

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870200

研究課題名(和文) 巨大ヘモグロビンにおける協同的酸素結合過程の逐次構造解析

研究課題名(英文) Crystal structure analyses of cooperative oxygen-binding intermediates of giant hemoglobin

研究代表者

沼本 修孝 (Numoto, Nobutaka)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20378582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：無脊椎動物由来巨大ヘモグロビンの酸素結合型結晶より、結晶状態を保ったまま酸素非結合型へ移行させる方法を確認し、その中間状態で反応を停止させたうえでX線結晶構造解析による立体構造決定を行った。巨大ヘモグロビンが酸素結合型から酸素非結合型へと変化していく過程で酸素分子が徐々に解離していく様子を電子密度図から明らかにすることができた。また各サブユニットの三次構造変化が起きやすい部位を同定し、さらにサブユニット間の四次構造変化はすべてのグロビン鎖から酸素分子が解離する直前まで、比較的小さなものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The crystals of the giant hemoglobin (V2Hb) from an invertebrate were transformed from the oxygenated to the deoxygenated state in keeping a crystalline structure. We have performed X-ray crystal structure analyses of various intermediate states between the oxy and deoxy forms of V2Hb. The electron densities of the oxygen molecules at the heme pockets (oxygen binding sites) gradually became very weak or disappeared. The ternary structural changes occur primarily at AB-loop region of some subunits. The quaternary rearrangement of V2Hb might arise just before a complete dissociation of all the oxygen molecules from all the subunits.

研究分野：構造生物化学

キーワード：ヘモグロビン 協同性 構造変化 X線結晶構造解析 中間体

1. 研究開始当初の背景

ある種の無脊椎動物の血液中においては、ヒトのヘモグロビンの数倍から数十倍におよぶ巨大分子量のヘモグロビンの存在が知られており、その分子構造に興味もたれていた。われわれは 2005 年にマシコヒゲムシ由来巨大ヘモグロビンの結晶構造解析に成功 (Numoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14521-14526, 2005) し、ヒトヘモグロビンの約 6 倍の分子量をもち、全く異なる分子構造をしていることを初めて明らかにした (図 1)。その後も解析分解能を向上させつつ (Numoto *et al.*, *Proteins*, **73**, 113-125, 2008)、酸素結合時の協同的な構造変化モデルの一部を提唱するに至っている (Numoto *et al.*, *Biochemistry*, **47**, 11231-11238, 2008)。しかしながら巨大ヘモグロビンは酸素親和性が非常に高く、完全な酸素非結合型 (deoxy 型) を調製することが難しかったため、海外のグループにより同時期に解析された類似の巨大ヘモグロビンも含め、完全な deoxy 型での構造解析がなされていなかった。

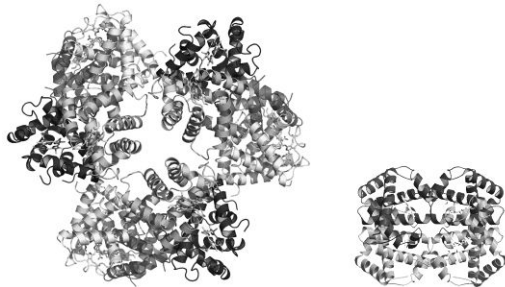


図 1. 巨大ヘモグロビン(左)とヒトヘモグロビン(右)。

われわれはごく最近、巨大ヘモグロビンの酸素結合型 (oxy 型) 結晶から、結晶の状態を保ったまま deoxy 型へと変化させることに成功し、ついに完全な deoxy 型での結晶構造解析を実現した (Numoto *et al.*, *Acta Crystallogr. D*, **70**, 1823-1831, 2014)。このように結晶の状態のまま酸素結合状態を変化させることができるようになったことにより、適当な条件を設定することで、すべてのサブユニットに酸素が結合した oxy 型から、すべてのサブユニットの酸素が解離した deoxy 型に至るまでの中間状態を、各段階ごとに自由に作り出すことが出来るものと期待される。すなわち、酸素結合/解離に伴って巨大ヘモグロビン分子の構造が変化していく過程における、種々の中間状態を逐次的に結晶構造解析できるものと考えられる。このような oxy-deoxy 間の中間状態での構造解析は、いかなるヘモグロビン分子においても現在まで全く実現されていなかったことであり、ヘモグロビンが協同的に酸素を結合/解離する際の構造変化の過程を詳細に解明するうえで、非常に大きな進展をもたらすものである。

2. 研究の目的

本研究では無脊椎動物由来巨大ヘモグロビンについて、酸素結合から解離までの様々な中間過程について、それぞれ X 線結晶構造解析により構造決定する。得られた分子構造を比較解析し、巨大ヘモグロビンが分子構造を協同的に変化させていく様子を詳細にモデル化する。

