

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

著者	Jin Yayoi
著者別名	神, 弥生
journal or publication title	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
volume	平成18年1月
page range	41-49
year	2006-01-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/16703">http://hdl.handle.net/2297/16703</a>

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  $\alpha$  or  $\beta$  subunit. The  $\alpha$ -abnormal Hb M's (Iwate and Boston) show physiological properties different from the  $\beta$ -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  $\alpha$ -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 suggested to arise from the hydrogen bond formation of Tyr- $\alpha$ 42 or Trp- $\beta$ 37 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- $\alpha$ 140 $\rightarrow$ His) and three recombinant (r) Hbs (rHb Ser- $\alpha$ 42, rHb His- $\beta$ 37, and rHb Thr- $\beta$ 145) revealed that environmental alterations of Tyr- $\alpha$ 140 and  $\beta$ 145 are primarily responsible for the negative CD band rather than the formation of the intersubunit hydrogen bonds by Tyr- $\alpha$ 42 and Trp- $\beta$ 37. 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 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) 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<sup>1</sup>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、 $\alpha\beta$ 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 ( $\text{Fe}^{3+}$ , 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 [ $\alpha 87(\text{F8})\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$ ]、Boston [ $\alpha 58(\text{E7})\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$ ]、Hyde Park [ $\beta 92(\text{F8})\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$ ]、および Saskatoon [ $\beta 63(\text{E7})\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$ ]では、 $\alpha$ または $\beta$ 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 [ $\beta 67(\text{E11})\text{Val} \rightarrow \text{Glu}$ ]である。 $\beta$ 鎖異常 Hb M (Hyde Park, Saskatoon および Milwaukee) では異常 $\beta$ 鎖の還元性や正常 $\alpha$ 鎖の酸素親和性は Hb A とほぼ同様であるが、 $\alpha$ 鎖異常 Hb M (Iwate と Boston) では異常 $\alpha$ 鎖は極めて還元されにくく、正常 $\beta$ 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 ( $1680 \sim 1280 \text{ cm}^{-1}$ ) 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。 $\alpha$ 鎖異常 Hb M (Iwate と Boston) の異常鎖ヘムの面内骨格振動モード、 $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ 、 $\nu_2$  および  $\nu_{37}$  バンドはそれぞれ  $1625$ 、 $1570$ 、 $1589 \text{ cm}^{-1}$  にみられ、metHb A に比べ  $4 \sim 9 \text{ cm}^{-1}$  高波数シフトしていた。一方、 $\beta$ 鎖異常 Hb M (Hyde Park, Saskatoon, および Milwaukee) の異常鎖ヘムではこれ

