

ヘム電子論によるヘモグロビンの協同的酸素結合機能の解明

著者	山本 泰彦
著者別名	Yamamoto Yasuhiko
発行年	2013
その他のタイトル	Elucidation of cooperative binding of oxygen to hemoglobin from the standpoint of the electronic theory of the heme cofactor
URL	http://hdl.handle.net/2241/120950

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655151

研究課題名（和文）ヘム電子論によるヘモグロビンの協同的酸素結合機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cooperative binding of oxygen to hemoglobin from the standpoint of the electronic theory of the heme cofactor

研究代表者

山本 泰彦 (YAMAMOTO YASUHIKO)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：00191453

研究成果の概要（和文）：血液の赤血球中に酸素運搬体として存在するヘモグロビンが示す高い酸素運搬能は、協同的酸素結合機能によって支えられている。私共は、ヘモグロビンにおいて酸素が結合する部位であるヘムの電子構造に着目し、従来の研究とはまったく異なる新しい観点で研究を行い、ヘム、ヘム鉄、そして軸配位子ヒスチジンの間の電子的な相互作用がヘモグロビンの協同的酸素結合機能の調節に重要であることを実証することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Hemoglobin is the heme-containing oxygen-transport protein in the red blood cell. Highly efficient oxygen-transport of hemoglobin is achieved by cooperative oxygen binding properties of the protein. In this study, molecular mechanism responsible for the cooperative oxygen binding of the protein has been investigated from the standpoint of a novel theory, i.e., the electron theory of the heme cofactor. The study revealed that electronic interaction among the heme π -system, the heme iron, and the F-bound histidine plays a crucial role in control of the cooperative oxygen binding of the protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ヘムタンパク質 ヘム電子構造 計算化学 NMR 機能解析 $\pi-\pi$ 相互作用
タンパク質の高次構造 マリケン電荷

1. 研究開始当初の背景

酸素運搬タンパク質ヘモグロビン (Hb) は、 α 鎖、 β 鎖と呼ばれる2種類のサブユニットが各2個ずつ、合計4個のサブユニットからなるタンパク質であり、各サブユニットは酸素分子 (O_2) の結合部位であるヘムを1分子ずつ含んでいる。X線結晶構造解析の結果から、Hbには、T状態とR状態と呼ばれる2種類の四次構造があることが示されており、生物化学の教科書では、「Hbの四次構造は、

O_2 分圧に応じてT状態とR状態の間で変化し、そのことによって各サブユニットに含まれるヘムの O_2 親和性が変化するため、Hbは協同的酸素結合を示す」と説明されている。教科書のこの記載内容は現象論的説明としては正しいが、化学的な説得力をもっていない。Hbの四次構造がどのような分子機構で各サブユニットに含まれるヘムの O_2 親和性に影響を及ぼしているのかが、説明されていないからである。生物化学の教科書に記載されて

いる定性的かつ現象論的説明から脱却することは、生命を担う生体分子の理解に生物化学が有用であるということを示すことになり、結果的にバイオサイエンスにおける化学のプレゼンスを高めることにつながると考えられる。本研究では、酸素貯蔵ヘムタンパク質ミオグロビン (Mb) の O_2 親和性および外部配位子識別はいずれもヘムの電子構造によって調節されることを実証した私共の研究成果 (*J. Am. Chem. Soc.* (2010)) に基づいて、Hb の協同的酸素結合の分子機構をヘム電子論に基づいて解析した。

2. 研究の目的

Hb の各サブユニットのヘム側鎖ビニル基のコンフォメーションは、 O_2 結合前後で変化することが X 線結晶構造解析により明らかになっている。ビニル基の π 平面は、 O_2 結合前はポルフィリン環の π 平面とほぼ共平面であるのに対して、 O_2 結合後には両平面はある二面角 (Ψ 、図 1B 参照) をなす配向になる。ビニル基とポルフィリン環の互いの π 電子系の相互作用 (π - π 相互作用) は Ψ に依存し、 $\Psi = \sim 0^\circ$ では、ビニル基はポルフィリン環 π 電子を求引するのに対して、 $\sim 90^\circ$ では逆にポルフィリン環に電子を供与すると考えられる。したがって、ヘムのポルフィリン環の π 電子密度およびヘム鉄原子の電子密度 (ρ_{Fe}) は、 O_2 結合前よりも O_2 結合後の方が大きいことが予想される。

私共は、Mb の O_2 親和性は ρ_{Fe} の減少に伴って低下することを明らかにしている (*J. Am. Chem. Soc.* (2010))。この知見に基づいて、上記 Hb の O_2 結合における O_2 親和性の変化を考えると、Hb の O_2 親和性は O_2 結合前よりも O_2 結合後の方が高いと結論づけることができる。この結論は、Hb の機能に関する既知の知見と一致する。そこで、本研究では、ヘムの側鎖ビニル基とポルフィリン環の π - π 相互作用の変化がヘムの電子構造や ρ_{Fe} に及ぼす影響に焦点を当て、Hb の協同的酸素結合機能の分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

