示唆している。考えられる仮説としては内部効果と表面効果が考えられる。内部効果は、 $O_2$  侵入が HbA サブユニットの三次構造変形を引き起こし、これが四次構造変化に繋がるとするものである。実際に HbA への  $O_2$  侵入経路解析で示したように 8 ns の間に多数の  $O_2$  分子がヘムポケット等の内部空洞に侵入する[2]ことに加え、ミオグロビンにおいて空洞内リガンド移動が三次構造変化を引き起こすことが確認されている [3-7]。また表面効果は、サブユニット表面付近の水分子の挙動が変化することで、サブユニット間塩橋が切断されやすくなるとするものである。タンパク質表面に位置する水分子は低い拡散係数を有する等バルク層の水とは異なる性質を有しており[8]、また二量体ヘモグロビンにおいてサブユニット間に存在する水分子の数が四次構造変化と連動して変化する[9]ことから、四次構造変化と表面水分子の関連が示唆される。ゆえに、 $O_2$  の存在が HbA 表面近傍の水素結合ネットワークを乱すことで水分子の性質を変え、四次構造変化に繋がっている可能性が考えられる。今回得られた非部位特異的な効果は、従来から受け入れられている部位特異的な効果と相補的な役割を果たすはずであり、HbA のアロステリック制御を分子論的視点から包括的に理解するためのマイルストーンになると期待している。

【参考文献】 [1] Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M., *Scientific Reports*, 4, 4601 (2014). [2] Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B*, 117, 6082 (2013). [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] Nishihara Y., Kato S., Hayashi S., *Biophys. J.* 98, 1649 (2010). [7] Tsuduki T., Tomita A., Koshihara S., Adachi S., Yamato T., *J. Chem. Phys.* 136, 165101 (2012). [8] Yu I., Takayanagi M., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B* 113, 3543 (2009). [9] Kim K. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 134, 7001 (2012).