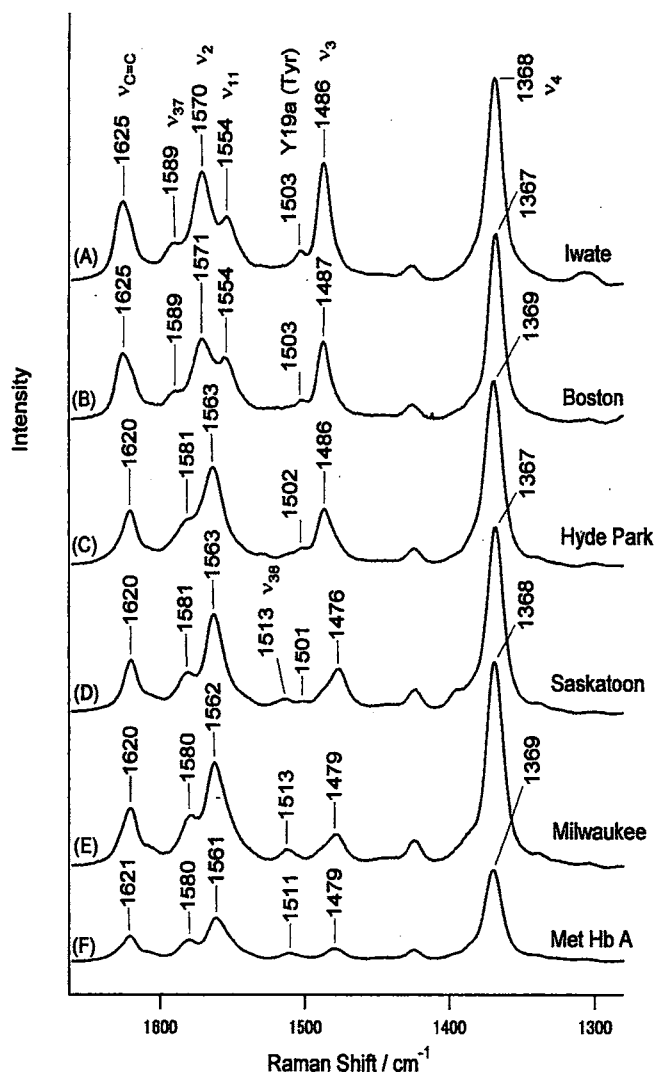


図1. Hb M Iwate (A)、Boston (B)、Hyde Park (C)、Saskatoon (D)、Milwaukee (E)の異常鎖 (met型) および metHb A (F)の高波数領域 406.7-nm 励起共鳴ラマンスペクトル Hb、50  $\mu$ M (ヘム濃度)、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0 の条件で測定した。

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  $\nu_3$  バンドは、Hb M Iwate、Boston、および Hyde Park の異常鎖ヘムでは 1486~1487  $\text{cm}^{-1}$  に、Hb M Saskatoon と Milwaukee では 1476~1479  $\text{cm}^{-1}$  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  $\text{cm}^{-1}$  領域ラマンスペクトルを示した。 $\alpha$ 鎖異常 Hb M Boston では面外骨格振動モード、 $\nu_{15}$  バンドの強度が著しく

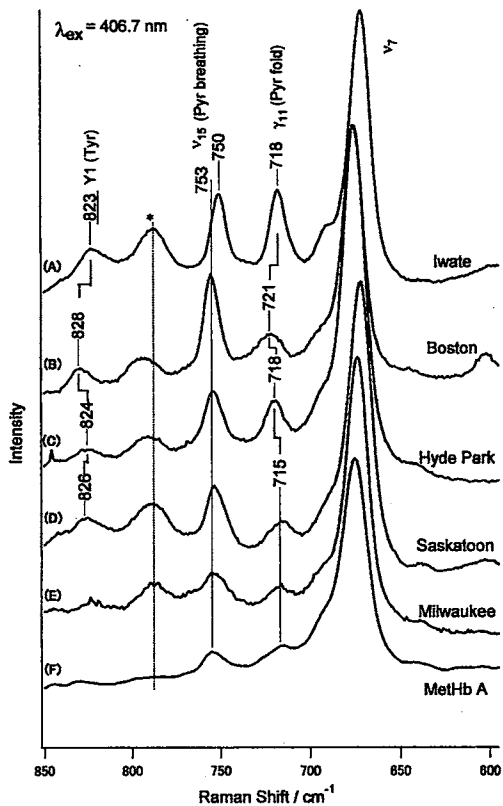


図2. Hb M Iwate (A)、Boston (B)、Hyde Park (C)、Saskatoon (D)、Milwaukee (E)および metHb A (F) の 850~600  $\text{cm}^{-1}$  領域 406.7-nm 励起共鳴ラマンスペクトル 図1と同じ条件で測定した。

