

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840028

研究課題名(和文)ヘモグロビンのリガンド解離ダイナミクス直接観測

研究課題名(英文)Direct observation of the ligand-dissociation dynamics of the hemoglobin

研究代表者

佐藤 文菜 (Sato, Ayana)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50717709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘモグロビンのリガンド解離に伴う構造変化の過程を動的に直接観測することを目的とし、一酸化炭素結合型ヘモグロビン単結晶を用いてレーザー照射下でのX線結晶構造解析を行った。反応時間の異なる複数のデータセットを取得し、得られた原子座標を用いてタンパク質主鎖部分の構造変形過程を定量的に評価した。その結果、ヘモグロビンの各サブユニット内での段階的な構造変化が伝播し、分子全体の四次構造変化へと拡張していく様子を追跡することができた。

研究成果の概要(英文)：To trace structural changes of carbonmonoxy hemoglobin associated with ligand photolysis, the X-ray crystallography under laser irradiation conditions were carried out. Using a set of coordinates of those intermediate states of hemoglobin, the quantitative conformational change in inner subunit and intra subunits of hemoglobin were appraised. The sequential structural change in each subunit propagated across the overall tetrameric molecule and produced the quaternary conformational motion.

研究分野：生物物理

キーワード：ヘモグロビン 光解離 結晶構造解析 時間分解測定

### 1. 研究開始当初の背景

近年、放射光 X 線を用いて種々のタンパク質の構造決定が盛んに行われており、原子レベルでの分子構造が明らかになっているが、その多くは静的な構造の検出に留まっている。しかしながら、実際のタンパク質の挙動を明らかにするためには、タンパク質-リガンド相互作用における動的構造変化を検出することが必要である。なぜなら、タンパク質の機能発現には、基質との相互作用界面だけではなく、タンパク質全体の協同的構造変化が重要な役割を果たしていると考えられるからである。

上記のようなリガンドと相互作用する典型的なタンパク質として、ヘモグロビンが挙げられる。ヘモグロビンもまた、リガンド結合型、リガンド非結合型の 2 種類の基底状態での静的構造は解かれており、両者の構造は異なっている。リガンドである酸素に対する親和性が協同性を示す原因は両者の構造の違いによるものと考えられているが、詳細は未だ不明である。リガンドが解離し、それに伴って起こる動的構造変化を直接的に原子レベルで観測した例はまだなく、リガンドが結合サイトであるヘム近傍から、どのようなルートを通して分子の外に移動するのかについても議論が分かるところである。古くから代表的な生体分子の一つとして研究されてきたにもかかわらず、未だに直接観測がなされていない、ヘモグロビンの分子内リガンド輸送経路と、分子構造の変化を原子レベルで動的に直接観測することが本研究の主題である。

生体分子の動的構造変化観測において、時間分解 X 線結晶構造解析を用いるのが本研究の手法であるが、そのような研究は、日本国内の研究機関ではあまり行われておらず、国外の研究機関にて、ごく少数の報告例があるのみである[1-3]。また、動的構造を明らかにする数々の研究手法(分光、溶液散乱、NMR、X 線吸収等)の中で、局所的にはなく、分子全体の構造を詳細に捉えることのできる X 線結晶構造解析を用い、その手法が確立されれば、他の生体分子に対しても同様のアプローチが可能になる事が期待される。

[1] F. Schotte et al., Science 300 1944-1947 (2003).

[2] J. E. Knapp et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 103, 7649-7654 (2006).

[3] Z. Ren et al., Biochemistry 40, 13788-13801 (2001).

### 2. 研究の目的

ヘモグロビンの構造変化の中間状態を捕捉するため、低温下でのパルス照射実験及び、室温付近でのポンププローブ Laue 回折実験を行い、4 量体ヘモグロビンのリガンド光解離に伴う構造変形を明らかにする。構造変形の種類について、主に 3 次構造変化の

観測に重点を置く予定である。まず、リガンドの解離が起こり、4 次構造変化が始まる前に、そのトリガーとなるリガンド輸送を伴う 3 次構造変化が起こっていると考えられるためである。

