Structure-function relationship in human hemoglobin : studies on circular dichroism and resonance Raman spectroscopy of mutant hemoglobins with one amino acid substitution

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16703

氏　　名	神　弥生
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博甲第681号
学位授与の日付	平成16年9月30日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	Structure-Function Relationship in Human Hemoglobin:Studies on Circular Dichroism and Resonance Raman Spectroscopy of Mutant Hemoglobins with One Amino Acid Substitution. （ヒトヘモグロビンの酸素平衡機能とタンパクの高次構造変化との相関：1アミノ酸変異ヘモグロビンの円二色性と共鳴ラマン分光法による研究）
論文審査委員(主査)	福森　義宏（自然科学研究科・教授）
論文審査委員(副査)	櫻井　　武（自然科学研究科・教授），坂本　敏夫（自然科学研究科・助教授），細野　隆次（医学系研究科・教授），長井　雅子（法政大学・教授）

学位論文要旨

Abstract

Hemoglobin M (Hb M) is natural mutants with an amino acid substitution in the heme pocket of the α or β subunit. The α-abnormal Hb M's (Iwate and Boston) show physiological properties different from the β-abnormal Hb M's (Hyde Park, Saskatoon, and Milwaukee), that is, extremely low oxygen affinity of the normal subunit and extraordinary resistance to reduction of the abnormal met-subunit. In the present study, it was clarified that these are due to the great distortion of the heme structure in the α-abnormal Hb M's by the 406.7-nm excited resonance Raman (RR) spectroscopy. The 244.0-nm excited UVRR spectra of Hb M's indicated that the deprotonated F8- or E7-Tyr is bound to the ferric heme iron in the abnormal subunits.

DeoxyHb A exhibits a prominent negative CD band at 287 nm, which is sometimes used as a T-state marker and suggestsd to arise from the hydrogen bond formation of Tyr-α42 or Trp-β37 at the $\alpha_1\beta_2$ subunit interface. But there is no experimental evidence about the suggestions. Near-UV CD spectra of Hb Rouen (Tyr-α140→His) and three recombinant (r) Hbs (rHb Ser-α42, rHb His-β37, and rHb Thr-β145) revealed that environmental alterations of Tyr-α140 and β145 are primarily responsible for the negative CD band rather than the formation of the intersubunit hydrogen bonds by Tyr-α42 and Trp-β37. A part of the negative CD band was also come from the tertiary structure change.

成人ヒトヘモグロビン（Hemoglobin A, Hb A）は2種類のサブユニット（α、β）から成る四量体（$\alpha_2\beta_2$）で、酸素を結合した（oxy）酸素親和性の高い relaxed (R) 型と、酸素を解離した（deoxy）酸素親和性の低い tense (T) 型の2つの異なった四次構造をとることがX線結晶解析から示唆されている。Hb の各サブユニットにはヘムが 1 つずつ含まれていて、同一分子内の 4 つのヘムは協同的に酸素の結合・解離を行っている。この Hb の協同性は、酸素脱着に伴って Hb が2つの四次構造、R型と T 型との間を転移することで説明されているが、ヘムに酸素が結合した情報がどのように他のサブユニットに伝達されて四次構造転移が起こるのかについては未だ不明な点が多い。そこでX線結晶解析や ^{1}H-NMR 等の研究からこの構造変化に関与すると考えられているヘム周辺、αβサブユニット接触面、またはC末端付近に位置するアミノ酸に変異を有する天然変異 Hb や遺伝子組み換えによって合成した人工変異 Hb を用いて、それらの酸素結合機能と四次構造変化との相関を共鳴ラマン散乱と紫外域円二色性の分子分光学的手法により調べた。

