

クロマトグラフィーによるヘムタンパク質の分離機構の解明および未解決の問題

長 友 重 紀

1 はじめに

混合物の分離は古くから分析化学の重要な課題であり、現在もクロマトグラフィーの原理の解明に関する研究が進められている。クロマトグラフィーには排除体積（ゲル）クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどがある。これらは分離に関係する物質（移動相）と多孔性シリカゲル、高分子（固定相）間の相互作用の違いによって選択され、方法は異なる。いずれも細孔内に物質が取り込まれ放出される際の分配係数と拡散速度が分離と分離能に関係するので、物質の分離が可能になっている。

本解説では、これまで行ってきた顕微吸収法および共焦点顕微蛍光法によって得られた単一シリカゲル細孔内でのタンパク質分子の拡散挙動の著者の研究を紹介し、次いで、タンパク質の分離における未解決の課題を2点紹介し、将来の分離に関する分析化学の課題として分析化学の発展に寄与したく考えている。

2 シリカゲル細孔内でのタンパク質の拡散挙動

2.1 ミオグロビン（Mb）の単一シリカゲル粒子細孔内での拡散挙動

タンパク質の細孔内での拡散挙動（分配と放出）を調べるためにシリカゲル粒子サイズ 30~100 μm で細孔サイズ 10, 15, 30, 50 nm のシリカゲル粒子を用いて、外部溶液（バルク）から細孔内に入る分配と細孔内からバルクへ放出される Mb の拡散挙動を調べた。実験方法は以下に示す通りである。図1のようなシャーレに入った緩衝水溶液内に浸して細孔内も緩衝溶液で満たされている。図1のように組み立てられた倒立型顕微吸収分光装置を用いて溶液と単一シリカゲル粒子の細孔内の濃度を決定して分配比（=粒子内濃度/粒子外溶液濃度）を求め、共焦点蛍光顕微鏡（Olympus, FL-1000）にて後述する重鉛再構成ミオグロビン（ZnMb）の蛍光強度測定

から拡散係数を決定した¹⁾。ZnMb は既報の方法²⁾ に従い、ウマ心筋 Mb（Sigma-Aldrich）の水溶液の pH を下げて分液漏斗によりヘム（鉄プロトポルフィリン IX）を抜いたアポ Mb を調製し、アルカリ性溶液に溶かした重鉛ポルフィリン IX をアポ Mb と混合して調製した。Mb はポリペプチド鎖とヘム（鉄プロトポルフィリン IX）をもつヘムタンパク質で、ポリペプチド鎖とヘムは近位ヒスチジン（His F8）がヘム鉄に配位結合でつながっている（図2）³⁾。重鉛ポルフィリンは鉄プロトポル

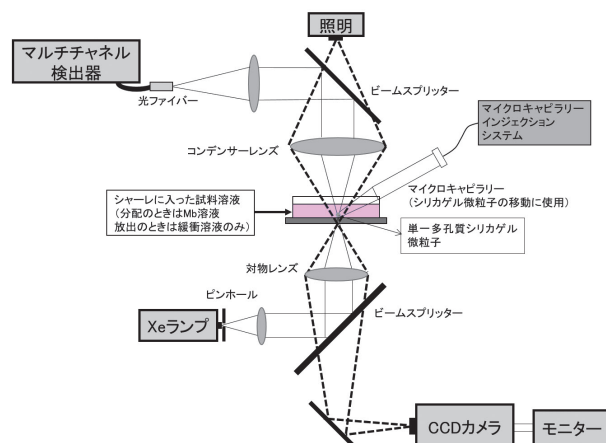


図1 マイクロキャピラリーインジェクションシステムと倒立型顕微鏡を用いた顕微吸収分光装置図

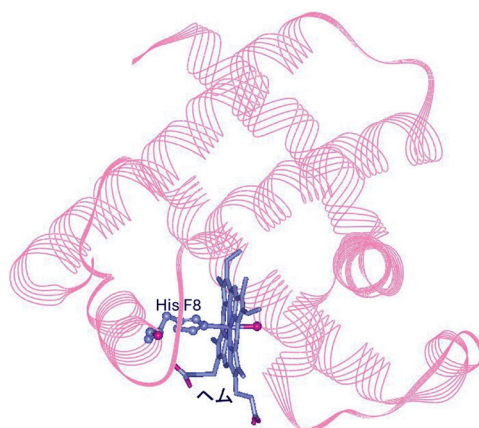


図2 ウマ心筋ミオグロビンの分子構造（酸化形）
PDB : 1YMB

フィリン IX の鉄が亜鉛に置き換わっている。

共焦点蛍光顕微鏡での結果から、拡散は細孔外律速ではなく、細孔内律速であることがわかった。細孔内拡散（拡散係数 D_p ）に関してポア・表面拡散モデル⁴⁾にしたがって解析を行った（図3）⁵⁾。

