

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570197

研究課題名(和文)ヘモグロビンのアロステリック平衡の実体解明

研究課題名(英文)Elucidation of the true picture of the hemoglobin allosteric equilibrium

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) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の活性調節機構は、ヘモグロビン(Hb)の事例を下敷きにして、T(tense)状態からR(relaxed)状態への2状態転移で説明されてきた。しかし、肝心のHbでは2状態モデル的な理解が定量的に成功していないのが実状である。本研究では、Hbの4次構造変化を許容する過去に例のない結晶を作製し、9個の異なる4次構造とその酸素親和性を同一結晶型中で決定した。今回の結果は、Hbのアロステリック平衡が、今まで知られていなかったTとRの中間的な状態を含む多状態系からなることを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of protein allostery have been attributed to the two-state transition between T (tense) and R (relaxed) states, based largely on the knowledge about hemoglobin (Hb). However, an equilibrium ensemble for solution Hb cannot be adequately described by just these two states. Here we report an unprecedented crystal form in which Hb is free to adopt any allosteric structure, depending on the conditions, and at the same time allows oxygen binding to be monitored directly in the crystal. We identify nine conformations including a new intermediate between T and R. Our findings give a comprehensive picture of the equilibrium conformers and transition pathway for Hb.

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ヘモグロビン アロステリー X線結晶構造解析 酸素平衡曲線 2状態モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質の機能は、目的に合わせて調節される必要があることが多い。環境の変化が蛋白質分子の高次構造を通して活性を大幅に変化させることで実現されている調節法がある。この活性調節のメカニズムについてあまりたくさんのことは分かっていないが、多くの事例に共通のメカニズムがあると考えられている。アロステリック蛋白質と呼ばれるのは、このような蛋白質のことである。現在、アロステリック蛋白質のメカニズムは、その代表格であるヘモグロビンの事例と、Monod-Wyman-Changeux (MWC)の2状態モデル [(1965) *J. Mol. Biol.* 12, 88] を下敷きにして T (tense) 状態と R (relaxed) 状態の2状態平衡で説明される場合が多い。しかし、肝心のヘモグロビンでは2状態モデル的な理解が、定性的にはともかく定量的には成功していない。最も大きな問題は、広範な結晶化条件で得られた脱酸素型ヘモグロビンの結晶構造は全て同じT構造を呈するにもかかわらず、溶液のT状態脱酸素型ヘモグロビンの酸素親和性 (K_T) は pH や Cl^- 濃度などの溶液条件に依存して 40 倍以上も変化することである [Imai K. (1982) *Allosteric Effects in Haemoglobin*. Cambridge Univ. Press] この変化は、自由エネルギーに直すとヘモグロビンの示す全酸素親和性変化の自由エネルギーの約半分に相当するので、T状態の摂動で説明するには無理がある。2状態モデルが抱えるこの問題は、1970年代には既にヘモグロビン研究者の間では知られていたが、30年以上たった今なお未解決のまま残されている。

(2) これまで、上述の K_T の溶液依存性を包含できるように原型の2状態モデルを修正する理論的アプローチはしばしば試みられてきたが、その分子メカニズムの基盤となるアロステリック平衡の実体解明を意図した実験的研究は驚くほど少ない。その中で、以下の二つのアプローチが重要である。

一つは、ヘモグロビン単結晶の酸素平衡曲線の測定である。Mozzarelli ら [(1991) *Nature* 351, 416] は、顕微分光光度計を用いて、ポリエチレングリコール (PEG) で作製した脱酸素型ヘモグロビン (T) 結晶の酸素平衡曲線測定に初めて成功した。これは、結晶構造とその機能を直接関連づける先駆的な研究である。この研究から、T結晶の酸素結合の親和性は非常に低く、協同性はほとんど無いことが示された。更に大事な発見は、T結晶の酸素親和性は pH や Cl^- 濃度によらず一定で、

溶液ヘモグロビンの酸素親和性の下限と完全に一致することである。つまり、酸素親和性最低のアロステリック状態 (T) の構造基盤は、既知のT結晶構造で与えられることがわかった。

