



Title	Site-directed mutagenesis in hemoglobin : Test of functional homology of the F9 amino acid residues of hemoglobin α and β chains
Author(s)	Abdul, Hassan Mohammed Mawjood
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41842
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	アブドル ハッサン モ ハ マ ド マウジュド Abdul Hassan Mohammed Mawjood
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15215 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Site-directed mutagenesis in hemoglobin : Test of functional homology of the F9 amino acid residues of hemoglobin α and β chains (ヘモグロビンの部位特異的変異誘導 : ヘモグロビン α 鎖、 β 鎖のF9アミノ酸残基の機能的相同性の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 福田 淳 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

ヘモグロビン β 鎖のF9部位のCys残基のSH基は、デオキシT状態では周囲のアミノ酸残基の側鎖によってマスクされるが、オキシR状態では溶媒に露出して反応性を示す。このCys-F9 β 残基は哺乳類と鳥類では保存されているが、その機能的役割は不明である。最近、そのSH基が肺組織で生成したNOを結合して、局所の血流および酸素運搬を調節するという仮説が提唱されている。一方、 α 鎖の相同部位F9にはCysはなく、この部位の残基の役割も不明である。そこで、ヒト・ヘモグロビンの α 鎖のAla-F9(88)をCysに(rHb A88 α C)、また逆に、 β 鎖のCys-F9 β (93)をAlaに(rHb C93 β A)、さらにこのCys-F9 β (93)をThrに(rHb C93 β T)、それぞれ置換した3種類の単一アミノ酸置換変異ヘモグロビン合成し、これらの酸素結合能、紫外域微分スペクトル、反応性SH基の滴定・反応速度などの解析を通じて、 α 鎖、 β 鎖のF9部位残基の機能的役割や相同性について検討した。

【方法】

1) 遺伝子組換え変異ヘモグロビンの調製

変異ヘモグロビンの合成は基本的にはNagai et al.の部位特異的変異誘導法に従った。目的の変異を導入した α または β グロビン遺伝子を、T7プロモーターを持つ発現プラスミド(pT7cIIFX α -globinまたはpT7cIIFX β -globin)に組み換え、大腸菌BL21株中で発現させた。得られた変異グロビン鎖、相手の天然グロビン鎖、ヘミンからヘモグロビン四量体を再構成し、精製した。目的の変異が導入されたことを質量分析法によって確認した。

2) 酸素結合能の解析

Imaiの酸素解離曲線自動分析装置を用いて試料の酸素解離曲線を測定し、コンピュータでデータを実時間収集した。pHなどの溶液条件を変えて、酸素親和性、協同性のほか、Bohr効果(pH依存性)、inositol hexaphosphate(IHP)の効果を解析した。

3) 分光学的解析

ダブルビーム自記分光光度計(320L型、日立製)を用いて、可視・紫外域吸収スペクトルのほか、紫外域一次微分スペクトルを測定した。

4) SH基の滴定・反応速度解析

反応性SH基をp-mercuribenzoate(PMB)で滴定し、その4,4'-dipyridine disulfide(4PDS)との反応の

速度を解析した。

【結果】

正常ヘモグロビン (Hb A) に比べて3つの変異ヘモグロビンはいずれも高い酸素親和性 ($r\text{Hb C93 } \beta\text{A} < r\text{Hb A88 } \alpha\text{C} < r\text{Hb C93 } \beta\text{T}$) を示した。また、協同作用 (Hill 係数 n_{max})、Bohr 効果はいずれも減少、IHP の効果は $r\text{Hb C93 } \beta\text{A}$ と $r\text{Hb C93 } \beta\text{T}$ においては減少、 $r\text{Hb A88 } \alpha\text{C}$ においては消失していた。 $r\text{Hb C93 } \beta\text{A}$ と $r\text{Hb C93 } \beta\text{T}$ に IHP を加えると n_{max} は回復したが、 $r\text{Hb A88 } \alpha\text{C}$ の n_{max} は不変であった。