### 3. 研究の方法

ヘモグロビンの種類として、ヒト成人型ヘモグロビン、ヒト天然変異型ヘモグロビン、ウマヘモグロビンの 3 種類の 4 量体ヘモグロビンをターゲットとしている。まず、各 4 量体ヘモグロビンの精製を行い、それぞれ結晶化を行う。また、リガンドについては、酸素の代わりに光解離収率の高い一酸化炭素を用いる。

低温下での照射 X 線回折実験は、結晶内でのリガンドの移動を効率的に行うため、連続光源ではなく、高繰り返しパルスレーザーを用いる[4]。結晶の温度を 100 K から 140 K 程度に保ち、パルスレーザーを照射しながら X 線結晶構造解析を行う。

室温付近での Laue 回折実験は、高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory Advanced Ring (PF-AR) のビームライン NW14A[5]にて行う。ヘモグロビンのリガンド光解離は可逆反応であり、その再結合にかかる時間は 80 ミリ秒程度とされている[6]ため、10Hz 付近の繰り返し数でポンププローブ実験が可能である。励起光を紫外~可視域パルスレーザー、検出光をシングルバンチ放射光 X 線とする。NW14A では、2 つの挿入光源が設置されており、ポンププローブ実験を行うに当たって十分な X 線強度が得られるが、より S/N の良い実験をするため、2 次元 CCD 検出器のダイナミックレンジ付近まで、可逆反応の特定の時間点の信号を繰り返し積算する。また、NW14A では 2 種類以上の外部同期可能な波長可変レーザーを備えており、レーザーの波長だけでなく、レーザーパルスのパルス幅もフェムト秒、ピコ秒、ナノ秒と選択可能である。この点は、試料の照射によるダメージの軽減等に有用である。室温付近での X 線照射による試料のダメージを考慮すると、データセット当たりの回折イメージ数が抑えられる、白色 X 線での測定が適しているため、Laue 法での測定を行う。また、PF-AR は通年シングルバンチモードで運転を行っており、時間分解実験を行うのに適している。その X 線のパルス幅は約 150 ピコ秒であり、光反応ダイナミクスを 150 ピコ秒の時間分解能で測定することが可能である。

[4] A. Tomita et al., PNAS 106, 2612-2616 (2009).

[5] S. Nozawa et al., J. Synchrotron Rad. 14, 313-319 (2007)

[6] L. J. Noe et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 573-577 (1978)

#### 4. 研究成果

低温下での光照射 X 線回折実験において、ヒト成人型ヘモグロビンのリガンド解離に伴う分子構造変形を確認することが出来た。ヘモグロビンはアルファ鎖とベータ鎖の 2 量体がさらにダイマーとなった四量体構造 (図 1) を取っているが、アルファ鎖とベータ鎖

