

# C<sub>2</sub>対称フッ素化ヘム再構成ヘムタンパク質の活性部位構造の<sup>19</sup>F NMRによる解析

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

○ 古市英資<sup>1</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>

## <sup>19</sup>F NMR Comparative Study between Human Adult and Fetal Hemoglobins Bearing C<sub>2</sub>-symmetrically Fluorinated Heme

○Eisuke Furuichi<sup>1</sup>, 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>

We report here the results from <sup>19</sup>F NMR studies of human adult hemoglobin (Hb A) and human fetal hemoglobin (Hb F) possessing C<sub>2</sub> fluorinated heme. The orientation of axial His F8 imidazole relative to heme in the subunits of Hb A and Hb F has been estimated through the analysis of paramagnetic <sup>19</sup>F NMR shifts. The study suggested a possible difference in the orientation of HisF8 imidazole relative to heme between the  $\alpha$  subunits of the two Hbs, indicating that the His F8 imidazole orientation in the  $\alpha$  subunit is affected through the subunit interaction.

### 序論

ヒト成人ヘモグロビン(Hb A,  $\alpha_2\beta_2$ ), 胎児ヘモグロビン(Hb F,  $\alpha_2\gamma_2$ )は、共に四量体構造をもち、各サブユニットにヘムを1つずつ含む。ヘム鉄には、近位ヒスチジン(HisF8)が配位しており(Fig. 1)、このHisF8のヘムに対する配向はHisのイミダゾール窒素のp軌道とヘム鉄のd軌道との相互作用を介して、ヘムの電子構造に影響を及ぼす。Hb A、Hb Fの機能は、ヘムの電子構造やポリペプチドサブユニットの立体構造により調節されている。本研究では、2つのCF<sub>3</sub>基を側鎖にもち、分子構造がC<sub>2</sub>対称である2,8-DPF(13,17-bis(2-carboxylatoethyl)-(3,7,12,18-tetramethyl-2,8-diperfluoromethyl)-porphyrinatoiron(III))をHb AおよびHb Fに組み込み、<sup>19</sup>F NMRによりヘムの電子構造やヘムに対するHisF8の配向角( $\Phi$ (Fig. 1))を解析した。

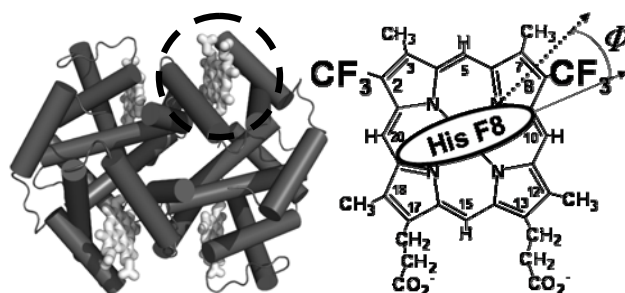


Fig. 1. Structure of hemoglobin and coordination of axial His to heme. The  $\Phi$  angle defines the orientation of axial His imidazole plane with respect to heme.

### 結果・考察

2,8-DPF再構成Hb F(2,8-DPF Hb F)の一連の配位状態(CO体(Fe<sup>2+</sup>, S=0)、O<sub>2</sub>体(Fe<sup>2+</sup>, S=0)、CN<sup>-</sup>体(Fe<sup>3+</sup>, S=1/2)、N<sub>3</sub><sup>-</sup>体(Fe<sup>3+</sup>, S=1/2)、Deoxy体(Fe<sup>2+</sup>, S=2))における<sup>19</sup>F NMRスペクトルでは、不対電子の数の増大に伴い、シグナルのより大きな低磁場シフトが観測された(Fig. 2)。また、2,8-DPFがタンパク質に組み込まれた際には、2つのCF<sub>3</sub>基に由来するシグナルの縮退は解けて、分裂する。このシグナルの分裂幅は、主にHisF8の配位に依存すると考えられることから、シフト値の解析より、ヘムに対するHisF8の配向角( $\Phi$ (Fig. 1))を見積もることができる。常磁性

Keywords : <sup>19</sup>F NMR, ヘムタンパク質, 配位結合, 常磁性シフト, フッ素化ヘム

ふるいち えいすけ, 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

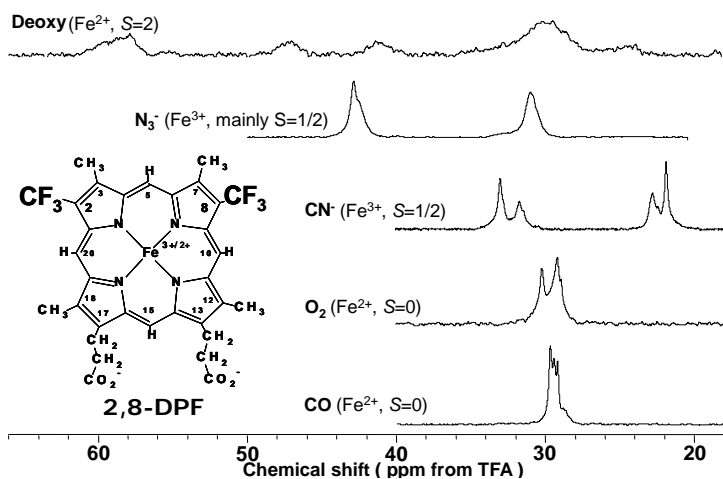


Fig. 2.  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of 2,8-DPF Hb F in various oxidation, spin, and ligation states of heme iron at 25 °C and pH 7.0.

