

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20971

研究課題名(和文) 巨大ヘモグロビン結晶中での酸素結合飽和度の同定と時分割構造解析

研究課題名(英文) Time-resolved analysis of oxygen-binding saturation and structural changes in the crystal of the 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：環形動物マシコヒゲムシ由来巨大ヘモグロビン(分子量約40万)について、酸素結合型結晶を調製し、これを浸漬法により少しずつ酸素解離型へ移行させることで、様々な酸素結合飽和度の結晶を作製した。レーザーによる結晶加工機を用いてこれらの結晶の外形を最適に加工し、酸素結合の飽和度と立体構造が同時に変化する過程を、X線回折と顕微分光の手法によりともに時分割的に観測した。巨大ヘモグロビンが酸素結合型から酸素解離型へ変化する過程で、局所的な三次構造変化が酸素解離の比較的早い段階から生じているのに対し、分子全体にわたる四次構造変化はやや遅れて生じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The oxygenated crystals of the giant hemoglobin (molecular mass of about 400 kDa) from an annelid *Oligobrachia mashikoi* were prepared and then the crystals were shifted to various intermediate rates of oxygen-binding saturation with the soaking method. The crystals were processed by the laser crystal processing machine and these optimally processed crystals permitted us to observe the simultaneous transition in both oxygen dissociation and three-dimensional structure by microspectrophotometry and X-ray diffraction method in a time-resolved manner. The results suggest that while the giant hemoglobin changes from the oxygenated to the deoxygenated state, the local tertiary structural changes occur from a relatively early stage of oxygen dissociation, whereas the quaternary structural change across the molecule occurs a late stage of oxygen dissociation.

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 顕微分光

1. 研究開始当初の背景

環形動物の一種であるマシコヒゲムシ、サツマハオリムシは、その血液中に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を有しており、その分子構造と機能発現機構に興味をもたれていた(図1)。われわれは2005年に環形動物由来の巨大ヘモグロビンの結晶構造解析にはじめて成功(Numoto *et al.*, PNAS, 2005)した後、解析分解能の向上(Numoto *et al.*, Proteins, 2008)や、酸素結合時の協同的な構造変化モデルの提唱(Numoto *et al.*, Biochemistry, 2008)などに取り組んできた。さらにサツマハオリムシ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酸素解離型(deoxy型)へと変化させることに成功し、deoxy型での巨大ヘモグロビン結晶構造を世界で初めて決定した(Numoto *et al.*, Acta D, 2014)。さらにこの方法を応用することで、結晶中の酸素結合の飽和度を任意に変化させる技術を確認し、これに伴ってoxy型からdeoxy型へ構造が変化する過程のいくつかの中間構造の決定に成功し、連続的に四次構造が変化する様子をとらえることに成功した。

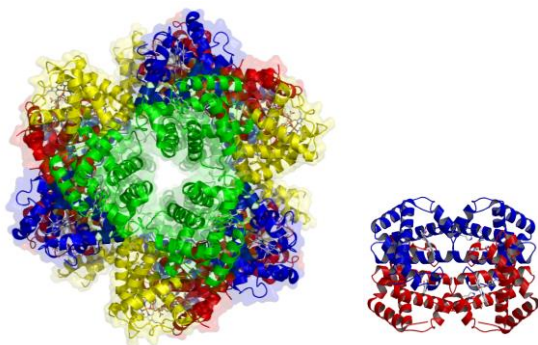


図1 巨大ヘモグロビン(左)とヒトヘモグロビン(右)。

しかしながら、結晶中の電子密度のみから酸素結合の飽和度を精度よく定量的に解析することは難しく、酸素結合の飽和度変化とこれに伴う分子構造変化との相関の定量的な分析に至っていなかった。ヘモグロビン一般においては、可視領域の吸収スペクトルにより酸素結合飽和度を精度よく決定できることが知られており、巨大ヘモグロビンにおいても、構造解析に用いた結晶の吸収スペクトルを同時に測定することにより、特定の中間構造における酸素結合飽和度を精度よく決定できるものと考えられる。近年、国内の放射光施設にて、X線回折データ収集と平行して結晶の吸収スペクトルの測定が可能となるon-line顕微分光装置が整備された。これにより、本研究が対象とする巨大ヘモグロビンにおいても、oxy-deoxy中間体の結晶構造と、吸収スペクトルによる酸素結合飽和度の定量から得られる情報を統合し、これらが同時に変化する過程をともに時分割的に精密観測できる環境が整い、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、環形動物由来巨大ヘモグロビンについて、結晶中で酸素結合の飽和度を連続的に変化させ、酸素結合の飽和度と立体構造が同時に変化する過程を、X線回折と分光の手法によりともに時分割的に精密観測し、これらが協同的に変化していく過程をはじめて実験的に明らかにする。

