

# 各サブユニットを区別したヒト成人ヘモグロビンの機能解析

筑波大院数物

○佐藤惇志、太虎林、長友重紀、山本泰彦

## <sup>1</sup>H NMR Characterization of Functional Properties of the Individual Subunits of Human Adult Hemoglobin

○Atsushi Sato, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, and Yasuhiko Yamamoto

Dept. of Chem., Univ. of Tsukuba

Based on a combined use of the measurements of <sup>1</sup>H NMR and absorption spectra, we have established a technique which enables characterization of oxygen binding properties of the individual subunits of intact Hb A. Characterization of the effects of allosteric effectors, 2,3-bisphosphoglycerate (BPG) and inositolhexaphosphate (IHP), on the oxygen affinities of the individual subunits of Hb A revealed that the affinities of both  $\alpha$  and  $\beta$  subunits are deteriorated by the allosteric effectors, and that the deterioration of the affinity in the former subunit is much larger than the latter. Difference in the oxygen affinity between the subunits is likely to be essential to cooperative oxygen binding of Hb A.

**[序論]** ヒト成人ヘモグロビン(Hb A,  $\alpha_2\beta_2$ )の機能と構造の関係を解明する研究において、各サブユニットの機能を区別して解析することが重要である。一般的に、Hb Aの酸素運搬機能は、酸素飽和度が50%の時の酸素分圧  $P_{50}$  を指標として評価される。私共は、deoxy Hb Aの<sup>1</sup>H NMRスペクトルにおいて、軸配位子のHisF8 N<sub>δ</sub>H由来のシグナルが、低磁場に常磁性シフトして観測され、さらに各サブユニットで異なる化学シフト値を示すことに注目し、各サブユニットの $P_{50}$ を<sup>1</sup>H NMRとUV-VISを組み合わせることにより計測する手法の確立を目指している。本研究では、生体内の環境に近い状態でHb Aの機能と構造の解析を行うために、赤血球自体の<sup>1</sup>H NMR測定を行った。そこで、通常の方法で精製したHb Aと成人赤血球内のHb Aの構造を<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析を通して比較した。さらに、赤血球内に存在する2,3-ビスホスホグリセリン酸(2,3-BPG)を除去したHb A、イノシトールヘキサリン酸(IHP)を加えたHb Aの解析から、これらアロステリックエフェクターがHb Aの $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットのどちらの機能により大きな影響を及ぼすかについて明らかにした。

### [結果・考察]

#### 赤血球内Hb Aの構造

赤血球内Hb Aの構造解析のために、赤血球内Hb Aと精製したHb Aの<sup>1</sup>H NMRスペクトルで機能解析に用いるdeoxy体およびoxy体の指標となるシグナルのシフト値と線幅の比較を行った(**Table 1**)。その結果、各状態の指標となるシグナルをはじめ、その他の常磁性シフトしたシグナルのシフト値がほぼ同一であることから、活性部位であるヘム近傍の電子構造は両者でほぼ等しいことが示された。一方、シグナルの線幅は、赤血球内Hb Aの方が精製したHb Aより広いことが明らかとなり、赤血球内部のHb Aの運動性が抑制されていることが示唆された。

**Table 1.** NMR parameters of selected NMR signals of Hb A in erythrocyte and purified Hb A.

	Chemical shift (ppm)			Linewidth (Hz)		
	Deoxy form (HisF8 N <sub>δ</sub> H)		Oxy form (ValE11 $\gamma_2$ -CH <sub>2</sub> )	Deoxy form (HisF8 N <sub>δ</sub> H)		Oxy form (ValE11 $\gamma_2$ -CH <sub>2</sub> )
<b>Purified</b>	$\alpha$ 63.4	$\beta$ 75.7	$\alpha, \beta$ - 2.38	$\alpha$ 1094	$\beta$ 1154	$\alpha, \beta$ 76.12
<b>In cell</b>	63.7	75.7	- 2.43	1903	1944	102.5
<b>Difference (In cell - purified)</b>	<b>+ 0.3</b>	<b>0</b>	<b>- 0.05</b>	<b>+ 809</b>	<b>+ 790</b>	<b>+ 26.38</b>

**Keywords :** 常磁性 NMR, ヘモグロビン, 酸素親和性, 協同性, ヘム

さとう あつし, たい こりん, ながとも しげのり, やまもと やすひこ

## 赤血球内 Hb A の酸素化過程

赤血球内 Hb A の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの酸素分圧依存性を Fig. 1 に示す。酸素分圧が低いときは deoxy 体由来のシグナルのみ  $\sim 70$  ppm に観測され (G. N. La Mar *et al.* (1980))、酸素分圧の上昇に伴い deoxy 体由来のシグナル強度の減少と共に、oxy 体由来のシグナル ( $\sim 3$  ppm, C. Dalvit and C. Ho (1985)) 強度の増大が観測された。酸素分圧が高くなると最終的に oxy 体由来のシグナルのみ観測された。このように  $^1\text{H}$  NMR により、各サブユニットの酸素化過程を区別して観測することが可能である。Fig. 1 に示した一連の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの測定結果

