

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K03877

研究課題名（和文）低誘電率細孔内に閉じ込めたヘモグロビンの機能とそのTHz, GHz主鎖振動の観測

研究課題名（英文）Investigation of giga- and terahertz frequency of main-chain involved with function of hemoglobin confined in pore with low dielectric constant

研究代表者

長友 重紀（Nagatomo, Shigenori）

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：80373190

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）：生体内存在するヘモグロビン分子の機能の発現におけるGHz, THzの振動数の果たす寄与を解明すべく本研究に取り組んだ。水の寄与を減らすということで誘電率の小さいシリカゲル細孔内に閉じ込めてGHz, THzの振動数の検出を試みたが、水の寄与は想像以上に大きく研究の進展が困難であった。そこで、本課題に関する基礎的な知見を得るべく、細孔内におけるヘムタンパク質の挙動を調べることに視点をいった。共焦点顕微鏡、顕微吸収分光法を用いて研究を進め、細孔内でのヘムタンパク質の挙動には、細孔内表面とタンパク質との静電相互作用による脱着が大きく寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細孔内に取り込まれたヘムタンパク質の挙動を調べることで、ヘムタンパク質が変性されることなく細孔内を移動する過程を追跡できたことにより、タンパク質分離の過程を解き明かすことに貢献した。とりわけpHを変化させることでヘムタンパク質の拡散挙動が表面拡散の脱着速度に大きく依存していることを実証したことは細孔内におけるヘムタンパク質の挙動に関する基礎的な知見を得ることに大きく貢献している。本研究で得られた知見は、混合物からのタンパク質分離を考えるときに大きな学術的意義をもち、さらにはヘモグロビン分子の機能の発現におけるGHz, THzの振動数の果たす寄与の解明につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：I conducted this research to elucidate the contribution of GHz and THz frequencies to the expression of functions of hemoglobin molecules existing in living organisms. In order to reduce the contribution of water, we tried to detect frequencies of GHz and THz by confining it in silica gel pores with a low dielectric constant, but the contribution of water was larger than expected, making it difficult to advance the research. Therefore, in order to obtain basic knowledge regarding this topic, we focused on investigating the behavior of heme proteins within the pore. Through research using confocal microscopy and microscopic absorption spectroscopy, we revealed that desorption due to electrostatic interaction between the pore inner surface and the protein greatly contributes to the behavior of heme proteins within the pore.

研究分野：生物物理

キーワード：ヘムタンパク質 シリカゲル 細孔 拡散 振動分光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2017~2019年の科研費の課題「ヘモグロビン協同性発現へのタンパク質の大振幅揺らぎと低波数振動の寄与の実験的検証」基盤研究(C)において、ヘモグロビンの酸素親和性とタンパク質の大振幅揺らぎに由来する低波数振動 (THz, GHz 帯域) を観測すべく種々の実験を行ったが、観測するタンパク質濃度 (最大で数 mM) に比べ、ヘモグロビン水溶液中に存在する水の濃度 (55.6 M) のため、観測することが難しいということが明確になった。そこで、ヘモグロビンの大振幅揺らぎに由来する低波数振動 (THz, GHz 帯域) を妨害する誘電率の大きい水の寄与を減らすことを目的としてシリカゲルのような低誘電率の細孔内にヘモグロビンを入れて測定することを考えた。そこで、シリカゲル細孔内に取り込んだヘムタンパク質の一種であるミオグロビンを用いてまずは細孔内における種々の測定を行い、細孔内におけるヘムタンパク質の基礎的知見を得ることを行った。

またその一方で本研究課題の元となった米谷らの説、「酸素親和性は四次構造で決定されるのではなく、主鎖の揺らぎの大きさで決まる」(T. Yonetani and Kanaori, *BBA*, **1834**, 1873 (2013)) は、大振幅振動の大きさと酸素親和性との関係を理論的に予測した論文であるが、実証されていない。そこで、ヘモグロビンのゆらぎにかかわる実験も並行して行った。