Hemoglobin M の異常鎖ヘムの構造：共鳴ラマン（RR）分光法による研究

ヘム周辺に位置するアミノ酸、すなわちヘム鉄と唯一共有結合している近位（F8）His、酸素結合部位付近にあり、ヘムと酸素の結合を安定化しているとされる遠位（E7）His や E11-Val は Hb の機能や四次構造転移に重要であることが示唆されている。これらのヘム周辺アミノ酸に変異を有する天然変異体、Hemoglobin M（Hb M）ではヘム鉄が酸化（Fe^{3+}, met）型で安定化しているため、異常鎖に酸素は結合できない。現在、5 種類の Hb M が知られているが、そのうち4種類の Hb M、Iwate [α87(F8)His→Tyr]、Boston [α58(E7) His→Tyr]、Hyde Park [β92(F8)His→Tyr]、および Saskatoon [β63(E7)His→Tyr]では、αまたはβ鎖の F8-あるいは E7-His が Tyr に置換している。もう 1 種類は E11-Val の Glu 置換による Hb M Milwaukee [β67(E11)Val→Glu]である。β鎖異常 Hb M（Hyde Park、Saskatoon および Milwaukee）では異常β鎖の還元性や正常α鎖の酸素親和性は Hb A とほぼ同様であるが、α鎖異常 Hb M（Iwate と Boston）では異常α鎖は極めて還元されにくく、正常β鎖の酸素親和性は非常に低い。Hb M のこのような生理学的特徴の違いの原因を追究するため、5 種類の Hb M のヘムの構造を 406.7-nm 励起 RR スペクトルで調べた。406.7-nm 励起では met 型ヘム由来のラマンバンドが強く現れるので、half-met 型 Hb M（異常鎖は met 型、正常鎖は deoxy 型）のラマンスペクトルにより選択的に異常鎖ヘムの状態を調べることができる。図 1 に高波数領域（1680~1280 cm^{-1}）における 5 種類の Hb M の異常鎖ヘム由来ラマンスペクトル（A~E）と metHb A のスペクトル（F）を比較した。α鎖異常 Hb M (Iwate と Boston)の異常鎖ヘムの面内骨格振動モード、$\nu_{C=C}$、ν_2 およびν_{37} バンドはそれぞれ 1625、1570、1589 cm^{-1} にみられ、metHb A に比べ 4~9 cm^{-1} 高波数シフトしていた。一方、β鎖異常 Hb M (Hyde Park、Saskatoon、および Milwaukee)の異常鎖ヘムではこれ