$$D_p = \frac{D_w H(a, d_p)}{\tau_w (1+R)} + \frac{D_s R}{\tau_s (1+R)} \dots\dots\dots (1)$$

$$H(a, d_p) = \left[1 - \frac{a}{d_p} \right]^2 \left\{ 1 - 2.104 \left[\frac{a}{d_p} \right] + 2.09 \left[\frac{a}{d_p} \right]^3 - 0.95 \left[\frac{a}{d_p} \right]^5 \right\} \dots\dots\dots (2)$$

なお、物理量の意味は以下のとおりである。

D_w ：水溶液中の拡散係数、 D_s ：表面拡散係数、 R ：分配係数（＝細孔内溶液濃度/細孔壁濃度）、 τ_w ：ポア拡散の屈曲率 (tortuosity)、 τ_s ：表面拡散の屈曲率、 $H(a, d_p)$ ：立体障害パラメーター、 a ：(球状分子とみなした時の) Mb の直径、 d_p ：シリカゲル細孔径（直径）。

図3より、横軸を $1/(1+R)$ 、縦軸に拡散係数 (D_p) をとると、(1) 式の第一項（傾き）が「ポア拡散」、第二項（切片）が「表面拡散」を表すことがわかる。この解析により、以下の結論を得た。

1. 分配（粒子外から粒子内への拡散）は、細孔サイズが小さいとき（10, 15 nm）、表面拡散が主で起こり、細孔サイズが大きいつき（30, 50 nm）、表面拡散に加えてポア拡散の寄与が生じる。ただし、モデルから予想される拡散係数値よりもポア拡散係数の値はかなり小さかった。
2. 放出（粒子内から粒子外への拡散）は、10 nm では表面拡散が主で起こったが、15, 30, 50 nm では表面拡散に加えてポア拡散の寄与が大きくなる。得られたポア拡散係数の値はモデルから予想される

る拡散係数値よりも小さかった。

先行研究より、シリカゲル粒子の細孔内の拡散は、低分子のローダミン 6G (R6G) では分子がポア（細孔）内を通るポア拡散のみで起こることがわかっている。なお、ポア拡散は図4に示すように、シリカゲル細孔壁との間の吸脱着平衡が成立している状態で起こっている。Mbにおいて、表面拡散のみならずポア拡散の寄与が観測されたのは、分子サイズが細孔壁のシラノール基間隔よりも大きいことから脱着がなくとも細孔内の壁面のシラノール基を“ずりずり”と動く（表面拡散する）ことができるからと考えられる。シリカゲル細孔内壁面はシラノール基 (Si-O-H) のプロトン解離のため、負に帯電している。R6Gでは、分子サイズが小さいため分子体積当たりの正電荷密度が高く、シリカゲル細孔内壁面の負電荷と強く静電相互作用（引力）で引き合うが、分子サイズが小さいため、分子サイズが大きい Mb とは異なり、表面拡散では次のシラノール基に（分子サイズを利用して）進む（表面拡散する）ことができない。そのため、低分子のローダミン 6G (R6G) ではポア拡散のみで起こったと考えられる。

なお、ミオグロビンのようなタンパク質は正味の電荷が正であっても、タンパク質表面は正と負の電荷が存在しており、シリカゲル細孔内壁面からの脱着が容易に起こるため、ポア拡散が観測されたと考えている。ただし、細孔内からの放出において、モデルから予想されるポア拡散係数の値よりも小さく（15 nm：85%，30 nm，59%，50 nm：44%）、細孔サイズが大きいくほど、抑制割合が大きい。なお、この数値（%）は図3（B）の実線を破線で割った値である（15 nm のときの“破線”は図3には示していない）。

この理由としては、図4に赤色両矢印（ $\updownarrow$ ）で示した脱着が遅く、平衡に達していないため、平衡に達したときに取り得るポア拡散よりも小さくなっていると示唆される⁵⁾。

また、分配におけるポア拡散の拡散係数の値が、放出に比べて著しく小さいことが図3より示されるが、分配と放出において細孔内と細孔外を区切る“細孔の入り口”で生じる現象が両者の違いを生じていると考えられる。それは以下の通りである。