もう一つの重要なアプローチは、多孔性シリカゲルに閉じこめたヘモグロビン分子の酸素平衡曲線の測定である。柴山ら [(1995) *J. Mol. Biol.* 251, 203] は、水に溶けたヘモグロビン分子をゾル・ゲル法で多孔性シリカゲルの空孔中に閉じこめ、その構造変化を凍結したまま酸素平衡曲線を測定する新しい手法を開発した。ゲルに閉じこめられた個々のヘモグロビン分子は、事実上構造変化を凍結されたまま非協同的に酸素結合するので、平衡で存在する個々の構造状態の酸素親和性と存在比率を決定できる。この手法を用いた一連の研究の成果は次のようにまとめられる。まず、MWCモデルが前提とするアロステリック平衡の存在、及び、各状態の非協同性の仮定の妥当性がゲルを使った実験から検証された。しかし更に詳しい研究から、脱酸素型ヘモグロビン中には、T結晶に対応する酸素親和性最低のT状態と、TとRの間中間的な親和性を持つ未知のアロステリック状態 (ここではTR状態と呼ぶことにする) が共存することが実験的に示され、状態数2の仮定は修正を迫られている。

(3) 以上の結果を統合すると、ヘモグロビンのアロステリック平衡のおぼろげな描像が見えてくる。ヘモグロビンは、酸素親和性の大幅に異なる最低三つのアロステリック状態 (酸素親和性最低のT状態、酸素親和性最高のR状態、そして、TとRの間中間的な酸素親和性のTR状態) の間の平衡にあり、各状態はプロトンや Cl^- などの非ヘムリガンドに対して異なる結合親和性を持つ。脱酸素型ヘモグロビンは実質的にTとTRの混ざりであるが、Tの方がプロトンや Cl^- の結合親和性が高いため、低 pH または高 Cl^- 濃度の溶液条件ではTが支配的になり酸素親和性は低下する。これが、脱酸素型ヘモグロビンの酸素親和性の溶液依存性の説明となる。しかし、各状態の構造と機能の関係について現時点で確実に言えるのは、結晶のT構造が酸素親和性最低のアロステリック状態 (T) の構造基盤を与えるということだけである。一般には、酸素型ヘモグロビン結晶のR構造が、酸素親和性最高のアロステリック状態 (R) に対応すると予想されているが、その実験的証拠となるR結晶の酸素平衡曲線はまだ報告されて

いない。また、多孔性シリカゲルを用いた機能解析の結果は、TとRの中間的な酸素親和性を持つアロステリック状態(TR)の存在を強く示唆しているが、その構造はまだ謎である。

2. 研究の目的

蛋白質分子の機能を調節している構造変化は、ヘモグロビンの事例を下敷きとしてT状態とR状態の2状態の平衡で説明されることが多い。しかし、肝心のヘモグロビンでは2状態モデル的な理解が定量的に成功していないのが実状である。また、ヘモグロビンの既知の結晶構造と溶液の酸素平衡機能データを組み合わせても、その分子メカニズムの本質に迫れない慢性的な手詰まり状態がここ30年以上も続いている。本研究では、このような閉塞状況を打破するため、平衡状態にある蛋白質分子の構造と機能の関係を調べる新しい結晶学的研究領域を開拓し、ヘモグロビンのアロステリック平衡のリアルな描像を提出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、以下の二つの研究課題に取り組む。一つは、酸素型ヘモグロビン結晶の酸素平衡曲線の測定である。酸素型(または一酸化炭素型)ヘモグロビンは、4次構造の異なるRとR2の二つの結晶構造をとることが知られている[Silva M. M. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17248]。これら二つの構造は、酸素親和性最高のアロステリック状態(R)の構造多形性の反映なのか、あるいは、酸素親和性の異なる独立なアロステリック状態なのか、未だ論争中である。この点をはっきりさせるために、両結晶の酸素平衡曲線を測定し、結果を比較する。本研究では、先ず、現有の顕微分光光度計(Zeiss UMSP 80)、精密ガス混合機(Kofloc GB-4Cに電磁弁を増設し低酸素濃度ガス対応にしたもの)、酸素濃度計(Iijima MC-7G-L galvanic O₂ sensor)を組み合わせたシステムを構築した。また、本研究では、安定なRとR2結晶を得るため、分子表面に一残基変異を持つ異常ヘモグロビンC($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$)を用いた。ヘモグロビンCの特筆すべき特徴は、酸素平衡機能は通常のヘモグロビンAと同じであるが、溶解度が著しく低いおかげで極めて良質の結晶が速やかに得られる点にある。これらの結晶と上記の測定システムを用いてRとR2の酸素平衡曲線を決定する。