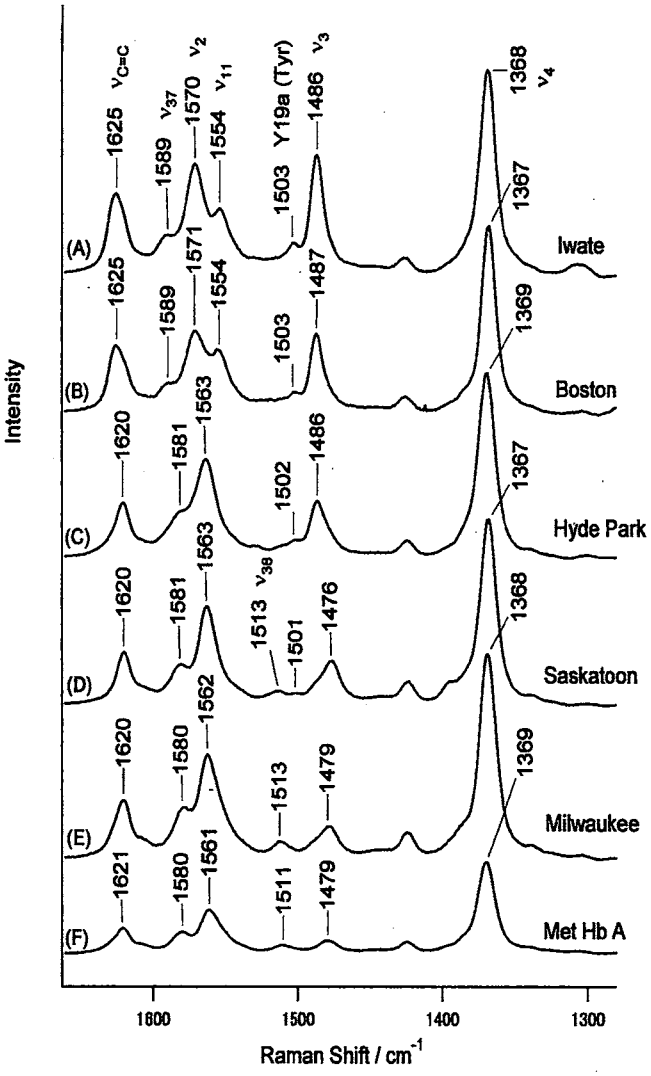

図 1. Hb M Iwate (A)、Boston (B)、Hyde Park (C)、Saskatoon (D)、 Milwaukee (E)の異常鎖（met 型）および metHb A (F)の高波数領域 406.7-nm 励起共鳴ラマンスペクトル Hb、50 μM（ヘム濃度）、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0 の条件で測定した。

らのラマンバンドの波数は metHb A とよく似ていた。また、ヘムの配位状態を反映するν_3バンドは、Hb M Iwate、Boston、および Hyde Park の異常鎖ヘムでは 1486~1487 cm^{-1} に、Hb M Saskatoon と Milwaukee では 1476~1479 cm^{-1} にみられ、前者 3 種類の Hb M の異常鎖ヘムは F8-またはE7-Tyr とのみ結合した 5 配位高スピン構造を、後者 2 種類の Hb M の異常鎖ヘムは F8-His および、E7-Tyr または E11-Glu と結合した 6 配位高スピン構造をとっていることが示された。図 2 に half-met 型 Hb M（A~E）と metHb A（F）の 850~600 cm^{-1} 領域ラマンスペクトルを示した。α鎖異常 Hb M Boston では面外骨格振動モード、ν_{15}バンドの強度が著しく

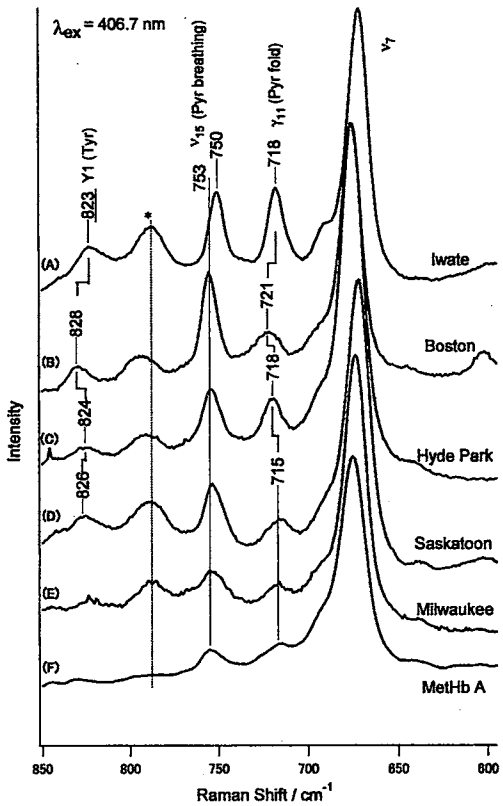

図 2. Hb M Iwate (A)、Boston (B)、Hyde Park (C)、Saskatoon (D)、Milwaukee (E)および metHb A (F) の 850~600 cm^{-1} 領域 406.7-nm 励起共鳴ラマンスペクトル　図 1 と同じ条件で測定した。