まず、ヘムの電子構造がポルフィリン環 π 電子系と側鎖ビニル基 π 電子系の π - π 相互作用により受ける影響を密度汎関数法による計算化学で評価する。次に、 ρ_{Fe} を大きくかつ段階的に変えるために、ヘム側鎖として大きな電子求引性を示すトリフルオロメチル基 (CF_3) を有機合成で導入したフッ素化ヘムや化学修飾ヘム (図 2) を Hb のタンパク質部分に組み込み、 CF_3 導入に伴う ρ_{Fe} の変化が Hb の O_2 親和性や協同性の指標である Hi11 係数に与える影響を解析する。なお、フッ素化ヘムや化学修飾ヘムを Hb に組み込む際は、酸性水溶液中における Hb の変性を利用して、

Hb に含まれている天然のヘム (プロトヘム) を遊離させた後でタンパク質部分を単離し、得られたタンパク質水溶液の pH を約 7 に調整した後でフッ素化ヘムや化学修飾ヘムを加えるという再構成法を利用した。また、フッ素化ヘム再構成 Hb の機能測定の結果、ヘム側鎖としてビニル基が存在しなくても、Hb は小さいながらも協同的酸素結合機能を示すことが明らかになった。そこで、ヘム側鎖ビニル基のヘム平面に対するコンフォメーション変化がヘムの電子構造に与える影響に加えて、 O_2 結合前の Hb におけるヘムとタンパク質の相互作用がヘム電子構造の変化により受ける影響を明らかにするために、デオキシ Mb を用いて ρ_{Fe} とヘム鉄と軸配位子ヒスチジン (近位 His (His93)) の配位結合 (Fe-His 結合、図 3 左) の関係を解析した。

4. 研究成果

(1) 密度汎関数法による計算 ヘムのポルフィリン環に対するビニル基のコンフォメーションと ρ_{Fe} の関係を解明するために、モデル分子 (図 1A) のビニル基のコンフォメーション (図 1B) を系統的に変化させた構造について、 ρ_{Fe} の指標として利用できると考えられるマリケン電荷を密度汎関数法 (計算法と基底関数: rB3LYP/6-31G(d)) により計算した (図 1C)。計算結果では、予想通り、 ρ_{Fe} は、 $\Psi = 0^\circ$ で最少、そして $\Psi = 90^\circ$ で最大となり、ヘムの電子構造はヘム平面に対するビニル基のコンフォメーションに依存することが確認された。また、フッ素化ヘムのモデル分子でも同様にして ρ_{Fe} を見積もったところ、天然のヘムが側鎖としてもつ 2 つのビニル基のコンフォメーション Ψ が同時に 90° から 0° に変化する際に生じる ρ_{Fe} の

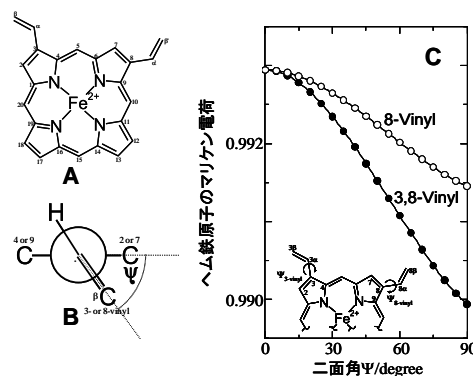


図 1. 計算に用いたモデル分子 (A)、ポルフィリン環に対するビニル基のコンフォメーションを規定する二面角 (Ψ) (B)、およびヘム鉄原子のマリケン電荷の Ψ 依存性 (C)。C で、○はビニル基 1 つ (8-Vinyl) の Ψ 、一方、●はビニル基 2 つ (3-および 8-Vinyl) の Ψ を同時に、 5° 刻みで変化させて求めた結果。

変化は、CF₃基1つの導入に伴う変化に匹敵する大きさであることが示唆された。

(2) CF₃導入Hbの調製と機能解析 ヘムのπ電子密度がHbの機能に及ぼす影響を解析するために、Hbの側鎖に大きな電子求引性を示すCF₃を導入して、ヘムに電子的摂動を与えた。本研究で使用したフッ素化ヘムおよび化学修飾ヘムを図2に示す。これらのヘムのうち、7-PFと2,8-DPは鈴木秋弘教授（長岡工業高等専門学校）、そして3,8-DMDは根矢三郎教授（千葉大学）から、それぞれ供給を受けた。これらのヘムを補欠分子族としてHbに導入した。

