

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06601

研究課題名(和文)ヘモグロビン結晶構造の半網羅的機能決定

研究課題名(英文)Semi-comprehensive functional determination of crystal structures of hemoglobin

研究代表者

柴山 修哉 (Shibayama, Naoya)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20196439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分子の機能調節に関わる構造変化は、ヘモグロビン(Hb)の事例を下敷きとしてTense(T)状態とRelaxed(R)状態との間の2状態転移で説明されることが多い。しかし、肝心のHbでは、2状態モデル的な理解が定量的な意味で成功していない。HbはX線結晶構造解析法が最初に適用されたタンパク質の一つであるが、その結晶構造と溶液中機能との関係が未だ整理されておらず、未解決の課題として残されている。本研究では、結晶中Hbの酸素平衡曲線測定による結晶構造の直接機能決定、及び、水を含む多孔性シリカゲル中で状態間遷移を凍結したHbの機能解析を行い、Hbのとりうる構造と機能の関係を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘモグロビン(Hb)のアロステリック効果のメカニズムを理解するためには、溶液中に平衡状態で存在すると考えられる各構造とその機能を直接関連づけることが重要である。それにもかかわらず、この種の研究は国内外でほとんど行われていない。この現状を鑑み、かつ、研究代表者の柴山の経験と実績を踏まえ、本研究は立案・遂行された。本研究により、HbのR状態、T状態の持つ機能的柔軟性の構造的基盤が定義され、これらの成果は、Hbのアロステリック効果を説明する新しい構造機能連関モデルの創造へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Structural changes associated with protein allostery are often explained in terms of a two-state transition between the tense (T) state and the relaxed (R) state, using hemoglobin (Hb) as an example. However, the two-state model has not been successfully applied to the understanding of Hb allostery in a quantitative sense. Although Hb was one of the first proteins to be solved by X-ray crystallography, the correlation between its crystal structure and solution function has not yet been clarified and remains as an unresolved issue. In this study, we directly determined the functional properties of crystals of Hb, and analyzed the function of Hb whose transition between states was frozen in a porous silica gel containing water. We have elucidated the relationships between the structure and function of Hb.

研究分野：生物物理学

キーワード：ヘモグロビン アロステリー 酸素親和性 MWCモデル 結晶構造解析 ゾル・ゲル法

1. 研究開始当初の背景

ヒトのヘモグロビン (Hb) は $\alpha_2\beta_2$ 型の四量体である(図 1A)。各サブユニットにはヘムを 1 個ずつ持ち合計 4 個の O_2 を結合する。Hb は分子全体の構造を変化させて、4 個の O_2 結合間の正の協同作用と、ヘム以外の部位に結合する H^+ 、 Cl^- 、有機リン酸などの非ヘムリガンドと O_2 結合との間の負の調節作用を実現している。これら 2 種類のアロステリック効果は、いずれも教科書的には X 線結晶構造解析で解かれた O_2 の結合していないデオキシ T 構造と O_2 の 4 個結合したオキシ R 構造(図 1B に示した二量体間の位置が約 15° 異なる 2 構造)の間の 2 状態平衡で説明される。この 2 状態モデルは、半世紀近く経った今でも動かしがたい教科書的知識として学生に教えられている。