ヘモグロビンの酸素結合飽和度変化に伴う分子構造変化については、その協同性機構の解明に直結するものとして半世紀以上にわたる研究がなされているものの、最も詳細に研究されているヒトヘモグロビンにおいても、oxy型とdeoxy型の中間状態での構造解析は結晶の調製が困難であったためなされていない。本研究での成果は、環形動物巨大ヘモグロビンのみならず、ヒトをはじめとする様々な種のヘモグロビン分子についても、その構造変化と協同性機構についての議論に、決定的な実験証拠を提出することが期待された。

3. 研究の方法

環形動物マシコヒゲムシ、およびサツマハオリムシの血液より抽出した巨大ヘモグロビン(分子量約40万)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。得られた巨大ヘモグロビンの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を加えた溶液におおよそ10-90秒程度浸漬させることで、結晶を破壊することなく様々な酸素結合飽和度の中間構造へと変化させた。規定の時間浸漬後直ちに結晶を極低温(-178°C)の窒素気流にて瞬間的に凍結させ、これらの結晶は液体窒素中で反応を停止させたまま保存し、後のX線回折実験、および顕微分光実験に備えた。

結晶を用いた顕微分光測定では、測定試料が非常に高濃度であるため、一般に厚さの非常に薄い(数μmから100μm程度)結晶を用いる必要がある。測定を行う結晶の厚さを数種類試し、最適な厚さを検討した。一方、このように薄い結晶からでは、構造解析に十分な高分解能のX線回折データが得られにくいことが予想される。そこで、比較的大きな(500μm角程度の)結晶を用意し、これの一部のみを数十μmに薄く「削り取り」、ひとつの結晶から良質のX線回折データ取得と顕微分光データ測定を可能とする新しい測定法を検討した。これには、放射光施設にてごく最近開発が進められている、タンパク質結晶の形状をレーザーにより自由に加工する装置(結晶加工機)を用いた。

様々な酸素結合飽和度に調整した結晶を結晶加工機で加工し、X線回折実験と顕微分光実験を行った。得られたデータから、巨大ヘモグロビンがoxy型からdeoxy型へと酸素

結合飽和度を変化させる過程とそれぞれの中間構造を対応づけ、巨大ヘモグロビンの酸素結合協同性機構の時分割モデル化を行った。

4. 研究成果

試料量が比較的確保しやすかったマシコヒゲムシ由来巨大ヘモグロビンを用いて結晶の調製を行った。酸素結合型結晶を準備し、次いでポリエチレングリコールと dithionite を加えた溶液に浸漬させることで酸素解離型結晶へ移行させた。浸漬時間をおよそ 10 秒間隔で 10-90 秒程度とし、様々な酸素結合飽和度の結晶を大量に調製した。結晶の体積が一定でないため、同じ浸漬時間であっても個々の結晶により酸素結合飽和度が異なる。このため、顕微分光の手法により個々の結晶の可視吸収スペクトルを測定し、酸素結合飽和度を定量的に見積もった。結晶からの顕微分光測定に際しては、レーザーを用いた結晶加工機を利用して、顕微分光に最適な厚さを検討した結果、約 30 μm のとき、最も良好にスペクトルを測定できることが分かった。結晶の半分の領域は未加工のまま残り、X 線回折実験用の領域とした (図 2)。

