

トピックス

# 無脊椎動物巨大ヘモグロビンの deoxy 型構造

沼本修孝 東京医科歯科大学難治疾患研究所  
中川太郎 長浜バイオ大学  
福森義宏 金沢大学理工研究域  
三木邦夫 京都大学大学院理学研究科

## 1. はじめに

動物細胞はエネルギー源として酸素を必要とするが、外界から取り入れた酸素を全身の細胞までくまなく運搬するタンパク質がヘモグロビン (Hb) である。すべての Hb は、150 残基前後のサブユニット (グロビン鎖) の会合体で、そのサブユニットの構造は、N 末端から順に A から H までのヘリックスから構成されるグロビンフォールドである。それぞれのグロビン鎖中にはヘムが 1 分子存在しており、酸素はこのヘムの鉄原子に結合 (配位) して運搬される。

ヒトを含めた脊椎動物の Hb は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖からなる  $\alpha_2\beta_2$  のホモ四量体である。その研究の歴史は長く、特に四つある酸素結合部位が互いに影響を及ぼしあう、いわゆるアロステリック効果の分子機構について議論がなされてきた。現在のところ、酸素結合型 (oxy 型) と酸素非結合型 (deoxy 型) の結晶構造 (図 1) から明らかになった四次構造変化による説明<sup>1)</sup> が、一般に広く受け入れられている。

一方で動物のなかでも多数を占める無脊椎動物の Hb は、ホモ二量体から、場合によっては百量体をはるかに超える会合体を形成するものまで、非常に多種多様である。図 1 に、これまで構造決定がなされた主な Hb を示す。いずれも、脊椎動物 Hb のものとはまったく異なった会合様式を示し、どのような機構でアロステリック効果を実現しているのかに興味もたれる。しかしながら、oxy 型と deoxy 型の双方の結晶構造を決定したうえで詳細な議論がなされている例は、アカガイ由来のホモ二量体 Hb<sup>2)</sup> の他はほとんど見あたらない。

筆者らは、無脊椎動物 (海産環形動物) のもつ分子量約 40 万 (24 グロビン鎖) の巨大ヘモグロビンの構

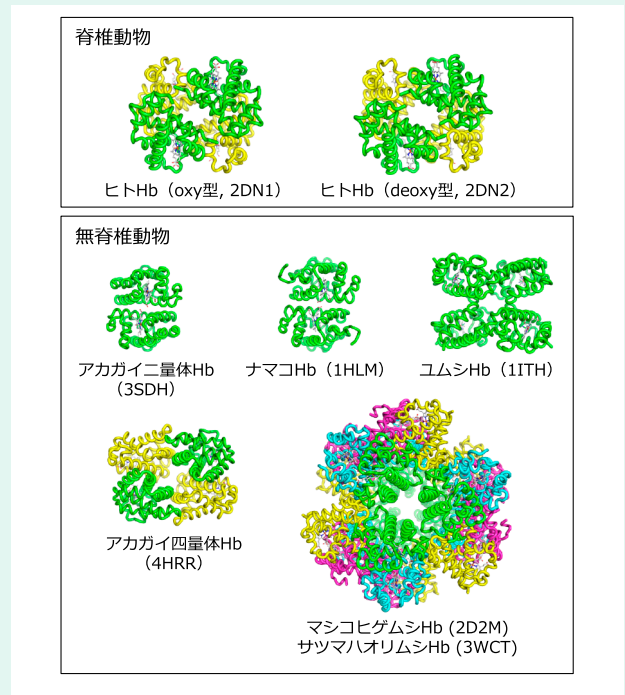


図 1 結晶構造が報告されている脊椎動物および無脊椎動物の Hb. アミノ酸配列の異なるグロビン鎖については色を変えて示している。

造解析に取り組んできた。この過程で、まず oxy 型の構造を決定<sup>3),4)</sup> していたが、最近 deoxy 型の構造決定を行うことができた<sup>5)</sup>。このような多数のグロビン鎖からなる Hb について、oxy 型と deoxy 型の結晶構造が決定されたのは初めてであり、脊椎動物とは異なったアロステリック機構の議論ができるようになった。