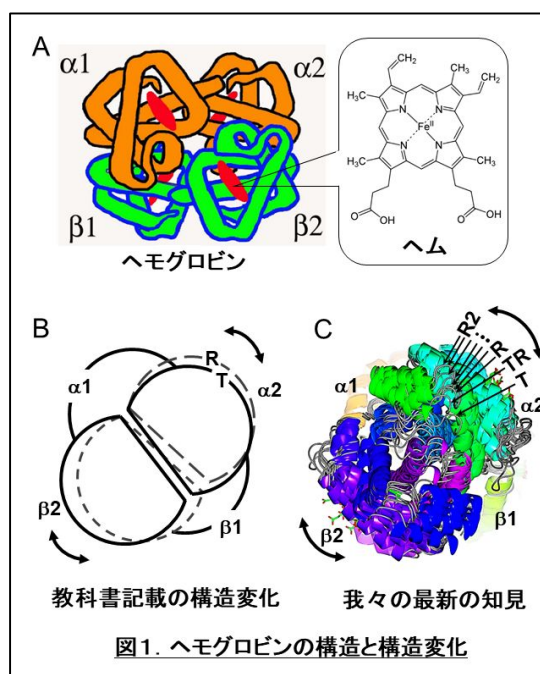


図 1. ヘモグロビンの構造と構造変化

しかしながら、実際の溶液中 Hb の機能を定量的に見てみると、T 状態 Hb の酸素親和性は溶液条件に依存して 40 倍以上変化することが古くから知られている [Imai K. (1982) *Allosteric Effects in Haemoglobin*. Cambridge Univ. Press] また最近では、強力なアロステリックエフェクターの結合した R 状態 Hb の酸素親和性は、Hb の酸素親和性の最低値近くまで下がることを示唆する実験結果が報告されている [Yonetani T. et al. (2002) *JBC* 277, 34508] 更に、最近我々が行った結晶構造解析研究では、単一結晶形中に 9 種類の異なる 4 次構造が現れることから、Hb の構造変化は多数の 4 次構造の間を行き来する複雑な過程(図 1C)であることが示されている [Shibayama N. et al. (2014) *JACS* 136, 5097] これらの知見は、Hb 分子の大自由度系が周囲の環境に応じて柔軟に構造集団のポピュレーションをシフトさせるメカニズムを暗示するが、Hb の構造集団は 2 状態モデルの予想よりも格段に複雑であり、各構造と機能との関係を調べる研究は手付かずのままである。特に、R 構造集団の酸素親和性の幅とその親和性変化を引き起こすメカニズムについては Hb 研究者の間で見解が分かれており、早期説明が求められている。本研究では独自の機能測定法を駆使して、これらの未説明問題にアプローチする。

2. 研究の目的

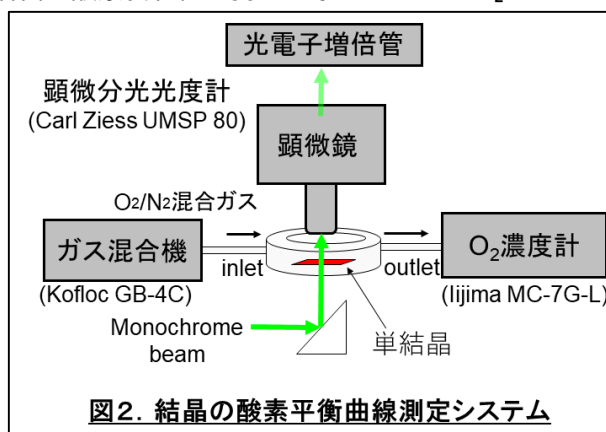
アロステリックタンパク質の分子メカニズムを理解するためには、タンパク質分子がとりうる個々の構造とその機能を結びつけることが重要である。Hb はアロステリックタンパク質の代表格であるにもかかわらず、この基本的課題に正面から取り組んだ研究は驚くほど少ない。本研究の目的は、典型的なアロステリックタンパク質 Hb がとる各結晶構造とその機能を直接関係づけることにある。

本研究では、研究代表者の柴山がこれまでに実用化した結晶用酸素平衡曲線測定システムを更に高精度化し、酸素親和性が異なることが予想される種々の R 状態 Hb 結晶の酸素平衡曲線を測定する。これにより、各結晶構造とその機能を直接関係づける。また、研究代表者が開発した「水を含む多孔性シリカゲル中で状態間遷移を凍結した Hb の機能解析法」を駆使して、溶液中

