

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. 28 P.9-P.13
Issue Date	1979-10
Text Version	publisher
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/10939">http://hdl.handle.net/11094/10939</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

# 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 $\alpha$ 鎖が2本、146個からなる $\beta$ 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 $N_\epsilon$ 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。

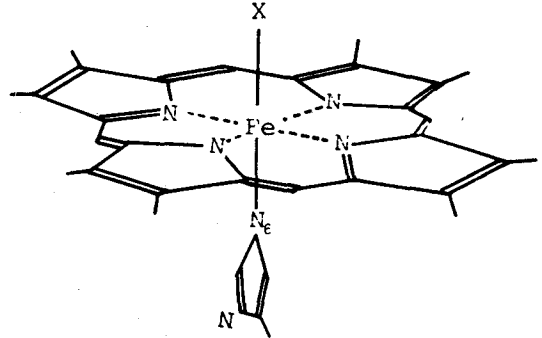


図1. ヘムの骨格と軸配位子、ヘム鉄の一方側からヒスチジンのイミダゾールグループの $N_\epsilon$ が鉄に配位し、Xの位置に $O_2$ が結合する。

$O_2$ 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 $\sim 100$ 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O<sub>2</sub>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 $\Delta G_T$ 、Rのままdeoxy→oxyとなるときのを $\Delta G_R$ とすると、 $\Delta G_R$ が $\Delta G_T$ より3 kcal/molだけ大きい。<sup>1)</sup>これを協同性エネルギー( $\Delta G_c$ )と呼ぶが、 $\Delta G_c$ 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

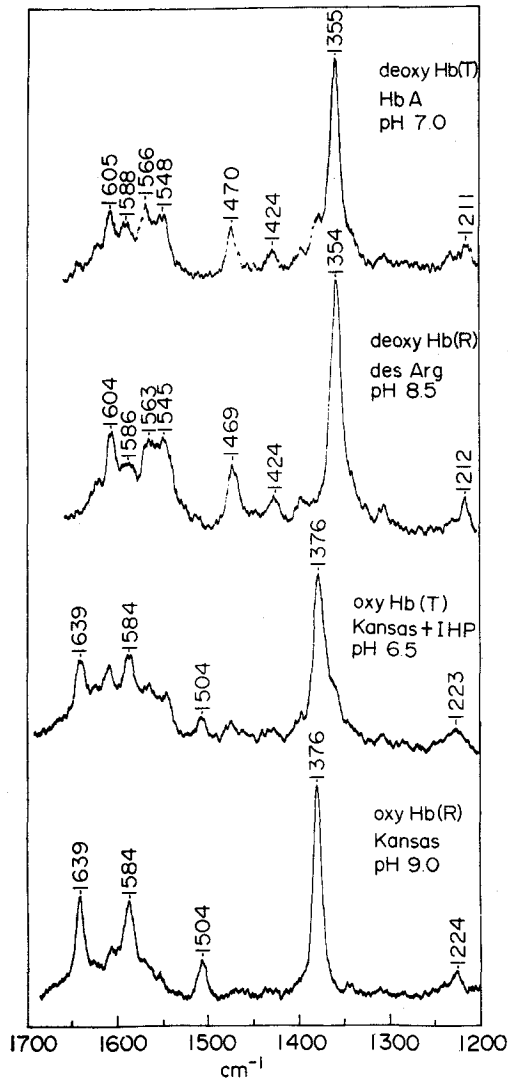


図2. deoxy HbのTとRおよびoxy HbのTとRの1200~1700cm<sup>-1</sup>領域の共鳴ラマンスペクトル

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<sup>2)</sup>や基準振動の計算<sup>3)</sup>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-O<sub>2</sub>伸縮振動領域のスペクトルを図3<sup>4)</sup>に示す。a)はTのoxy Hb, b)はRのoxy Hbで、b)の<sup>16</sup>O<sub>2</sub>の代りに<sup>18</sup>O<sub>2</sub>を結合させたものがc)である。<sup>16</sup>O<sub>2</sub>を<sup>18</sup>O<sub>2</sub>に置換すると $568\text{cm}^{-1}$

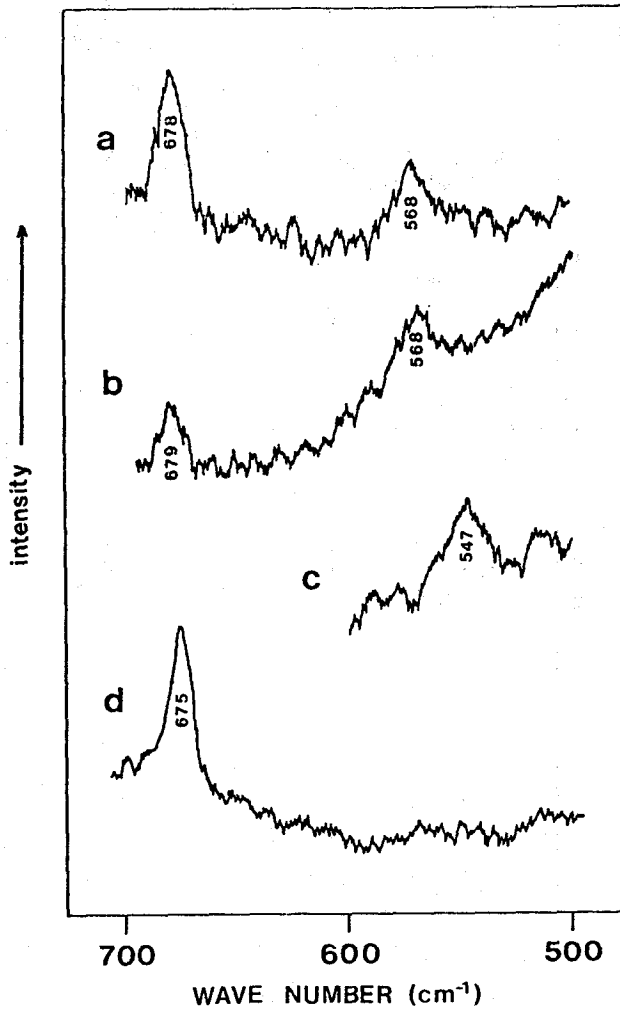


図3. HbのFe-O<sub>2</sub>伸縮振動領域のラマンスペクトル<sup>4)</sup>

- a) oxy Hb(T), b) oxy Hb(R), c) <sup>18</sup>O<sub>2</sub>を結合したoxy Hb(R)  
d) deoxy Hb

