

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07326

研究課題名(和文) 働く最中のヘモグロビン分子内動態の原子レベル追跡

研究課題名(英文) Direct observation of ligand and protein dynamics within hemoglobin at work

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヘモグロビンは血液中の酸素運搬蛋白質であり、肺で受け取った酸素を全身の細胞に届ける役割を担っている。ヘモグロビンは、世界で初めて原子レベルの立体構造が決定された蛋白質の一つとして有名であるが、酸素などのガス分子がその結合部位であるヘム鉄から外部溶液へ出ていくまでの道筋やそれを後押しする蛋白質の動きは今まで知られていない。今回我々は、独自のヘモグロビン調製・結晶化技術と低温X線結晶解析法およびレーザー光解離法を組み合わせ、ヒトのヘモグロビンから切り離された後のガス分子の動きとそれを後押しする蛋白質の動きを原子レベルで追跡することに世界で初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト・ヘモグロビンはアロステリック蛋白質の代表格として教科書にも載っており、そのガス配位子結合調節能はよく研究されている。しかし、酸素などのガス分子の通る道筋は結晶構造に見当たらず、ガス分子が蛋白質分子のどこをどのように移動していくのかは謎のまま。今回の研究成果は、赤血球中のヘモグロビンが酸素を迅速に受け渡す仕組みの理解につながると期待される。特に、ヘモグロビンが酸素濃度の低い末梢組織にやってきたとき、T状態特有のタンパク質分子内運動を使って酸素を迅速かつ巧妙に外部へ送り出すことを実験的に明らかにした。この発見は、生理学的にも、生物物理学的にも極めて重要な意味がある。

研究成果の概要(英文)：Hemoglobin is one of the best characterized proteins with respect to structure and function, but the internal ligand diffusion pathways remain obscure and controversial. Here, we capture the CO migration processes in human hemoglobin by crystallography using a high-repetition pulsed laser technique at cryogenic temperatures. We find that the photodissociated CO molecules migrate along different pathways in the α and β subunit by hopping between the internal cavities with correlated side-chain motions of large nonpolar residues. Our results provide a comprehensive picture of ligand movements in hemoglobin, and highlight the relevance of cavities, nonpolar residues, and distal histidines in facilitating the ligand migration.

研究分野：生物物理学

キーワード：ヘモグロビン ダイナミクス X線結晶構造解析 光解離 アロステリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

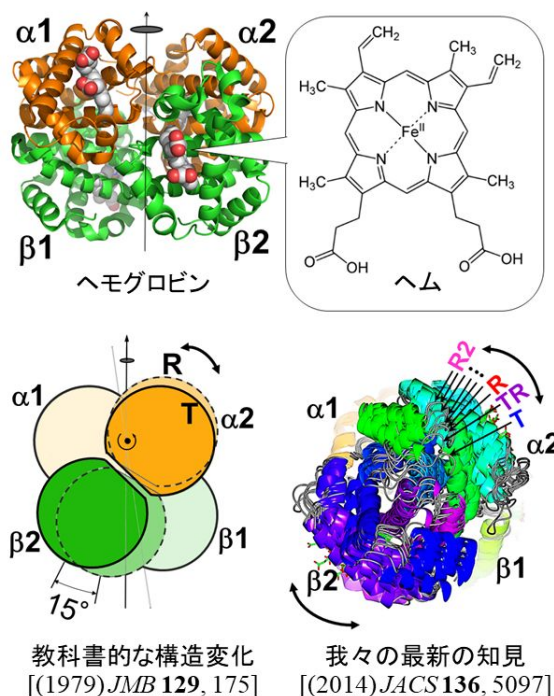
ヘモグロビン $\alpha_2\beta_2$ 型の四量体である(右図上)。各サブユニットにはヘムを持ち、ヘム中心金属 Fe(II)の第6配位座に O₂、CO 等のガス配位子を脱着する仕組みになっている。ヘモグロビンは分子全体の構造を変化させて、4個の O₂ 結合間の正の協同作用や、別の部位に結合する水素イオン、有機リン酸、CO₂ との負の調節作用を実現している。ヘモグロビンの諸性質は、Perutz [(1970) *Nature* 228, 726] が X 線結晶構造解析で明らかにした O₂ の結合していないデオキシ T (tense) 構造と O₂ の4個結合したオキシ R (relaxed) 構造との比較から説明されることが多い。しかし、その構造変化の過程を詳細に原子レベルで追跡した例は無く、O₂ 結合を精密に制御するメカニズムについては未だ不明な点が多い。特に以下の二つの大きな問題が残されている。