3. 研究の方法

サツマハオリムシ由来 V2 ヘモグロビンは酸素親和性が非常に高く、特別な操作なく oxy 型を保持したまま精製および結晶化が可能である。またこれまでに、V2 ヘモグロビンの oxy 型結晶に対し、結晶化に必要な沈殿剤であるポリエチレングリコールの濃度を漸進的に上昇させつつ、dithionite を加えた溶液に浸漬させることで、結晶を破壊することなく deoxy 型へと変化させ得ることを見いだしている (図 2)。この際の溶液の濃度や浸漬時間を変化させ、目的とする様々な中間状態を実現する条件を検討した。目的の中間状態へ移行した結晶は、直ちに液体窒素や極低温の窒素気流にて瞬間的に凍結させることで、中間状態を保持したまま保存し、放射光施設にて X 線結晶構造解析を行った。得られた種々の中間状態の分子構造を比較し、協同的な構造変化の過程を調べた。

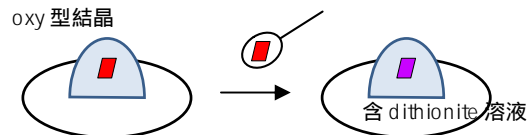


図 2. 浸漬法による oxy 型 V2 ヘモグロビンの deoxy 型への移行。

4. 研究成果

サツマハオリムシ由来 V2 ヘモグロビンの oxy 型結晶を作成し、oxy 型結晶の dithionite 溶液への浸漬時間を変化させ、それぞれについて X 線結晶構造解析を行った。浸漬時間はそれぞれ 3 秒、5 秒とごく短時間のもの、または 10 秒より 120 秒までおよそ 10 秒ごとに設定し、それぞれの時間で複数の結晶において行った。この結果、浸漬時間が 5 秒未満では多くの場合、結晶の色に変化が見られず oxy 型を保っていたが、10 秒以上の場合、oxy 型の鮮紅色から deoxy 型の黒紫色へと変化がみられた。

浸漬後の結晶はそれぞれ即座に窒素気流中で凍結して保存し、放射光施設にて X 線回折実験を行った。構造解析の結果、10 秒以上の浸漬時間とした結晶では、数カ所のサブユニットでヘムポケットにおける酸素の電子密度が弱いか、ほとんどなくなっていた。また、概して浸漬時間が長いほど酸素の電子密度が消失しているサブユニットの数が多くなり、90-120 秒以上の浸漬時間ではほぼすべてのサブユニットから酸素が解離していることが確認された (図 3)。

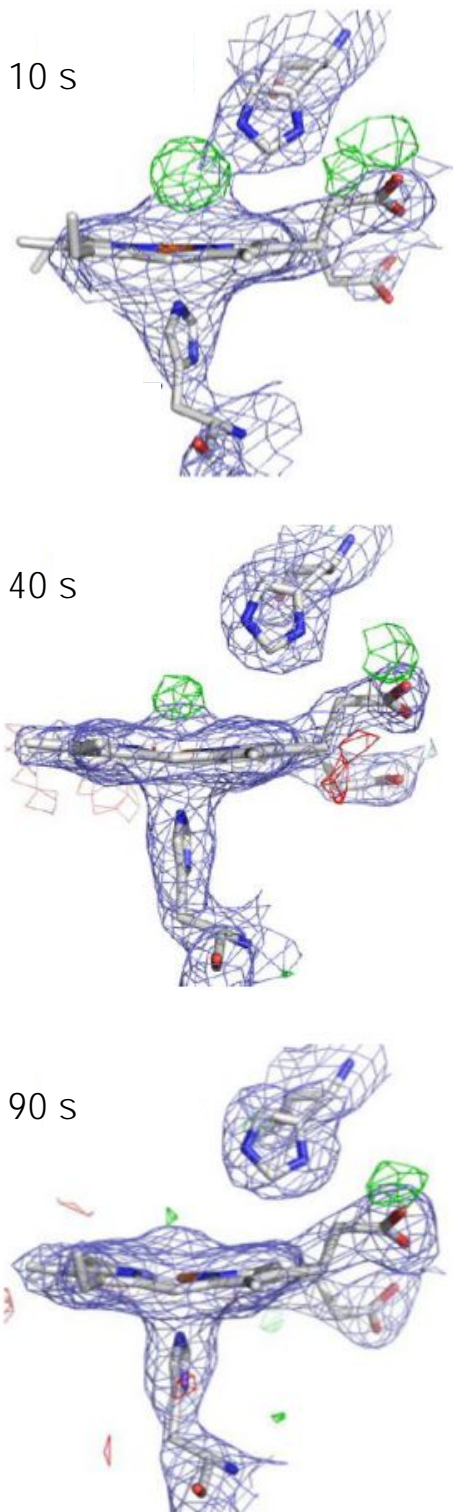


図3 .oxy 型 V2 ヘモグロビンの deoxy 型への移行過程。浸漬時間が長くなるほど、酸素分子の電子密度が消失していく。

一方、構造の変化に着目すると、deoxy 型への移行の初期段階で、A ヘリックスと B ヘリックスの間のループ部位周辺でわずかな構造変化がみられた。この領域は、oxy 型と deoxy 型で構造変化が顕著であった部位であり、最も構造変化の起こりやすい領域であることが示唆される (図 4)。