## 2. 巨大ヘモグロビンの deoxy 型構造解析の試み

我々が研究対象としている巨大 Hb のほかにも、ミズゴカイなども類似の巨大 Hb をもつことが以前

### Deoxygenated Structure of Invertebrate Giant Hemoglobin

Nobutaka NUMOTO<sup>1</sup>, Taro NAKAGAWA<sup>2</sup>, Yoshihiro FUKUMORI<sup>3</sup> and Kunio MIKI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

<sup>2</sup>Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

<sup>3</sup>College of Science and Engineering, Kanazawa University

<sup>4</sup>Graduate School of Science, Kyoto University

より知られていた。それらの結晶構造解析の取り組みも 1980 年代ごろより行われていたが、その巨大な分子量ゆえに難航していた。2000 年代なかばになりにはわかに状況が変わり、これら巨大 Hb の結晶構造が相次いで報告<sup>6,8)</sup>されるようになった。筆者らも、まず 2005 年にマシコヒゲムシ由来巨大 Hb の oxy 型の結晶構造を報告した。この巨大 Hb は、4 種類のグロビン鎖から構成され、これらが 6 個ずつ会合した 24 量体の球状構造 (図 1) であった<sup>3)</sup>。ほぼ同時期に他のグループにより類似の巨大 Hb の結晶構造も報告<sup>6,7)</sup>されたが、いずれも oxy 型と同一の構造であった。その後筆者らも oxy 型や酸素が一部解離した状態での構造をより高分解能で報告<sup>4,9)</sup>したが、完全な deoxy 型での構造は決定されないままであった。これは巨大 Hb の酸素親和性が非常に高く、通常的环境下で試料調製と結晶化を行った場合 oxy 型が非常に安定であり、酸素を解離させて deoxy 型を安定的に調製することが難しかったことが主な原因である。

筆者らは巨大 Hb の deoxy 型結晶を得るべく様々な手法を試す中で、サツマハオリムシ由来巨大 Hb (V2Hb) を用いて、soaking 法により deoxy 型結晶を作製する方法を確立した。V2Hb の oxy 型結晶をまず調製し、これを PEG と dithionite 濃度を漸進的に高めた溶液に順次 soaking することで、結晶状態を保ったまま deoxy 型へ移行させることが可能であった。ここで PEG は結晶化の沈殿剤と抗凍結剤を兼ねたものであり、dithionite は様々な Hb で一般的に用いられている還元剤である (酸素を解離させる効果がある)。この方法により、V2Hb の oxy 型、deoxy 型双方の結晶構造を、それぞれ 2.4、2.9 Å 分解能で決定することに成功した<sup>5)</sup>。これにより、巨大 Hb のアロステリック機構を議論する構造基盤が初めて得られた。

### 3. 巨大ヘモグロビンの oxy-deoxy 間構造変化

サツマハオリムシ V2Hb の oxy 型と deoxy 型の構造を比較したところ、まず各々のグロビン鎖で共通の特徴がみられた。すなわち、ヘムに結合した酸素のすぐ真上に位置している Val 残基が、deoxy 型構造では酸素に向かって大きくせり出しており、立体障害により酸素結合を妨げていることが明らかになった (図 2a)。この Val 残基は E ヘリックスの中ほどに位置し、A ヘリックスの下流に位置するループ領域が隣接している。このループ領域の Tyr (一部のグロビン鎖では Trp) のコンフォメーション変化と、Val のせり出しが強く連動していることがわかった (図 2b)。ほぼ同様のコンフォメーション変化の連動が、巨大

