

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05606

研究課題名(和文)ヘモグロビン協同性発現へのタンパク質の大振幅揺らぎと低波数振動の寄与の実験的検証

研究課題名(英文) Experimental examination for contributions from the protein fluctuations with large amplitude and low frequencies to cooperativity of human hemoglobin

研究代表者

長友 重紀 (Nagatomo, Shigenori)

筑波大学・数理解析系・講師

研究者番号：80373190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の機能発現は活性部位近傍の構造変化によると考えられているが、主鎖の揺らぎ、低波数振動によるという説が提案されている。そこで、ベクトルネットワークアナライザーとテラヘルツ時間分解分光法とアーティファクトの入り込む余地のない溶液交換型のセルを組み合わせて小さな吸光度差の検出可能な装置を構築した。その結果、タンパク質の主鎖のゆらぎ、低波数振動は溶液中の大きな水の比誘電率のため、事実上埋もれてしまっていることが示唆された。このことが明確になったことは重要で、今後、比誘電率の小さな媒体(細孔など)にタンパク質を閉じ込めることで、タンパク質の大振幅揺らぎを実験的に検証する手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の機能発現が従来考えられている活性部位近傍の構造のみに着目するのではなく、主鎖の揺らぎ、あるいは低波数振動がタンパク質の機能発現に寄与していることの実証を主にヒト成人ヘモグロビンを用いて検証した。ギガヘルツからテラヘルツまでの帯域でアーティファクトを排した非常に小さな吸光度差を測定することができる実験系を構築し、その結果、低波数振動を観測するには、水の大きな比誘電率を軽減する必要があることを明らかにした。本研究課題「タンパク質の機能発現における主鎖の揺らぎ、あるいは低波数振動の実験的検証」の推進において、比誘電率の小さい媒体を用いる必要性が明確になったことは大きな成果であった。

研究成果の概要(英文)：Function of proteins are considered to be caused by structural change of active site, while hypotheses that fluctuations of main chains and/or low frequencies of proteins are important for function of proteins have been proposed. To detect these signals based on absorbance, apparatus connected with vector network analyzer (GHz) and Terahertz-time domain spectroscopy (TDS) was constructed. It was suggested that fluctuations of main chains and/or low frequencies of proteins were buried and that difficult to detect their signals because of large permittivity of solvent. This funding is of very significance, because clue to detect their signals can be obtained by confining proteins to medium (pore) of low permittivity.

研究分野：振動分光学

キーワード：ヘモグロビン 揺らぎ 酸素親和性 鉄ヒスチジン配位結合 テラヘルツ分光 低波数振動 鎖非等価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト成人ヘモグロビン (Hb A) は、 α 鎖と β 鎖が各々2つずつからなる四量体 ($\alpha_2\beta_2$) 構造をもつヘムタンパク質である。4つの酸素結合部位 (ヘム) が正の協同効果をもつことにより、Hb Aの酸素結合過程において酸素親和性が大きくなる。このため生体中において、肺から筋肉への効率よい酸素運搬が行われている。X線結晶構造解析に基づいて提案されたモデル (Perutzモデル, M. F. Perutz, *Nature* **228**, 726 (1970)) により、Hb Aの酸素結合の協同効果は四次構造変化により起こると説明されており、Perutzモデルは国際的に広く受け入れられている。

一方、「酸素親和性は四次構造で決定されるのではなく、主鎖の揺らぎの大きさに決まる」というPerutzモデルとは異なる説が近年発表されている (T. Yonetani and Kanaori, *BBA*, **1834**, 1873 (2013))。この説は、大振幅振動の振幅の大きさが酸素親和性を制御するという説であるが、分子動力学に基づいており、分光学的な実験結果は研究開始当初研究代表者が知る限りなかった。さらに、この説よりも前に、基準振動の理論計算から「タンパク質の低振動数振動モードが機能を決定する」との指摘もある (Y. Seno and N. Go, *J. Mol. Biol.*, **216**, 111 (1990), N. Go, *Biophys. Chem.*, **35**, 105 (1990)) が、実験的困難さゆえに、肯定も否定もされていない状況にあった。