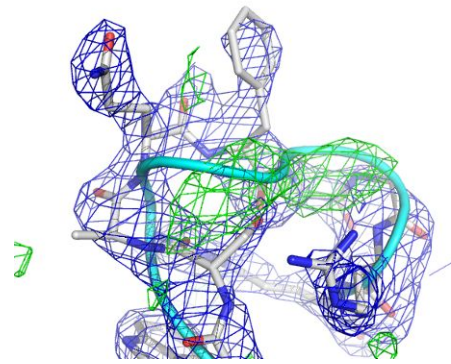


図 4 .AB loop 領域での構造変化。構造精密化を oxy 型として行った場合、deoxy 型に相当する残余の電子密度 (緑) が存在した。

さらに V2 ヘモグロビン分子全体での四次構造変化に着目すると、本研究で得られた各種の oxy-deoxy 中間状態のうち、酸素分子の解離している割合が少ない結晶では、四次構造はいずれも oxy 型に非常に近いものであることがわかり、すべてのグロビン鎖から酸素分子が解離する直前まで、oxy 型の四次構造を取りやすいことが示された。

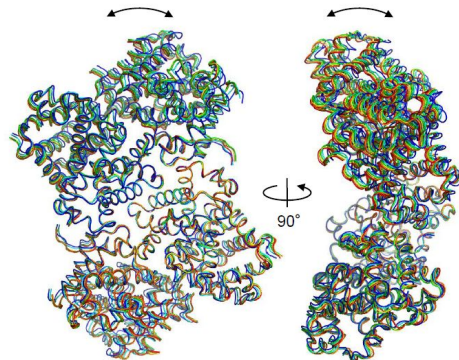


図 5 . V2 ヘモグロビンの oxy-deoxy 間四次構造変化。

また本研究で作製した結晶について、顕微分光法による結晶の吸収スペクトル測定を行った。本研究の手法により得られた結晶が oxy-deoxy 中間状態に相当するスペクトルを示すことを確認し、X 線結晶構造解析による電子密度から結論された oxy-deoxy 中間状態と矛盾しないことを確かめた (図 6)。

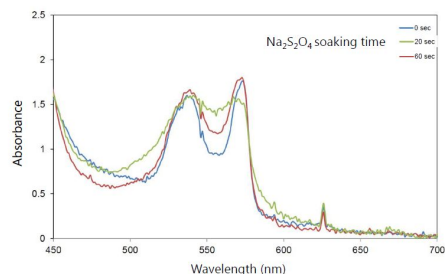


図 6 . oxy-deoxy 中間結晶の可視吸収スペクトル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Numoto N., Nakagawa T., Ohara R., Hasegawa T., Kita A., Yoshida T., Maruyama T., Imai K., Fukumori Y., Miki K. The structure of a deoxygenated 400 kDa haemoglobin reveals ternary- and quaternary-structural changes of giant haemoglobins. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 70, 1823–1831, 2014. 査読有 DOI: 10.1107/S1399004714008475.

〔学会発表〕(計6件)

沼本修孝, ヘモグロビン分子の多様性 -巨大ヘモグロビンの構造と協同性機構-, 宮崎大学テニユアトラック推進機構医学系物質科学分野セミナー, 2015年3月23日, 宮崎大学(宮崎).

沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素解離に伴う構造変化, 日本結晶学会 2014 年度年会, PC-031, 2014 年 11 月 1-3 日, 東京大学(東京).

- ③ 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン結晶内での oxy 型から deoxy 型への移行, 第 52 回日本生物物理学会年会, 1P036, 2014 年 9 月 25 日, 札幌コンベンションセンター(北海道).

Numoto N., Nakagawa T., Kita A., Ito N., Fukumori Y., Miki K. Partial oxygen-dissociation of crystalline giant hemoglobin, XXIII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, MS29.P42, August 6-7, 2014, Palais des congrès de Montréal, Montreal (Canada).

沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン結晶内における酸素解離過程, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 3P-002, 2014 年 6 月 27 日, ワークピア横浜(神奈川).

沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合状態の操作, 日本結晶学会 2013 年度年会, 13-P1C-10, 2013 年 10 月 12-13 日, 熊本大学(熊本).

6. 研究組織

(1)研究代表者

沼本 修孝 (NUMOTO, Nobutaka)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号: 20378582