まず、結晶構造中のヘムは蛋白質部分に埋もれており、O₂ が外部からヘム鉄まで移動する隙間、すなわち通り道が存在しないことである。これは、O₂ の移動は蛋白質の変形運動と連動していることを意味する。Anfinrud らのグループは、CO 結合型ミオグロビン(ヘモグロビンのサブユニットと似た構造の単量体)結晶を用いた光解離中間体の X 線解析を室温で行い、光解離した配位子 CO の分子内移動を観測している [(2003) *Science* 300, 1994]。ヘモグロビンよりも配位子再結合速度が遅いミオグロビンを用い、かつ、O₂ よりも光解離収率の高い CO を用いたことが実験成功の鍵と考えられる。実際、同グループが最近行った CO 結合型ヘモグロビンを対象とした同様の室温実験では、CO 再結合速度が速いため光解離状態が保持できず、CO はヘム近傍にとどまり蛋白質の構造変化もほとんど観測されなかった [(2013) *Chem. Phys.* 422, 98]。第二の問題は、協同作用を生み出すヘムからヘムへの蛋白質分子内部運動の伝播動態・経路は、T と R の構造比較からはわからないことである。最近 Karplus らが行った T と R を結ぶ最小エネルギー経路の計算では、ヘモグロビンの四次構造変化は教科書的な $\alpha\beta$ 二量体同士の単純な回転運動(図左下)ではなく、二量体内の歪運動を含む2段階の回転運動であることが示唆されている [(2011) *PNAS* 108, 5608]。また最近、研究代表者の柴山らは「四次構造変化を許容する単結晶」を用いた X 線構造解析を行い、ヘモグロビンの四次構造変化は T と R の間の2状態転移(図左下)ではなく、実際は多状態の間を行き来する複雑な過程(図右下)であることを、単一結晶型中の9種類の異なる四次構造を解くことで実験的に証明した [(2014) *JACS* 136, 5097]。これらの最新の知見は、ヘモグロビンの配位子結合と連動するアロステリックな構造変化がこれまで考えられていたよりもはるかに複雑な過程であることを示している。しかしその一方で、構造変化の中間的状态(安定または準安定な状態)の数が予想外に多い事実は、時分割単結晶 X 線構造解析で構造変化している最中のヘモグロビン分子の姿をコマ送りのように捉えられる可能性が高いことを示唆している。これが、本研究の着想に至った理由である。

本研究の遂行は、研究代表者の柴山のヘモグロビン研究の実績と経験を基礎にして行われる。柴山らは、2003年に T と R の両方の CO 結合型ヘモグロビン単結晶の光解離実験を 25K の極低温で行い CO の光解離に成功した実績がある [(2003) *PNAS* 100, 7039]。しかしながら、極低温下では、解離した CO はヘム近傍にとどまり、蛋白質の運動も凍結されアロステリックな構造変化は観測されなかった。これまでに報告されているヘモグロビン結晶の光解離実験は、この研究と先に述べた Anfinrud らの室温実験 [(2013) *Chem. Phys.* 422, 98] の二つのみで、CO の移動も蛋白質のアロステリックな動きも観測されていない。本研究では、最近、ミオグロビン結晶の光解離実験でその有効性が示された 100-140K での高繰り返しパルスレーザー照射法 [(2009) *PNAS* 106, 2612] をヘモグロビン結晶に適用し、アロステリックな構造変化の直接観測を目指す。

