

Title	ヘモグロビン機能と構造化学：共鳴ラマン分光法による研究
Author(s)	北川, 禎三
Citation	大阪大学低温センターだより. 1979, 28, p. 9-13
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/10939
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

ヘモグロビンの機能と構造化学：

共鳴ラマン分光法による研究

蛋白質研究所 北川 禎 三(吹田 3827)

我々の身体にはヘモグロビン(Hb)という蛋白分子が約2億8千万個あるため血液は赤く見える。Hbは肺で酸素と結合し、組織でそれを解離して酸素運搬の役割を果している。肺の O_2 分圧は $\sim 100\text{mmHg}$ 、組織のそれは $\sim 30\text{mmHg}$ で、その圧力差による化学平衡のずれによって O_2 の結合、解離がうまくいつている。Hbの O_2 親和性が低すぎると $P_{O_2} \sim 100\text{mmHg}$ では O_2 と十分に結合しないし、親和性が高すぎると $P_{O_2} \sim 30\text{mmHg}$ でも O_2 を解離しないので、いづれにしても細胞での内呼吸に必要な O_2 が不足する。Hbの O_2 親和性は分子の4次構造によって支配されているが、それが O_2 の結合する場所にとどのような分子構造変化として現われるかを共鳴ラマン分光法で調べる。

Hbは分子量64,000で、アミノ酸141個からなる α 鎖が2本、146個からなる β 鎖が2本の計4個のサブユニット($\alpha_2\beta_2$)より成り、各サブユニットにヘムと呼ばれる鉄錯体(図1)が1個含まれる。ヘム鉄の片側からヒスチジン残基(H_{is})の N_ϵ が配位して、 $Fe-N_\epsilon$ 結合がヘムと蛋白とを繋ぐ唯一の化学結合である。 H_{is} のトランス位(X)に O_2 が配位する。したがって、Hb1分子当たり4個の O_2 分子が結合できる。Hb分子をサブユニットに解離してしまっても O_2 は結合するが、結合した O_2 が離れにくいので酸素運搬の役割は果せない。つまり、4個のユニットから構成されているというところにHbの機能の秘密が隠されている。

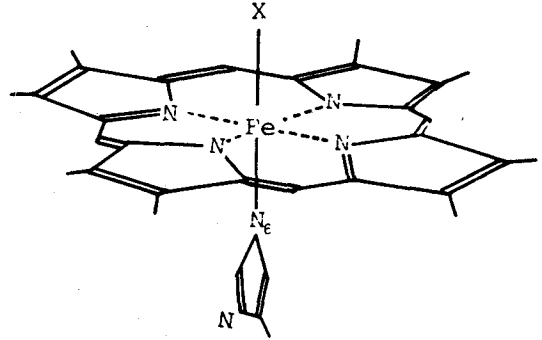


図1. ヘムの骨格と軸配位子、ヘム鉄の一方側からヒスチジンのイミダゾールグループの N_ϵ が鉄に配位し、Xの位置に O_2 が結合する。

O_2 の結合していないヘムをdeoxyヘム、結合したヘムをoxyヘムと呼ぶ。Hbのoxyヘム/deoxyヘムの存在比を O_2 の分圧に対して両方とも対数目盛でプロットすると、サブユニットに分解したもものでは直線になるが、Hb分子ではシグモイドになる。Hb分子の状態としては、 $(\text{deoxy})_4$ 、 $(\text{deoxy})_3(\text{oxy})_1$ 、 $(\text{deoxy})_2(\text{oxy})_2$ 、 $(\text{deoxy})_1(\text{oxy})_3$ 、 $(\text{oxy})_4$ の5種あるが、 $(\text{deoxy})_4$ より $(\text{deoxy})_1(\text{oxy})_3$ の方が O_2 の親和性が ~ 100 倍高い。これは、一つのサブユニットのヘム鉄に O_2 が結合すると、となりのサブユニットにあるヘム鉄にそれを知らせ、そこへ O_2 がより結合しやすいようにしているからで、このようなアロステリック効果(協同性効果)は次のように説明されている。