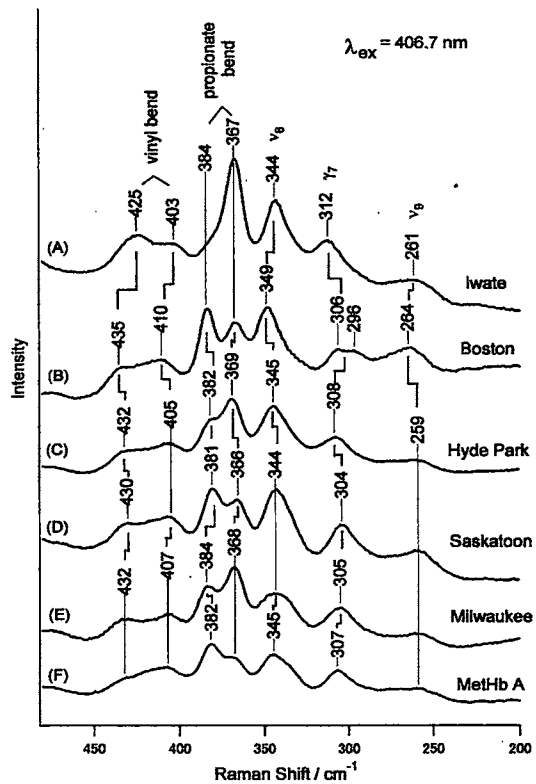

図 3. Hb M Iwate (A)、Boston (B)、Hyde Park (C)、Saskatoon (D)、Milwaukee (E)および metHb A (F) の 480~200 cm^{-1} 領域 406.7-nm 励起共鳴ラマンスペクトル　図 1 と同じ条件で測定した。

増加していた。さらにα鎖異常 Hb M 間でも F8 置換と E7 置換とで大きく異なっていた。図 3 に half-met 型 Hb M（A~E）と metHb A（F）の低波数領域ラマンスペクトルを示した。Hb M Iwate ではビニル基由来の$\delta(C_\beta C_a C_b)_{2,4}$バンドは 425 と 403$cm^{-1}$にみられ、高波数側のラマンバンドの方が低波数側のバンドよりも大きかったが、Hb M Boston では 435 と 410 cm^{-1}に高波数シフトし、低波数側のバンドの方が大きく、2 つの山の比が逆転していた。そして、プロピオン酸由来の$\delta(C_\beta C_c C_d)_{6,7}$バンドは Hb M Iwate では 367 cm^{-1}に 1 本の顕著なバンドを示したのに対し、Hb M Boston では 384 と 367cm^{-1}の 2 本のバンドに分裂した。一方、β鎖異常 Hb M では若干の差は認められるが、これらのバンドは metHb A と似ていた。これらの結果は、α鎖異常 Hb M ではヘムの変化が著しく、それはヘムのゆがみや側鎖の状態の変化として現れていることを示している。また、興味深いことに同じα鎖異常 Hb M でも F8-His 置換と E7-His 置換とでその影響は異なっていた。

Hb M の異常鎖を還元すると（完全還元型）、いずれも deoxyHb A とほぼ同様のスペクトルを示し、1470 cm^{-1}にν_3バンドを、215 cm^{-1}にヘム鉄と His の結合を示す伸縮振動モード、$\nu_{Fe\text{-}His}$を示したことから、完全還元型ではヘム鉄は E7-Tyr または

F8-Tyr との結合が切れて、F8-His または E7-His と結合した 5 配位高スピン構造をとることが判明した。したがって、α鎖異常 Hb M でみられたヘムの変化はヘム鉄と置換 Tyr との結合に由来し、還元によって置換 Tyr との結合が切れると、ヘムの構造は Hb A と同じになることがわかった。以上のことから、α鎖異常 Hb M が示す生理学的異常はヘムの構造変化が原因であると考えられる。また、Hb M の F8-または E7-Tyr がどういう形でヘム鉄と結合しているのかを 244.0-nm 励起 UVRR スペクトルで調べた。その結果、置換 Tyr の OH 基は脱プロトン化した状態（tyrosinate）でヘム鉄と結合していることが判明した。

DeoxyHb A においてヘム鉄はヘム面から 0.6Å程度、近位側へ飛び出しており、酸素結合に伴ってヘム面内に移動する。このヘム鉄の動きが F8-His を通ってグロビン蛋白に伝わり、四次構造転移が起こると示唆されている。しかし、今回の結果から、ヘム鉄と F8-His との結合だけでなく、F8-His とヘム鉄との結合がないα鎖異常 Hb M でもヘムの構造が変化すると Hb の四次構造転移および機能に影響を与えることが明らかとなった。