Hb を構成する 4 種類のグロビン鎖すべてで共通してみられた。

さらにグロビン鎖間の構造変化 (四次構造変化) に着目すると、ヘムを向い合わせるように会合している二つのグロビン鎖間で構造変化の連鎖がみられた (図 2c)。巨大 Hb は 4 種のグロビン鎖から構成されるが、それぞれ 2 種が良く似た二量体を形成している。これらはヘムを挟み込むように位置する E と F ヘリックスを、互いに向き合うように会合しているため、EF ダイマーと呼ばれている。この EF ダイマーの接触領域において、一方のグロビン鎖でヘムに酸素が結合 (または解離) すると、そのヘム周辺にコンフォメーション変化が生じる。すると、これと直接接触している、隣のグロビン鎖の F ヘリックスのコンフォメーションの変化を促していることがわかった。F ヘリックスはヘムを配位しているため、F ヘリックスのコンフォメーション変化は当然ヘム周辺のコンフォメーション変化につながる。このようにして、隣のグロビン鎖においても図 2a と同様なヘム周辺のコンフォメーション変化が促されるものと考えられた。ヘム周辺でグロビン鎖界面の接触に関与しているアミノ酸残基は、他の種由来の巨大 Hb の間でも大部分がよく保存されている。すなわち、このような構造変化の伝達機構は巨大 Hb に共通していることを強く示唆し

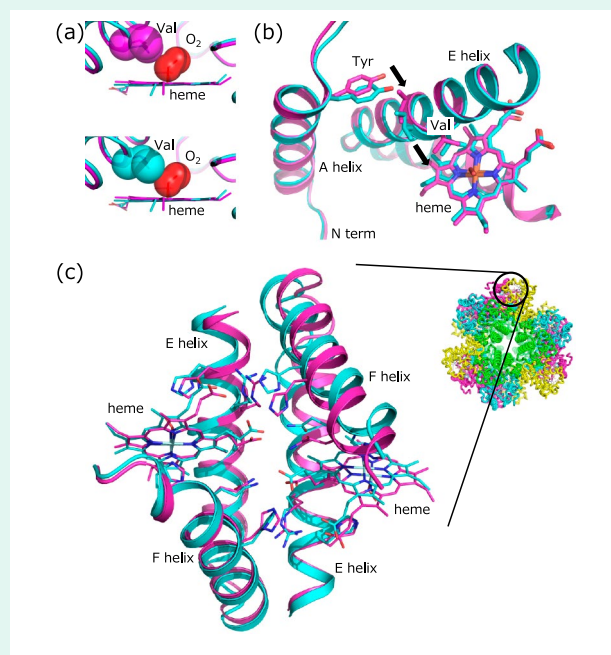


図 2 V2Hb の oxy-deoxy 間構造変化。Oxy 型をマゼンタ、deoxy 型をシアンで示す。(a) 酸素結合部位周辺の重ね合わせ。(b) AB ループ領域と Val の構造変化の連動。(c) 隣り合うグロビン鎖界面での構造変化。

ている。したがって、この領域が巨大 Hb におけるアロステリック機構の最も重要な部分を担っているものと考えている。

最後に、24 量体全体での四次構造変化をみてみると、分子全体の対称構造を崩すことなく互いのグロビン鎖の配向を変化させていた（文献 5 の Supplementary Movie を参照）。巨大 Hb は分子内に 3 回対称と 2 回対称をもつ球状の分子構造をしている。構造の変化はこれら対称軸付近では小さく、対称軸から離れるにつれ構造変化の度合いが大きくなっていった。このように分子内の対称軸を損なうことなく構造を変化させるため、V2Hb は結晶状態を保ったまま oxy 型から deoxy 型へ移行することができたと考えられる。