大振幅振動の振幅の大きさが酸素親和性を制御するという説では、高い酸素親和性では主鎖の揺らぎの振幅が小さく、低い酸素親和性ではそれが大きくなるのが計算化学 (分子動力学) により示されている。それが正しいならば、低い酸素親和性ではそれ (主鎖の揺らぎの振幅) が Fe-His振動数の違いに反映されるのではないかと研究代表者は考えた。Hb Aのタンパク質部分とヘムの間の配位結合であるFe-His結合のFe-His伸縮振動に比べて遅い主鎖の揺らぎがあると、主鎖の揺らぎによるFe-His結合長の伸び縮みに応じて、Fe-His伸縮振動の異なる振動数が観測されるのではないかと、という予測である。

Hb A では、低い酸素親和性の脱酸素 (deoxy) 形において Fe-His 伸縮振動の波数は 215 cm^{-1} に観測され、そのバンドの形状は非対称である。その理由は α 鎖と β 鎖の Fe-His 伸縮振動の波数が少し異なり、その2つが重なりあっているためである。ところで、ヘム鉄の Fe^{2+} が酸化された Fe^{3+} -His 伸縮振動は (Fe^{2+} -His 伸縮振動とは異なり) ラマン不活性である。そこで、 α 鎖のみに由来する Fe-His 伸縮振動を観測するために、 β 鎖のヘムが Fe^{3+} で安定となる天然の変異ヘモグロビン (Hb M Milwaukee: $\beta 67\text{Val} \rightarrow \text{Glu}$) の可視共鳴ラマンスペクトル (励起波長 442 nm) を測定すると、 α 鎖のみの Fe-His 伸縮振動が観測される。Hb M Milwaukee の α 鎖の Fe-His 伸縮振動を見ると 201 cm^{-1} のピークの他に、 217 cm^{-1} にショルダーが見えており、少なくとも2種の Fe-His 伸縮振動の存在 (以後、このことを「ヘテロ性」と呼ぶこととする) を示唆している。このショルダーが見える Fe-His 伸縮振動は以前にも報告されている (K. Nagai and T. Kitagawa, *PNAS*, **77**, 2033 (1980)) が、このヘテロ性が静的か、動的かについては明らかにされていない。 α 鎖のヘテロ性が Fe-His 振動の動きよりも遅い主鎖の揺らぎによって引き起こされていると考え、大振幅振動の振幅の大きさが酸素親和性を制御するという上に記した仮説 (米谷ら) につながる。

そこで、 α 鎖の Fe-His 伸縮振動のヘテロ性と主鎖の揺らぎと酸素親和性との関係について検証し、ヘモグロビンの協同性発現におけるタンパク質の大振幅揺らぎと低振動数モードの実験的検証を行った。

2. 研究の目的

酸素結合に高い協同性を示すヘモグロビンの協同性発現機構に関して、最近提案されている「タンパク質主鎖の大振幅揺らぎ説」(米谷ら)と、少し前に提案された「低振動数モードの寄与説」(郷ら)を分光学的手法 (主に、テラヘルツ分光法と可視共鳴ラマン分光法) により実験的に検証する事を目的とする。本研究は、四次構造をもつタンパク質の協同効果 (アロステリック効果) 発現機構の基本となるものであり、研究代表者が 2015 年に報告した論文 (S. Nagatomo, *et al. PLoS ONE*, **10**, e0135080 (2015)) の次の展開となる研究である。

3. 研究の方法

(1) 主鎖の大振幅ゆらぎの大きさと周波数の評価：主鎖の揺らぎが 1 GHz ~ 10 THz , とりわけ数テラヘルツ (数十 cm^{-1}) にあるとの予測より , テラヘルツ分光測定を実施する . 実験結果に基づいて主鎖の揺らぎの振幅の解析法を考案し , 酸素親和性の高低と主鎖の揺らぎとの相関を検討する .