Hbには O_2 親和性の高い4次構造(R構造)と O_2 親和性の低い4次構造(T構造)とがあり、正常

なHbではO₂が2~3個結合した段階でTからRに転移するために、酸素平衡曲線がシグモイドになる。実際、ある種の異常Hbや化学修飾したHbではTのままdeoxy→oxyになったり、Rのままdeoxy→oxyとなり、そういう場合の酸素平衡曲線は直線である。Tのままdeoxy→oxyと、変化するときの自由エネルギー変化を ΔG_T 、Rのままdeoxy→oxyとなるときのを ΔG_R とすると、 ΔG_R が ΔG_T より3 kcal/molだけ大きい。¹⁾これを協同性エネルギー(ΔG_c)と呼ぶが、 ΔG_c がHb分子のどこに、どういう形で貯えられたかを解明したいという興味が本研究の出発点である。

共鳴ラマン散乱では分子の発色団の振動スペクトルを測定することができる。巨大な生体分子でも、その発色団のスペクトルは比較的簡単であり、発色団が活性部位となっている生体分子の構造研究に共

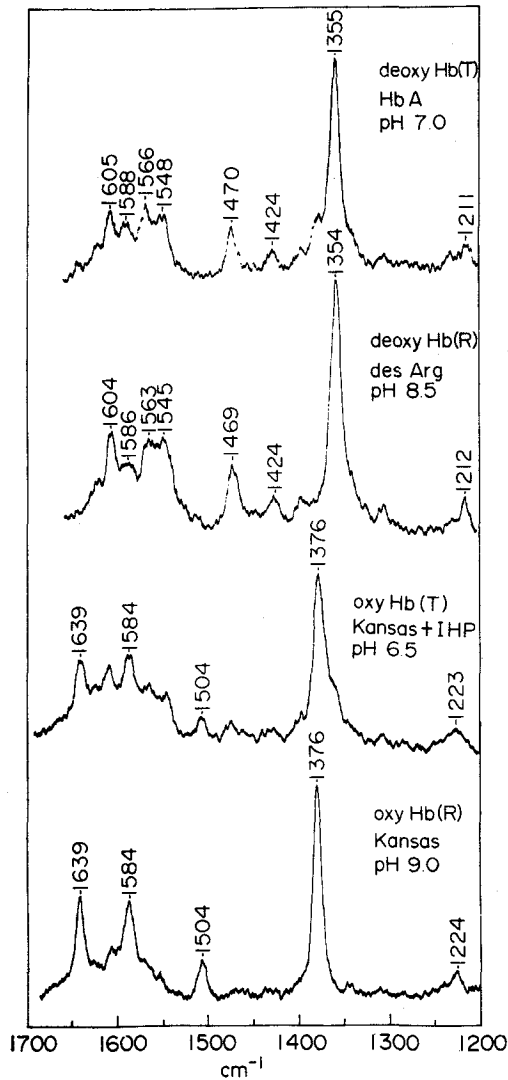


図2. deoxy HbのTとRおよびoxy HbのTとRの1200~1700cm⁻¹領域の共鳴ラマンスペクトル

鳴ラマン散乱は極めて有効な方法である。Hbの場合、ヘムの $\pi\pi^*$ 電子遷移が赤色の原因であり、それに共鳴させたラマン散乱ではヘムの振動スペクトルがまわりの蛋白の分子振動に妨害されることなく観測できる。

T構造をとるdeoxy Hbとoxy Hb, R構造をとるdeoxy Hbとoxy Hbの $1200\sim 1700\text{cm}^{-1}$ 領域の共鳴ラマンスペクトルを図2に示す。この領域には、ヘムのCC, CN伸縮振動が現われる。各ラマン線の帰属は、同位体原子を置換したヘムに関する測定²⁾や基準振動の計算³⁾によりほぼ確立している。deoxy Hbとoxy Hbのスペクトルは明らかに異なるが、TとRとの間に有意の差は殆どみとめられない。これはヘム自体の構造がTとRとにより殆んど変化しないことを意味している。

oxy HbのFe-O₂伸縮振動領域のスペクトルを図3⁴⁾に示す。a)はTのoxy Hb, b)はRのoxy Hbで、b)の¹⁶O₂の代りに¹⁸O₂を結合させたものがc)である。¹⁶O₂を¹⁸O₂に置換すると 568cm^{-1}