2. 研究の目的

ヘモグロビンの協同性の発現が現在広く受け入れられている結晶構造解析によるヘモグロビン分子の四次構造に基づいて提案されたPerutzモデルではなく、ヘモグロビン分子の主鎖の大振幅揺らぎに関係する低波数振動が関係するのかどうかを実証するために、低波数振動を可能とするための低誘電率の細孔内にヘモグロビンを入れて、水の寄与を減らすことを通してそのことが可能かどうかの実験的検証を行う。そのため、その過程において必要な細孔内でのヘムタンパク質の基礎的知見を得ることも併せて行う。

3. 研究の方法

細孔内にヘムタンパク質を入れて分光研究を行うため、鉄-プロトポルフィリンであるヘムの鉄を亜鉛にした亜鉛-鉄-プロトポルフィリンをヘムタンパク質の一種であるミオグロビンに入れて再構成し、共焦点蛍光顕微鏡で測定する。さらに顕微吸収分光計を作成し、吸収スペクトル変化から細孔内でのミオグロビンの拡散挙動を調べ、細孔内でのヘムタンパク質の基礎的知見を得る。

4. 研究成果

- (1) Shigenori Nagatomo, Teizo Kitagawa, Masako Nagai,
四量体と二量体のヘモグロビン平衡混合物の構造の柔らかさの違いによる分離
日本生物物理学会第58回年会, 2020年9月, オンライン開催
- (2) S. Nagatomo, T. Kitagawa and M. Nagai
Roles of Fe-Histidine bonds in stability of hemoglobin: recognition of protein flexibility by Q Sepharose
Biophys. J., **120**, 2734–2745 (2021). DOI: 10.1007/s12551-017-0364-5

本研究発表と本論文においてβ鎖のFe-His結合をβ92His → Glyの変異に加えてイミダゾールを加えたFe-imidazole + Glyで置き換えたことにより、四量体 ⇄ 二量体の平衡が二量体へ平衡が移動することがわかった。これに関連してβ鎖のFe-His結合をFe-imidazole + Glyで置き換えてβ鎖のF-ヘリックスとイミダゾールの間に共有結合がなくなることで (Fe-His結合ではF-ヘリックスとイミダゾールの間に共有結合がある), ヘモグロビン分子全体のゆらぎが大きくなり、このことはβ鎖のヘムの脱離を促していることもわかった。本研究課題の大元につながる米谷らの説、「酸素親和性は四次構造で決定されるのではなく、主鎖の揺らぎの大きさで決まる」(T. Yonetani and Kanaori, *BBA*, **1834**, 1873 (2013)) は主鎖の揺らぎの振幅が大きいとき、酸素親和性が低くなるという説であるが、本研究結果はβ鎖のFe-His結合をFe-imidazole + Glyで置き換えることでゆらぎが大きくなり四量体から二量体へ平衡が移動したことを示し、ゆらぎが酸素親和性と関係していることを示唆する結果となった。

- (3) 寺田拓人, 風見裕明, 宮川晃尚, 長友重紀, 中谷清治
単一メソ多孔性シリカゲル微粒子/水系における亜鉛ミオグロビンの細孔内物質移動過程の細孔径依存性
第39回溶媒抽出討論会, 2020年11月, オンライン開催

- (4) A. Miyagawa, S. Nagatomo, H. Kazami, T. Terada, and K. Nakatani
Kinetic Analysis of the Mass Transfer of Zinc Myoglobin in a Single Mesoporous Silica Particle by Confocal Fluorescence Microspectroscopy
Langmuir, **37**(43), 12697–12704 (2021). DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c02127

