

ヘモグロビンの酸素結合解離にともなう近紫外 CD の変化： 三次構造と四次構造変化の寄与

○安藝・神 弥生¹、長井幸史¹、今井清博^{1,2}、長井雅子^{1,2}

¹法政大・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター、²法政大・工・生命機能
pd0005@k.hosei.ac.jp

【序】成人ヘモグロビン (Hb A) の効率の良い酸素運搬は、酸素親和性の低い tense (T) 型と酸素親和性の高い relaxed (R) 型の 2 つの四次構造間を転移することによって行われているとされている。Hb A は deoxy (T) で 287 nm に負の CD バンドを示すが oxy (R) では消失することから、この負の CD バンドは T 型構造マーカーバンドと言われている[1]。その由来は、deoxy でのみサブユニット間で水素結合を形成する Tyr- α 42 または Trp- β 37 ではないかといわれているが確証はない。協同性を失った変異 Hb でもこの負の CD バンドは小さくなるものの完全には無くならないことから[2]、T 型マーカーバンドといえるかどうか議論のあるところである。本研究では T 型マーカーバンドに寄与するアミノ酸残基を明らかにするため、Tyr- α 42 と Trp- β 37、および C 末端から 2 番目に位置する Tyr (α 140 と β 145) の変異 Hb の近紫外 CD を解析した。また、この CD バンドへの三次構造変化の関与を調べるために、単離した α 鎖および β 鎖の酸素結合・解離に伴う CD の変化を調べた。

【方法】患者血液から精製した Hb Rouen (Tyr- α 140 $\rightarrow$ His) と、今回我々の研究室で新たに大腸菌で合成した人工変異体 (rHb) である rHb (Tyr- α 42 $\rightarrow$ Ser)、rHb (Trp- β 37 $\rightarrow$ His)、rHb (Tyr- β 145 $\rightarrow$ Thr) を用いた。有意な協同性を示し (Hill 係数 $n > 2.0$)、四次構造変化がおこると考えられる実験条件で、これらの変異体の CD を解析した。また、 α 鎖および β 鎖は Hb A から単離した。これらの CD を Jasco J-725 旋光分散計により 50 μ M (ヘム濃度)、0.1 M リン酸緩衝液、走査速度 50 nm/min、積算回数 60~80 回、25 $^{\circ}$ C で測定し、Mol. CD ($\Delta\epsilon/M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) で示した。

【結果と考察】図 1 に 275–305 nm の各変異 Hb の CD スペクトル (実線) を Hb A (点線) と比較して示した。rHb (Trp- β 37 $\rightarrow$ His)、Hb Rouen、および rHb (Tyr- β 145 $\rightarrow$ Thr) ではいずれも oxy、deoxy とともに Hb A とは異なる CD スペクトルがみられた。他方、rHb (Tyr- α 42 $\rightarrow$ Ser) は oxy、deoxy とともに Hb A と同様の CD スペクトルを示した。Hb A の酸素結合に伴う 287 nm の楕円率の変化量 [$\Delta\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_{287}(\text{deoxy}) - \Delta\epsilon_{287}(\text{oxy})$] 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、次式で Hb A と比較することにより、4 つの芳香族アミノ酸の T 型マーカーバンドへの寄与を計算し、図中 (%) に示した。

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

その結果、従来の予想に反して、Tyr- α 42 と Trp- β 37 の寄与は小さく、C 末端近傍の Tyr- α 140 と Tyr- β 145 の寄与が大きいことが判明した。Tyr と Trp の CD スペクトルは、モデル化合物による研究から、溶液の疎水性により顕著に変化するとされている。