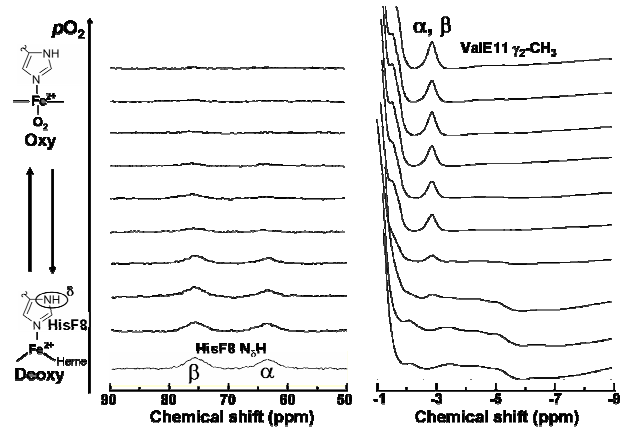


Fig. 1.  $^1\text{H}$  NMR Characterization of Hb A oxygenation in erythrocyte at physiological temperature and pH.

と吸収スペクトルの測定結果から得られた赤血球内 Hb A 四量体の酸素平衡曲線 (A. H. M. Mawjood and K. Imai (1999)) を用いて、各サブユニットの酸素平衡曲線および  $P_{50}$  の算出を行った。Deoxy 体由来のシグナル強度の解析により求めた各サブユニットそれぞれの酸素飽和度を酸素分圧に対してプロットすることにより、各サブユニットの酸素平衡曲線 Fig. 2 を求めることができる。このようにして得られた酸素平衡曲線から  $P_{50}$  は、 $\alpha$  サブユニットが  $24.7 \pm 1.2$  mmHg、 $\beta$  サブユニットが  $28.9 \pm 1.6$  mmHg と見積もることができ、 $P_{50}$  を区別して決定することが可能であることが示された。

## アロステリックエフェクターが Hb A の酸素化に与える影響

赤血球内 Hb A と同様に、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルの酸素分圧依存性から、各サブユニットの酸素平衡曲線 (Fig. 2) および  $P_{50}$  の計測を行った。アロステリックエフェクターとして知られている IHP 存在下での各サブユニットの  $P_{50}$  は  $\alpha$  サブユニットが  $44.3 \pm 1.9$  mmHg、 $\beta$  subunit が  $53.7 \pm 2.7$  mmHg と求まり、両者の差と赤血球内つまり血液中に存在するアロステリックエフェクターである 2,3-BPG 存在下での  $P_{50}$  の差を比較すると、前者の差の方が大きいことが示された。この結果から 2,3-BPG よりも IHP の方が Hb A の機能、特に  $\beta$  サブユニットの機能により大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。一方、アロステリックエフェクター非存在下での各サブユニットの  $P_{50}$  は  $\alpha$  サブユニットが  $5.28 \pm 0.11$  mmHg、 $\beta$  サブユニットが  $5.36 \pm 0.13$  mmHg と求まり、両者の差は IHP または 2,3-BPG 存在下での差よりも小さくなった。これらの結果から、Hb A の機能にアロステリックエフェクターが及ぼす影響は各サブユニットで異なることが初めて実証された。Hb A が協同的な酸素結合性を発現するためには、 $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットの酸素親和性が著しく異なることが不可欠であると考えられる。

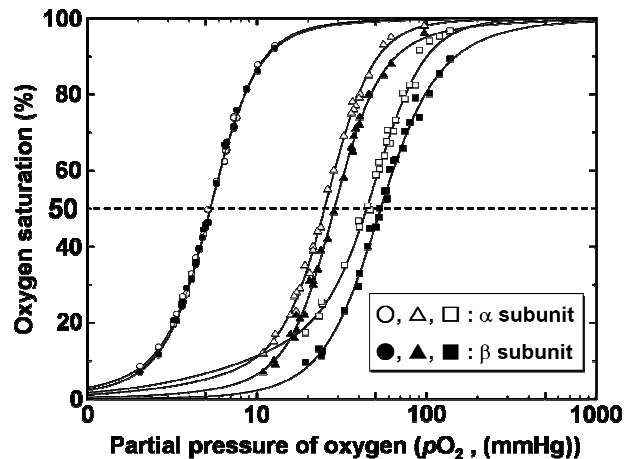


Fig. 2. Oxygen equilibrium curves of the individual subunits of 2,3-BPG-depleted Hb A (circles), Hb A in erythrocyte (triangle) and Hb A in the presence of IHP (square).

**【結論】**  $^1\text{H}$  NMR と UV-VIS を組み合わせることにより、Hb A の各サブユニットの  $P_{50}$  の決定が可能であることが示された。IHP 存在下で、Hb A の両サブユニットの  $P_{50}$  は共に増大するが、その増大の程度は  $\beta$  サブユニットの方が大きいことが明らかとなった。IHP は、Hb A の  $\beta_1\beta_2$  間に結合する考えられることから、IHP の結合は酸素結合に伴う四次構造変化を抑制し、 $\beta$  のみならず  $\alpha$  サブユニットの  $P_{50}$  も増大させることが示唆された。