本研究発表と本論文において、亜鉛-ポルフィリンで再構成したミオグロビンをシリカゲル細孔（粒子サイズ30-60 μm細孔直径15 nm）内に入れ、ミオグロビンの拡散過程を共焦点顕微鏡と倒立顕微鏡を用いて明らかにした。亜鉛-ポルフィリンで再構成したミオグロビンをういたのは、レーザー照射により、ミオグロビンが蛍光を発するようにして蛍光による追跡を可能にするためである。シリカゲル細孔の外部からシリカゲル細孔の内部にミオグロビンが入る過程（分配）とシリカゲル内部に入っているミオグロビンがシリカゲル外部に出る過程（放出）をリン酸緩衝溶液濃度を変えて（10, 20, 30 mM）拡散係数を調べた。また、倒立顕微鏡を用いたシリカゲル内の可視吸収スペクトル測定よりミオグロビンの分配比（= シリカゲル内の濃度/シリカゲル外（バルク）の濃度）を決定した。ポア-表面拡散モデルによる解析より、分配過程においては、ポア拡散（細孔内溶液における拡散）はほとんどおこらず、表面拡散（細孔内壁面に沿った拡散）が主であり、一方、放出においては、ポア拡散と表面拡散の両方の寄与を含むことがわかった。本発表によりタンパク質（ミオグロビン）分子のシリカゲル細孔内の拡散が分配、放出とも表面拡散で起こることが初めて明らかになった。

(5) 長友重紀

細孔内に取りこまれたヒト成人ヘモグロビンの機能発現における GHz, THz 領域の主鎖のゆらぎの実験的検証

2020 年度福井大学遠赤外領域開発研究センター共同研究成果報告会, 2021 年 3 月, 福井大学

本研究発表において、ヘモグロビン水溶液においては、タンパク質の大振幅揺らぎに由来する低波数振動（THz, GHz 帯域）の観測を試みる際に、大きな比誘電率（80）をもつ水の存在がタンパク質の低波数振動の観測を妨げることが示唆された。

(6) S. Nagatomo, M. Nagai, and T. Kitagawa (総説)

Structural origin of cooperativity in human hemoglobin: a view from different roles of α and β subunits in the $\alpha_2\beta_2$ tetramer

Biophys. Rev., **14**, 483–498 (2022). DOI: 10.1007/s12551-022-00945-7

本総説において、ヘモグロビンの協同効果の様々要因について紹介した。

(7) 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

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

第 47 回生体分子科学討論会, 2021 年 6 月, オンライン開催

(8) S. Nagatomo, M. Shoji, T. Terada, K. Nakatani, Y. Shigeta, S. Hirota, S. Yanagisawa, M. Kubo, T. Kitagawa, M. Nagai, M. Ohki, S-Y. Park, and N. Shibayama

Heme-bound tyrosine vibrations in hemoglobin M: Resonance Raman, crystallography, and DFT calculation

Biophys. J., **121**, 2767–2780 (2022). DOI: 10.1016/j.bpj.2022.06.012

本研究発表と本論文において、ヒト成人ヘモグロビン（Hb A）の α 鎖にチロシン（Tyr）の変異のあるヘモグロビン Hb M Iwate（ $\alpha 87\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$ ）と Hb M Boston（ $\alpha 58\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$ ）の Fe-O-C(Tyr) 角度と振動分光による波数との間に相関があることを見出した論文である。Hb A は、酸素結合部位のヘムの Fe イオンが Fe^{2+} で近位ヒスチジン（ α 鎖は His87, β 鎖は His92）が配位しているが、 α 鎖の近位ヒスチジン（His）がチロシンに変異した Hb M Iwate と遠位ヒスチジン（ $\alpha\text{His}58$ ）がチロシンに変異した Hb M Boston では、ヒスチジンの代わりに変異したチロシンがヘムに配位し、その際ヘムの Fe イオンが Fe^{2+} から Fe^{3+} になる。この結果、Hb M Iwate と Hb M Boston は α 鎖のヘムにおいて Fe とチロシンの O 原子との間に配位結合を生じるので Fe-O-C(Tyr) の構造を有することになる。可視共鳴ラマン分光（励起波長 488.0 nm, 442 nm）により Hb M Iwate で 899 cm^{-1} , Hb M Boston で 876 cm^{-1} に観測された帰属未定であった振動が、理論計算によりヘム（ α 鎖）に配位している Tyr を含む振動で、かつ広角度になるにしたがい高波数になることが予測された。高分解能 X 線結晶構造解析により Hb M Iwate（分解能 1.45–1.40 Å）が 153.6° （4 サブユニットの平均値）、Hb M Boston（分解能 1.35–1.30 Å）が 134.6° （4 サブユニットの平均値）で決

