

## 単一接触面を有するアロステリック蛋白質における浸透圧の影響

常重, アントニオ / TSUNESHIGE, Antonio

---

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

科学研究費助成事業 研究成果報告書

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

4

(発行年 / Year)

2014-06

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23540481

研究課題名(和文) 単一接触面を有するアロステリック蛋白質における浸透圧の影響

研究課題名(英文) Osmotic Effects on an Allosteric Protein With a Single Interface

研究代表者

常重 アントニオ (TSUNESHIGE, Antonio)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：30409346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：両親媒性溶質を用いて、ヘモグロビンの構造的・機能的解剖を行った。ベタインの存在下では、酸素親和性の低下は浸透圧ストレスで解釈ができた。

一方、3-(1-Pyrido)-1-propane sulfonateの存在下では、デオキシ状態が安定化されたことによって酸素親和性が低下した。驚いたことに、dimethylbenzylammonium propane sulfonate濃度の増加につれて、Hbのデオキシ状態の酸素親和性が徐々に上昇し、オキシ状態の酸素親和性が低下した。しかし、酸素結合協同性に関しては十分に残された。これらの結果はMWCアロステリックモデルに支持しないということが分かった。

研究成果の概要(英文)：By using three amphoteric amphipathic kosmotropes, we were able to split hemoglobin into its two minimal allosteric component, dimers of the form  $\alpha\beta$ , and study their oxygen binding characteristics. In the presence of betaine, the decrease in oxygen affinity was explained in terms of osmotic stress: oxygen affinity dropped as a result of a stabilization of the deoxy conformation. However, in the presence of 3-(1-Pyrido)-1-propane sulfonate, the oxygen affinity of the deoxy conformation of Hb rather increased and ligation cooperativity decreased. In the presence of dimethylbenzylammonium propane sulfonate, with increasing concentrations of this solute, there was not only an increase in the affinity for the deoxy conformation, but also a decrease in affinity for the oxy conformation. However, cooperativity was not abolished. This trait is not compatible with the classical two-state model, since a change in the oxy conformation is not expected, and dimers are non-cooperative.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：allostery amphiphilic solutes protein interface hemoglobin dimer

## 様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アロステリー現象を示す蛋白質のなかから最も知られているのは、四量体のヘモグロビンである。この蛋白質の機能(すなわち、酸素親和性)が調節される。古典論に基づいて、この蛋白質は二つの異なった構造TまたはRをとることに由来している。酸素がこの蛋白質に徐々に結合することにつれて低い親和性をもった T 構造から高い親和性をもった R 構造に変わり、酸素飽和が促進する。構造解析により、TとR構造の違いは、二つの二量体から構成される四量体の形成はそれぞれの $\alpha$ 鎖から $\beta$ 鎖への軸は $15^\circ$ の差が異なるというように解釈されてきた。それぞれTとR構造は、四量体でしか見られない。

(2) しかし、近年、我々はこのような解釈に対して様々な矛盾点があり、古典論では説明できないことが分かった。そこで、四量体のみではなく、二量体にもアロステリー現象がみられると推理した。

(3) 本研究では、様々な実験結果を証拠として挙げて、二量体もアロステリー現象を見せることを紹介したい。

## 2. 研究の目的

(1) 両親媒性溶質を用いて、ヘモグロビン四量体を二つの二量体に構造的に安定化させ、その二量体の機能(つまり、酸素結合能)を調べることによってアロステリーの有無を確かめる。

(2) 従来、ヘモグロビン二量体が四量体に安定化する原因は、二量体間において塩橋または水素結合のネットワークが形成されると考えられてきた。しかし、溶液中のイオン濃度を増加しても四量体は崩れない。よって、親水性ではなく、主に疎水性相互作用は関与していると思われる。そのため、疎水性強度の部位を有する様々な両親媒性溶質を用いて、四量体構造への影響および解離した二量体の機能を調べることにした。

## 3. 研究の方法

(1) 妥当な疎水性を持つ三級アミノ系を選択し、新型両親媒性溶質を合成し、結晶化を繰り返すことによって高純度の化合物を得た。それらの濃度依存性によるヘモグロビンへの酸素結合能に及ぼす影響を厳密に調べた。

(2) 酸素結合能は、今井式自動記録装置を利用した。得られたデータを厳密に様々な解析を行ったうえ、P50、協同性定数  $n_{max}$ 、酸素結合平行定数等を求めた。

