

# フッ素化ヘム再構成ヘモグロビンの<sup>19</sup>F NMRによる機能解析

筑波大院数物<sup>1</sup>, 長岡高専物質<sup>2</sup>

○水関和哉<sup>1</sup>, 太虎林<sup>1</sup>, 長友重紀<sup>1</sup>, 山本泰彦<sup>1</sup>, 鈴木秋弘<sup>2</sup>

## Functional Analysis of <sup>19</sup>F NMR of Reconstituted Hemoglobin Possessing Fluorinated Heme

○Kazuya Mizuseki<sup>1</sup>, Hulin Tai<sup>1</sup>, Shigenori Nagatomo<sup>1</sup>,  
Yasuhiko Yamamoto<sup>1</sup>, and Akihiro Suzuki<sup>2</sup>

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba<sup>1</sup> and Nagaoka Natl. Coll. of Tech.<sup>2</sup>

Taking advantages of <sup>19</sup>F NMR, we have shown that the introduction of fluorinated hemes into *b*-type hemoproteins provides spectroscopic probes highly sensitive to heme electronic nature which is relevant to functional properties of the proteins. In the present study, we elucidated oxygen binding of the individual subunits of human adult hemoglobin (Hb A). The study demonstrated that the incorporation of a C<sub>2</sub>-symmetrically fluorinated heme into the protein results in a significant non-equivalence between the oxygen binding affinities of the subunits. This finding indicated the significance of the heme-protein interaction in the regulation of the functional properties of Hb A.

### 【序論】

成人ヘモグロビン (Hb A) は、 $\alpha_2\beta_2$ の四量体として存在する分子量約64500の代表的なヘムタンパク質であり、生体内で酸素運搬の役割を果たしている。Hb Aの機能を解明するためには、補欠分子族として存在するヘム (Fig. 1, R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = -CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>8</sub> = -CH=CH<sub>2</sub>) の電子構造や、ヘム近傍のタンパク質の立体構造について明らかにすることが重要である。<sup>1</sup>H NMRによるHb Aの研究では、観測されるシグナルのオーバーラップにより、スペクトルの解析が困難である (Fig. 2)。本研究では、生体内にはほとんど含まれないフッ素をヘム側鎖に導入したフッ素化ヘムを用いて、<sup>19</sup>F NMRによるHb Aの研究の可能性を検証した。

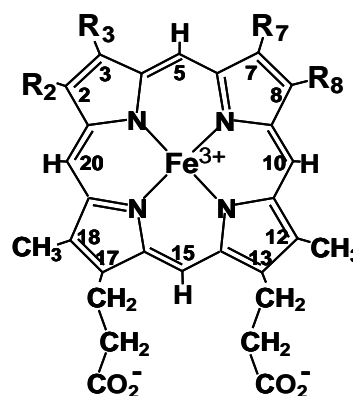


Fig. 1. The structures and numbering system for protoheme (R<sub>2</sub> = R<sub>7</sub> = -CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>8</sub> = -CH=CH<sub>2</sub>) and 2,8-DPF (R<sub>2</sub> = R<sub>8</sub> = -CF<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>7</sub> = -CH<sub>3</sub>).

### 【実験】

天然のHb Aから、Teale (1959)の方法に従って、ヘムを除去し、その後ヘムの側鎖にCF<sub>3</sub>基を導入したC<sub>2</sub>対称2,8-DPFフッ素化ヘム (Fig.1, R<sub>2</sub> = R<sub>8</sub> = -CF<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>7</sub> = -CH<sub>3</sub>) を組み込んで、2,8-DPF再構成Hb A [Hb A(2,8-DPF)]を調製した。Hb A(2,8-DPF)をジチオナイトにより還元して、oxy体とし、機能測定及び<sup>19</sup>F NMR測定を行った。なお、Deoxy体はOxy体を脱気して調製した。

Keywords : <sup>19</sup>F NMR、ヘモグロビン、酸素親和性、常磁性シフト、フッ素化ヘム  
みずせき かずや、たい こりん、ながとも しげのり、やまもと やすひこ、  
すずき あきひろ

## 【結果・考察】

**機能解析:** Hb A(2,8-DPF)の酸素親和性と協同性の指標である50%酸素化が達成される酸素分圧 ( $P_{50}$ ) と協同性を反映するHill係数 ( $n$ ) を、Hb Aでの対応する値と比較してTable 1にまとめて示す。Hb A(2,8-DPF)は、Hb Aより酸素親和性と協同性が共に低下しているが、酸素運搬体としての機能は保持されていることが確認された。