ヘモグロビンの四次構造転移に伴う円二色性（CD）スペクトルの変化

Hb A では oxy（R）型で 260 nm に大きな正の CD バンドと 285 nm に非常に小さな正の CD バンドを示すが、deoxy（T）型になると 260 nm の正の CD バンドが約半分に減少し、新たに 287 nm に顕著な負の CD バンドが出現する。260 nm の CD バンドはヘムの状態を反映しているとされているが 280~300 nm 領域はグロビン蛋白中の芳香族アミノ酸、つまり Tyr または Trp の環境変化を反映すると考えられている。287 nm の負の CD バンドは T 型マーカーバンドといわれ、Tyr-α42 と Trp-β37 の水素結合に由来することが示唆されているが、その実態は不明である。まず、この負の CD バンドが本当に Hb の四次構造を反映しているのか、大腸菌で合成したリコンビナント（recombinant, r）Hb、rHb Leu-α42 (Tyr-α42→Leu) と Hb Kansas (Asn-β102→Thr)を用いて調べた。rHb Leu-α42 の酸素親和性は非常に高く、協同性がほとんどないことから（P_{50} = 0.58 mmHg、Hill's n = 1.2）、rHb Leu-α42 の四次構造は deoxy 型でも R 型であると考えられる。rHb Leu-α42 は oxy 型で Hb A と同じ CD スペクトルを示したが、deoxy

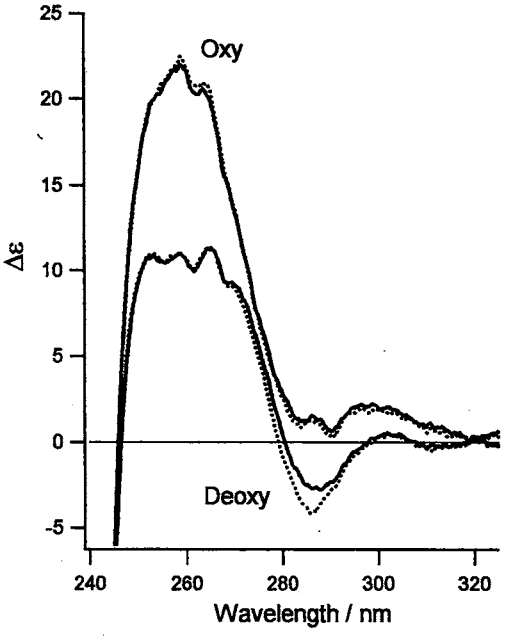

図 4. リコンビナント(r)Hb Thr-β145（実線）と Hb A(点線)の near-UV CD スペクトル
Hb、50 μM（ヘム濃度）、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0、25℃で測定し、積算 60~80 回分を平均化した。実線, rHb Thr-β145; 点線, Hb A.

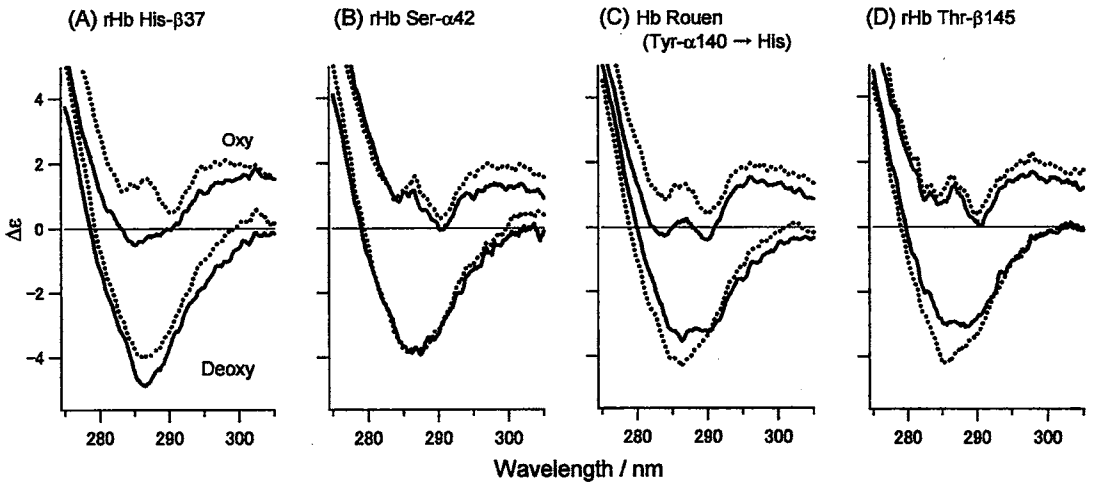

図 5. 270~300 nm 領域における変異 Hb（実線）と Hb A(点線)の CD バンド (A), rHb His-β37; (B), rHb Ser-α42; (C), Hb Rouen; (D), rHb Thr-β145.