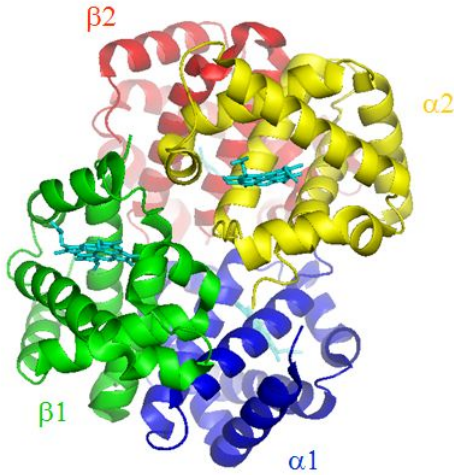


図 1. ヘモグロビンの四量体構造

鎖の内部で、リガンドは異なる経路を通過することが明らかとなった。

図 2 にアルファ鎖の内部構造、図 3 にベータ鎖の内部構造を示す。ファンデルワールス半径から定義される分子表面と分子内部空洞をメッシュで表示した。

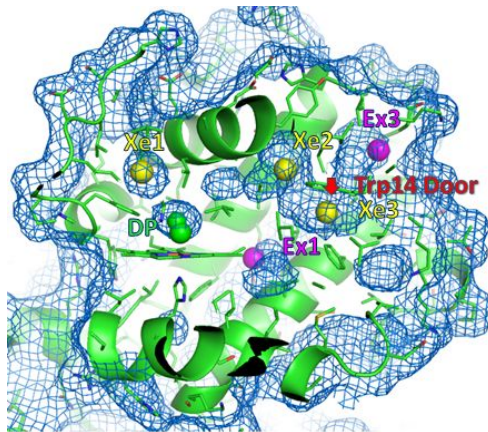


図 2. ヘモグロビンのアルファ鎖の構造

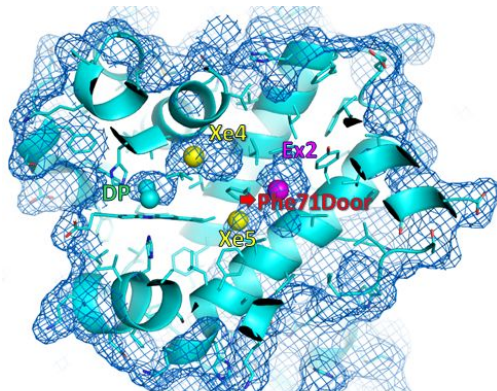


図 3. ヘモグロビンのベータ鎖の構造

内部空洞の場所を DP, Xe1, Xe2, Xe3, Xe4, Xe5, Ex1, Ex2, Ex3 で表す。低温での光照射実験の結果、リガンドの解離経路は、アルファ鎖については、DP → Xe2 → Ex3 の経路、ベータ鎖については、DP → Xe4 → Xe5 の経路となることが分かった。また、リガンドの移動に伴って、アルファ鎖では 14 番目のアミノ酸であるトリプトファン残基、ベータ鎖では 71 番目のフェニルアラニン残基が、ゲートの役割を担っていることが示された。

さらに、リガンド解離過程でのヘモグロビン分子内の原子間距離変化について Difference Distance Matrix Plot (DDMP) による解析を行った。図 4 に、ヘモグロビンからリガンドが完全に解離した場合に見

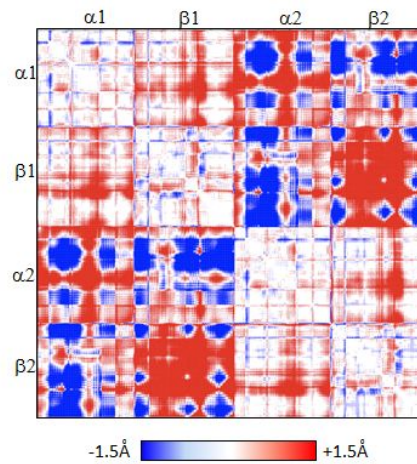


図 4. リガンド完全解離前後で見込まれる Difference Distance Matrix Plot 図

まれる DDMP を示す。この図は四量体ヘモグロビン (アルファ鎖 2 本とベータ鎖 2 本) のリガンド解離前後の座標間での原子間距離変化 (主鎖の  $C_{\alpha}$  原子のみ) を表している。図 5 に、光照射前及び照射後 840 分での DDMP を示す。図 4 と同様のパターンが観測されていることが分かる。さらに、アルファ

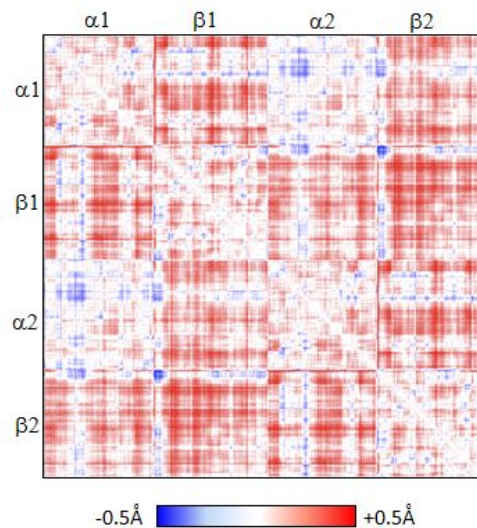


図 5. 光照射前後での DDMP 図

鎖内での構造変化(図6)を時間経過と共に追うと、段階的な構造変形が観測されており、リガンド解離に伴う分子変形が起こる過程は、決して一方向の動きではない事が示唆される。