のラマン線が $547\text{cm}^{-1}$ 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、 $568\text{cm}^{-1}$ のピークは消えた。したがって $568\text{cm}^{-1}$ のラマン線がFe-O<sub>2</sub>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、 $\Delta G_0$ がFe-O<sub>2</sub>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<sup>4)</sup>によって初めて見つけられた。図4<sup>4)</sup>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

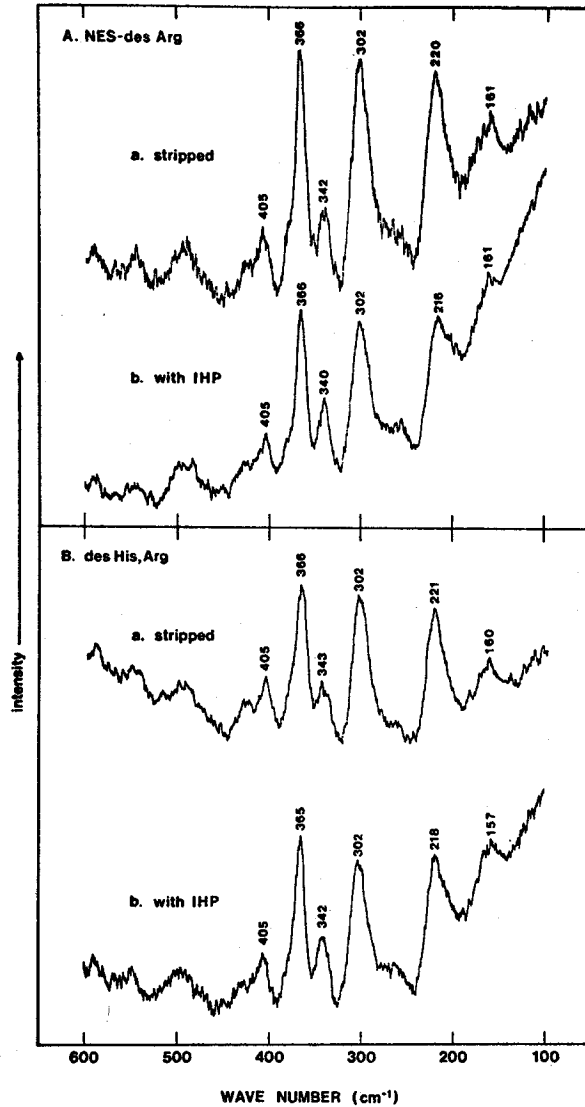


図4. 二種のdeoxy HbのTとRの比較<sup>4)</sup>

A, Bとも(a)がR, (b)がT構造

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

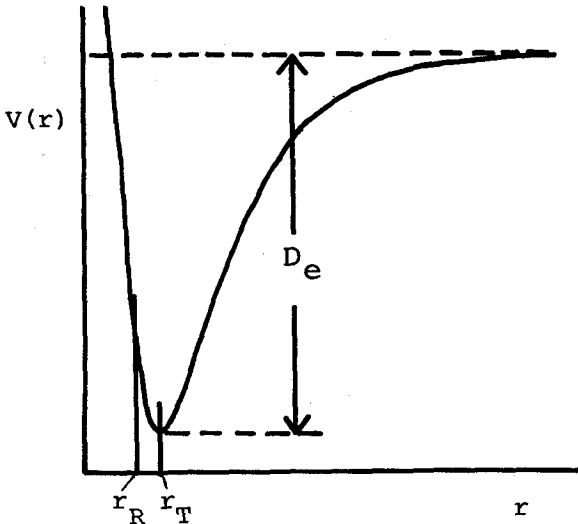


図5. モースポテンシャル関数

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<sub>e</sub>(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<sub>e</sub>が平衡距離(r<sub>T</sub>)にあってそのバネの定数がk<sub>T</sub>, RではΔrだけずれて(r<sub>R</sub>)そのバネの定数がk<sub>R</sub>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<sub>R</sub>=k<sub>T</sub>(1-3aΔr)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~24Å<sup>-1</sup>であることが知られている。(ν<sub>R</sub>/ν<sub>T</sub>)=(k<sub>R</sub>/k<sub>T</sub>)<sup>1/2</sup>という関係と、TとRとで最大の振動数差を生むν<sub>T</sub>とν<sub>R</sub>の実測値とからΔr=-0.007Åと計算された。それに相当するエネルギー変化はΔv=0.003kcal/molであった。216cm<sup>-1</sup>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Δv=0.01kcal/mol程度で、ΔG<sub>v</sub>=3kcal/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<sub>e</sub>(His)結合がRで~0.01Å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<sup>57</sup>Feや<sup>54</sup>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3cm<sup>-1</sup>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207cm<sup>-1</sup>にみとめられ、<sup>54</sup>Fe置換により4cm<sup>-1</sup>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3cm<sup>-1</sup>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.