(2) 本研究のもう一つの課題は、アロステリック平衡に存在すると予想されるTとRの中間的な酸素親和性を持つアロステリック状態(TR)の結晶構造解析である。TR状態結晶化の最大の難しさは、TRは常に平衡を通してTとRの間を行き来していることにある。このため、仮に溶液中にTRが存在して

も、相対的に結晶化しやすい(溶解度の低い)TまたはRの結晶が優先的に析出してしまう問題がある。最近我々は、この問題に対する新しいアプローチを偶然見つけた。BiswalとVijayan [(2001) *Curr. Sci.* 81, 1100]は、PEGで作製したメトヘモグロビン(3価鉄ヘモグロビン)の結晶は、非対称単位中に4次構造が少しずつ異なる独立な3分子のヘモグロビン(全てRとR2の中間的な4次構造)を内包すると報告している。しかし驚いたことに、我々の行った一酸化炭素(CO)を2個結合した中間状態ヘモグロビンのモデル(金属置換混成ヘモグロビン)を用いた結晶化実験の中から、これと同型結晶で非対称単位中に4次構造の大きく異なる独立な3分子(TとRとR2)を含むものが上と似た結晶化条件で見つかった。つまり、この結晶では、結晶化に用いるヘモグロビンのアロステリック平衡を反映して、それを構成する複数のコンホマーが丸ごと非対称単位中に結晶化する可能性が高いと考えられる。本研究では、この結晶の特性を利用して、TR状態が相対的に安定化する溶液条件の金属置換混成ヘモグロビンを結晶化し構造解析する。更に、得られた結晶が内包する3分子の機能を酸素平衡曲線の測定で直接決定する。

4. 研究成果

(1) ヘモグロビンの二つのリラックス状態(R状態とR2状態)の機能を結晶の酸素平衡曲線から直接決定した[Shibayama, N. *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286, 33661]。実験では、安定なRとR2結晶を得るため、分子表面に一残基変異を持つ異常ヘモグロビンC($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$)を用いた。RとR2の結晶は両者とも酸素結合の親和性は非常に高く、溶液ヘモグロビンの酸素親和性の上限と一致し、協同性はほとんど観測されなかった。これらの観測より、RとR2は酸素親和性の異なる独立なアロステリック状態ではなく、酸素親和性最高のアロステリック状態(R)の構造多形性の反映であることが明らかになった。また、横浜市立大・朴教授との共同で、ヘモグロビンCのR結晶とR2結晶のX線結晶解析をそれぞれ1.4と1.8の高分解能で行い[PDB ID: 3S66 (R)と3S65 (R2)]、対応するヘモグロビンAの結晶構造と一致することを確認した。

(2) 複数のコンホマーから構成されるヘモグロビンの平衡状態を包括的に結晶解析する目的で、平衡に存在する構造の異なる3個のコンホマーを丸ごと結晶非対称単位に取り込むC2結晶を三種類の異なる条件で結晶化した[Shibayama, N. *et al.* (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136, 5097]。具体的には、 $\alpha 1$ サブユニットと $\beta 2$ サブユニットにCOが2個結合したNi(II)-Fe(II)混成ヘモグロビン(リン酸存在下と非存在下の2結晶)と水分子が4個結合したメトヘモグロビン(リン酸存在下の1結

晶)であり、これら三つの同型結晶中に9個のコンホマーが内包されている。

(3) 上述三つの同型結晶のX線構造解析と酸素平衡曲線測定を行った [Shibayama, N. *et al.* (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136, 5097] X線結晶構造解析については、横浜市立大・朴教授との共同で行った。三つの同型結晶を比較すると、リガンドの個数、リン酸イオンの有無に応じたアロステリック平衡の違いを反映し、内包する9個のヘモグロビン分子の4次構造は全て異なっていた。更に詳細な構造比較の結果、9個のコンホマーはTからRを経てR2に到るヘモグロビンの構造空間全域にほぼ連続的に分布しており、教科書に書かれているよりもはるかに多くの状態が平衡で存在することを明らかにした。また、多くの研究グループがこれまで数10年間探し求めていたTとRの中間的な構造と機能を持つ新しいアロステリック状態(今回TRと名付けた)を捕らえることに世界で初めて成功し、ヘモグロビン研究の重要なミッシング・ピースを埋めることができた。