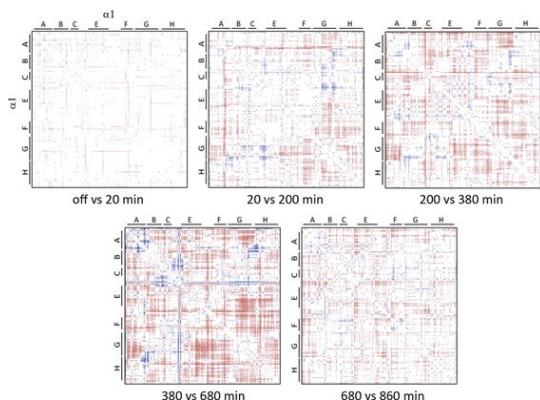


図6. アルファ鎖内の段階的な構造変化

また、図7にベータ鎖内の構造変化を示すが、アルファ鎖とは異なる動きをしていることがわかる。このように、アルファ鎖、ベータ鎖内において、リガンドの解離経路だけでなく、分子構造変形において別々の挙動を示すことにより、複雑な協同性を実現していることが示唆される。

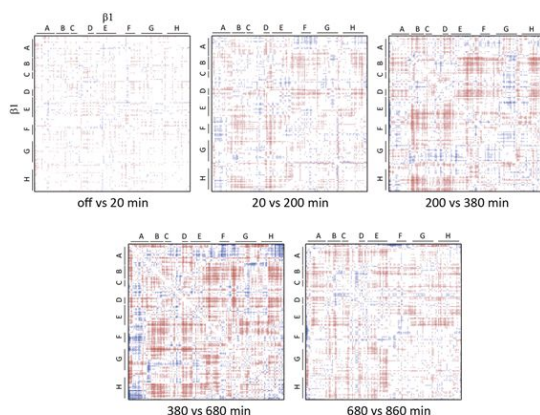


図7. ベータ鎖内の段階的な構造変化

図8にアルファ - ベータ2量体内の段階的な構造変化を示す。2量体間の距離は全体的

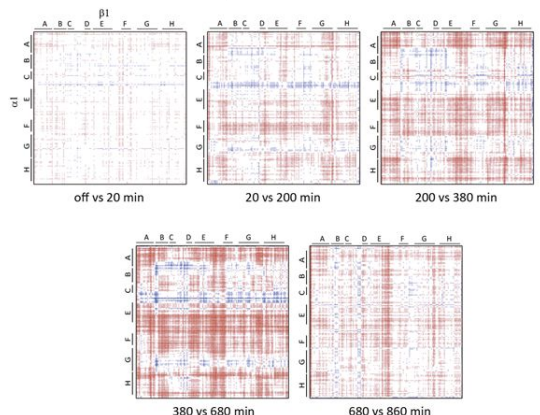


図8. アルファ-ベータ2量体内の段階的な構造変化

に近づいているが、図4の最終形態には到達しておらず、まだ中間段階であると考えられる。

図9にアルファ鎖間の構造変化を示す。このパネルでは、Fヘリックスからの構造変化

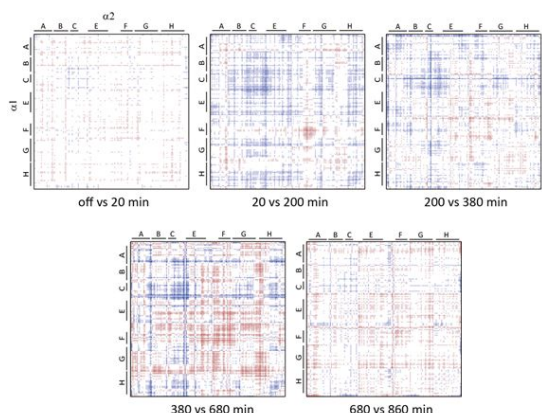


図9. アルファ鎖間の段階的な構造変化

の伝播が顕著である。

光照射によるヘモグロビンの構造変形をDDMPによって定量的に示すことができ、現在この結果を論文にまとめているところである。

また、ウマヘモグロビンを用いて室温でのポンプ - プローブ Laue 回折実験も行い、結果を解析中である。現在、パルスレーザーの照射により、ヘモグロビン結晶の空間群の変化が観測されている。これは、結晶内においてヘモグロビン四量体は、結晶の2回回転対称軸によって、アルファ - ベータ2量体から生成されるが、分子の4次構造変化によって2量体同士がねじれ、同じ空間群では記述できなくなるためと考えられる。

