

ヘモグロビンの機能を塩素イオンが アロステリックに制御する機構の理論的研究

¹名大院情報, ²JST-CREST, ³京大ESICB
○高橋由芽¹, 栗崎以久男^{1,2}, 長岡正隆^{1,2,3}

Theoretical study on mechanism for controlling hemoglobin function by allosteric interaction with chloride ions

○Yume Takahashi¹, Ikuo Kurisaki^{1,2}, Masataka Nagaoka^{1,2,3}

¹ Graduate School of Informatics, Nagoya University, Japan

² Core Research for Evolutional Science and Technology, JST, Japan

³ Elements Strategy Initiative for Catalysts and Batteries, Kyoto University, Japan

【Abstract】 Since oxygen binding affinity of Hemoglobin (HbA) is repressed under presence of chloride ions (Cl^-), interaction between HbA and Cl^- has been supposed to stabilize HbA in T state. To explain the mechanism from molecular point of view, the two hypotheses are proposed so far: one is site specific interaction and the other is non-site specific interaction. However, it is not determined that either actually works. In this study, we employed molecular dynamics simulations for HbA in KCl solution. We examined frequency of contact between Cl^- and amino acid residues in HbA, and also the effect of Cl^- on stability of T state. Considering Cl^- dependence on these properties, we address to clarify the molecular basis of HbA functional regulation of Cl^- .

【序】 酸素輸送タンパク質ヘモグロビン(Hb)の研究は、生体分子のアロステリック制御を理解するためのパラダイムとなってきた。Hbの機能発現機構は、 O_2 結合親和性の低いT状態と O_2 結合親和性の高いR状態に基づき理解される。このT状態とR状態の相対的な安定性は、 O_2 や Cl^- といった「アロステリック・エフェクター」により制御される[1]。特に、 O_2 はHbのヘムに「部位特異的」に結合することで、HbにR状態を取りやすくさせるという考え方が広く受け入れられてきた。しかし我々は、 O_2 とHbの「非部位特異的」な相互作用のみでも、同様の効果が得られるという知見を得ている[2]。つまり、 O_2 によるHbの機能制御機構には「部位特異的」相互作用のほかに「非部位特異的」相互作用も影響している可能性があり、実際、1993年に Cl^- の「非部位特異的」相互作用によるHb機能制御が提案されている[3]。 Cl^- はHbの O_2 結合親和性を低下させることから、T状態を安定化させる働きを持つと考えられている。Uenoらはその機構を Cl^- とHb中心空洞内の正電荷との部位特異的相互作用と考え[4]、一方、Perutzらはそれを非部位特異的相互作用と考え[3]、議論が定まっていない(Fig. 1)。そこで本研究では、Hbが Cl^- と相互作用する部位を理論的に調査し、それが「部位特異的」なのか「非部位特異的」なのかの検証を試みた。更に Cl^- がT状態安定性に与える影響を調査した。

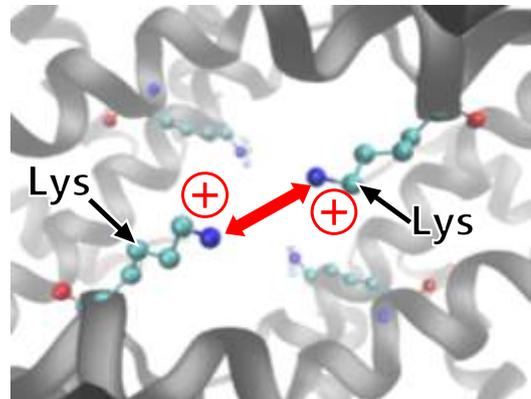


Fig. 1. Repulsion between positively charged residues in central cavity of T state Hb.

【方法 (実験・理論)】 T 状態ヒト成人ヘモグロビン (HbA)(PDB ID: 2DN2)を使用し、塩濃度の異なる 3 種類の水溶液系(35mM Cl^- , 生理濃度 140 mM KCl, 1000 mM KCl)を設計した。AMBER16 を用いて NPT 条件下(310 K, 1 bar)で 100 ns の分子動力学(MD)シミュレーションを行った。各系について、上述の MD シミュレーションをイオン配置の異なる初期構造から 30 回ずつ行った。得られたトラジェクトリを用いて、 Cl^- と HbA の各アミノ酸残基との接触頻度を解析した。また、X 線結晶構造解析で解かれた T 状態 HbA 及び R 状態 HbA 構造(PDB ID: 2DN3)に対する根平均二乗変位(Root Mean Square Deviation: RMSD)を計算し、水溶液中における HbA の構造遷移を判定した。

