

ヒト成人および胎児ヘモグロビン四量体と単離鎖との構造比較を通じたサブユニット間相互作用の解析

筑波大院数物

○柴田友和, 太虎林, 長友重紀, 山本泰彦

Characterization of Subunit Interaction in Human Adult and Fetal Hemoglobins through Comparative Studies between the Constituent Subunits in Their Tetrameric and Isolated States

○Tomokazu Shibata, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto
Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Subunit interaction in human adult and fetal hemoglobins, i.e., Hb A and Hb F, respectively, which is responsible for the cooperative oxygen binding of the proteins, has been shown to be manifested in the shift differences between heme peripheral side chain proton signals of met-azido adducts of the constituent subunits in their tetrameric and isolated states. Downfield shifts of the signals of β and γ subunits in Hb A and Hb F, respectively, relative to the corresponding signals in the isolated ones could be attributed to an increase in the high spin contents of the subunits in the former than the latter, as a result of an elongation of the coordination bond between heme Fe and axial His imidazole.

序論

酸素運搬タンパク質成人ヘモグロビン(Hb A)は, Fig. 1 に示すように四量体 ($\alpha_2\beta_2$ (分子量 64500))として存在している. Hb A の α および β サブユニットは補欠分子族としてヘムをもち, 酸素分子は, ヘム (Fig. 2) に結合して運搬される. Hb A による酸素運搬の効率は, サブユニット間の相互作用により高められている. したがって, 各サブユニットを単離した単離鎖では運搬効率が著しく低下する. 私共は Hb A と単離鎖の NMR スペクトルの比較を通して, NMR によるサブユニット間相互作用の検出を試みた. また, β サブユニットのかわりに γ サブユニットをもつ胎児ヘモグロビン(Hb F)についても同様の解析を行った.

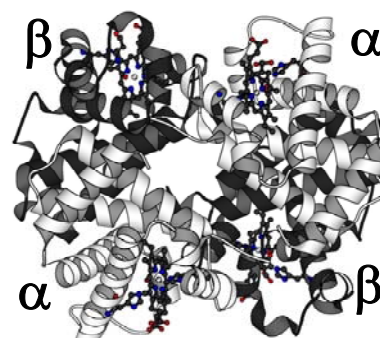


Fig. 1. Structure of oxyHb A. (PDB: 2DN1)

結果・考察

Hb A と Hb F の各サブユニットのヘム鉄にアジドイオン(N_3)が結合した N_3 体の 1H NMR スペクトルで, 低磁場で常磁性シフトして観測されるシグナルを Fig. 3 に比較して示す. Fig. 3 に示す通り, Hb A と Hb F の N_3 体のスペクトルでは, 各サブユニットのヘムの側鎖メチルプロトンに由来するシグナルが分離して観測される. Hb A と Hb F のシグナルで, 同じ化学シフトを示すシグナルを両者で共通する α サブユニット由来, 一方, 異なる化学シフトを示すシグナルを β , γ サブユニット由来であると帰属した.

各サブユニットのヘムメチルプロトンシグナルのシフト値は, Table 1 に示す通り, Hb A または Hb F の構成要素として存在する状態と, 単離された状態では異なる. このように, サブユニット間の相互作用は, 各サブユニットのヘム近傍の構造変化に反映される.

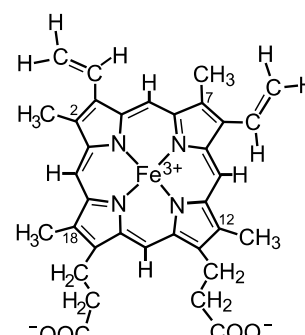


Fig. 2. Molecular structure of heme.

Keywords: 常磁性 NMR, ヘモグロビン, 単離鎖, サブユニット, ヘム

しばた ともかず, たい こりん, ながとも しげのり, やまもと やすひこ

たとえば、Fig. 4に示したHb Fのスペクトルでは、 γ サブユニットのヘムメチルプロトンシグナルは、四量体形成により低磁場シフトして観測された。通常 N_3 体のヘム鉄のスピンの状態は低スピン($S = 1/2$)と高スピン($S = 5/2$)の平衡にあり、観測された低磁場シフトは、四量体形成により平衡が高スピンの側に偏ったことに起因すると考えることができる。これは、ヘム鉄とその軸配位子であるヒスチジン(His)の結合(Fe-His 結合)が伸長したためであると考えられる。 1H NMR では、HbA と HbF の四量体形成で各サブユニットのヘムメチルプロトンのシフト変化が観測されなかった。

