

クライオ電子顕微鏡を用いた立体構造解析による

ワニヘモグロビン特有のアロステリック制御の解明

横浜市立大学生命医科学研究科 博士後期課程3年（助成時）

ドイツ Heidelberg 大学 Biochemistry Center ポスドク研究員（現 在）

高橋 捷也

【研究背景・目的】

ヘモグロビンは赤血球中に存在し、血液で全身をめぐりながら、肺で取り込んだ酸素を末梢組織へと運搬するという重要な役割を担うタンパク質である。 α 、 β の2種類のサブユニットが各2つずつ会合した四量体構造をとっており、酸素分圧に応じた酸素の結合と解離を伴ったアロステリックな四量体間の構造が変化する。ほとんど全ての脊椎動物で共通して有機リン酸の作用で酸素の放出が促進されるのに対し、脊椎動物で唯一、ワニのヘモグロビンは HCO_3^- （重炭酸イオン）によるアロステリック制御を受ける。息を止めた潜水時に、末梢組織の血中で増加した二酸化炭素の水和によって HCO_3^- が生成され、 HCO_3^- がヘモグロビンに結合して酸素の解離が促進される。ヒトなどでは取り込んだ酸素の半分程しか全身へと供給できないのに対し、ワニは酸素を余すことなく供給することができる。進化の過程でワニのみが獲得したこの仕組みのおかげで、ワニは2-3時間潜水することができ、水底で獲物を待ち伏せし、捕らえるといった特徴的な狩りを行うことができると考えられている。

しかし、このワニヘモグロビン特有の HCO_3^- 作用が報告されてから40年以上が経過したが、天然のワニヘモグロビンの良質な結晶がこれまでに得られておらず、X線結晶構造解析による構造決定に至っていない。そのため、ワニヘモグロビンと HCO_3^- との結合様式とワニ特有の酸素放出の機序は未だに解明されていない。そこで、結晶化実験の必要のないクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）の単粒子解析法を用いることで、ワニヘモグロビンの立体構造を明らかにすることを目指した。

