

## 4A16 酸素の脱離に伴うヘモグロビンの構造ダイナミクス: 生理的なダイナミクスの解明に向けて

(神戸大院・自然科学1, 神戸大・分子フォト2) ○村川 由佳<sup>1</sup>, 水谷 泰久<sup>1,2</sup>

【序】ヘモグロビン(HbA)のリガンドの脱着に伴う構造ダイナミクスの研究では、測定上の困難さゆえに、これまで、生理的なリガンドである酸素(O<sub>2</sub>)の代わりに一酸化炭素(CO)が用いられてきた。しかし、COを用いて調べられたダイナミクスが、果たして生理的に重要なものであるかどうか疑問が残る。そこで、本研究においては、HbAの本来のダイナミクスを知るため、O<sub>2</sub>脱離に伴うHbAの時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、CO脱離の場合と比較した。

【実験】試料には、精製したヒトHbA(50 mM リン酸バッファー pH 7.0)を用いた。HbAとの比較のため、HbAと同様にO<sub>2</sub>を生理的なリガンドとする、ミオグロビン(Mb)についても同様の実験を行った。ウマ由来のMbを50 mM Tris/HCl バッファー(pH 8.5)に溶かし、ヒドロサルファイトナトリウムにて還元後、Sephadex G-25 カラムでゲルろ過し、O<sub>2</sub>形(MbO<sub>2</sub>)を得た。ポンプパルス(532 nm または 540 nm)、プローブパルス(436 nm または 442 nm)を用いて、ポンプ-プローブ法により、ピコ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】HbAのO<sub>2</sub>脱離

とCO脱離に伴うピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを図1に示す。ピコ秒の時間領域において、鉄-ヒスチジン伸縮振動[ν(Fe-His)]バンドとメチン基のたてゆれ振動(γ<sub>7</sub>)バンドの振動数、鉄-ピロール伸縮振動(ν<sub>8</sub>)バンドの強度、この3点において、O<sub>2</sub>脱離の方がCO脱離よりもデオキシ形への緩和が速かった。また、ナノ秒以降の時間領域でも、この特徴が見られた。図2にν(Fe-His)バンド、γ<sub>7</sub>バンドの振動数を遅延時間に対してプロットしたものを示す。ν(Fe-His)バンド、γ<sub>7</sub>バンド共にCO脱離に比べ、O<sub>2</sub>脱離の方が

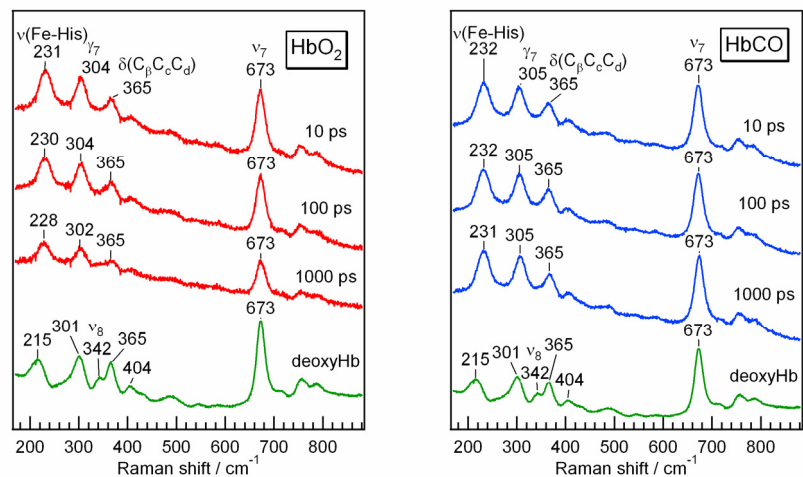


図1 Hbのリガンド脱離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトル  
O<sub>2</sub>脱離(左)、CO脱離(右)

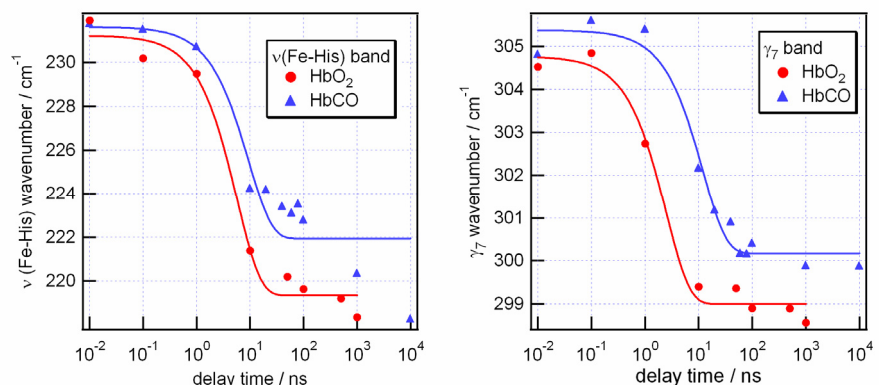


図2 各バンドの振動数変化 ν(Fe-His)バンド(左)、γ<sub>7</sub>バンド(右)  
(実線は指数関数でフィットしたもの)