NMRによりこれらフッ素化ヘムと化学修飾ヘムがHbのタンパク質部分に正常に組み込まれることを確認した上で、これら再構成HbのO₂親和性および協同性の指標であるHi11係数を測定した。その結果、CF₃を1つ導入すると、O₂親和性は約1/2.2—1/6.3倍低下することが示された（未発表データ）。一方、協同性は天然のHbの約半分であり、導入したCF₃の数には存しなかった（未発表データ）。

本研究の目的は、ヘム側鎖ビニル基のヘム平面に対するコンフォメーション変化がρ_{Fe}に与える影響に着目してHbの協同的酸素結合機能を理解することであったが、ビニル基をもたないフッ素化ヘムでも小さな協同性を示すという実験結果が得られたことから、O₂結合前のHb（デオキシHb）におけるヘムとタンパク質の相互作用がヘム電子構造の変化により受ける影響を明らかにする研究を新たに計画した。このことにより、ヘム側鎖ビニル基のヘム平面に対するコンフォメ

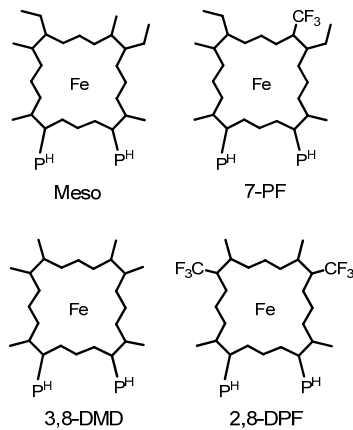


図2. 本研究で用いたフッ素化ヘムと化学修飾ヘム。P^Hはプロピオン酸基を表す。Mesoと7-PF、そして3,8-DMDと2,8-DPFで得られた実験結果を互いに比較検討することにより、それぞれCF₃1つそして2つの導入がHbの機能と構造に及ぼす影響を明らかにすることができる。

ーションの変化がρ_{Fe}に与える影響に加えて、ρ_{Fe}の変化がデオキシHbにおけるヘムとタンパク質の相互作用に与える影響に基づいて、Hbの協同的酸素結合機能の発現機構を明らかにすることが可能となった。

(3) ヘム電子構造の変化がデオキシMbのFe-His結合に与える影響 デオキシMbに関する有用な情報を得るために、まず、デオキシMbを用いてρ_{Fe}とFe-His結合の関係の解析を行った。Mbでは、Hbの場合と異なり、サブユニットを区別する必要がない上に、種々の測定法により高感度で解析できる点が、本研究目的の遂行には好都合である。デオキシMbにおけるO₂結合前のヘムは外部軸配位子をもたない5配位状態として存在する（図3左）。したがって、ヘム鉄の反応性（外部配子親和性）を電子的に調節する因子としては、Fe-His配位結合がある。デオキシMbの、Fe-His配位結合の解析は、共鳴ラマン分光法により測定できるFe-His伸縮振動数（ν_{Fe-His}）に基づいて行った。CF₃を導入して、ρ_{Fe}を減少させれば、Fe-His配位結合の強度が増大することは、密度汎関数法による計算結果から予想していたが、ν_{Fe-His}に基づく解析により実証された。また、ρ_{Fe}の指標として、一酸化炭素（CO）結合型のMbで観測されるヘム鉄に結合したCOの伸縮振動数（ν_{CO}）が利用できることを明らかにした。COがヘム鉄に結合するとFe²⁺-C≡O ↔ Fe²⁺=C=Oの共鳴が起き、ρ_{Fe}の減少はこの共

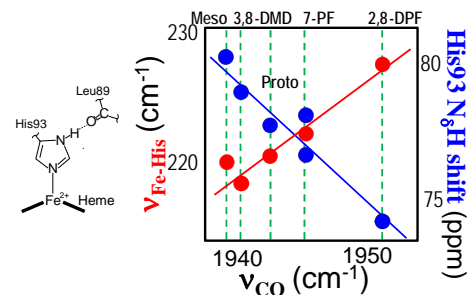


図3. デオキシMbのヘム鉄の配位構造（左）とMbにおけるρ_{Fe}の指標であるヘム鉄に結合したCOの伸縮振動数（ν_{CO}）に対するデオキシMbのFe-His伸縮振動数（ν_{Fe-His}）（●）およびHis93 N₈Hプロトンに由来するNMRシグナルのシフト値（●）のプロット（右）。ν_{Fe-His}とN₈Hシフトはいずれもρ_{Fe}に依存することが実証された。ρ_{Fe}の減少により、ν_{Fe-His}は増大するのに対してN₈Hシフトは逆に小さくなることから、ρ_{Fe}の変化は、His93のイミダゾール環の電子的な性質に影響を与え、さらに、His93とLeu89の水素結合にも影響を及ぼしていることが明らかになった（詳細は、本文参照）。