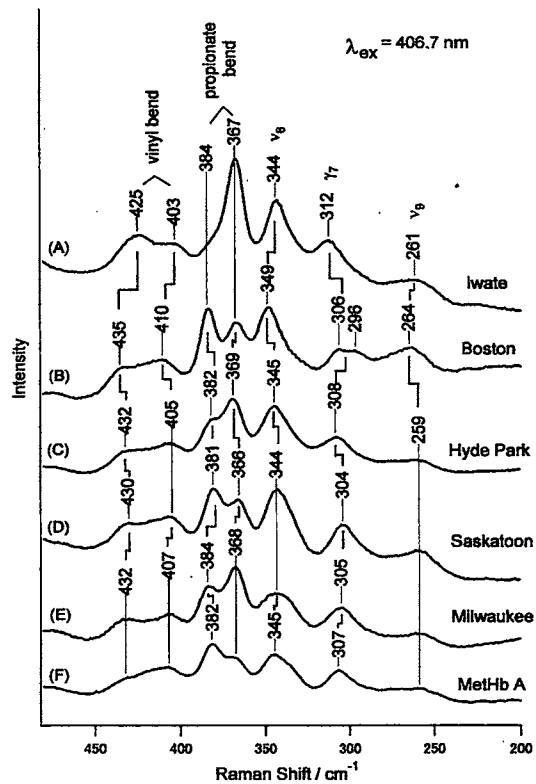


図3. Hb M Iwate (A)、Boston (B)、Hyde Park (C)、Saskatoon (D)、Milwaukee (E)および metHb A (F) の 480~200  $\text{cm}^{-1}$  領域 406.7-nm 励起共鳴ラマンスペクトル 図1と同じ条件で測定した。

増加していた。さらに $\alpha$ 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 $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\delta)_{2,4}$  バンドは 425 と 403  $\text{cm}^{-1}$  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  $\text{cm}^{-1}$  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 $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\delta)_{6,7}$  バンドは Hb M Iwate では 367  $\text{cm}^{-1}$  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 367  $\text{cm}^{-1}$  の2本のバンドに分裂し

た。一方、 $\beta$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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  $\text{cm}^{-1}$  に  $\nu_3$  バンドを、215  $\text{cm}^{-1}$  にヘム鉄と His の結合を示す伸縮振動モード、 $\nu_{\text{Fe-His}}$  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、 $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 0.6 Å 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  $\alpha$ 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- $\alpha$ 42 と Trp- $\beta$ 37 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- $\alpha$ 42 (Tyr- $\alpha$ 42 $\rightarrow$ Leu) と Hb Kansas (Asn- $\beta$ 102 $\rightarrow$ Thr) を用いて調べた。rHb Leu- $\alpha$ 42 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- $\alpha$ 42 の四次構造は deoxy 型でも R 型であると考えられる。rHb Leu- $\alpha$ 42 は oxy 型で Hb A と同じ CD スペクトルを示したが、deoxy

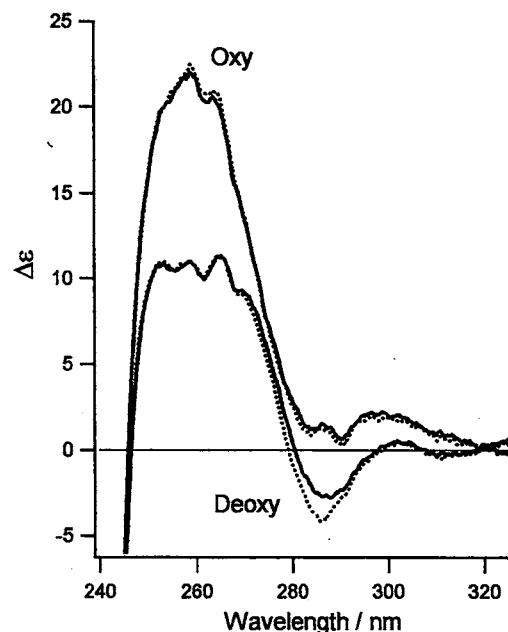


図 4. リコンビナント(r)Hb Thr- $\beta$ 145 (実線) と Hb A(点線)の near-UV CD スペクトル

Hb, 50  $\mu$ M (ヘム濃度)、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0、25°C で測定し、積算 60~80 回を平均化した。実線, rHb Thr- $\beta$ 145; 点線, Hb A.