(2) β 鎖の Fe-His 伸縮振動が観測されない酸素親和性の異なる Hb A 変異体の合成 : 1 . で記した β 鎖のヘムが Fe^{3+} で安定となる天然の変異ヘモグロビン(Hb M Milwaukee: $\beta 67\text{Val} \rightarrow \text{Glu}$)のように , β 鎖の Fe-His 伸縮振動が観測されず , その (β 鎖の Fe-His 伸縮振動が観測されない) 状態で酸素親和性の異なる Hb を調製する . このような試料に対して可視共鳴ラマン分光法とテラヘルツ分光法を適用し , ヘテロ性と主鎖の揺らぎの関係を明らかにする .

4 . 研究成果

(1)

S. Nagatomo, K. Saito, K. Yamamoto, T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai
Heterogeneity between Two α Subunits of $\alpha 2\beta 2$ Human Hemoglobin and O_2 Binding Properties: Raman, ^1H Nuclear Magnetic Resonance, and Terahertz Spectra
Biochemistry, **56**(46), 6125–6136 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00733

Shigenori Nagatomo, Kohji Yamamoto, Masako Nagai, Teizo Kitagawa
ヘモグロビンの酸素親和性制御に関係する大振幅ヘリックス揺らぎの実験的検証 :
テラヘルツ(THz)分光による研究
(日本生物物理学会第55回年会) , 2017年9月 , 熊本大学黒髪北キャンパス

本研究発表 , 本論文において , β 鎖の Fe-His が観測されない酸素親和性の異なる Hb A として , 天然の変異ヘモグロビンである Hb M Hyde Park , Hb M Saskatoon , Hb M Milwaukee を用い , これらがすべて α 鎖の Fe-His 伸縮振動が “ヘテロ性” (2 種の Fe-His 振動の存在) であり , さらに , この “ヘテロ性” は四次構造が T 構造であるときのみ観測されることを示した . なお , Hb M Milwaukee については , 酸素が結合できる α 鎖の酸素親和性との高い時と低い時に相当する溶液条件で 0.15 - 1.0 THz の範囲でテラヘルツ時間領域吸収分光測定を行ったが , 有意な差は観測されなかった . このことから , α 鎖の Fe-His 伸縮振動が “ヘテロ性” は確実に存在するが , 主鎖の揺らぎの振幅の大小に由来する低波数振動はこの領域にはないことが示唆された .

(2)

Shigenori Nagatomo, Kohji Yamamoto, Masako Nagai, Teizo Kitagawa
ヒト成人ヘモグロビンの酸素親和性制御に関連した GHz, THz 領域振動の研究
(日本生物物理学会第 57 回年会) , 2019 年 9 月 , 宮崎シーガイア

本発表において , ベクトルネットワークアナライザーの用いたギガヘルツ帯域の振動の吸光度差を測定する装置を構築し , 成人ヘモグロビン溶液 , 溶媒の比誘電率を水よりも小さいグリセロールを混合した成人ヘモグロビングリセリン溶液の deoxy 形 (低酸素親和性) と oxy 形 (高酸素親和性) の測定をギガヘルツ帯域は 75 GHz - 140 GHz で行ったが , 有意な差は観測されなかった . このことから主鎖の揺らぎ , 低波数振動はこの領域にはないこと , あるいは , 水 , あるいはグリセリンの高い比誘電率 (水 80 , グリセリン 48) により , 主鎖の揺らぎの振幅の大小に由来する低波数振動の吸光度差が埋もれている可能性が示唆された .