2. 研究の目的

近年の X 線結晶学の進歩により、蛋白質の立体構造決定に要する時間と労力は大幅に軽減されるようになった。しかし、蛋白質が働くメカニズムを理解する上で重要な「働く最中の蛋白質の動作」は結晶構造からは直接知ることができない。古くから結晶構造解析が行われているヘモグロビンの場合でも、その機能発現に深く関わる「O₂ の蛋白質内移動動態」や「協同作用を生み出す蛋白質内部運動の伝播動態」は結晶構造から読み取ることができない。本研究では、研究代表者の柴山が開発してきた独自のヘモグロビン分子の調製法と結晶化技術に、高繰り返し光解離法と低温捕捉 X 線解析法を組み合わせ、これらの運動を直接観察すると共に、今後さらに重要度が増すと考えられる原子レベルでの蛋白質動態解析のモデルケースとする。



3. 研究の方法

(1) T 状態 CO 結合型ヒト・ヘモグロビン結晶

通常の T 状態デオキシヘモグロビン結晶に CO が 4 個結合すると四次構造変化が起こり結晶は壊れてしまう。熱力学的に不安定な T 状態 CO 結合型ヘモグロビンの結晶を作製するためには以下の二つの工夫が必要である。一つは金属置換混成ヘモグロビンの利用である。ヘモグロビンの α 鎖あるいは β 鎖いずれか一方のサブユニットの Fe(II)ヘムのみを O_2 や CO と結合しない Ni(II)ヘムに置き換えた 2 種類の金属置換混成ヘモグロビンを用いて、CO が 2 個だけ結合した安定な T 状態を実現する ($[\alpha(\text{Fe-CO})\beta(\text{Ni})]_2$ と $[\alpha(\text{Ni})\beta(\text{Fe-CO})]_2$)。デオキシ Fe(II)ヘムのモデルとしての Ni(II)ヘムの妥当性は過去の柴山らの研究から十分検討されている [(1986) *JMB* 192, 330]。もう一つの工夫は分子内架橋である。ヘモグロビンには四量体二量体平衡 $[\alpha\beta]_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ があり、 $\alpha\beta$ 二量体への解離は結晶性を低下させる要因の一つと考えられている [McPherson A. (1985) *Meth. Enzymol.* 114, 112]。そこで、分子内の 2 個の Lys82 β の間をフマル基架橋 (XL と略記) した両混成ヘモグロビン ($\text{XL}[\alpha(\text{Fe-CO})\beta(\text{Ni})]_2$ と $\text{XL}[\alpha(\text{Ni})\beta(\text{Fe-CO})]_2$) を結晶化に用いる。両試料から光解離実験に適した光学的に薄く、かつ、回折強度に優れた同型の平板形 T 状態結晶を得ることができる [(2003) *PNAS* 100, 7039]。また、ここで使用している分子内架橋はヘモグロビンの O_2 親和性及び協同性にほとんど影響を与えないことが柴山らにより確認されている [(1991) *Biochemistry* 30, 8158]。今回、厚さ約 20 μm の両混成ヘモグロビンの結晶を用いて、レーザー照射有り無しで、ともに 1.40-1.45 \AA 分解能のデータセットを集めることができた。今回更に、レーザー照射が結晶に与える CO 光解離以外の影響 (例えば、ヘムの一過的な温度上昇による周囲の水分子の移動など) を評価する目的で、CO 脱着のない完全 Ni(II)置換ヘモグロビン ($\text{XL}[\alpha(\text{Ni})\beta(\text{Ni})]_2$) の同型 T 状態結晶を用いたネガティブコントロール実験も行った。厚さ約 20 μm の結晶を用いて、レーザー照射有り無しで、ともに 1.40 \AA 分解能のデータセットを集めることができた。