#### 4. | おわりに

無脊椎動物の巨大 Hb について、初めて deoxy 型構造を決定することができ、oxy 型との比較が議論できるようになった。さらに筆者らの deoxy 型結晶の作成方法を応用すれば、oxy 型と deoxy 型の中間状態の結晶も作成できるものと考えられる。長い Hb の研究の中でも、oxy 型と deoxy 型の双方の結晶構造が決定されている例は数種ほどに過ぎない。さらにその中間状態での構造解析となると、ヒト Hb でようやく昨年報告<sup>10)</sup>されたほかにほとんど報告例がない。巨大 Hb のように、多数のグロビン鎖からなる Hb で oxy 型と deoxy 型の間の種々の中間構造を明らかにできれば、Hb のアロステリック機構の理解が一段と進むものと期待される。

#### 謝 辞

本研究は、京都大学原子炉実験所の喜田昭子博士、海洋研究開発機構の吉田尊雄博士、丸山正博士、法政大学の今井清博博士（2013 年退職）との共同研究である。また本研究の大部分は、沼本については前所属の金沢大学および京都大学で、中川については前所属の金沢大学および法政大学で行われたものである。

#### 文 献

- 1) Perutz, M. F. (1970) *Nature* **228**, 726-734. DOI: 10.1038/228726a0.
- 2) Royer, W. E. Jr. (1994) *J. Mol. Biol.* **235**, 657-681. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1019.
- 3) Numoto, N. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14521-

14526. DOI: 10.1073/pnas.05015411102.

- 4) Numoto, N. *et al.* (2008) *Biochemistry* **47**, 11231-11238. DOI: 10.1021/bi8012609.
- 5) Numoto, N. *et al.* (2014) *Acta Crystallogr.* **D70**, 1823-1831. DOI: 10.1107/S1399004714008475.
- 6) Strand, K. *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* **344**, 119-134. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.08.094.
- 7) Flores, J. F. *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2713-2718. DOI: 10.1073/pnas.0407455102.
- 8) Royer, W. E. Jr. *et al.* (2006) *Structure* **14**, 1167-1177. DOI: 10.1016/j.str.2006.05.011.
- 9) Numoto, N. *et al.* (2008) *Proteins* **73**, 113-125. DOI: 10.1002/prot.22040.
- 10) Shibayama, N. *et al.* (2014) *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5097-5105. DOI: 10.1021/ja500380e.



沼本修孝

#### 沼本修孝（ぬもと のぶたか）

東京医科歯科大学難治疾患研究所助教

2004 年京都大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程単位認定取得退学、同年京都大学産学官連携研究員、05 年博士（理学）、07 年金沢大学博士研究員、10 年京都大学特定助教、12 年より現職。

研究内容：構造生物学

連絡先：〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

E-mail: numoto.str@mri.tmd.ac.jp



中川太郎

#### 中川太郎（なかがわ たろう）

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部助手

2004 年金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻（博士後期課程）修了、博士（理学）、同年金沢大学理学部博士研究員、08 年法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター博士研究員、11 年より現職。

研究内容：機能生物学

連絡先：〒526-0829 滋賀県長浜市田村町1266番地

E-mail: t\_nakagawa@nagahama-i-bio.ac.jp



福森義宏

#### 福森義宏（ふくもり よしひろ）

金沢大学理事・副学長

1980 年大阪大学大学院理学研究科生理学専攻修了。理学博士。大阪大学理学部、東京工業大学理学部、同生命理工学部を経て、97 年金沢大学理学部教授、2014 年より現職。

研究内容：磁性細菌オルガネラの構造機能関連の解明

連絡先：〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: fukumor@staff.kanazawa-u.ac.jp



三木邦夫

#### 三木邦夫（みき くにお）

京都大学大学院理学研究科教授

1977 年大阪大学大学院工学研究科前期課程修了、78 年大阪大学工学部助手、91 年東京工業大学資源化学研究所助教授、94 年より現職。

研究内容：タンパク質結晶学、構造生物学

連絡先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

E-mail: miki@kuchem.kyoto-u.ac.jp