(3)

長友重紀 , 奥村美紀 , 齋藤一弥 , 小倉尚志 , 北川禎三 , 長井雅子

ヒト成人ヘモグロビンの α , β それぞれのサブユニットの Fe-His 結合と酸素親和性との関係
(第 44 回生体分子科学討論会), 2017 年 6 月, カレッジプラザ (秋田)

Shigenori Nagatomo, Takashi Ogura, Teizo Kitagawa, Masako Nagai
Different roles between α and β subunits in $\alpha_2\beta_2$ tetramer for cooperative O₂ binding of hemoglobin
(Tenth International Conference on Porphyrins & Phthalocyanines (ICPP-10)), Jul. 1-6, 2018, München, Germany

Shigenori Nagatomo, Masako Nagai, Teizo Kitagawa
ヒト成人ヘモグロビンの四量体構造の安定性に対する β サブユニットの Fe-His 結合の寄与
(日本生物物理学会第 56 回年会), 2018 年 9 月, 岡山大学津島キャンパス

本発表において, ヘモグロビンの α 鎖の Fe-His 伸縮振動は“ヘテロ性”(2 種の Fe-His 振動の存在)であり, さらに, この“ヘテロ性”は四次構造が T 構造であるときのみ観測され, β 鎖の Fe-His 伸縮振動においては, 四次構造が T 構造であっても“ヘテロ性”が観測されないことを示した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Nagatomo, K. Saito, K. Yamamoto, T. Ogura, T. Kitagawa, and M. Nagai	4. 巻 56
2. 論文標題 Heterogeneity between Two Subunits of 2 2 Human Hemoglobin and O ₂ Binding Properties: Raman, ¹ H Nuclear Magnetic Resonance, and Terahertz Spectra	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 6125-6136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.7b00733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Nagai, N. Mizusawa, T. Kitagawa, S. Nagatomo	4. 巻 10
2. 論文標題 A role of heme side-chains of human hemoglobin in its function revealed by circular dichroism and resonance Raman spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophys. Rev. (Biophysical Reviews)	6. 最初と最後の頁 271-284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-017-0364-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shigenori Nagatomo, Kohji Yamamoto, Masako Nagai, Teizo Kitagawa
2. 発表標題 ヒト成人ヘモグロビンの酸素親和性制御に関連したGHz, THz領域振動の研究
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長友重紀, 寺田拓人, 庄司光男, 重田育照, 中谷清治, 廣田俊, 長井雅子, 北川禎三
2. 発表標題 チロシン配位の天然の変異ヘモグロビンで観測される帰属未定の振動バンドの挙動と性質
3. 学会等名 第46回生体分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigenori Nagatomo, Takashi Ogura, Teizo Kitagawa, Masako Nagai
2. 発表標題 Different roles between α and β subunits in $\alpha_2\beta_2$ tetramer for cooperative O ₂ binding of hemoglobin
3. 学会等名 Tenth International Conference on Porphyrins & Phthalocyanines (ICPP-10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長友重紀, 長井雅子, 北川禎三
2. 発表標題 ヒト成人ヘモグロビンの四量体構造の安定性に対する α サブユニットのFe-His結合の寄与
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長友重紀, 奥村美紀, 齋藤一弥, 小倉尚志, 北川禎三, 長井雅子
2. 発表標題 ヒト成人ヘモグロビンの α 、 β それぞれのサブユニットのFe-His結合と酸素親和性との関係
3. 学会等名 第44回生体分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長友重紀, 山本晃司, 長井雅子, 北川禎三
2. 発表標題 ヘモグロビンの酸素親和性制御に関係する大振幅ヘリックス揺らぎの実験的検証: テラヘルツ(THz)分光による研究
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北川 禎三 (Kitagawa Teizo) (40029955)	兵庫県立大学・生命理学研究科・客員研究員(研究員) (24506)	
連携 研究者	山本 晃司 (Yamamoto Kohji) (70432507)	福井大学・遠赤外領域開発研究センター・准教授 (13401)	