定され、理論計算による予測が正しいことを示した。この知見は、X線結晶構造等による分子構造が未知であるが、Tyrが配位していることがわかっているヘムタンパク質のTyr配位のFe-O-C(Tyr)角度を振動分光により結合角度の推定に利用できる。なお、 α 鎖のヘムにTyrが配位していることから、酸素は α 鎖には結合せず、Hb M Iwate, Hb M Bostonともに β 鎖のみに酸素が結合するヘモグロビンであるが、どちらもHb Aのように酸素結合のある段階で酸素親和性が高くなるということはなく、酸素親和性が低いまま推移する。そのため、低酸素親和性のヘモグロビンの代表として、ゆらぎとの関係を調べるヘモグロビンとしては大きな価値を有する。

(9) 久能初陽, 長友 重紀, 宮川 晃尚, 中谷 清治
メソポーラスシリカに対するミオグロビンの拡散係数の細孔径および緩衝液濃度依存性
第82回分析化学討論会, 2022年5月, 茨城大学

(10) A. Miyagawa, S. Nagatomo, H. Kuno, T. Terada, and K. Nakatani
Pore Size Dependence of Mass Transfer of Zinc Myoglobin in Single Mesoporous Silica Particle
Langmuir, **39**(32), 11329–11336 (2023). DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c01017

本研究発表と本論文において、シリカゲル細孔（粒子サイズ 30 - 100 μm 細孔直径 10, 15, 30, 50 nm）内でのミオグロビンの拡散過程を共焦点顕微鏡と倒立顕微鏡を用い、細孔直径の違いが、シリカゲル外部からシリカゲル内部にミオグロビンが入る過程（分配）とシリカゲル内部に入っているミオグロビンがシリカゲル外部に出る過程（放出）に及ぼす効果をリン酸緩衝溶液濃度を 10, 20, 30 mM にして拡散係数を調べた。ポア-表面拡散モデルによる解析より、分配過程においては、上述(4)の 15 nm のときの結果と同様、細孔直径 10, 30, 50 nm においてもポア拡散（細孔内溶液における拡散）はほとんどおこらず、表面拡散（細孔内壁面に沿った拡散）が主であった。ただ、表面拡散係数は、細孔サイズが大きくなるにつれて大きくなる傾向が見られた（ただし、30, 50 nm は同じ値）。一方、放出においては、ポア拡散と表面拡散の両方の寄与が存在したが、細孔サイズが大きくなるにつれてポア拡散の寄与が表面拡散よりも大きくなっていったが、ポア-表面拡散モデルから予想されるポア拡散の拡散係数よりも実測値は小さかった。このことから、ポア拡散モデルの前提である細孔表面からの吸脱着の平衡が達成されておらず、吸脱着が遅いことが考えられた。細孔内の拡散に関するこれらの結果を細孔サイズの大きさで [10, 15 nm] と [30, 50 nm] で分けると、相対的に小さい [10, 15 nm] の方は、細孔入り口での立体障害（ミオグロビンの集積）が拡散係数を規定し、相対的に大きい [30, 50 nm] の方は、細孔内拡散における吸脱着の（吸脱着平衡に達しないほどの）遅い速度が規定することが明らかになった。

(11) A. Miyagawa, H. Kuno, S. Nagatomo, and K. Nakatani
Evolution of myoglobin diffusion mechanisms: exploring pore and surface diffusion in a single silica particle
Anal. Sci., in press, DOI: 10.1007/s44211-024-00575-x