に存在する T 状態 Hb の機能状態を洗い出す。これらの実験から得られる知見を統合し、Hb のとりうる構造と機能の関係を整理する。

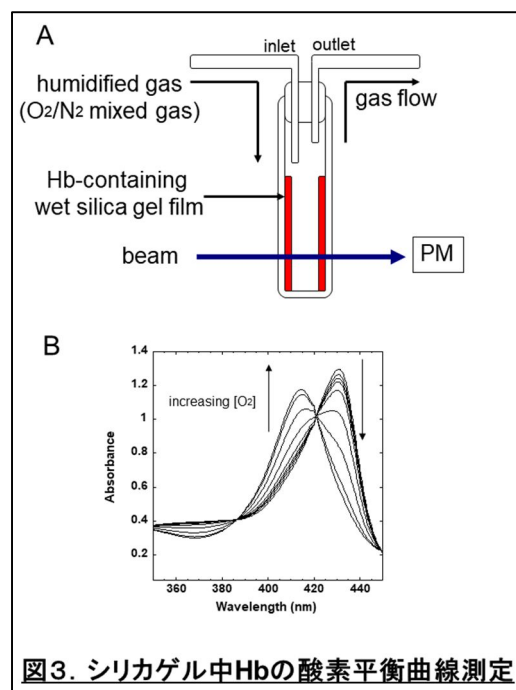
3. 研究の方法

(1) これまでに報告されている R 状態 Hb と強力なアロステリックエフェクターとの共結晶構造は 2 例のみである。一つは、CO 結合型ウマ Hb とアロステリックエフェクター bezafibrate (BZF) との共結晶構造 (PDB ID: 11WH) であり、もう一つは、CO 結合型ウマ Hb と BZF 類似化合物 2-[4-({[(3,5-dichlorophenyl)amino]carbonyl}amino)phenoxy]-2-methylpropanoic acid (L35) との共結晶構造 (PDB ID: 2D5X) である。これら二つの共結晶は、いずれも同形の O_{22} 結晶で R 型の 4 次構造が PDB に登録されている。特に、CO 結合型ウマ Hb (R 構造) と L35 との共結晶構造は、通常の R 状態よりも約 2000 倍低い酸素親和性を持つと予想されている [Yonetani T. and Laberge M. (2008) *BBA* 1784, 1146]。本研究では、これら 2 種類の共結晶をポリエチレングリコール (PEG) で結晶化し、図 2 のシステムを用いて酸素平衡曲線の測定を行った。またコントロールとして、アロステリックエフェクターなしのメト型 (Fe^{3+} 型) ウマ Hb の O_2 結晶 (R 構造) を硫酸アンモニウムで結晶化し、酸素平衡曲線の測定を行った。



(2) もう一つの強力なアロステリックエフェクター inositol hexaphosphate (IHP) の結合した R 状態 Hb の共結晶構造は未だ報告されていない。本研究では、メト型ヒト Hb とメト型ウマ Hb を用いた IHP 存在下の結晶化スクリーニングを行い、得られた結晶の X 線結晶構造解析を行った。

(3) 柴山の方法 [Shibayama N. and Saigo S. (1995) *JMB* 251, 203] を用いて、含水シリカゲル中で高次構造変化が凍結された T 状態 Hb 構造集団の酸素平衡曲線を測定した (図 3A)。シリカゲルの詳しい減速機構はよくわかっていないが、ゲルマトリックスがタンパク質の水和水の運動性を低下させることで、間接的にタンパク質の構造変化の速度を大幅に (約 10 桁) 減速させると考えられている [Shibayama N. (2008) *Biochemistry* 47, 5784]。一方、拡散による低分子のゲル中への浸透、及び、低分子とタンパク質分子との反応は溶液中と同じオーダーの速度で進行する。また、このゲルは透明度に優れており、既知の酸素分圧で平衡化したゲルの吸収スペクトルを高精度に測定することができる (図 3B)。これら一連の吸収スペクトルを解析すると、状態間遷移が事実上凍結された T 状態 Hb 構造集団の酸素平衡曲線が得られる。



(4) Hb の酸素親和性変化と良い相関を持つ構造プローブとして 鎖 93 番システイン SH 基の

反応性がある。酸素親和性の異なる T 状態 Hb を溶液ごと透明な多孔性シリカゲルのゲルマトリックス中に閉じこめ状態間遷移を凍結した状態で 鎖 93 番システイン SH 基の反応性の測定を行った。SH 基反応試薬としては、過去の多くの Hb 研究で利用された 4,4'-dithiodipyridine(4-PDS) を用いた。SH 基反応試薬の拡散浸透による不感時間を最小に抑えるため 0.1 mm 厚の平板ゲルを作製して実験を行った。また、脱酸素型 Hb の代替としてヘムの中心金属 Fe(II) を酸素と結合しない Ni(II) に置き換えた Ni(II)Hb を用いることで、手技が容易な好気条件での実験を可能にした。Ni(II)ヘムの脱酸素型 Fe(II)ヘムのモデルとしての妥当性は色々な物理化学的測定から検証されている [Shibayama N. et al. (1986) *JMB* 192, 323; Shibayama N. et al. (1986) *JMB* 192, 331; Shibayama N. et al. (1987) *Biochemistry* 26, 2194]