型では 287 nm の負の CD バンドは Hb A の約半分に減少していた。しかし、強力なアロステリックエフェクターであるイノシトール六リン酸（IHP）を加えると、協同性に回復がみられると共に（P_{50} = 2.85 mmHg、Hill's n = 2.0）、この負の CD バンドは大きくなり、Hb A に近い大きさになった。一方、酸素親和性および協同性が低いことから（P_{50} = 41.0 mmHg、Hill's n = 1.3）、四次構造が T 型に偏っていると考えられる Hb Kansas では deoxy 型において Hb A とほぼ同様の負の CD バンドを示したが、oxy 型においても 285 nm 付近に小さな負の CD バンドを示し、oxy 型でも T 型よりの構造をとっていることを反映していると考えられた。

次にαとβサブユニットの接触面に位置する Tyr-α42 と Trp-β37 および C 末端から 2 番目に位置する Tyr（α140 とβ145）の 287 nm の負の CD バンドへの関与を変異 Hb を用いて検討した。変異 Hb には大腸菌により合成した 3 種類の rHb Ser-α42 (Tyr-α42→Ser)、rHb His-β37 (Trp-β37→His)、rHb Thr-β145 (Tyr-β145→Thr)と天然変異体、Hb Rouen (Tyr-α140→His)を用いた。これらの変異 Hb はいずれも酸素親和性が高く協同性が低下していたが、条件を検討し、これらの変異 Hb が有意な協同性を示す条件（Hill's n > 2.0）、すなわち四次構造変化がおこると考えられる条件で