本論文において、シリカゲル細孔（粒子サイズ 30 - 100 μm 細孔直径 10, 15, 30, 50 nm）内でのミオグロビンの拡散過程を顕微吸収測定により pH の違い（pH 6 ~ 8）が、シリカゲル外部からシリカゲル内部にミオグロビンが入る過程（分配）とシリカゲル内部に入っているミオグロビンがシリカゲル外部に出る過程（放出）に及ぼす効果をリン酸緩衝溶液濃度を 10, 20, 30 mM にして拡散係数を調べた。pH がミオグロビンの等電点である pH 7 近傍で分配、放出過程における拡散が大きくなり、それよりも低い pH では拡散が減少した。これは、ミオグロビンの正味の正電荷が増えたことによりシリカゲル表面のシリノール基による負電荷との静電相互作用が大きくなりシリカゲル細孔内の表面からの吸脱着が遅くなることによるものとわかった。一方、ミオグロビンの等電点である pH 7 よりも大きい pH ではミオグロビンの正味の電荷が負になるため、シリカゲル外部からシリカゲル内部にミオグロビンが入りにくくなることもわかった。これらは細孔内でのヘムタンパク質の挙動を理解するうえで重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigenori Nagatomo, Teizo Kitagawa, Masako Nagai	4. 巻 120
2. 論文標題 Roles of Fe-Histidine bonds in stability of hemoglobin: recognition of protein flexibility by Q Sepharose	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2734-2745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2021.05.014	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 Akihisa Miyagawa, Shigenori Nagatomo, Hiroaki Kazami, Takuto Terada, Kiyoharu Nakatani	4. 巻 37
2. 論文標題 Kinetic Analysis of the Mass Transfer of Zinc Myoglobin in a Single Mesoporous Silica Particle by Confocal Fluorescence Microspectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 12697-12704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.1c02127	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 Shigenori Nagatomo, Masako Nagai, Teizo Kitagawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural origin of cooperativity in human hemoglobin: a view from different roles of α and β subunits in the $\alpha_2\beta_2$ tetramer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 483-498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-022-00945-7	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 Shigenori Nagatomo, Mitsuo Shoji, Takuto Terada, Kiyoharu Nakatani, Yasuteru Shigeta, Shun Hirota, Sachiko Yanagisawa, Minoru Kubo, Teizo Kitagawa, Masako Nagai, Mio Ohki, Sam-Yong Park, Naoya Shibayama	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 Akihisa Miyagawa, Shigenori Nagatomo, Hatsuhi Kuno, Takuto Terada, Kiyoharu Nakatani	4. 巻 39
2. 論文標題 Pore Size Dependence of Mass Transfer of Zinc Myoglobin in Single Mesoporous Silica Particle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 11329-11336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.3c01017	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 Akihisa Miyagawa, Hatsuhi Kuno, Shigenori Nagatomo, Kiyoharu Nakatani	4. 巻 -
2. 論文標題 Evolution of myoglobin diffusion mechanisms: exploring pore and surface diffusion in a single silica particle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-024-00575-x	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shigenori Nagatomo, Teizo Kitagawa, Masako Nagai
2. 発表標題 Separation of tetramer-dimer mixtures mutant hemoglobin by structural flexibility
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田 拓人, 風見 裕明, 宮川 晃尚, 長友 重紀, 中谷 清治
2. 発表標題 単一メソ多孔性シリカゲル微粒子/水系における亜鉛ミオグロビンの細孔内物質移動過程の細孔径依存性
3. 学会等名 第39回溶媒抽出討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長友 重紀
2. 発表標題 細孔内に取りこまれたヒト成人ヘモグロビンの機能発現におけるGHz, THz領域の主鎖のゆらぎの実験的検証
3. 学会等名 2020年度福井大学遠赤外領域開発研究センター共同研究成果報告会
4. 発表年 2021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 久能初陽, 長友 重紀, 宮川 晃尚, 中谷 清治
2. 発表標題 メソポーラスシリカに対するミオグロビンの拡散係数の細孔径および緩衝液濃度依存性
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022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
研究分担者	中谷 清治 (Nakatani Kiyoharu) (00250415)	筑波大学・数理物質系・教授 (12102)	

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
---------	---------