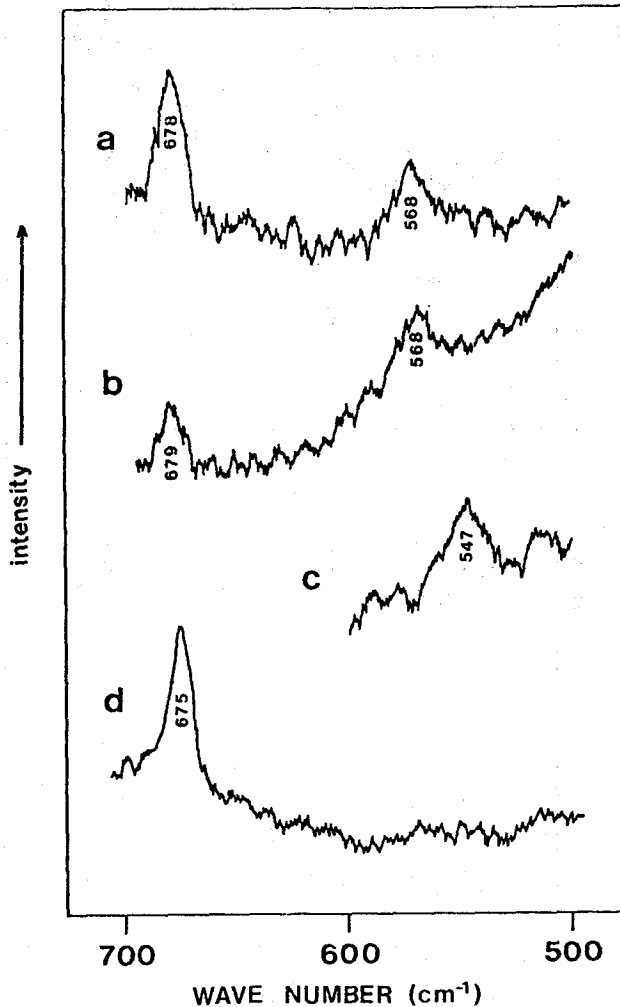


図3. HbのFe-O₂伸縮振動領域のラマンスペクトル⁴⁾

- a) oxy Hb(T), b) oxy Hb(R), c) ¹⁸O₂を結合したoxy Hb(R)
d) deoxy Hb

のラマン線が 547cm^{-1} にシフトしている。セル内を減圧してdeoxy Hbにすると(a)のスペクトルが得られ、 568cm^{-1} のピークは消えた。したがって 568cm^{-1} のラマン線がFe-O₂伸縮振動に帰属される。この振動数がTとRとで変化しないということは、 ΔG_0 がFe-O₂の結合エネルギーとして貯えられてはいないことをはっきり示している。

共鳴ラマンにおけるTとRとの相違は長井ら⁴⁾によって初めて見つけられた。図4⁴⁾はdeoxy Hb二種に関してTとRとを比較したもので、両方とも(a)がR、(b)がTである。Rで $220\sim 221\text{cm}^{-1}$ に出るラマン線がTで $216\sim 218\text{cm}^{-1}$ にシフトしているが、それ以外のラマン線には振動数変化はみとめ