これまで、タンパク質のダイナミクス観測において、時間分解 X 線結晶構造解析を用いて構造変形の観測を試みた系は非常に少なく、今後この手法が確立されれば、他の生体分子に対しても同様のアプローチが可能になる事が期待される。また、タンパク質が生体内でその役割を果たす際には、外場の変化に応答した状態変化、またそれに伴う構造変化が起こっているはずである。その機能発現中の動的な構造変化を原子レベルで直接観測することができれば、20種類のアミノ酸の組み合わせという限られた材料からなる機能性超分子について、それぞれに固有の機能が備わる仕組みを解明できると期待される。

## 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)

富田文菜、佐藤篤志、野澤俊介、柴山修哉、足立伸一、「ポンプ - プローブ法を用いた生体分子の構造ダイナミクス測定」、日本結晶学会誌, vol.56, 2014, pp.253-258, <http://doi.org/10.5940/jcrsj.56.253>

〔学会発表〕(計 11 件)

Ayana Sato-Tomita, Naohisa Happo, Sam-Yong Park, Kouichi Hayashi, Yuji C. Sasaki, Naoya Shibayama, “ X-ray fluorescence holography for proteins: Application to hemoglobin and myoglobin ”, The Biophysical Society 61th Annual Meeting, February 10-15, 2017, New Orleans, United States.

佐藤文菜, 柴山修哉, 八方直久, 松下智裕, 朴三用, 林好一, 佐々木裕次, 「生体分子活性サイトの原子分解能イメージング」, 第10回物性科学領域横断研究会, 神戸大学, 2016年12月

Ayana Sato-Tomita, Naoya Shibayama, Naohisa Happo, Koji Kimura, Takahiro Okabe, Tomohiro Matsushita, Sam-Yong Park, Yuji C. Sasaki, Kouichi Hayashi, “ Visualization of iron environments in hemoglobin using X-ray fluorescence holography ”, VUVX-2016 satellite workshop: Local 3D atomic and electronic structure imaging of functionally active sites, July 1, 2016, University of Zurich.

佐藤文菜, 柴山修哉, 八方直久, 林好一, 佐々木裕次, 「Visualization by X-ray fluorescence holography of metal environments in hemoglobin」, 第53回日本生物物理学会年会, 2016年11月26日, つくば国際会議場

Ayana Sato-Tomita, Shin-ichi Adachi, Sam-Yong Park, Yuji C. Sasaki, Kouichi Hayashi and Naoya Shibayama, “ New structural analysis methods for hemoglobin crystals. Time-resolved cryogenic X-ray crystallography with extended pulsed-laser pumping and 3D imaging by X-ray fluorescence holography ”, The Biophysical Society 60th Annual Meeting, February 27- March 2, 2016, Los Angeles, United States.

佐藤文菜, 「レーザー光照射によるヘモグロビンの構造ダイナミクス研究」, 第29回日本放射光学会年・放射光科学合同シンポジウム, 2016年1月9-11日, 柏の葉カンファレンスセンター

佐藤文菜, 柴山修哉, 足立伸一, 朴三用, 林好一, 佐々木裕次, 「ヘモグロビンの配位子結合サイトから伝播する分子構造変形の直接観測」, 第9回物性科学領域横断研究会(領域合同研究会), 東京大学, 2015年11月

Ayana Sato, “ Structural dynamics measurements of the intermediate states in the ligand-photolysis of hemoglobin ”, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13-15日, 金沢大学

富田文菜, 佐藤篤志, 野澤俊介, 柴山修哉, Kyung Hwan Kim, Hyotcherl Ihee, 足立伸一, 「ヘムタンパク質のリガンド解離過程における構造ダイナミクス実時間観測」, 第3回物構研サイエンスフェスタ, 2015年3月17日, つくば国際会議場

富田文菜, 佐藤篤志, 野口大貴, 野澤俊介, 朴三用, 柴山修哉, 足立伸一, 「一酸化炭素型ヘモグロビンの光解離中間体の観測」, 平成26年度日本結晶学会年会, 東京大学本郷キャンパス, 2014年11月1日~3日(口頭発表及びポスター発表, ポスター賞受賞)

富田文菜, 佐藤篤志, 野口大貴, 野澤俊介, 腰原伸也, 朴三用, 柴山修哉, 足立伸一, 「X-ray crystal structures of carbonmonoxy hemoglobin photolysis intermediates」, 第52回日本生物物理学会, 札幌コンベンションセンター, 2014年9月

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 文菜 (SATO, Ayana)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50717709