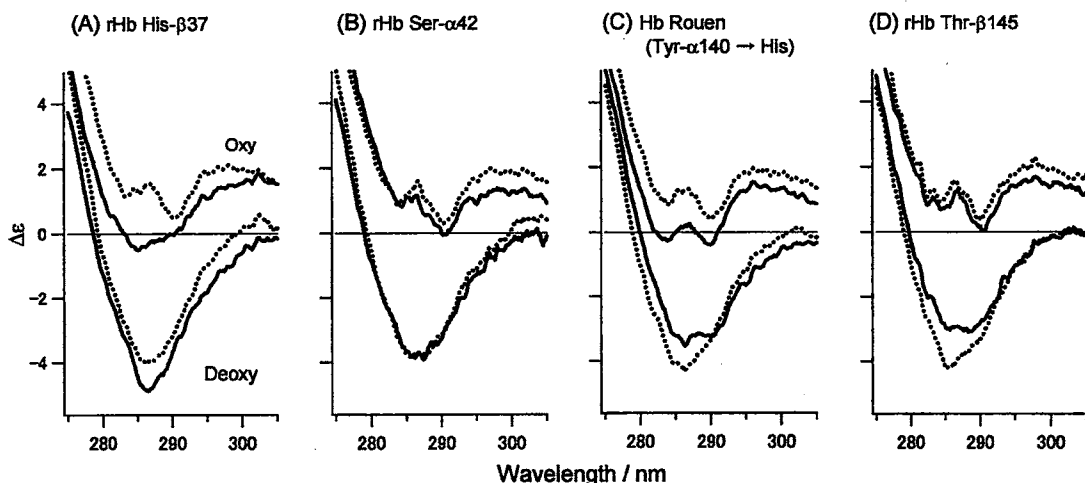


図 5. 270~300 nm 領域における変異 Hb (実線) と Hb A (点線) の CD バンド (A), rHb His-β37; (B), rHb Ser-α42; (C), Hb Rouen; (D), rHb Thr-β145.

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  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットの接触面に位置する Tyr- $\alpha 42$  と Trp- $\beta 37$  および C 末端から 2 番目に位置する Tyr ( $\alpha 140$  と  $\beta 145$ ) 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- $\alpha 42$  (Tyr- $\alpha 42 \rightarrow$  Ser)、rHb His- $\beta 37$  (Trp- $\beta 37 \rightarrow$

His)、rHb Thr- $\beta 145$  (Tyr- $\beta 145 \rightarrow$  Thr) と天然変異体、Hb Rouen (Tyr- $\alpha 140 \rightarrow$  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