4 . 研究成果

(1) Yonetani ら [(2002) *JBC* 277, 34508; (2008) *BBA* 1784, 1146] は、色々な溶液条件の Hb の酸素平衡曲線データと NMR などの構造データとを組み合わせ、強力なアロステリックエフェクター存在下の R 状態 Hb の酸素親和性は最大で約 2000 倍低下すると報告している。これは Hb の 2 状態モデル修正の方向を左右する重要な報告であるが、実験結果の解釈の是非に関しては Hb 研究者の間で意見が分かれている。本研究では、BZF または L35 の結合した R 状態 Hb 共結晶の酸素平衡曲線を測定し、結晶でタンパク質の 4 次構造を拘束したまま強力なアロステリックエフェクターの結合した R 構造の酸素親和性を直接決定した。結果は Yonetani ら [(2002) *JBC* 277, 34508; (2008) *BBA* 1784, 1146] の予想に反して、BZF または L35 の R 状態 Hb への結合は 2~3 倍程度の酸素親和性低下しか引き起こさないことを示していた。また、アロステリックエフェクターなしのメト型ウマ Hb 結晶 (R 構造) の酸素親和性は、予想通りアロステリックエフェクターなしの C0 結合型ヒト Hb 結晶 (R 構造) とほぼ同じ値を示した。R 状態 Hb の酸素親和性の幅と親和性変化のメカニズムに関して現在提唱されている学説 [Yonetani T. et al. (2002) *JBC* 277, 34508] には再検討が必要かもしれない。

(2) 上記 (1) の結論を強化するため、アロステリックエフェクターなしのメト型ウマ Hb の C2 結晶 (R 構造) に BZF または L35 を浸透させた後の結晶の酸素飽和度を測定した。エフェクター浸透後の C2 結晶を低酸素分圧に長時間置くと R-T 転移由来の不可逆な酸素親和性低下が起こることがわかった。そのため、酸素飽和度の測定は可逆性が担保される酸素飽和度 90% 程度となる酸素分圧のみで行った。各アロステリックエフェクター浸透後に観測された酸素飽和度は、(1) の C222₁ 共結晶の値と一致した。結晶空間群の異なる結晶で同じ酸素飽和度が得られた事実から、結晶パッキングによるアーチファクトの可能性は排除され、観測された 2~3 倍程度の酸素親和性の低下はエフェクター結合による変化であることが確認された。

(3) 未だ報告されていない IHP の結合した R 状態 Hb の結晶化スクリーニング、および、生成した結晶の X 線結晶構造解析を行った。Hb 試料としてはメト型ヒト Hb とメト型ウマ Hb の 2 種類を用い、結晶化条件は IHP 結合を阻害しない低塩条件 (沈殿剤は PEG) に限定した。その結果、ヒト Hb とウマ Hb でそれぞれ 1 種類ずつの IHP 存在下 R 状態結晶を得ることができた。しかし、いずれも比較的高分解能解析 (1.6-1.8 Å 分解能) であるにもかかわらず、IHP の電子密度はクリアに観測されなかった。これは、IHP の持つ 6 個のリン酸の Hb に対する結合モードが複数通りあることに起因すると推測される。またもう一つの問題として、いずれの IHP 入り結晶も脱酸素化に伴い R-T 転移由来の不可逆な酸素親和性低下を起こすことがわかった。

(4) T 状態 Hb の酸素親和性は溶液条件に依存して 40 倍以上変化することが古くから知られているが [Imai K. (1982) *Allosteric Effects in Haemoglobin*. Cambridge Univ. Press] その