シフトしたシグナルのシフト値 ( $\delta_{\text{obs}}$ ) は、反磁性シフト ( $\delta_{\text{dia}}$ ) と常磁性シフト ( $\delta_{\text{para}}$ ) の和として表される。ここで、 $\text{CF}_3$  のシグナルの  $\delta_{\text{para}}$  では、コンタクトシフト ( $\delta_{\text{con}}$ ) の寄与が支配的である。したがって、ミオグロビン (Mb)、Hb F の CN 体におけるシグナルの分裂に寄与する  $\delta_{\text{dia}}$  と  $\delta_{\text{con}}$  のうち、 $\delta_{\text{dia}}$  の寄与が CO 体での値と等しいと仮定すれば、 $\delta_{\text{con}}$  の寄与は ( $\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{dia}}$ ) で求めることができる。Fig. 3 に示した 2,8-DPF Hb A および Hb F の CN 体の  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルの化学シフト ( $\delta_{\text{obs}}$ ) からそれぞれのタンパク質での 2- $\text{CF}_3$  と 8- $\text{CF}_3$  に由来するシグナルの  $\delta_{\text{con}}$  の差 ( $\Delta\delta_{\text{con}}$ ) を計算し、天然型の Hb A CN 体の X 線結晶構造解析より求めた  $\Phi$  の値を理論式 ( $\Delta\delta_{\text{con}} = A \cos 2\Phi + B$ 、 $A, B$  は定数) でフィッティングすることにより、関係式  $\Delta\delta_{\text{con}} = 7.9 \cos 2\Phi + 3.7$  を得た。なお、解析の際は、天然の Mb、Hb A の CN 配位型の X 線結晶構造解析で示された  $\Phi$  値が 2,8-DPF Hb A でも保持されていると仮定した。また、シグナル帰属は、Hb A と Hb F で共通する  $\alpha$  サブユニット由来のシグナルのシフト値はお互いに類似しているとの予想に基づいて暫定的に行った。また、2,8-DPF Hb F のシグナルのシフト値と得られた関係式より、2,8-DPF Hb F の CN 体における HisF8 イミダゾール配向角を求めたところ (Fig. 4)、 $\alpha$  サブユニット ( $\Phi = 14.9^\circ$ )、 $\gamma$  サブユニット ( $\Phi = 17.3^\circ$ ) が得られ、Hb A CN 体の  $\alpha$  サブユニット ( $\Phi = 15.5^\circ$ )、 $\beta$  サブユニット ( $\Phi = 19.5^\circ$ ) とは異なることが示唆された。

## 結論

Hb A と Hb F で共通する  $\alpha$  サブユニットのヘムの電子構造の比較から、ヘムに対する HisF8 の配向がそれぞれの  $\alpha$  サブユニットで異なることが示唆された。したがって、Hb A における  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニット、Hb F における  $\alpha$  サブユニットと  $\gamma$  サブユニットそれぞれのサブユニット間相互作用は異なると考えられる。

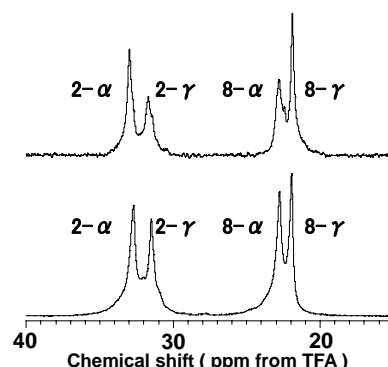


Fig. 3.  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of CN<sup>-</sup> forms of Hb F (2,8-DPF) and Hb A (2,8-DPF) at 25 °C and pH 7.0. The signal assignments are given with the spectra.

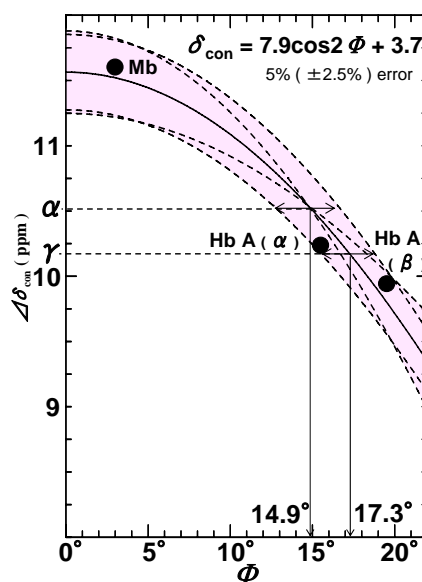


Fig. 4. Plots of  $\Delta\delta_{\text{con}}$  against  $\Phi$  for Mb(2,8-DPF), Hb A(2,8-DPF), and Hb F(2,8-DPF).  $\Delta\delta_{\text{con}}$  is the difference in the  $\delta_{\text{con}}$  contribution between 2- $\text{CF}_3$  and 8- $\text{CF}_3$  signals. In the cases of the 2- $\text{CF}_3$  and 8- $\text{CF}_3$  signals, since  $\delta_{\text{con}}$  dominates in  $\delta_{\text{para}}$ ,  $\delta_{\text{con}}$  can be calculated by the equation  $\delta_{\text{con}} = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{dia}}$ . The  $\Phi$  values reported for the X-ray crystal structures of native proteins, i.e.,  $\Phi = 3.0$  for Mb (PDB:2JHO), and  $\Phi = 15.5$  for  $\alpha$  subunit and  $\Phi = 19.5$  for  $\beta$  one of Hb A (PDB:1O1I), have been used for the plots.