分配に際しては、細孔外から細孔内に Mb が入ってくるが、入り口で細孔壁に吸着する（図4）と Mb の分子

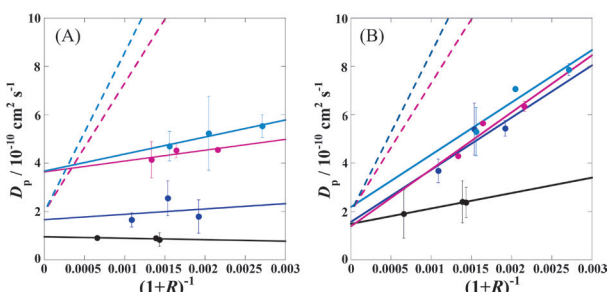


図3 (A) 分配、(B) 放出に対する D_p （細孔内拡散係数）と $(1+R)^{-1}$ の間の関係

シリカゲル細孔径（直径）10 nm（黒）、15 nm（群青）、30 nm（赤紫）、50 nm（水色）。実線は各々実験値の最小二乗、破線は式（1）のポア-表面拡散モデル（ $a=3.46$ nm、 $D_w=1.3 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ for ZnMb^{6),7)}、 $D_s=4.0 \times 10^{-10}$ cm² s⁻¹）に基づいて計算された線である。Reprinted with permission from *Langmuir*, 39, 11329 (2023). Copyright 2023 American Chemical Society.

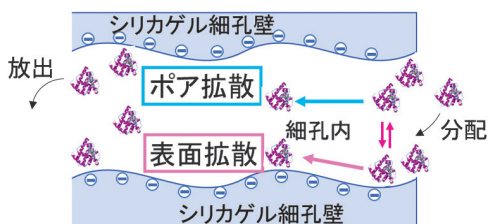


図4 ミオグロビンの分配と放出の模式図

サイズ（球状モデルと仮定；4.4 nm×4.4 nm×2.5 nm）の分だけ細孔径が小さくなるので、見かけの「細孔径」が小さくなると予測される。この影響は式（1）の H （立体障害パラメータ）に現れ、より「細孔径が小さく」なることで、ポア拡散の寄与が減少する。

一方、放出に際しては細孔内から細孔外へ出ることになるので、「細孔内が小さくなる」ことは生じない。したがって、本来の細孔径で放出が行われることになるので、同じ細孔径で比較すると、分配よりも放出の方が細孔内拡散（拡散係数 D_p ）へのポア拡散の寄与が大きくなると考えられる。

2.2 Mb のシリカゲル細孔内拡散の pH 依存性

Mb の細孔内での拡散挙動（分配）に関して、Mb を溶かしている緩衝溶液の pH の依存性を検討した⁸⁾。シリカゲル粒子サイズと細孔サイズはそれぞれ 30~100 μm 、50 nm で行った。2・1 と同様、外部溶液（バルク）から細孔内に入る分配される Mb の拡散挙動を調べた。実験方法も（1）と同様であるが、今回は紫外可視吸収スペクトルにて細孔内に入る Mb の拡散挙動を追跡したので、前述の図 1 のような顕微吸収分光装置を用いて測定した。

顕微吸収分光装置での結果から、2・1 と同様、拡散は細孔外律速ではなく、細孔内律速であることがわかった。細孔内拡散に関してポア・表面拡散モデルにしたがって解析した（図 5）。この解析より、以下の結論を得た。

1. pH 6.0 ではシリカゲル細孔内の拡散は表面拡散のみで起こり、ポア拡散は生じなかった。
2. pH 6.5, pH 6.8 と pH 7.1 ではポア拡散が観測されたが、モデルから予想されるポア拡散係数の値よりも小さく（pH 6.5：20 %，pH 6.8：23 %，pH 7.1：49 %）、2・1 と同様、細孔径 50 nm でポア拡散が抑制されていることが確認された。なお、こ

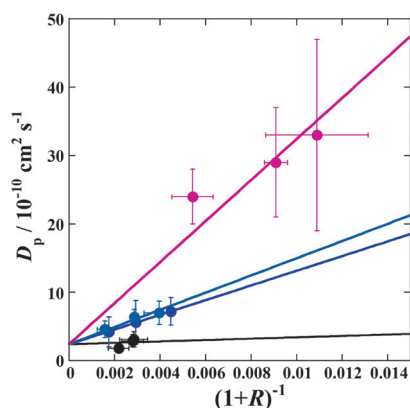


図 5 種々の pH での分配に対する D_p （細孔内拡散係数）と $(1+R)^{-1}$ の間の関係

pH 6.0（黒）、6.5（群青）、6.8（水色）、7.1（赤紫）。実線は各々実験値の最小二乗である。Reproduced with permission from Springer Nature, *Anal. Sci.*, **40**, 1545 (2024).