分子メカニズムはまだ分かっていない。本研究では、T 状態の構造集団を構成する機能の異なるコンホマーを洗い出すため、両極の酸素親和性を持つ脱酸素型 Hb をそれぞれ溶液ごと透明な多孔性シリカゲルのゲルマトリックス中に閉じこめ、状態間遷移を凍結した状態での酸素平衡曲線の測定を行った。溶液 Hb の最低酸素親和性を持つ脱酸素型 Hb は、強力なアロステリックエフェクター IHP を溶液に加えることで調製した。一方、最高酸素親和性を示す脱酸素型 Hb は、塩素イオン等の非ヘムリガンドが存在しない低塩溶液条件を用いることで実現した。また、より高精度の酸素平衡曲線を得るため、従来の含水シリカゲル固定法 [Shibayama N. and Saigo S. (1995) *JMB* 25, 203] を改良し、Hb の高次構造固定能を向上させた。IHP 存在下の脱酸素型 Hb の酸素平衡曲線は、単一の機能状態を仮定するモデルでうまくフィットできた。その酸素親和性は、溶液 Hb の最低酸素親和性と一致し、また、T 結晶の酸素親和性とも一致した。これらの一致から、この T 状態コンホマーの構造基盤が T 結晶構造で与えられることが示唆された。一方、最高酸素親和性を示す低塩条件の脱酸素型 Hb の酸素平衡曲線は顕著な二相性を示し、二つの機能状態を仮定するモデルでフィットできた。このうちの約 80% を占める状態の酸素親和性は、上の最低親和性 T 状態コンホマーの値と一致した。一方、残り約 20% を占める未知の状態は、最低親和性 T 状態と比較して約 100 倍高い酸素親和性を示した。酸素親和性が高い T 状態コンホマーの構造基盤はまだ得られていないが、重要な手がかりが見ついている [詳細は (5) に後述]

(5) Hb の 鎖 93 番システイン SH 基の反応性は、鎖 C 末端塩橋の形成有無を判別する構造プローブとして知られている。脱酸素型 Hb の良いモデルとなる Ni(II)Hb を用いて、上で述べた酸素親和性の異なる T 状態 Hb (IHP 存在下と低塩溶液条件) を溶液ごと透明な多孔性シリカゲルのゲルマトリックス中に閉じこめ状態間遷移を凍結した状態で 鎖 93 番システイン SH 基の反応性の測定を行った。最低酸素親和性を持つ T 状態 Hb の SH 基の反応性は単一の指数関数でフィットすることができた。一方、比較的高い酸素親和性を持つ T 状態 Hb の SH 基の反応性は顕著な二相性を示し、二つの指数関数の和でフィットすることができた。このうちの約 80% を占める T 状態コンホマーの SH 基の反応性は、上の最低親和性 T 状態の反応性と一致した。一方、残り約 20% を占める未知の T 状態コンホマーは、最低親和性 T 状態と比較して、約 50 倍高い反応性を示した。(4) の結果と合わせると、酸素親和性が高い T 状態コンホマーは、鎖 C 末端塩橋が壊れた T 構造である可能性が強く示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 柴山 修哉	4. 巻 31
2. 論文標題 いまさらヘモグロビン?ヘモグロビンのアロステリーを再考する	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 人工血液（日本血液代替物学会会誌）	6. 最初と最後の頁 43～53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagatomo Shigenori, Shoji Mitsuo, Terada Takuto, Nakatani Kiyoharu, Shigeta Yasuteru, Hirota Shun, Yanagisawa Sachiko, Kubo Minoru, Kitagawa Teizo, Nagai Masako, Ohki Mio, Park Sam-Yong, Shibayama Naoya	4. 巻 121
2. 論文標題 Heme-bound tyrosine vibrations in hemoglobin M: Resonance Raman, crystallography, and DFT calculation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2767～2780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2022.06.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato-Tomita Ayana, Ang Artoni Kevin R., Kimura Koji, Marumi Riho, Happo Naohisa, Matsushita Tomohiro, Park Sam-Yong, Shibayama Naoya, Sasaki Yuji C., Hayashi Kouichi	4. 巻 635
2. 論文標題 X-ray fluorescence holography of biological metal sites: Application to myoglobin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 277～282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shibayama Naoya, Sato-Tomita Ayana, Ohki Mio, Ichiyonagi Kouhei, Park Sam-Yong	4. 巻 117
2. 論文標題 Direct observation of ligand migration within human hemoglobin at work	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4741～4748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1913663117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴山 修哉
2. 発表標題 ヘモグロビンの構造・機能・動態研究の最前線
3. 学会等名 第29回日本血液代替物学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長友 重紀, 寺田 拓人, 庄司 光男, 重田 育照, 中谷 清治, 廣田 俊, 北川 禎三, 長井 雅子, 大木 規央, 朴 三用, 柴山 修哉
2. 発表標題 ヘモグロビンM IwateとM Bostonにおけるヘム-チロシン結合の振動分光, 結晶構造, 理論計算による解析
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴山 修哉
2. 発表標題 ヘモグロビンの超精密制御機構の秘密
3. 学会等名 第33 回生物無機化学夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴山 修哉
2. 発表標題 いまさらヘモグロビン
3. 学会等名 低酸素研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------