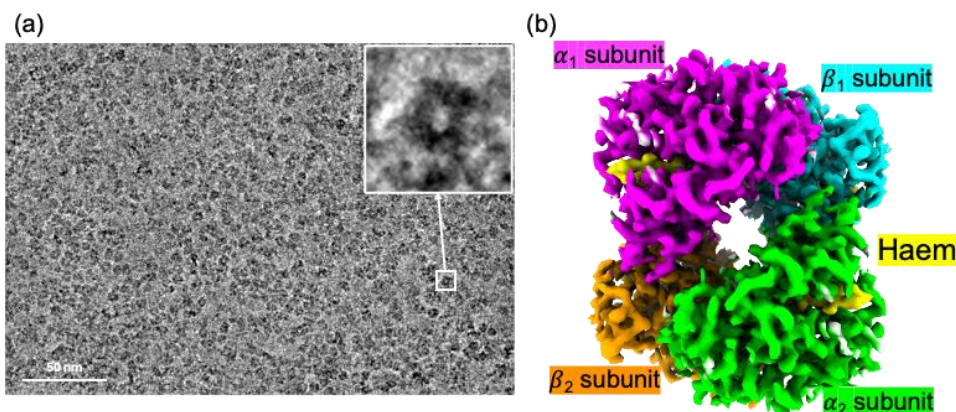


図1 (a) ワニHbの電子顕微鏡撮影像とその拡大図。(b) サブユニットごとに色付けした、ワニヘモグロビンの電鍵マップ。

【研究の成果】

研究目的で飼育されているワニ（アメリカアリゲーター、*Alligator mississippiensis*）から実験動物に関する規則に則って倫理的に採血された血液から、共同研究者によって精製されたワニヘモグロビン試料を用いた。それぞれ一酸化炭素（CO）と酸素が結合した状態の試料を調製し、凍結して cryo-EM で観察した（図 1a）。解析の結果、どちらの状態も約 2.3 Å の分解能の電頭マップを得た（図 1b）。ワニのヘモグロビンも他の脊椎動物と同じ四量体構造であり、酸素や CO が結合した際に見られる「R 型」と呼ばれる構造をとっていた。デオキシ状態の試料の調製は、低酸素な嫌気性環境下に保たれた嫌気チャンバー内で、酸素結合型ワニヘモグロビンに、ヘムから酸素を取り除くための還元剤と重炭酸ナトリウムを添加し、凍結した。解析より、2.2 Å の分解能の電頭マップを得て、「T 型」と呼ばれる立体構造をモデルした。 $\alpha\beta$ サブユニット二量体境界面の対称的な位置に HCO_3^- の密度が見られ、他の脊椎動物のヘモグロビンでは見られない新規の位置に HCO_3^- 結合部位を特定した。

HCO_3^- は、デオキシ型ワニヘモグロビンの $\alpha\beta$ サブユニット二量体間界面の正電荷、もしくは、極性をもつアミノ酸側鎖と複雑な相互作用様式を形成していた（図 2a）。結合に関与しているアミノ酸のうち、 β サブユニット 38 番目のリジン（Lys β 38）と 41 番目のチロシン（Tyr β 41）の、2 つのワニに特有なアミノ酸置換が HCO_3^- との結合重要であることが分かった（図 2b-e）。他のワニ特有のアミノ酸置換によっても、T 型構造中でのサブユニット内、間での相互作用の形成が酸素親和性の低い T 型構造を安定化して酸素の解離を助長していると考えられる。ワニヘモグロビンの立体構造を解明したことで、ワニの進化の過程でヘモグロビンに起こったあらゆる箇所でのアミノ酸置換が相まって、現存するワニの生態に大きな恩恵をもたらした一因であると考えられた。

【今後の課題】

ワニヘモグロビン同様の HCO_3^- 作用による酸素親和性をもつヒトヘモグロビン改変体を、安定性高く作製できれば、将来的には医療分野への応用が期待されている。心肺機能が弱い患者などへの遺伝子治療や輸血用人工血液などへの応用が例として挙げられる。

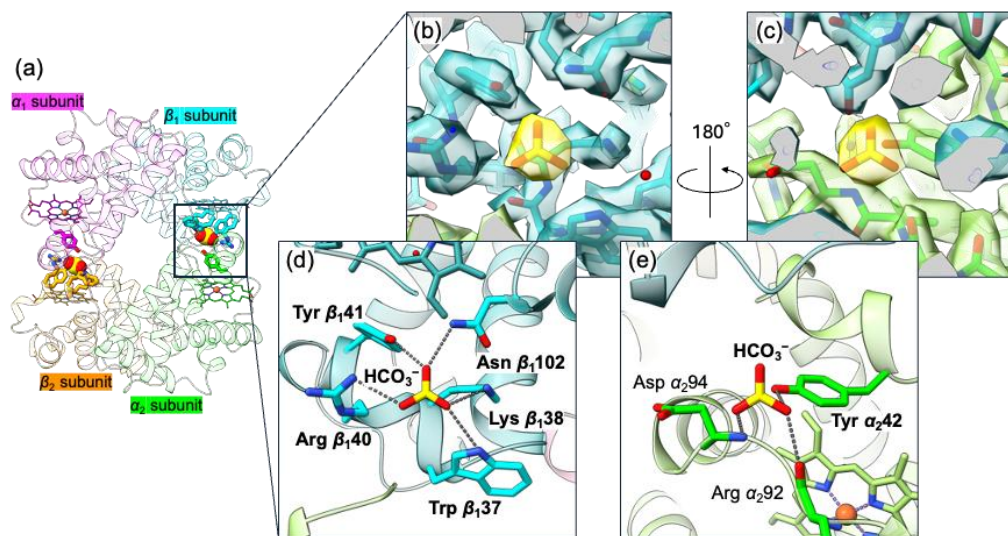


図 2 デオキシ状態のワニ Hb と HCO_3^- との結合様式