が変化が速いことがわかる。 $\nu(\text{Fe-His})$ バンド、 $\gamma_7$  バンドの振動数変化については、サブナノ秒からマイクロ秒の時間領域において違いが見られたのに対し、 $\nu_8$  バンドの強度変化については、100 ns 以降、 $\text{O}_2$  脱離と  $\text{CO}$  脱離の間に見られる差は小さくなった。このことから、 $\nu_8$  バンドの強度変化は、 $\nu(\text{Fe-His})$  バンド、 $\gamma_7$  バンドの振動数シフトとは異なる要因から生じていると考えられる。以上のように、生理的なリガンドである  $\text{O}_2$  と非生理的なリガンドである  $\text{CO}$  とでは、脱離後の HbA のダイナミクスが異なることが見出された。一方で、Mb においては、いずれのリガンドの場合も、1000 ps の時間分解スペクトルとデオキシ形のスペクトルがほぼ一致し、HbA で見られたようなリガンド依存性は見られなかった。つまり、Mb では数ピコ秒でヘムの構造がデオキシ形の構造まで緩和しているのに対し、HbA ではナノ秒以降に、リガンド依存性を示す遅い緩和の相が存在する。ナノ秒以降の遅い相は、単離鎖の試料においても見られ<sup>1</sup>、HbA のサブユニットのもつ固有の特徴であると考えられる。HbA 特有に見られるナノ秒以降の遅い緩和が、 $\text{O}_2$  脱離と  $\text{CO}$  脱離とで異なる緩和速度を持つという点は、非常に興味深い。

【考察】 リガンドによってダイナミクスが異なることが、どのような構造上の違いに由来するのかについて考察する。 $\text{O}_2$  形は、図 3(1) に示すように、ヘムに結合した  $\text{O}_2$  が、E ヘルクスにある遠位ヒスチジン残基と水素結合を形成している一方、 $\text{CO}$  形はこの水素結合は非常に弱い。そこで、この水素結合による E ヘルクスへの影響の違いが、ヘムの構造緩和速度の違いに影響しているのではないかと考えた。 $\text{CO}$  脱離後ナノ秒の時間領域では、ヘムの構造変化によって E-F コーナーを中心に、E-F ヘルクスの回転が誘起され、その際、A-E ヘルクス間の水素結合が切断されることが報告されている<sup>2</sup>。この時間領域は、ヘムの構造緩和において、リガンドによる違いが生じる時間領域に一致することから、E ヘルクスの動きとヘムの構造緩和は連動している可能性が高い。リガンド-E ヘルクス間の相互作用の違いが、リガンド結合形における E ヘルクスの状態に違いを生み、リガンド脱離後の E ヘルクスの動きに速度の差を生んでいると考え、本研究の結果をうまく説明できる。

本研究では、リガンド脱離後のヘムの構造変化が、 $\text{O}_2$  と  $\text{CO}$  では異なった速度で起きることを明らかにした。今回得られた結果は、これまで  $\text{CO}$  を用いた研究から得られた HbA の構造ダイナミクスの描像に、再検討を迫るものである。

#### 【謝辞】

本研究で用いた HbA の試料は、法政大学工学部の長井雅子教授よりご提供頂きました。

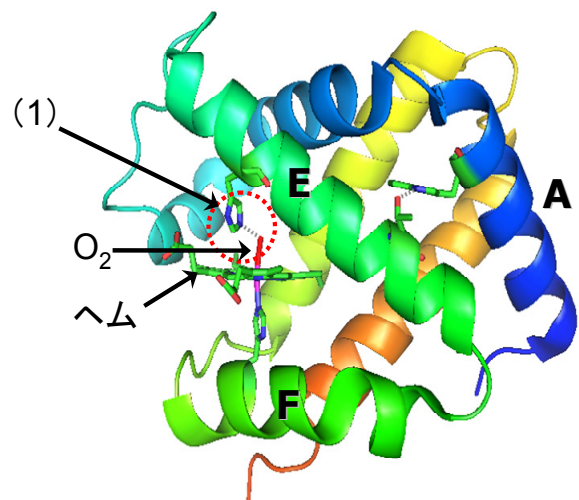


図 3 HbA の  $\text{O}_2$  形の立体構造  
( $\alpha$ サブユニットのみを示す)

<sup>1</sup> Y. Mizutani and M. Nagai, 投稿準備中

<sup>2</sup> V. Jayaraman, K. R. Rodgers, I. Mukerji, and T. G. Spiro, *Science* **1995**, 269, 1843-1848