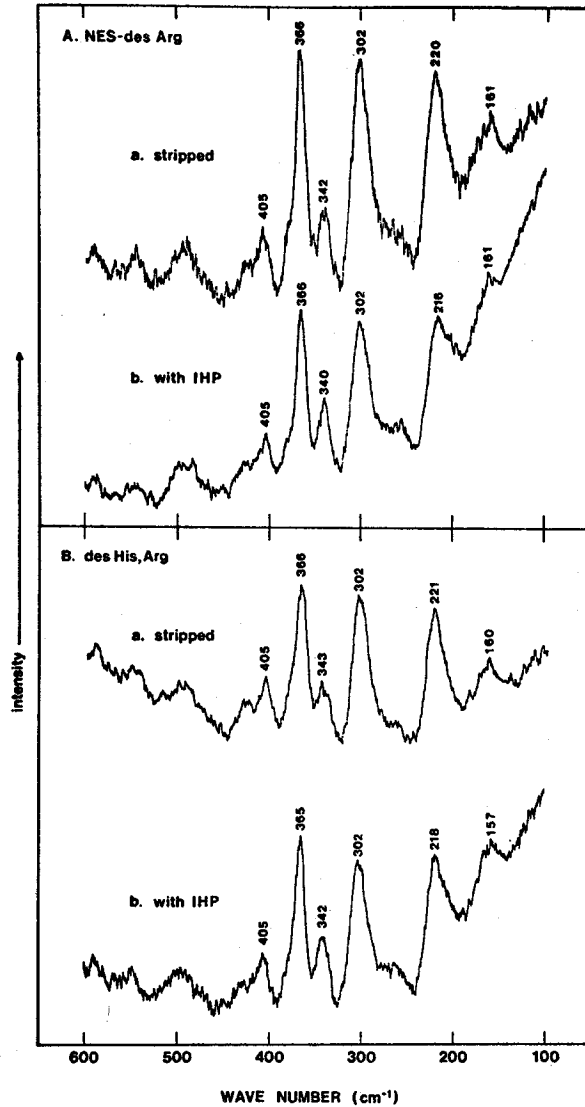


図4. 二種のdeoxy HbのTとRの比較⁴⁾

A, Bとも(a)がR, (b)がT構造

$$V(r) = D_e \{1 - \exp[-a(r-r_T)]\}^2$$

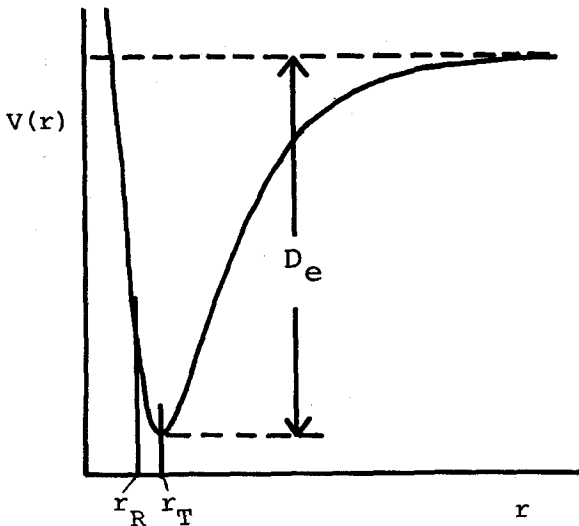


図5. モースポテンシャル関数

配位子との伸縮振動を主に含むモードに帰属された。そのモードがTとRとで振動数変化を起こす意味を、モデルポテンシャルを用いて考察してみた。

Fe-N_e(His)結合のポテンシャルが図5に示すMorse関数で表わされるとする。TでFe-N_eが平衡距離(r_T)にあってそのバネの定数が k_T , Rでは Δr だけずれて(r_R)そのバネの定数が k_R と定義する。 Δr だけずれた蛋白のポテンシャルが r に関して一次であるならば、 $k_R = k_T (1 - 3a\Delta r)$ と書ける。ここに a はモースパラメーター(図5)であり、多くの二原子分子では $\sim 2.4 \text{ \AA}^{-1}$ であることが知られている。 $(\nu_R/\nu_T) = (k_R/k_T)^{1/2}$ という関係と、TとRとで最大の振動数差を生む ν_T と ν_R の実測値とから $\Delta r = -0.007 \text{ \AA}$ と計算された。それに相当するエネルギー変化は $\Delta v = 0.003 \text{ kcal/mol}$ であった。 216 cm^{-1} のラマン線がポルフィリンの振動と少しカップルしていることを考慮しても、エネルギー変化量は $\Delta v = 0.01 \text{ kcal/mol}$ 程度で、 $\Delta G_c = 3 \text{ kcal/mol}$ に比べると非常に小さいことがわかった。すなわち、Hbの協同性エネルギーは、酸素の結合するヘム近傍には殆ど貯えられないが、4次構造の変化はdeoxyHbのFe-N_e(His)結合がRで $\sim 0.01 \text{ \AA}$ 短くなることによりヘム鉄に伝えられているという実験証拠が共鳴ラマンの研究から初めて得られたことになる。

られなかった。他のHbをいくつか調べて見ると、どの場合にもこのラマン線のみがTとRとで同様な振動数シフトを示した。

Hb からヘムをとり出し、そのヘム鉄を ^{57}Fe や ^{54}Fe に入換え、そのヘムをHbに再構成してラマンスペクトルを測定すると、このラマン線だけが 3 cm^{-1} シフトした。deoxyHbのモデル化合物である鉄ポルフィリン・2-メチルイミダゾール錯体においても、対応するラマン線が 207 cm^{-1} にみとめられ、 ^{54}Fe 置換により 4 cm^{-1} の高波数シフト、2-メチルイミダゾールの完全重水素化により 3 cm^{-1} の低波数シフトを示したので、このラマン線は鉄と軸

- 1) K.Imai, *Biochemistry* **12**, 798-807(1973).
- 2) T.Kitagawa, M.Abe, & H.Ogoshi, *J.Chem.Phys.* **69**, 4516-4525(1978).
- 3) M.Abe, T.Kitagawa, & Y.Kyogoku, *J.Chem.Phys.* **69**, 4526-4534 (1978).
- 4) K.Nagai, T.Kitagawa, & H.Morimoto, *J.Mol.Biol.* in Press.