ところで、Hb A と Hb F の各サブユニットを単離する際には、*p*-ヒドロキシ水銀安息香酸 (PMB) が用いられる。PMB がシステイン(Cys)の側鎖に結合することにより誘起される構造変化により、四量体構造が崩壊するからである。 β , γ サブユニットではヘム鉄に配位しているHisの隣にあるCys93をPMBで修飾することで、酸素親和性が著しく低下することが知られている。 β , γ サブユニットの N_3 体のヘムメチルプロトンシグナルは、PMB 修飾により低磁場側にシフトした(Fig. 4 (γ サブユニットのみを示す))。この結果は、結合したPMB とヘムの立体障害でFe-His 結合が伸長し、スピン平衡が高スピンの側に偏ったことを示唆していると考えられる(Fig. 5)。PMB 修飾による β , γ サブユニットのFe-His 結合の伸長と酸素親和性の低下が、四量体形成により両サブユニットに誘起される変化と同様であることを考慮すると、PMB 修飾サブユニットは、四量体におけるそれぞれのサブユニットの良いモデルであると見なすことができる。

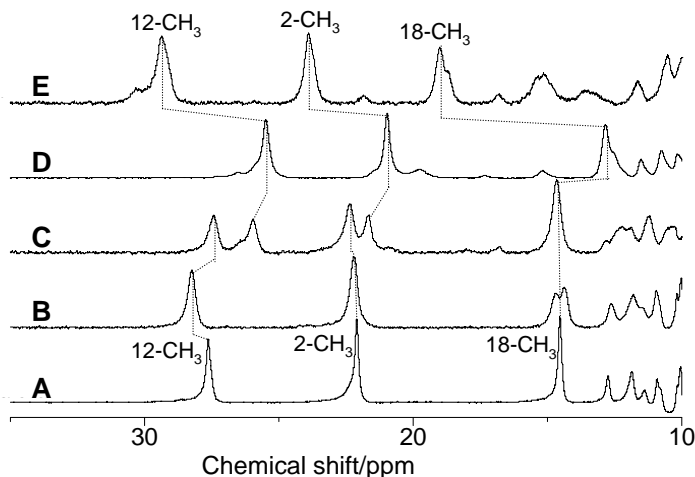


Fig. 4. Downfield-shifted portions of 1H NMR spectra of met-azido α subunit (A and B), in the presence and absence of PMB, Hb F (C), and γ subunit (E and D) in the presence and absence of PMB, in 20% $^2H_2O/80\% H_2O$, pH 8.1 at 25°C. The assignments of the resolved heme methyl proton signals are given with the spectra.

結論

Hb A や Hb F における四量体形成では、 β , γ サブユニットのFe-His 結合が共に伸長することが示唆された。また、四量体形成によるFe-His 結合の伸長により誘起されるヘムの電子構造の変化は、PMB の結合によりそれぞれのサブユニットのヘムに誘起される電子構造の変化と類似していることが示された。

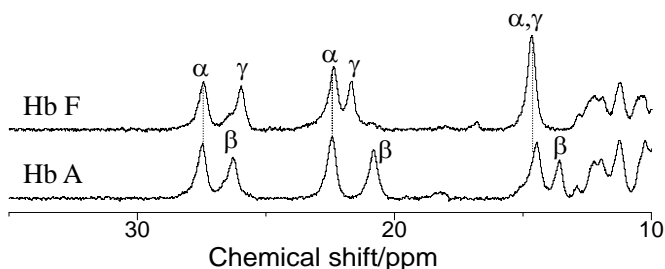


Fig. 3. Downfield-shifted portions of 1H NMR spectra of met-azido Hb A and Hb F in 20% $^2H_2O/80\% H_2O$, pH 8.1 at 25°C.

Table 1. Resolved heme methyl proton shifts of Hb A, Hb F and isolated subunits

	HbA					
	α (ppm)			β (ppm)		
	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃
Tetramer	27.47	22.44	14.47	26.26	20.79	13.59
Isolated subunit	28.25	22.21	14.54	25.67	20.34	11.71
$\Delta\delta$	-0.78	+0.23	-0.07	+0.59	+0.45	+1.88

	HbF					
	α (ppm)			γ (ppm)		
	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃	12-CH ₃	2-CH ₃	18-CH ₃
Tetramer	27.47	22.33	14.67	25.97	21.70	14.67
Isolated subunit	28.25	22.21	14.54	25.49	20.96	12.84
$\Delta\delta$	-0.78	+0.12	+0.13	+0.48	+0.74	+1.83

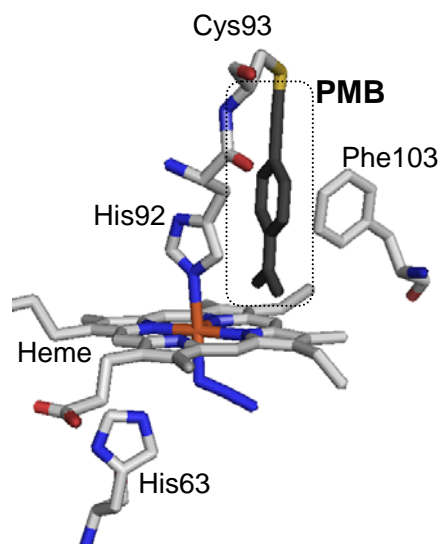


Fig. 5. Schematic drawing of the orientation of PMB with respect to heme in PMB-modified γ subunit.