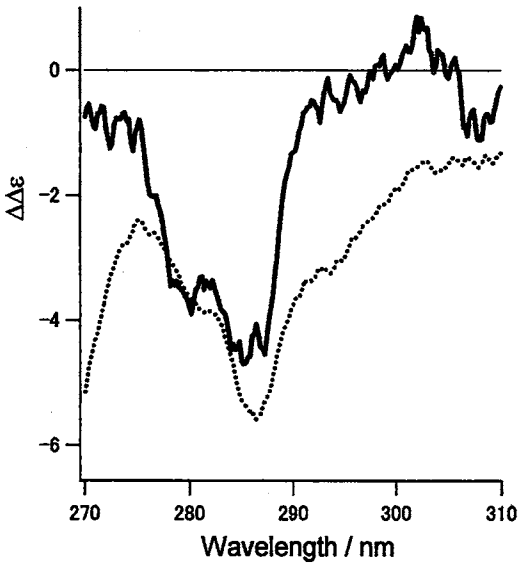

図 6. 酸素結合・解離に伴う CD の変化
実線, 4 残基の四次構造変化への寄与の合計;
点線, Hb A の変化

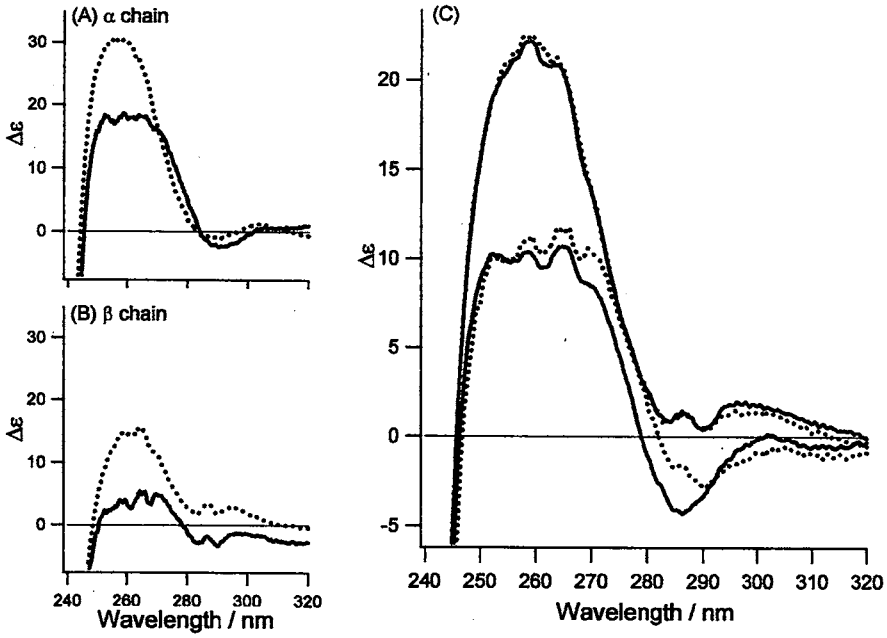

図 7. Hb の単離鎖と再構成 Hb の CD の比較
Oxy 型（点線）と deoxy 型（実線）における単離α鎖(A)と単離β鎖(B)の CD スペクトルおよび単離鎖の算術平均によるスペクトル（点線）と再構成 Hb の CD スペクトル（実線）の比較 (C)。

CD スペクトルを測定しそれらの寄与を検討した。図 4 に 240~320 nm 領域の rHb Thr-β145 (実線) の CD スペクトルを Hb A（点線）と比較して示した。rHb Thr-β145 の 260 nm の CD バンドは oxy 型、deoxy 型ともに Hb A と一致し、アミノ酸置換によるヘムへの影響はほとんどないと考えられる。一方、rHb Thr-β145 の 287 nm の負の CD バンドは Hb A に比べて小さく、Tyr-β145 がこの負の CD バンドの出現に関与していることが伺われた。図 5 は 270 ～ 300nm 領域の rHb His-β37（A）、rHb Ser-α42（B）、Hb Rouen（C）、および rHb Thr-β145（D）の CD（実線）を Hb A（点線）と比較して示した。rHb His-β37、Hb Rouen、および rHb Thr-β145 はいずれも oxy 型、deoxy 型ともに Hb A と比べると差がみられた。とくに Hb Rouen と rHb Thr-β145 では Hb A よりも負の CD バンドはかなり減少していた。一方、rHb Ser-α42 は oxy 型、deoxy 型において Hb A とほぼ同じ CD スペクトルを示した。oxy（R）型から deoxy（T）型に変化するとき、Hb A では 287 nm の楕円率（Δε）は 1.3 から-4.3 に変化し、その変化量（ΔΔε）は 5.6 である。それぞれの変異 Hb の 287 nm の楕円率の変化量を求め、Hb A の変化量と次式で比べることにより、4 つの芳香族アミノ酸の負の CD バンドへの寄与を見積もった。

[(Hb A のΔΔε) － (変異 Hb のΔΔε)] / (Hb A のΔΔε) × 100 (%)

その結果、Tyr-α42 と Trp-β37 の負の CD バンドへの寄与は小さく、C 末端近傍に

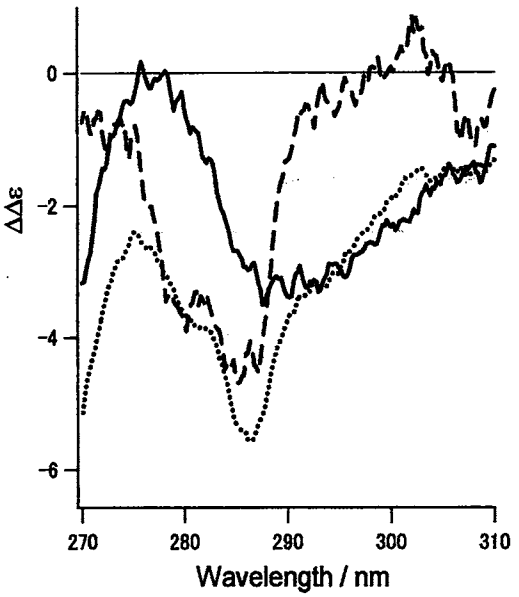

図 8. 287 nm の負の CD バンドへの三次構造変化と四次構造変化の寄与
実線, 三次構造変化; 点線, Hb A の酸素脱着による変化; 破線, 四次構造変化（算出方法は本文を参照)。