【結果・考察】 まず、生理濃度 140 mM KCl での Cl^- と HbA の各アミノ酸残基との接触頻度の解析から、接触頻度が比較的高い 7 組の残基を特定した。その結果、中心空洞内の正電荷残基が Cl^- と高い頻度で接触することが分かった(Fig. 2)。この結果は先行研究[3,4]で示された予測と一致する。次に、この 7 組の残基に着目し、接触頻度の Cl^- 濃度依存性を解析した。その結果、中心空洞の奥に位置する残基ほど濃度依存性が小さいという傾向が見られた。また、実験によって求められた HbA への Cl^- 結合数は 1 つであるが[5]、HbA に対する Cl^- 接触総数の解析からは、それ以上の Cl^- が HbA 中心空洞内の残基と接触することが確認された。以上のことから、 Cl^- の部位特異的な結合と非部位特異的な接触の両方が HbA の機能制御に関与する可能性が示唆された。

更に、各濃度条件での T 状態 HbA 及び R 状態 HbA に対する RMSD の分布を解析し、 Cl^- が HbA の構造安定性に及ぼす影響を調査した。 Cl^- 濃度と HbA の酸素親和性には負の相関がある[6]。構造機能相関の観点からは、 Cl^- 濃度が増加するほど、酸素結合能の低い T 状態が安定化されると考えられる。しかし実際には、 Cl^- 濃度の増加に伴い、T 状態にも R 状態にも近づきやすくなるという結果が得られた。このことから HbA の酸素親和性は、従来支持されてきた T 状態及び R 状態に基づく 2 状態遷移とは異なるメカニズムで制御されている可能性が示唆された。

当日は、以上の結果と考察に加えてより詳細な議論を展開する予定である。

【参考文献】

- [1] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman & CO., 2008, 1158p; [2] M. Tanakayagi, I. Kurisaki, M. Nagaoka, *Sci. Rep.*, 2014, **4**, 4601; [3] M. F. Perutz, G. Fermi, C. Poyart, J. Pagnier, J. Kister, *J. Mol. Biol.*, 1993, **233**,536-545; [4] H. Ueno, J. M. Manning, *J. Prot. Chem.*, 1992, **11**, 177-185; [5] R. N.Haire, B. E. Hedlund, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, **74**(10), 4135-4138; [6] P. Guensnon, C. Poyart, E. Bursaux, B. Bohm, *Respir. Physiol.*, 1979, **38**, 115-129

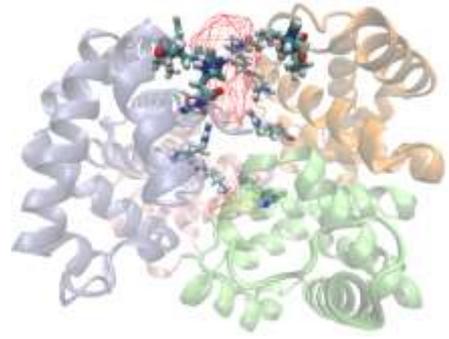


Fig. 2. Spatial distribution of Cl^- . Locations with density $\geq 0.001 \text{ \AA}^{-3}$ are drawn with red wire frame. The residues with high contact frequency with Cl^- are drawn with sticks.

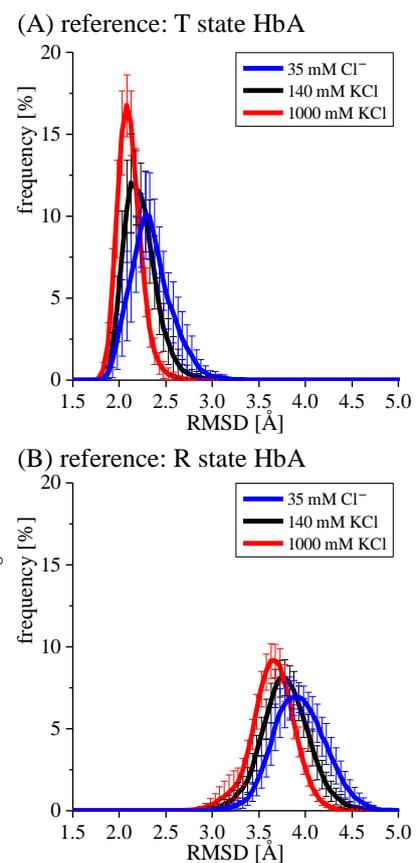


Fig. 3. Distribution of the RMSD.