の数値（%）の求め方は図 3（B）の場合と同じである。

3. pH 7.1 で pH 6.5, pH 6.8 よりもポア拡散係数が大きくなっている。これは pH 7.1 で Mb の正味の電荷が正電荷から負電荷になったことにより、負電荷を帯びているシリカゲル細孔内壁面と Mb 分子間の静電相互作用（引力）が弱まり、部分的に斥力が働くことで脱着速度が大きくなったためと考えられた。

2・1 で細孔径が大きい（30 nm, 50 nm）場合のポア拡散の抑制が示唆されたが、pH 依存性を調べることで、ポア拡散係数における脱着速度の寄与が大きいことが明らかになった。

このように、単一シリカゲル細孔内でのミオグロビンの拡散挙動を研究より、タンパク質のサイズ、シリカゲル細孔の大きさの選択により、細孔内のポア拡散、表面拡散を制御できることがわかった。分配と放出でポア拡散、表面拡散の値は異なる、つまり分配と放出の細孔内拡散係数 D_p （＝ポア拡散＋表面拡散）の値が異なる。また各 pH では分配係数も異なっている。

このように、分配係数と拡散速度は Mb の分離と分離能に関係している。細孔サイズの違いによって分配と放出の拡散係数が変わり、その結果として細孔内に滞在する Mb の分子数を制御し得る。Mb の pI より低いあるいは高い pH により、Mb 分子の正味の電荷を正と負に変えることで Mb を細孔内に吸着しやすくしたり（正の場合）、拡散しやすくしたり（負の場合）することにより制御できる。このことがクロマトグラフィーによるミオグロビンを含むヘムタンパク質の分離を可能にしていることが示唆された。

3 タンパク質の分離における未解決の課題の紹介

3.1 SP-Sepharose fast-flow カラムによるヘム反転を区別するイオン交換クロマトグラフィー⁹⁾

天然のヒト成人ヘモグロビン（Hb A）は、ヒトの赤血球中に存在し、酸素運搬機能を有するヘムタンパク質である。 α サブユニットと β サブユニットを二つずつもつ四量体構造をもち、各サブユニットに一つのヘム（鉄プロトポルフィリン）をもち、そのヘムに酸素分子が可逆的に結合する（図 6）¹⁰⁾。

Hb A にあるヘムは 5-15 軸を対称軸としてほぼ対称であるが、厳密には 2,7-位のメチル基、3,8-位のビニル基がそれぞれ 5-15 軸に対して対称の位置にないため、ヘムには「表」と「裏」が存在する。天然の Hb A では、「表」のヘムの割合が α サブユニットでは 90 %、 β サブユニットでは 98 % とほぼ 100 % 近くであるのに対し、「裏」の割合は非常に少ない。以後、「表」のヘムのことをノーマル（正常）型ヘム配向、「裏」のヘムのことをリバース（反転）型ヘム配向と呼ぶことにする（図 7）。

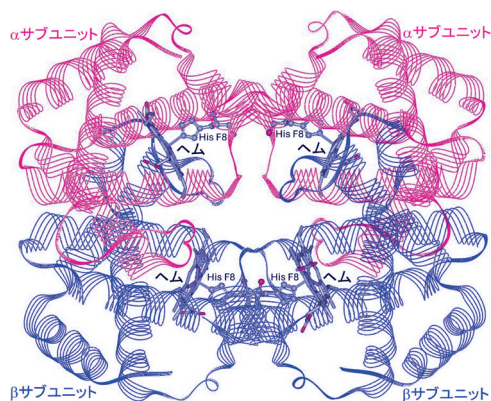


図6 ヒト成人ヘモグロビン (Hb A) の分子構造 (脱酸素形)
PDB: 2DN2

Hb A 中のヘムの配向は常磁性シフトした ^1H NMR にて区別できる (図8). 常磁性シフトした ^1H NMR の測定, 実験例はこちらの文献^{(11)~(13)}を参照されたいが, 図7に示すように, 2-, 12-, 18- (リバー型では 8'-, 18'-, 12'-) の常磁性シフトした ^1H NMR の化学シフトの値が異なる. また, ^1H NMR のシグナル強度は各々の配向で存在するメチル基の存在数を表すので, シグナル強度が大きいくほど存在数が多くなる. 天然の Hb A ノーマル型がほとんど (α サブユニットでは 90 %, β サブユニットでは 98 %⁽¹¹⁾) であることがわかる.