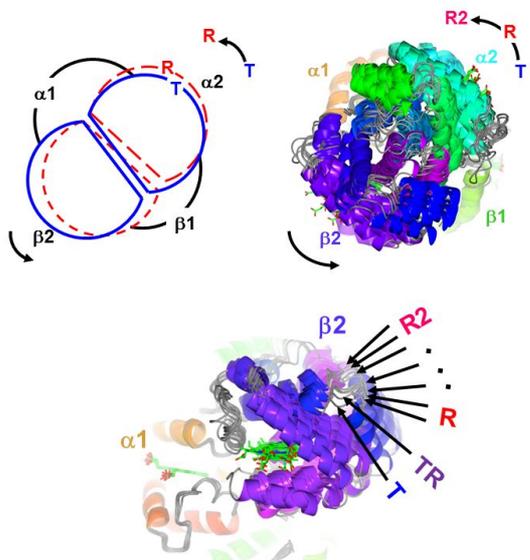


図1: ヒト・ヘモグロビン四量体(等価な二つの二量体 $\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$ が会合した四量体)の教科書的な2状態アロステリック転移の模式図(上左図)と、今回同定された9状態の重ね書き(上右図)。両図とも、各構造の $\alpha_1\beta_1$ 二量体を重ね合わせたときの $\alpha_2\beta_2$ 二量体の回転運動で4次構造変化を表現した。下図は、9状態の α_1 サブユニットに対する β_2 サブユニットの動きの拡大図。

(*JACS* 136:5097–5105, 2014 より引用改変)

(4) 本研究では、 α_1 サブユニットと β_2 サブユニットにCOが2個結合した非対称Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを結晶化に用いたが、四量体中の非等価な2個の二量体($\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$)は区別されずランダムに充填された結晶ができた。このヘモグロビン分子の溶液中での分子対称性を確認する目的で、四量体の対称な部位にある二つのフリー

なシステイン残基(β_1 と β_2 の93番 Cys-SH)のSH試薬に対する反応速度の違いを計測した [Shibayama, N. (2012) *FEBS Letters* 586, 74]。二つの Cys-SH の反応速度は同じオーダーであり、ヘモグロビン分子の非対称な部位のリガンド結合が引き起こす対称性の破れは比較的小さいことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Naoya Shibayama, Kanako Sugiyama, Jeremy R. H. Tame, and Sam-Yong Park, “Capturing the Hemoglobin Allosteric Transition in a Single Crystal Form” *J. Am. Chem. Soc.* (査読有) Vol. 136 (13), 2014, 5097–5105, DOI: 10.1021/ja500380e

Naoya Shibayama, “Symmetry Distortion in the Human Hemoglobin Tetramer Induced by Asymmetric Ligation” *FEBS Letters* (査読有) Vol. 586 (1), 2012, 74–78, DOI: 10.1016/j.febslet.2011.11.027

Naoya Shibayama, Kanako Sugiyama, and Sam-Yong Park, “Structures and Oxygen Affinities of Crystalline Human Hemoglobin C (β_6 Glu→Lys) in the R and R2 Quaternary Structures” *J. Biol. Chem.* (査読有) Vol. 286 (38), 2011, 33661–33668, DOI: 10.1074/jbc.M111.266056

[学会発表](計 3件)

柴山 修哉, 単一結晶形中でのヘモグロビンのアロステリック転移、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月29日、国立京都国際会館

柴山 修哉, 朴 三用, ヘモグロビンのアロステリック平衡のリアルな描像、第50回日本生物物理学会年会、2012年9月24日、名古屋大学・東山キャンパス

柴山 修哉, 2種類のリラックス状態ヘモグロビン結晶の機能比較、第49回日本生物物理学会年会、2011年9月16日、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/news/research/2013/20140327.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

朴 三用 (PARK, Sam-Yong)

横浜市立大学・大学院医科学研究科・教授

研究者番号：20291932