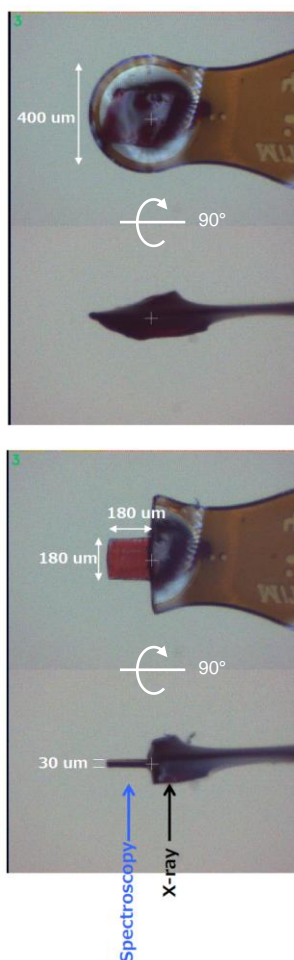


図 2 レーザーによる加工前(上)と加工後(下)の結晶。

顕微分光データと X 線回折データを収集し、定量された酸素結合飽和度と結晶構造を詳細に検討し、この方法では結晶の中心部分が酸素解離型へ十分に移行していない可能性が示唆された。これを改善するため、得られた結晶をまず結晶加工機を利用して約 30 μm の板状に加工し、次いでポリエチレングリコールと dithionite を加えた溶液に浸漬させることで酸素解離型結晶へ移行させた。このようにあらかじめ加工した薄い結晶を用いることにより、酸素結合飽和度が 20-10% とより低い状態の結晶を安定的に作製することが可能となった (図 3)。

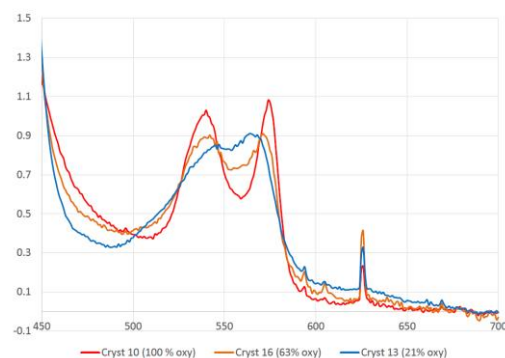


図 3 巨大ヘモグロビン結晶の吸収スペクトル。

この方法では、X 線回折実験も約 30 μm 厚で行うことになり、分解能の大幅な低下が懸念されたが、高輝度かつ最新の PAD 型 X 線検出器が備わった放射光ビームラインで実験を行うことにより、分解能の低下を最小限に抑えてデータ収集を行うことができた (図 4)。

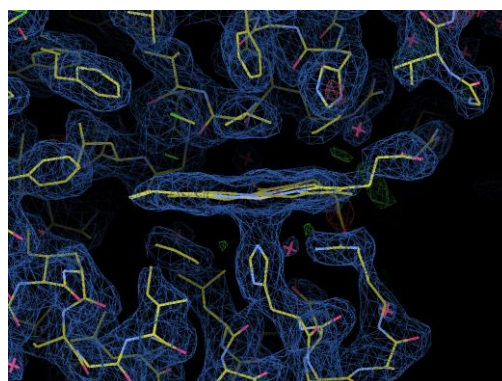


図 4 結晶加工部位での回折データから得られた電子密度図。2.2 Å 分解能。

各酸素結合飽和度の結晶構造を詳細に検討した結果、局所的な三次構造変化が酸素解離の比較的早い段階から生じているのに対し、分子全体にわたる四次構造変化はやや遅れて生じていることが示唆された。

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 1 件)

- ① 沼本修孝, 中川太郎, 福森義宏, 三木邦夫, 無脊椎動物巨大ヘモグロビンの deoxy 型構造, 生物物理, 55, 266-268, 2015. 査読有
DOI: 10.2142/biophys.55.266

[学会発表] (計 5 件)

- ① 沼本修孝, 中川太郎, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン酸素解離中間体の X 線結晶構造と分光学的解析, 第 54 回日本生物物理学会年会, 1Pos022, 2016 年 11 月 25 日, つくば国際会議場 (茨城).
- ② 沼本修孝, 中川太郎, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの酸素解離中間体, 日本結晶学会 2016 年度年会, PC-34, 2016 年 11 月 17-18 日, 茨城県立県民文化センター (茨城).
- ③ 沼本修孝, 生物系 BL 利用と最近の成果について -BL38B1 での on line 顕微分光測定-, SPRUC 放射光構造生物学研究会第 6 回研究会, 2016 年 8 月 29 日, 関西学院大学神戸三田キャンパス (兵庫).
- ④ 沼本修孝, 中川太郎, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン酸素解離中間状態の解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 3P-007, 2016 年 6 月 9 日, 福岡国際会議場 (福岡).
- ⑤ 沼本修孝, 中川太郎, 伊藤暢聡, 福森義宏, 三木邦夫, マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンのリガンド解離型構造, 日本結晶学会 2015 年度年会, PC-036, 2015 年 10 月 17-18 日, 大阪府立大学 (大阪).

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/SBS/sb/sub1.html>

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