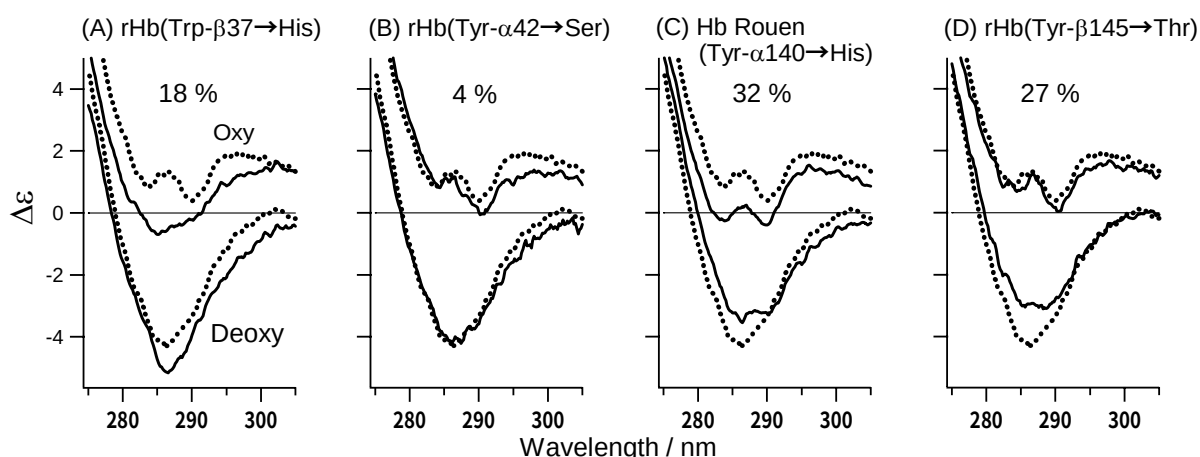


図 1. 275-305 nm 域における変異 Hb と Hb A の CD スペクトル
——, 変異 Hb; ·····, Hb A

Tyr-α42 と Trp-β37 は水素結合を形成しても、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。それに反し、C 末端から 2 番目にある Tyr 残基 (α140 と β145) の疎水性環境は、C 末端の塩橋の形成・切断に伴って大きく変化するので、その変化が主に負の CD バンドに反映しているのではないかと考えられる。

上記の 4 残基の T 型マーカーバンドへの寄与を (Hb A-変異 Hb) 差スペクトルから求め、その合計 (A) を Hb A の (deoxy-oxy) 差スペクトルに重ねて図 2 に示した。四次構造変化に伴う 4 残基の寄与は、Hb A の変化の短波長側 (280-290 nm) にはよく一致したが、長波長側 (290-300 nm) には合わなかった。この差は三次構造変化によるものかもしれないと考え、単離α鎖とβ鎖の CD から酸素解離に伴う三次構造変化を求めた。その三次構造変化に伴う CD の変化は図 2(B) に示すように、Hb A の変化の長波長側に位置していた。これらの結果は、T 型マーカーバンドといわれていた deoxyHb A の 287 nm の負の CD バンドはすべてが Hb の四次構造変化によるものではなく、三次構造変化も関与していることを示している。

【参考文献】

- [1] Perutz, M. F., Ladner, J. E., Simon, S. R., and Ho, C. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2163-2173.
- [2] Aki-Jin, Y., Nagai, Y., Imai, K., and Nagai, M. *ACS Symposium Book on "New Approaches in Biomedical Spectroscopy"*, in press.

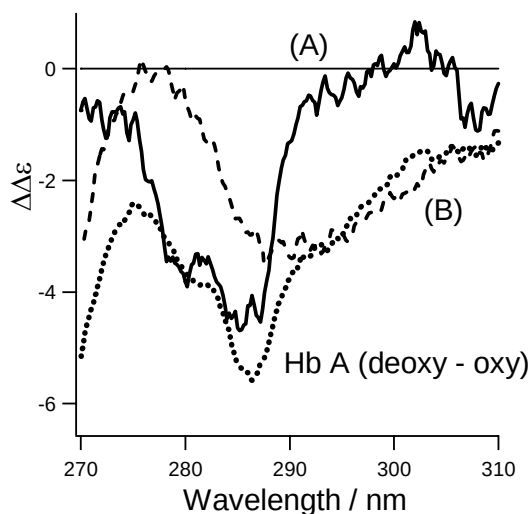


図 2. 287 nm の負の CD バンドへの四次構造変化と三次構造変化の寄与

(A) 芳香族アミノ酸 4 残基の寄与の合計 (四次構造変化の寄与); (B) α鎖とβ鎖の CD スペクトルの変化から求めた三次構造変化の寄与