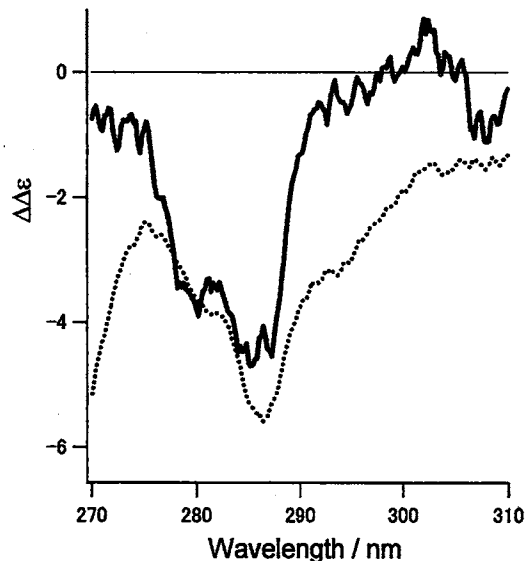


図 6. 酸素結合・解離に伴う CD の変化  
実線, 4 残基の四次構造変化への寄与の合計;  
点線, Hb A の変化

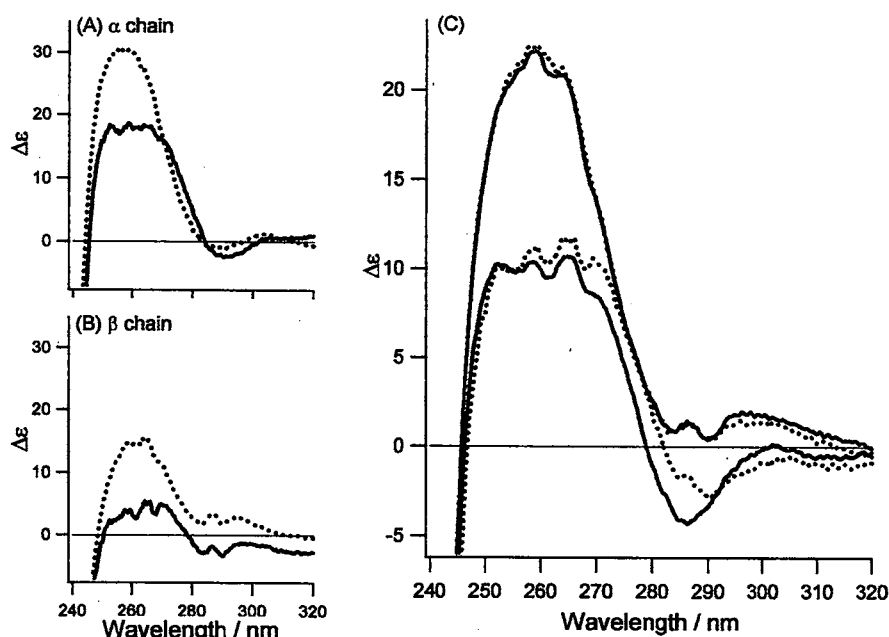


図7. Hbの単離鎖と再構成HbのCDの比較  
 Oxy型(点線)とdeoxy型(実線)における単離 $\alpha$ 鎖(A)と単離 $\beta$ 鎖(B)のCDスペクトルおよび単離鎖の算術平均によるスペクトル(点線)と再構成HbのCDスペクトル(実線)の比較(C)。

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- $\beta$ 145(実線)のCDスペクトルをHb A(点線)と比較して示した。rHb Thr- $\beta$ 145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- $\beta$ 145の287 nmの負のCDバンドはHb Aに比べて小さく、Tyr- $\beta$ 145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- $\beta$ 37(A)、rHb Ser- $\alpha$ 42(B)、Hb Rouen(C)、およびrHb Thr- $\beta$ 145(D)のCD(実線)をHb A(点線)と比較して示した。rHb His- $\beta$ 37、Hb Rouen、およびrHb Thr- $\beta$ 145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- $\beta$ 145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- $\alpha$ 42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の橢円率( $\Delta\epsilon$ )は1.3から-4.3に変化し、その変化量( $\Delta\Delta\epsilon$ )は5.6である。それぞれの変異Hbの287 nmの橢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。

$$\frac{[(\text{Hb A の } \Delta\Delta\epsilon) - (\text{変異 Hb の } \Delta\Delta\epsilon)]}{(\text{Hb A の } \Delta\Delta\epsilon)} \times 100 (\%)$$

その結果、Tyr- $\alpha$ 42とTrp- $\beta$ 37の負のCDバンドへの寄与は小さく、C末端近傍に



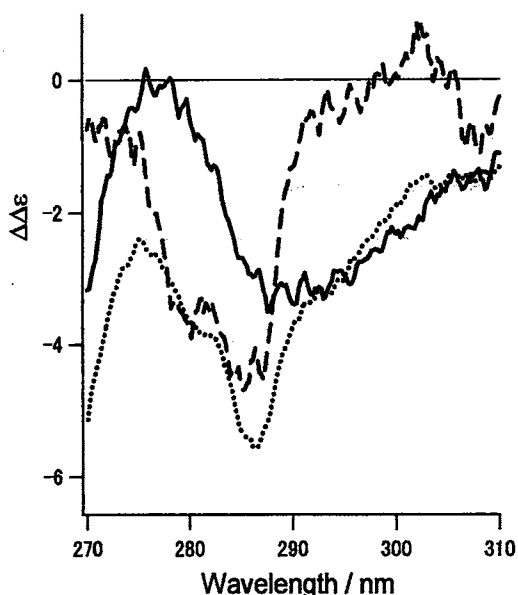


図 8. 287 nm の負の CD バンドへの三次構造変化と四次構造変化の寄与  
 実線, 三次構造変化; 点線, Hb A の酸素脱着による変化; 破線, 四次構造変化 (算出方法は本文を参照)。

位置する Tyr が大きく寄与していた。Tyr- $\alpha$ 42 と Trp- $\beta$ 37 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 ( $\alpha$ 140 と  $\beta$ 145) 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 $\alpha$ 鎖と単離 $\beta$ 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)。 $\alpha$ 鎖 (A) と  $\beta$ 鎖 (B) は異なる 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- $\alpha$ 42、Trp- $\beta$ 37、Tyr- $\alpha$ 140、および Tyr- $\beta$ 145 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は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合いを調べるため、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、 $\alpha$ 鎖異常 HbM と  $\beta$ 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。