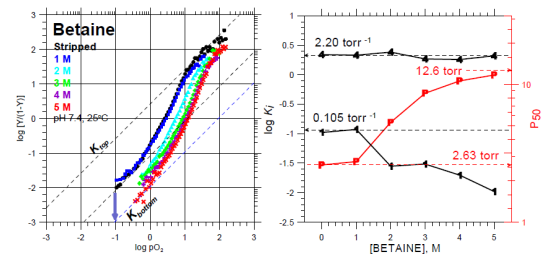
(3) シミュレーションによって溶質のイオンの結合部位を調べた。

## 4. 研究成果

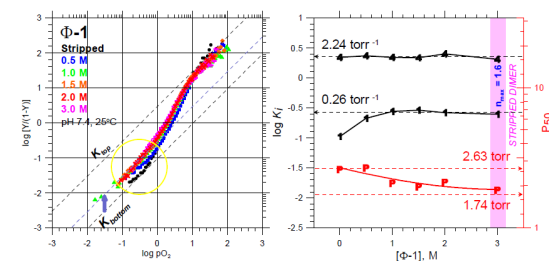
(1) 本研究では、合成した両親媒性溶質は、3-(1-Pyridino)-1-propane sulfonate, dimethylbenzylammonium propane sulfonate, であった。

(2) 酸素結合能実験結果は以下のとおりである。

## (A)



## (B)



## (C)

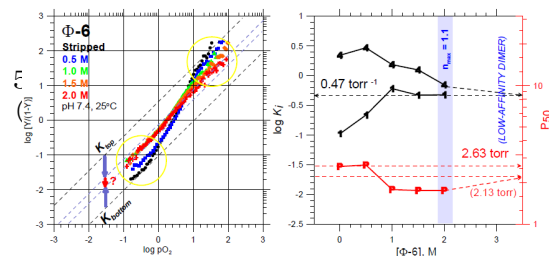


Figure 1. Hill plot で示したヘモグロビン酸素平行曲線(左部)およびそれぞれの溶質濃度に対するヘモグロビンにおける P50,  $K1$  および  $K4$  の依存性(右部)

(A) Betaine, (B) 3-(1-Pyridino)-1-propane sulfonate ( $\phi-1$ ), (C) dimethylbenzylammonium propane sulfonate ( $\phi-6$ ).

(3) Betaine の存在下では(Fig. 1(A)), ヘモグロビンは osmotic stress の影響を受ける、betaine 濃度の上昇につれてヘモグロビンの水和度が低下し、最も水和度の低いデオキシ構造が安定化される。したがって、酸素への親和性が低下する。これは  $K4$  値の低下として見られ、酸素飽和度 50%に当たる酸素分圧 P50 が低下する。

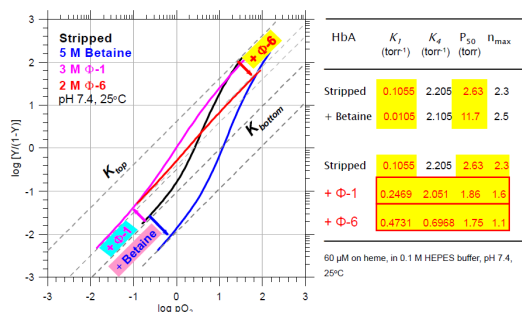


Figure 2. Table 1. 本研究に用いられた両親媒性溶質のヘモグロビン酸素結合能に及ぼした効果

(4) 3-(1-Pyridino)-1-propane sulfonate の存在下では、逆に、 $K_4$  値が上昇する。一方、 $K_1$  値は変化をみせなかった。協同性パラメータ  $n_{\text{max}}$  は 1.6 であり、酸素平行曲線は対称性を示したとサイズ排除クロマトグラフィー法の結果より、3M においては、デオキシ状態でも二量体が存在していると確認できた。

(5) Dimethylbenzylammonium propane sulfonate の存在下では、3-(1-Pyridino)-1-propane sulfonate で見られた  $K_4$  への影響のうへ、 $K_1$  値の減少がみられた。しかし、サイズは排除クロマトグラフィーで確認を行った際、2M では、ヘモグロビン平均分子量は上昇した。この条件下では、ヘモグロビンは  $n_{\text{max}}$  値は 1.1 であった。つまり、協同性は完全にならなかつた。

(6) 以上の結果より、両親媒性溶質分子に含まれている疎水部分が四量体の四次構造に直接に影響していると考えられる。疎水性の程度を強くするほど、四量体の機能が二量体の機能に変わるように見えた。恐らくこの疎水基が二量体界面を相互作用を行って、四量体が二量体に分解すると思われる。従って、Hoffmeister シリーズに含まれるハロゲン族のヨウ化物の影響を試してみた。ヨウ化物イオン ( $\text{I}^-$ ) の半径は大きく 2.06 Å である。これに対して塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) の半径は 1.67 Å。従って、電化密度は比較的には低い。従って、このイオンを水和する水分子との相互作用は強くではない。すなわち、ヨウ化物イオンは chaotrope の振舞をみせる。