**構造解析:** Oxy体、Deoxy体、及びOxy-Deoxy中間体のスペクトル測定を行った(Fig. 3)。Oxy-Deoxy中間体のスペクトルでは、Oxy体およびDeoxy体由来のシグナルが共に観測された。また、Deoxy体のへム8位CF<sub>3</sub>基由来のシグナル1つは、Oxy体のシグナルと重なって観測された。Oxy-Deoxy中間体で観測されたそれぞれのシグナル強度の解析から、一方のサブユニットのDeoxy体のシグナル強度が、もう一方のDeoxy体のシグナル強度の約2.5倍であることが明らかとなり、2つのサブユニットで酸素親和性が異なることが示された。一方、天然のHb Aでは、 $\alpha$ ,  $\beta$ の酸素親和性には大差無いことが示されている。これは、Hb AとHb A(2,8-DPF)とで、へム側鎖置換基の違いにより、へム近傍タンパク質との相互作用が異なることに起因すると考えられる。本研究で用いた2,8-DPFは、プロトへムと比較すると、3,8位のビニル基がそれぞれCH<sub>3</sub>基とCF<sub>3</sub>基に置換され、また、2,8-DPFの分子構造はC<sub>2</sub>対称である(Fig.1)。Hb Aでは、へム側鎖ビニル基が機能に与える影響が大きいと考えられているため、Hb A(2,8-DPF)における結果は、そのことを支持している。へム側鎖の置換基の変化によりへムとタンパク質との相互作用が変化し、その変化がHb Aの四次構造変化に影響を与え、結果的に酸素親和性が変化したものと推測される。

## 【結論】

フッ素化へム再構成Hb Aの<sup>19</sup>F NMR研究は、Hb Aの機能解析に有用であることが示された。Hb A(2,8-DPF)においては、天然のHb Aとは異なり、各サブユニットの酸素親和性が異なる事が示唆された。

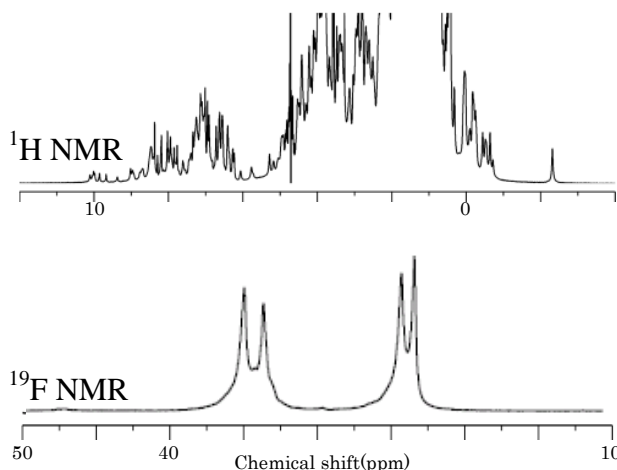


Fig. 2. <sup>1</sup>H NMR spectra and <sup>19</sup>F NMR spectra.

Table 1. Oxygen bindings properties

	$P_{50}^a$ (mmHg)	$n^b$
2,8-DPF Hb A	8.9	1.64
Native Hb A	5.9	2.99

a : Partial pressure of O<sub>2</sub> at [Deoxy Hb]=[Oxy Hb].  
b : Hill coefficient representing the cooperativity.

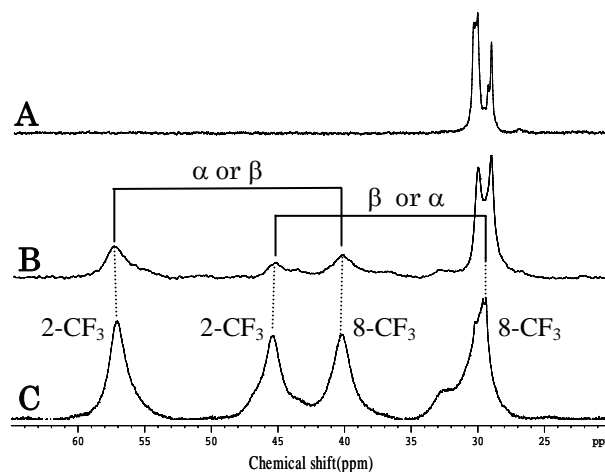


Fig. 3. <sup>19</sup>F NMR spectra of (A)oxy Hb A(2,8-DPF), (B) Hb A(2,8-DPF) intermediate state and (C)deoxy Hb A(2,8-DPF), 25°C and pH 7.0. As shown with the spectra, the assignments of the signals to the individual subunits were not completed at the present.