鳴の平衡を左に偏らすことになり、 ν_{CO} は増大するため、結果的に、 ν_{CO} は ρ_{Fe} を反映することになる。 ρ_{Fe} を鋭敏に反映する測定可能な物理量を見いだすことは、本研究にとって不可欠であることから、この研究成果は、今後の研究にとって極めて有用であると言える。

ν_{CO} に対する $\nu_{\text{Fe-His}}$ のプロット(図3右)からわかる通り、 ρ_{Fe} の減少に伴いFe-His配位結合の強度が増大することが明らかになった。一方、 ν_{CO} に対するHis93 N_δHプロトンに由来するNMRシグナルのシフト値(N_δHシフト)は、Fe-His配位結合の強度の増大に伴って、減少した。約80 ppmにおよぶN_δHシフトの大きさは、デオキシMbのヘム鉄に存在する不対電子による常磁性シフトのためである。上述の通り、 $\nu_{\text{Fe-His}}$ の解析からは、 ρ_{Fe} の減少に伴いFe-His配位結合の強度が増大することが示されたことから、当初、Fe-His配位結合の強度の増大に伴いN_δHシフトも増大することを予想したが、その予想に反して、N_δHシフトは減少した。この結果は、Fe-His配位結合の強度の増大によりFe-His配位結合を介してヘム鉄からHis93のイミダゾール環に非局在化する不対電子密度は増大するものの、His93イミダゾール環からN_δHプロトンへの不対電子の非局在化が阻害されていることを示唆している。図3左に示す通り、His93 N_δHはLeu89のカルボニル酸素原子と水素結合(His93-Leu89水素結合)を形成している。したがって、His93-Leu89水素結合の強度が増大すると、His93 N_δHの酸性度が増大し、結果的にHis93 N_δ-H結合を介した不対電子の非局在化が阻害されると考えられる。このように、ヘムの電子構造の変化は、軸配位子His93のイミダゾール環の電子的な性質に影響を与え、そのことがHis93-Leu89水素結合にも影響を与えると考えられる。この予想は、1,2-ジメチルイミダゾールを軸配位子として用いて調製したヘムの鉄二価5配位錯体に対して行った同様の解析の結果からも支持された。

また、CF₃を1つ導入した際に生じる ρ_{Fe} の減少に伴いO₂結合反応速度定数が約1.5倍になることが明らかになった。これは、 ρ_{Fe} の減少がヘム鉄のルイス酸性度を増大させるからであると考えられる。したがって、デオキシMbのヘム鉄の反応性は、ヘム電子構造、His93イミダゾールおよびHis93-Leu89水素結合の間の電子的な相互作用により調節されることが明らかになった。

本研究により、Hbの協同的酸素結合機能は、ヘム電子構造を通して調節されることが示された。本研究で得られた知見を一般化すると、「生体高分子の機能は、電子論で解明できる」と表現できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Relationship between the Electron Density of the Heme Fe Atom and the Vibrational Frequencies of the Fe-Bound Carbon Monoxide in Myoglobin
R. Nishimura, T. Shibata, H. Tai, I. Ishigami, T. Ogura, S. Nagao, T. Matsumoto, S. Hirota, K. Imai, S. Neya, A. Suzuki, and Y. Yamamoto
Inorg. Chem., 52(6), 3349-3355 (2013).
Doi: 10.1021/ic3028447.
- ② Relationship between Oxygen Affinity and Autoxidation of Myoglobin
T. Shibata, D. Matsumoto, R. Nishimura, H. Tai, A. Matsuoka, S. Nagao, T. Matsumoto, S. Hirota, K. Imai, S. Neya, A. Suzuki, and Y. Yamamoto
Inorg. Chem., 51(21), 11955-11960 (2012).
Doi: 10.1021/ic301848t

[学会発表] (計54件)

- ① Regulation of Functional Properties of Myoglobin through Tuning Heme Electronic Structure, Y. Yamamoto, R. Nishimura, T. Shibata, H. Tai, K. Nishiyama, D. Matsumoto, M. Fukaya, S. Nagao, T. Matsuo, S. Hirota, I. Ishigami, T. Ogura, S. Neya, O. Shoji, Y. Watanabe, K. Imai and A. Suzuki, Seventh International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-7), July 1-6, 2012, Jeju International Conference Center, Jeju, Korea.

[図書] (計1件)

高次 π 空間の創発と機能開発、赤阪健ら編、分担執筆；四重鎖DNAの π 空間におけるヘムの π 電子系の制御と機能調節、山本泰彦、太虎林、総ページ数245、シーエムシー出版(2013)。

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.tsukuba.ac.jp/yamamoto/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 泰彦 (YAMAMOTO YASUHIKO)
筑波大学・数理物質系・教授
研究者番号：00191453

(2) 研究分担者

太 虎林 (TAI HULIN)
筑波大学・数理物質系・特任助教
研究者番号：40512554