(7) ヨウ化物イオンの存在下では、Figure 3 に示す。

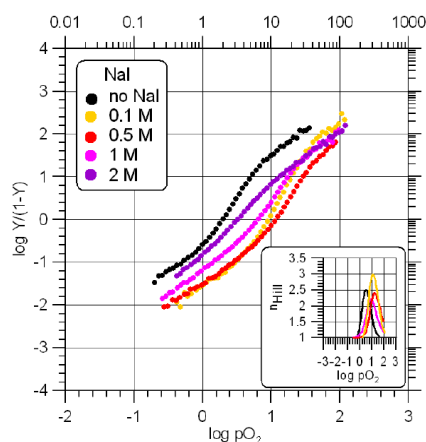


Figure 3. Hill plot で示したヘモグロビンの酸素結合能に及ぼすヨウ化物イオン濃度の影響

(8) ヨウ化物イオンの存在下では、本研究で用いられた両親媒性溶質の類似した効果がみられた。特に、0.1 M~0.5 M の範囲内、 $K_4$  値が低下し、1M からは再度上昇した。2 M ヨウ化物イオンの条件下では、 $K_1$  値が低下し、 $K_4$  値がより上昇した。この際、曲線の対称性、 $n_{\text{max}}$  値で判断すると四量体が二量体に分離していると考えられる。サイズ排除クロマトグラフィー法によって平均分子量を測定したところ、ヘモグロビン二量体になっていると分かった。ゲル濾過を行ったうへ、ヨウ化物イオンが取り除けたところ、再度ヘモグロビンの平均分子量および酸素結合特性が戻った。すなわち、ヨウ化物イオンはヘモグロビンの残基とか悪反応が起こらなかつたと示唆された。

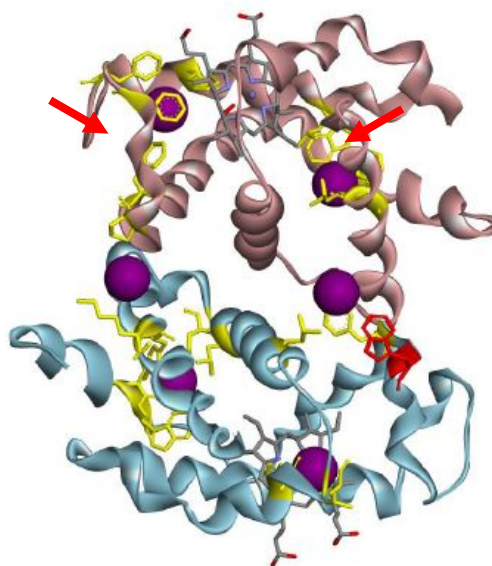


Figure 4.  $\alpha$  鎖(桃色)、 $\beta$  鎖(水色)が構成する二量体の中空洞に向かって *in silico* のシミュレーションの結果  
赤矢印は  $\alpha 1 \beta 1$  接触面に吸着する二つのヨウ化物イオンを示す。

(9) *In silico*でのシミュレーションを行ったところ、Figure 4で示すように、ヨウ化物イオンは疎水基に吸着する傾向がみられた。二つのヨウ化物イオン(紫球体)は $\alpha 1 \beta 1$ 接触面、中空洞のところくに吸着する傾向がみられた(赤矢印)。蛋白質上、これらの部位は Trp, Phe, Leu, Valが多くみられた。特に、Trp37 $\beta$ の近辺にヨウ化物イオンが結合する。

(10) 結論として、本研究で用いた両親媒性溶質は、四量体で安定化された構造が二量体に溶解するような作戦に成功した。この二量体にも協同性が存在すると示唆される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

- ① Tsuneshige, A. & Tokoro, T. “Insight Into the Origin of Allostery. Stepwise Reconstruction Of An Allosteric Protein From Its Subunits”, August 8, 2014, 2014 IUPAB Congress, Brisbane, Australia, (予定)
- ② Tsuneshige, A., Sugawara, K. & Kanaori, K. “Functional Modulation in a Typical Allosteric Protein Revisited - Beyond “T” and “R”, 58th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 15-19, 2014, San Francisco, CA, USA
- ③ Sugawara, K. & Tsuneshige, A. “A New Non-Canonical Control Mechanism In An Allosteric Protein - An Inert Interface Comes to Life”, 57th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 2-6, 2013, Philadelphia, PA, USA
- ④ Tsuneshige, A. & Sugawara, K., “Impact of Interfacial Chemical Modifications on the Assembly of an Allosteric Protein. Isothermal Calorimetry and Oxygenation”, 57th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 2-6, 2013, Philadelphia, PA, USA
- ⑤ Tsuneshige, A., Tajiri, Y., Kanaori, K & Nishihara, H. ”Intradimeric But Not Interdimeric Interactions Control the Function of Hemoglobin”, 56th Annual Meeting of the Biophysical Society, February 25-29, 2012, San Diego, CA, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

常重 アントニオ(TSUNESHIGE, Antonio)  
法政大学・生命科学部・教授  
研究者番号:30409346

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: