

分子シミュレーションおよび時系列クラスタリング法によるヘモグロビンの

酸素運搬機能メカニズムの解明

北村 勇吉

静岡大学工学部化学バイオ工学科

ヘモグロビタンパク質の酸素運搬機能を制御するエフェクターの中で、血中の CO_2 分圧や溶存リン酸などによって変化する溶液 pH が体内での酸素運搬サイクルを制御するうえで重要となる。これまでは実験的にタンパク質表面に存在する 26 つのヒスチジン残基の寄与について議論されてきたが、微視的寄与の詳細なメカニズムについては不明な点があった。我々は、T 状態および R 状態ヘモグロビンの pH 依存性に寄与する 26 表面ヒスチジン残基のプロトン化状態を pH に応じて変化させた分子シミュレーションを実行することで、R 状態 Hb はその周辺で R2 や RR2 などの構造間の遷移挙動を調査し、局所構造およびエネルギー変化を詳細に解析した。その結果、R 状態を起点として TR 状態や R2 状態への pH に依存した遷移率が、実験での結晶条件の設定 pH の対応するシミュレーション結果が得られた。局所構造変化を比較することで、立体構造変化過程に対する表面ヒスチジン残基の微視的寄与を明らかにできた。

1 序論

ヒト成人ヘモグロビン(HbA) ($\alpha 2\beta 2$ グロビン鎖四量体)は赤血球のなかに存在し、肺から全身へと酸素を運搬する役割を担っており、その酸素運搬機能は、酸素(O_2)分圧やエフェクター(H^+ , Cl^- など)の濃度に依存して調節されている。従来のX線構造解析から、酸素親和性の異なる2状態(T状態とR状態)の詳細な3次元立体構造が特定されていた。また、T、R状態とは異なる複数の安定構造(R, R2, RR2, R3, RR3状態)(図1)をとることも報告されており、これらの状態間を動的に遷移することで O_2 親和性の変化を実現していると考えられている[1,2]。 O_2 親和性を調整するエフェクターのうち、水素イオン濃度依存性はボーア効果と呼ばれ[3]、ヒスチジン(His)残基の寄与が大きく、特に βHis143 と βHis146 の寄与が大きいことが指摘されている[4]。しかし、これらのHis残基のプロトン化状態変化が、状態間遷移にどのように影響を及ぼし、 O_2 親和性を調整するのかという詳細なメカニズムは未解明である。そこで本研究では、ボーア効果の分子論的な発現機構の解明を目指し、水素イオン指数(pH)に対応させて 26 表

面His残基のプロトン化状態を指定した条件下で分子動力学(MD)シミュレーションを行うことで、これらの残基側鎖のプロトン化状態変化がHbAの構造的安定性に及ぼす影響について調査した。

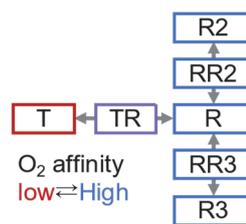


図 1. HbA 遷移経路の模式図[1,2]

2 計算の詳細

ヘモグロビンは酸素運搬過程において、T状態とR状態のみならず、それらの中間的な立体構造(R2やRR2)などを相互に遷移していると考えられている。そのために、多様な構造変化パターンを示すことが想定され、多数の異なる初期構造でからなる大規模なトラジェクトリのサンプリングを得ることが必要となり、スーパーコンピュータの計算資源を活用し実施した(Project ID: EX23603)。

ヒト成人ヘモグロビン(HbA)の R 状態, R2 状態, T 状態の X 線結晶構造(PDB ID:2DN3, 1BBB, 2DN2)を初期構造とし、NMR 測定から決定された 26 個の表面 His 残基の pK_a に基づいて、異なる pH 条件下(pH 4.5~8.0)でのプロトン化状態を指定したモデル系を作成した。各モデル系に対し、Amber16 を用いた 100 ns MD シミュレーションを 30~50 本実行した。平均二乗偏差(RMSD)と主成分分析(PCA)を用いて、安定構造間の遷移を分析し、プロトン化状態変化に伴う立体構造への影響を調査した。

3 結果と考察

R 状態を初期構造としたトラジェクトリにおける R 状態からの遷移率(表 1)を比較すると、系 R^{5.5}, R^{6.0} (pH 5.5, 6.0)で R 状態を保持した割合が 74.0%, 80.2%へと低下しており、pH 低下(His 残基のプロトン化)による R→TR 遷移(15.5, 6.4%)と R→RR2→R2 遷移(5.8, 9.7%)の促進が観察された。R→RR2→R2 遷移の促進は、 β His143 と β His146 のみを変更したモデル系でも観察された[5]。一方で、R2 状態を初期構造とした系においては、pH 変化による影響は小さかった。系 R^{5.5}, R^{6.0}では、R 状態からの遷移の増加とともに、 β サブユニット重心間距離の伸長が観察された。また、残基間接触の統計的解析により、 β サブユニット界面残基の接触の切断を示す構造変化パターンが検出された。

これらの結果は、R 状態と T 状態からの遷移率に対する pH 依存性は、ボーア効果における O₂ 親和性の傾向と一致した。低 pH 環境においては R-R2 状態間の活性化エネルギーが低下することを示唆し、プロトン化した β サブユニット界面 His 残基(β His143 と β His146 を含む)の静電反発が β サブユニット間距離を伸長させ、R 状態からの遷移を促進

することを示唆した (図 2)。

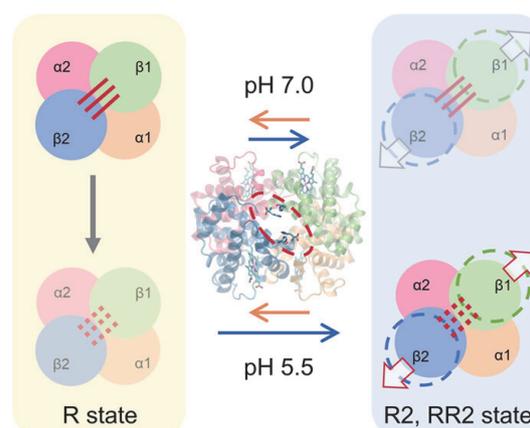


図 2. pH 依存した四次構造変化の模式図[5]

4 結論

ヒト成人ヘモグロビン(HbA)におけるボーア効果の微視的メカニズムについて分子シミュレーション手法を用いて解析した。その結果、His 残基のプロトン化状態がコンフォメーション間の相対的な安定性に影響を及ぼすことによってボーア効果を引き起こすことを示唆した。

5 引用文献

- [1] Safo, M. K., *et al.*, *Biochem.*, 2005, **44**, 8347.
- [2] Shibayama, N., *et al.* *Chem. Soc.*, 2014, **136**, 5097.
- [3] Bohr, C., *et al.*, *Skandinavisches Archiv Fur Physiologie*, 1904, **16**.
- [4] Ho, C., *et al.* In *Encyclopedia of Life Sciences* (Wiley), 2010.
- [5] Yotsuya, H.; Tanaka, M.; Kitamura, Y.; Nagaoka, M. *J. Phys. Chem. B*, 2024, **128**, 2853.

表 1. 5 つの pH 条件における R 状態から他の状態(TR, RR2, R2, RR3 状態)への遷移率

系	pH	R 状態から他の状態への遷移率 [%]				R 保持率
		TR	RR2, R2	RR2	RR3	
R ^{5.5}	5.5	15.5	5.8	1.3	2.9	74.0
R ^{6.0}	6.0	6.4	9.7	1.9	1.7	80.2
R ^{6.5}	6.5	1.3	0.2	0.4	0.7	97.3
R ^{7.0}	7.0	3.5	1.3	0.8	1.4	93.0
R ^{7.5}	7.5	2.2	1.7	1.2	0.9	93.8