

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

課題番号：19579002

研究課題名（和文）人工変異体を用いたヘモグロビンの引き金説の検証および酸素運搬分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Oxygen carrying mechanism of hemoglobin: verification of trigger model by using proximal cavity mutant hemoglobin

研究代表者

安藝 弥生（AKI YAYOI）

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：00452110

研究代表者の専門分野：タンパク質科学

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、酸素運搬機能、高次構造変化、引き金説

1. 研究計画の概要

ヘモグロビン（Hb）は肺から末梢組織へ酸素分子を運搬するタンパク質である。Hb は、 α 鎖2本と β 鎖2本からなる4量体であり、各ポリペプチド鎖は活性中心であるヘムを1つ含んでいる。Hbの酸素運搬機能は、血中の酸素濃度に応じてその四次構造を酸素親和性の高いR型または酸素親和性の低いT型に変えることによって実現すると考えられ、定説となっている。この定説において、四次構造変化のきっかけ（引き金）は、酸素分子がヘム鉄に結合したことでヘム鉄の位置が変わり、それに伴って、ヘム鉄と共有結合している近位Hisの位置が変化することではないかとされている（「引き金説」）が、未だ推測の域を出ていない。

本研究は、ヘム鉄-近位His間の結合を切断した人工変異体を適用して「引き金説」の直接検証を行うことで、酸素運搬機能を司る真の構造変化を解明し、定説の真偽に決着を付けることを目指す。

2. 研究の進捗状況

Hbの引き金説の検証は、 α 鎖または β 鎖の近位HisをGlyに置換することによって、ヘム鉄

近位His間の結合を切断した人工変異体、Proximal cavity mutant Hb (PCMH)を合成し、

その機能と構造変化を解析することにより行っている。PCMHを大腸菌で発現させるために、wild Hbの遺伝子が組込まれたプラスミド、pHE7を鋳型にして、近位Hisのコドン（CAC）をGlyのコドン（GGC）に置換したプラスミドをPCRにより合成した。そのプラスミドで大腸菌を形質転換し、PCMH（ α 鎖近位His Gly）と（ β 鎖近位His Gly）を発現させることに成功した。PCMHは、LysozymeとDNase I処理を経て大腸菌から抽出後、イミダゾール存在下でイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。

PCMHの酸素運搬機能は今井式酸素平衡曲線記録装置により、構造変化を円二色性分光法で調べた。その結果、 α 鎖のヘム鉄近位His間結合がないと、酸素親和性は異常 α 鎖では高くなり、正常 β 鎖では低くなることを突き止めた。また、四次構造はT型に近い構造のままほとんど変化しないことを示した。一方、 β 鎖のヘム鉄近位His間結合がないと、正常 α 鎖と異常 β 鎖の酸素親和性はともに上昇するが、協同性は失われないことから四次構造変化は不完全ながら起こっていると推察した。

Hb M（天然変異体で4種類ある）は、 α 鎖または β 鎖の近位あるいは遠位HisがTyrに変異していて、いずれも異常鎖にはヘム鉄

近位 His 間結合がない。Hb M の構造変化を共鳴ラマン分光法により解析し、機能との関係を調べて引き金説を検証したところ、 α 鎖のヘム鉄 近位 His 間結合がないと、四次構造は T 型になり酸素親和性が低下するが、 β 鎖のヘム鉄 近位 His 間結合がなくても四次構造や酸素親和性にそれほど影響しないことを解明した。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

(理由)

大腸菌で発現した PCMH は大腸菌から抽出後、ヘム鉄 近位 His 間結合を切断したことによってヘムが Hb から脱落するのを防ぐために、イミダゾール存在下でイオン交換クロマトグラフィー(条件の異なる 2 種類の Q Sepharose fast flow と 1 種類の SP Sepharose fast flow)により精製した。しかし、イミダゾールそのものに強い緩衝効果があるためイオン交換クロマトグラフィーの挙動が予測不可能で非常に難航し、精製条件の検討に時間がかかり、PCMH を用いた研究は当初の予定より少し遅れている。しかし、PCMH による研究と同時進行で Hb M を用いた引き金説の検証を行った。Hb M では異常鎖においてヘム鉄 近位 His 間結合はないが、その代わりに置換した Tyr がヘム鉄に配位しているため、PCMH とは全く同じではないが、PCMH による研究をサポートする結果を出すのに成功し、引き金説の検証は概ね順調に進んでいると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

平成 21 年度までは生理条件下での PCMH (α 鎖近位 His Gly)と(β 鎖近位 His Gly)の酸素運搬機能と構造変化の解析を行った。今後はこれらの解析をさまざまな測定条件(pH の変化、エフェクターの添加など)で行い Bohr 効果や三次構造変化なども精査する。また、ヘムの配向は ^1H NMR により、正常鎖のヘム鉄 近位 His 間結合の状態などは共鳴ラマン分光法を用いて調べ、Hb の機能発現における近位 His の役割をさらに追求する予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

1. Aki Y., Nagai M., Nagai Y., Imai K., Aki M., Sato A., Kubo M., Nagatomo S., Kitagawa T.

Differences in coordination states of substituted tyrosine residues and quaternary structures among hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15 (2010), 147-158, 査読有

2. Nagai, M., Nagai, Y., Aki, Y., Imai, K., Wada, Y., Nagatomo, S. and Yamamoto, Y. Effect of reversed heme orientation on circular dichroism and cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin, *Biochemistry*, 47 (2008), 517-525, 査読有

3. Aki, Y., Nakagawa, T., Nagai, M., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and Imai, K. Oxygenation properties of extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360 (2007), 673-678, 査読有

[学会発表](計 11 件)

1. Aki Y., Nagai M., Imai K., Aki M., Kitagawa T.

Coordination states of proximal or distal tyrosine residue in Hemoglobins M and their quaternary structures probed by resonance Raman spectroscopy, 第 47 回日本生物物理学会年会, アスティとくしま(徳島県), 2009 年 10 月 30 日

2. Nagai M, Aki Y., Kitagawa T.

Differences in coordination states of replaced tyrosine residues and quaternary structures among hemoglobins M probed by resonance Raman spectroscopy, 14th International Conference on Biological, Inorganic Chemistry, Nagoya Congress Center (愛知県), 2009 年 7 月 26 日