位置する Tyr が大きく寄与していた。Tyr-α42 と Trp-β37 は酸素脱着に伴い、水素結合を形成・解離するが、Hb 分子の内部に位置しているため疎水性環境の変化は小さいと考えられる。それに対し、塩橋を形成することにより T 型構造を安定化している C 末端の近傍にある Tyr 残基（α140 とβ145）の疎水性環境は塩橋の解離によって大きく変化することが考えられ、その変化が主に負の CD バンドに反映していると考えられる。287 nm の CD バンドへの四次構造変化に伴うこれらの 4 残基の寄与の合計を図 6（実線）に Hb A の deoxy-minus-oxy 差スペクトルと比較して示した。この図から明らかなように 4 残基の寄与を合計したスペクトルは Hb A の負の CD バンドの低波数側にはよく一致するが、高波数側では大きくはずれる。この差は酸素結合に伴う三次構造変化によるものかもしれないと考え、単離したサブユニット（単離α鎖と単離β鎖）の CD スペクトルを調べ三次構造変化の寄与を見積もった（図 7)。α鎖（A）とβ鎖（B）は異なった CD スペクトルを示すが、再構成すると Hb A の CD と一致する。単離鎖においても 280~300 nm 領域で酸素脱着によるスペクトル変化が認められた。図 7C に単離鎖の CD を算術平均したスペクトル（点線）と再構成した Hb（実線）の CD を比較した。算術平均スペクトルは 260 nm の CD は再構成 Hb と一致していたが、287 nm の負の CD バンドは再構成 Hb の約半分と小さかった。図 8 に酸素結合に伴う単離鎖の CD バンドの変化の差（実線）を酸素結合に伴う Hb A の CD バンドの変化（点線）と Tyr-α42、Trp-β37、Tyr-α140、および Tyr-β145 の四次構造変化への寄与を合計したスペクトル(破線)とを比較して示した。この図で明らかなように、サブユニットの CD バンドの変化、つまり三次構造変化に伴う CD の変化は上記の芳香族アミノ酸 4 残基の寄与（四次構造変化）と Hb A のスペクトルの差を埋めるものであった。以上の結果を統合すると、Hb A の酸素脱着による CD の変化は四次構造変化と三次構造変化の両方からなることが本研究により初めて明らかとなった。

学位論文審査結果の要旨

ヘモグロビン（Hb）のもつ協同的酸素結合のメカニズムを追求する論文は数多くあるが、その詳細については未だ不明な点が多い。本論文はHbの高次構造変化と機能との相関を明らかにするため、Hbの高次構造変化を円二色性（CD）と共鳴ラマン分光により解析した論文である。グロビン蛋白のどの部分がその協同性の鍵を握っているかを調べるため、多くの天然変異Hb及び遺伝子組換えによる人工変異Hbを用いているのも本研究の特徴である。そのため患者溶血液から異常Hbを分離精製する方法、大腸菌によるHbの発現、変異導入、菌体からのHbの精製法等を確立した。まず最初にヘムと周辺アミノ酸との関わりあいを調べるため、ヘム周辺に変異を有するHbMを用いてそのヘムの構造を共鳴ラマン分光で調べた。その結果、α鎖異常HbMとβ鎖異常HbMの間にみられたヘムの還元性や酸素結合機能の相違は、アミノ酸置換が与えるヘム面の歪みや側鎖への影響の違いが原因であることを明らかにした。次にサブユニット接触面やC末端付近アミノ酸の酸素結合による構造変化を近紫外域CDによって追求した。その結果、deoxyHbにのみみられる顕著な負のCD帯は4次構造マーカーバンドとされているが、従来考えられていたサブユニット間水素結合によるのではなくC末端付近アミノ酸の疎水性環境変化によることを明らかにした。以上、本研究によりヘモグロビンの構造変化と機能に関して多くのことを明らかにし、それらの知見は当該分野の研究発展に大いに寄与するものと考えられる。従って、本審査会は本論文が博士論文として妥当であると判断した。