(2) R 状態 CO 結合型ヒト・ヘモグロビン結晶

R 状態 CO 結合型ヒト・ヘモグロビンの結晶は、通常の CO 結合型ヘモグロビン溶液から比較的簡単に結晶化できる。しかしながら、結晶の形状がコロコロした 8 面体なのでどの方向からも光解離用のレーザーが通りにくい問題がある。今回、光解離測定に適した平板結晶を得る目的で、蒸気圧を保ちつつ結晶化溶液を薄く広げ、厚さを制限したパッチ法を行い、通常 8 面体の R 状態 CO 結合型ヘモグロビン結晶の形状を平板形に変えることに成功した [(2017) *Crystals* 7, 282]。厚さ約 20 μm の結晶を用いて、レーザー照射有り無しで、ともに 1.45-1.60 \AA 分解能のデータセットを集めた。

(3) R2 状態 CO 結合型ヒト・ヘモグロビン結晶

「研究開始当初の背景」のところの図で示したように、ヘモグロビンのリラックス状態は複数のコンホメーションのアンサンブルと考えられている。結晶学的には、R 結晶構造からさらに $\alpha\beta$ 二量体同士が回転した R2 結晶構造の存在が知られており、現在、これら二つの結晶構造がリラックス状態の両端の構造と考えられている。そこで、R2 状態 CO 結合型ヒト・ヘモグロビン結晶についても、上の R 状態 CO 結合型ヒト・ヘモグロビン結晶と同様の実験を行った。厚さ約 20 μm の結晶を用いて、レーザー照射有り無しで、ともに 1.60-1.70 \AA 分解能のデータセットを集めた。

(4) 実験室系での光解離実験

設備備品として購入した波長 532 nm、パルス幅 1.2 ns の Nd:YAG パルスレーザー (FDSS532-Q2, CryLas, Berlin) と現有の顕微分光光度計を組み合わせた実験室系でのヘモグロビン結晶の光解離収率測定システムを立ち上げ、レーザー強度、パルス周波数、温度の最適値を決めた。光解離の収率 (配位子非結合型の割合) は、可視吸収スペクトルから決定した。結晶中ヘモグロビンの配位子の光解離収率を向上させ中間の状態の相対的な安定化を図る目的で、ミオグロビン結晶でその有効性が示された低温高繰り返しパルスレーザー照射法 [(2009) *PNAS* 106, 2612] を上記ヘモグロビン結晶に適用した。ヘモグロビン結晶に対する最適条件は、レーザー強度 47 mWmm⁻²、パルス周波数 10 kHz、温度 95-140K であった。これらの条件を厚さ約 20 μm の上記ヘモグロビン結晶に用いると、T 状態 CO 結合型結晶では、ほぼ完全な光解離が達成できた。一方、R と R2 状態の CO 結合型結晶の光解離収率は 30-40% であった。

低温高繰り返しパルスレーザー照射法の利点は以下の通りである。高繰り返しパルスレーザーは、時間平均強度の等しい連続レーザーと比較して、尖頭強度が高く、正味の照射時間が短い。そのため、蛋白質の構造変化が凍結される 95-140K で高繰り返しパルスレーザーを照射すると、平均温度は低いので蛋白質の構造変化が凍結されている時間が支配的となるが、パルス尖頭が来たとき温度が一過的に上昇し、構造変化がその一瞬だけ許容される。これにより、蛋白質の構造変化の進行は格段に遅くなり、構造変化を通常の単色 X 線回折法で高精度にスローモーション観測することができる。

(5) 放射光での光解離実験

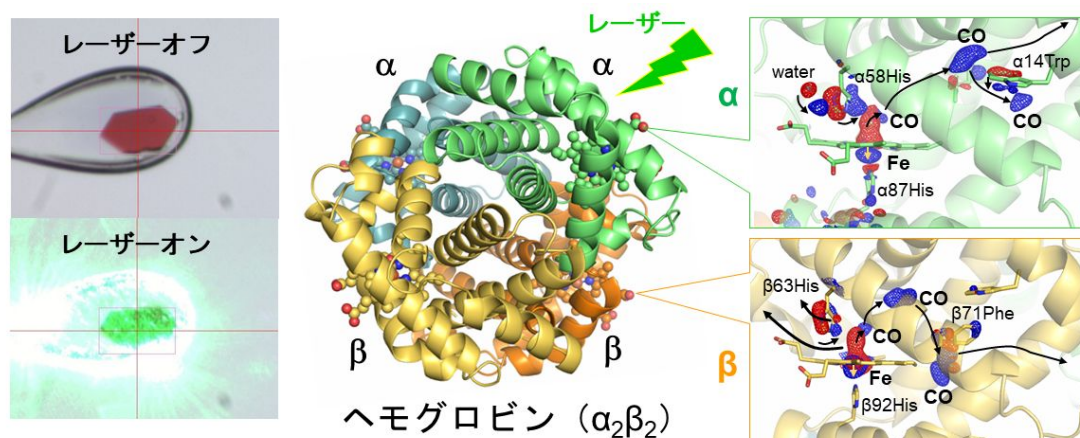
上で確立した光解離条件に従い、KEK PF 放射光施設 (AR NW-12A) で光解離有り無しの X 線回折実験を行った。差フーリエにより、光解離した CO の電子密度を時間追跡し、ヘム鉄から蛋白質外部に至る移動経路と、CO を送り出す蛋白質部分の動きを同定した。これらの実験から、 α/β サブユニットの比較、および、四次構造の比較を行った。また、CO 光解離後の構造変化が蛋白質分子内部を伝搬していく様子を時間追跡した。構造変化の評価には、全ての主鎖 C α 原子間距

離の変動を一括表示できる Difference Distance Matrix Plot (DDMP)を用いた。

4. 研究成果

今回、我々は、酸素 (O_2) と同等の性質を持つ一酸化炭素 (CO) の結合したヒトのヘモグロビンの結晶をガスの付きやすい R 状態と付きにくい T 状態の両方で作製し、光解離後の CO が各サブユニット内を移動する様子を低温下の X 線結晶解析法で直接観察した (下図左)。R 状態については、二つのリラックス構造 (R 構造と R2 構造) について別々に実験を行い比較した。レーザー照射の有無、照射時間 (2 分と 60 分)、温度 (95 K と 140 K)、ネガティブコントロール (CO 脱着の起こらないヘモグロビン試料の結晶でレーザー照射の影響を見る実験) などの条件を網羅するため、T、R と R2 について、それぞれ、6 セットずつの結晶構造解析を行い、合計 18 構造の精密化を行い Protein Data Bank に登録した (PDB ID codes: 6KA9, 6KAE, 6KAH, 6KAI, 6KAO, 6KAP, 6KAQ, 6KAR, 6KAS, 6KAT, 6KAU, 6KAV, 6L5V, 6L5W, 6L5X, 6L5Y, 6LCW, 6LCX)。これら 18 構造の比較から、以下の成果を得た。まず、 α サブユニットと β サブユニットの見かけの立体構造はよく似ているが、その運動部位は著しく異なり CO の通る道筋も異なることがわかった (下図右)。CO の移動を後押しする $\alpha 14\text{Trp}(A12)$, $\alpha 105\text{Leu}(G12)$, $\beta 15\text{Trp}(A12)$, $\beta 71\text{Phe}(E15)$ などの疎水性アミノ酸側鎖の動きと、遠位ヒスチジン ($\alpha 58/\beta 63\text{His}(E7)$) 側鎖の回転運動 (swing-out motion) が観測された。また、T、R、R2 状態中のガスの道筋は似ているが、その“通りやすさ”は大きく異なることがわかった。T 状態の両サブユニットでは、一般にガス分子のタンパク質内外への出入りが凍結されると考えられている 95K (- 178°C) の低温下においても、ヘモグロビン分子を構成するアミノ酸残基側鎖の協調的な運動でガス分子を能動的にサブユニット外へ送り出していることが明らかになった。このような活発な分子運動は、95K の R、R2 状態ではみられなかった。この発見は、ヘモグロビンが酸素濃度の低い末梢組織で T 状態に変化し、酸素をより迅速に外部へ供給する“仕掛け”を持っていることを示唆しており、生理学的にも、生物物理学的にも極めて重要な意味がある。