変異ヘモグロビンの紫外域微分スペクトルの微細構造の大きさは、オキシ型では HbA のそれに等しいが、デオキシ型では HbA に比較して大きくなっていった。変異ヘモグロビンの Soret 吸収帯の高さは、オキシ型では Hb A のそれに等しいが、デオキシ型では Hb A に比べて低くなっていった。

CO 型での反応性 SH 基の四量体当たりの数は、Hb A で2.2個、 $r\text{Hb A88 } \alpha\text{C}$ で3.5個、他の2つの変異ヘモグロビンでは0.1個以下であった。さらに、 $r\text{Hb A88 } \alpha\text{C}$ の反応性SH基の4PDSとの反応の速度は、CO 型では Hb A と同等であるが、デオキシ型では2.3倍だけ高まっていた。

【総括】

紫外域微分スペクトルや Soret 吸収帯の挙動は、今回の変異ヘモグロビンのオキシ型は正常な R 状態にあるが、デオキシ型では R 状態から T 状態への転移が部分的に抑制されていることを意味する。この結果は、変異ヘモグロビンでみられた酸素親和性の上昇やアロステリック作用の減少と合致する。これらの機能的変化の起こる構造上の機序を、Hb A の結晶構造に基づいて検討した。 $r\text{Hb A88 } \alpha\text{C}$ の3.5個の反応性 SH 基から Cys-93 β の寄与とみられる2個を差し引いた残りの1.5個は Cys-88 α の寄与と考えられるが、何故整数ではないのかは不明である。本研究により、 α 鎖と β 鎖の F9 部位のアミノ酸残基はともに重要な機能的役割を演ずること、また、F9 (88) α 部位での Ala \rightarrow Cys 置換と F9 (93) β 部位での Cys \rightarrow Ala 置換が互いに反対方向への機能変化をもたらさないことから、これら2つの相同部位は機能的相同性をもたないことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヘモグロビンの β 鎖のヘム鉄とリンクしている F8 部位のヒスチジン残基の隣に位置して、哺乳類と鳥類で保存されているシステイン残基 Cys-93 (F9) β と、これを相同部位にある α 鎖の88 (F9) 部位のアラニン残基の機能的役割や相同性について検討を行ったものである。

部位特異的変異誘導技術を用いて3種類の遺伝子組換え変異ヘモグロビンを調製して、これらの酸素親和性、協同作用、Bohr 効果などのアロステリック効果を正常ヘモグロビン (Hb A) および天然の F9 部位変異ヘモグロビンと比較している。さらに、紫外域一次微分スペクトルの微細構造や Soret 吸収帯の挙動から、これらの組換え変異ヘモグロビンのオキシ型は正常な R 状態にあること、また、デオキシ型は R 状態から T 状態への転移が部分的に抑制されていることを証明し、機能変化を説明するための基礎を与えた。また、これらの機能的変化の起こる構造上の詳細な機序を、Hb A の結晶構造に基づいて検討し説明した。SH 基の滴定により、Hb A に比べて Ala-F9 α \rightarrow Cys 置換体は1.5個だけ余分の反応性 SH 基を持つことを示し、それを Cys-F9 α の寄与と考えた。反応性 SH 基の反応速度の解析を通じて、デオキシ型では Ala-F9 α \rightarrow Cys 置換体の SH 基の環境は Hb A に比べて異なっていることを示した。

以上の結果より α 鎖と β 鎖の F9 部位アミノ酸残基はヘモグロビンの構造と機能に重要な役割を演ずることが明らかになった。さらに、F9 (88) α 部位での Ala \rightarrow Cys 置換と F9 (93) β 部位での Cys \rightarrow Ala 置換が互いに反対方向への機能変化をもたらさないことから、これら2つの部位は機能的相同性をもたないことが明らかにされた。

本研究は、長年にわたって不明であった F9 部位のアミノ酸残基の機能的役割に関して重要な知見を与え、 α 鎖と β 鎖の F9 部位のアミノ酸残基は機能的相同性をもたないことを証明することによって、ヘモグロビンの生理学の発展に重要な貢献を果たし、学位に値するものとする。