最後に、2020 年 2 月に米国科学アカデミー紀要に掲載された本研究の主要な研究成果 [(2020) PNAS 117, 4741] については、横浜市立大学と共同でプレスリリースを行うと共に自治医科大学ホームページにその成果を公開し、国民全体に積極的に発信した。



COの結合したヘモグロビン結晶 (T状態) のレーザー光解離とCO移動経路

(左) 結晶の外観 (温度は95 K) 上: レーザー照射前 下: 532nm 緑色パルスレーザー照射時

(中) リボンモデルで表現したヘモグロビン四量体

(右) 光解離後のCOの動き 上: α サブユニット 下: β サブユニット

赤、青は、レーザー照射後に電子密度がそれぞれ減少、増加した領域を表す。この情報からCOの動きを追跡できる。特にT状態では、COのサブユニット外部への放出も観察された。

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 4件）

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Shibayama Naoya, Ohki Mio, Tame Jeremy R. H., Park Sam-Yong | 4. 巻 292 |
| 2. 論文標題 Direct observation of conformational population shifts in crystalline human hemoglobin | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 18258 ~ 18269 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.781146 | 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 Ayana Sato-Tomita, Naoya Shibayama | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Size and Shape Controlled Crystallization of Hemoglobin for Advanced Crystallography | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Crystals | 6. 最初と最後の頁 282 ~ 282 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cryst7090282 | 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 - |
| 1. 著者名 Ohki Mio, Sato-Tomita Ayana, Matsunaga Shigeru, Iseki Mineo, Tame Jeremy R. H., Shibayama Naoya, Park Sam-Yong | 4. 巻 114 |
| 2. 論文標題 Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 8562 ~ 8567 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1704391114 | 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 - |
| 1. 著者名 Shibayama Naoya, Sato-Tomita Ayana, Ohki Mio, Ichianagi 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 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Shibayama Naoya | 4. 巻 1864 |
| 2. 論文標題 Allosteric transitions in hemoglobin revisited | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects | 6. 最初と最後の頁 129335 ~ 129335 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.03.021 | 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 Yun Ji-Hye, Ohki Mio, Park Jae-Hyun, Ishimoto Naito, Sato-Tomita Ayana, Lee Wonbin, Jin Zeyu, Tame Jeremy R. H., Shibayama Naoya, Park Sam-Yong, Lee Weontae | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Pumping mechanism of NM-R3, a light-driven bacterial chloride importer in the rhodopsin family | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 eaay2042 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay2042 | 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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 柴山 修哉 |
| 2. 発表標題 Comprehensive structural and functional analysis of hemoglobin in single crystals |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第56回年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naoya Shibayama, Ayana Sato, Mio Ohki, Sam-Yong Park |
| 2. 発表標題 Deciphering protein allosteric mechanisms from small structural changes in crystals |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第55回年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naoya Shibayama, Mio Ohki, Sam-Yong Park |
| 2. 発表標題 Direct observation of large-scale quaternary motions of hemoglobin in a crystalline state |
| 3. 学会等名 日本生物物理学会第54回年会 |
| 4. 発表年 2016年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>2020年2月17日 自治医科大学、横浜市立大学プレスリリース https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2019/dr3e6400000tysk-att/pressYCU5_final.pdf</p> <p>自治医科大学ホームページ・ニュース&トピックス・研究情報 https://www.jichi.ac.jp/news/research/2019/20200221.html</p> |
|--|

| | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|
| 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 |