しかしながら, 天然の Hb A からヘムを抜いてアポヘモグロビン (α , β サブユニットのみの Hb A) とし, ここにヘムを加えて Hb A を再構成 (以後, 再構成 Hb A と呼ぶ) すると再構成直後は平均してノーマル型とリバー型が半数 (50 : 50) になる. このことは速度論的にはノーマル型, リバー型は区別されていないことを意味する. このまま Fe^{3+} の完全酸化型のままにしておくと, 熱力学的に安定な配向であるノーマル型が多数となって平衡に達する (α サブユニットでは 90 %, β

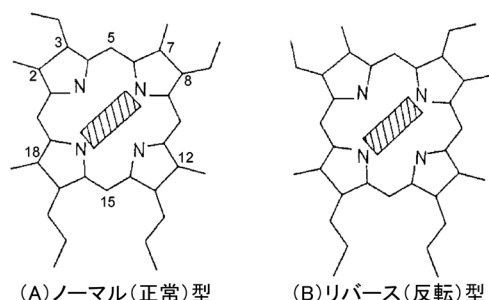


図7 近位ヒスチジン (His F8) に対するヘム (鉄プロトポルフィリン IX) の二つの取り得る配向

(A) ヒト成人ヘモグロビン (Hb A) の X 線結晶構造解析によって見いだされるノーマル型. (B) 5,15-メソ軸に対して (A) の配向から 180° 回転したヘムをもったリバー (反転) 型. 斜線をつけた長方形は近位 His F8 イミダゾール面の向きを示す. ヘムの側鎖の番号は IUPAC-IUB にしたがっている. プロトポルフィリン IX は 2,7,12,18 位にメチル基, 3,8 位にビニル基, 13,17 位にプロピオン酸基をもっている. Reprinted with permission from *Biochemistry*, **47**, 517 (2008). Copyright 2008 American Chemical Society.

サブユニットでは 98 %) が, Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元して一酸化炭素 (CO) をヘムに配位させると, 事実上ノーマル型とリバー型半数 (平均値) の配向のままで止まり, Fe^{3+} の場合と異なりノーマル型が多数にはならない.

なお, Hb A を遺伝子工学的に調製 (以下リコンビナント Hb A (rHb A と呼ぶ)) したときも, 調製された α サブユニットと β サブユニットがヘムを取り込む際の配向は再構成 Hb A の場合と同様, 平均してノーマル型とリバー型が半数 (50 : 50) になる⁽⁹⁾. なお, 遺伝子工学的に rHb A を調製する場合, 調製途中で CO を加えるので調製された rHb A は CO 結合形になっている.

この CO 配位の rHb A はノーマル型とリバー型半数の配向をもつ. この CO 配位の rHb A を SP-Sepharose fast-flow カラムにのせて溶出した. SP-Sepharose fast-flow カラムは, 陽イオン交換体 (6 % 架橋アガロース, 強陽イオン交換体, 交換基 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$, 粒子サイズ 45~165 μm (Pharmacia 社)) である. したがって, タンパク質の正味の電荷が負であればあるほど強く吸着する. SP-セファローズカラムは pH 7.2, 0.01 M のリン酸緩衝溶液 (Na^+) で平衡化した. 両方の Hb は pH 7.2 (0.01 M) から pH 8.0 (0.01 M) のリン酸緩衝溶液 (Na^+) の pH 勾配により溶出した. (実線) rHb A の 576 nm の吸光度 ($A_{576\text{ nm}}$). (破線) Hb A の $A_{576\text{ nm}}$. (点線, inset) rHb A の 576 nm の吸光度 ($A_{576\text{ nm}}$) に対する

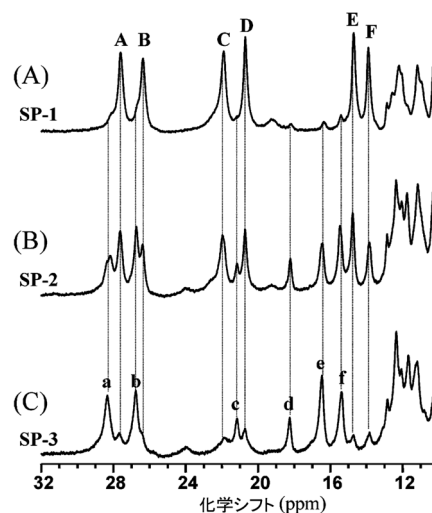


図8 メトアジド ($\text{Fe}^{3+}-\text{N}_5^-$) 誘導体リコンビナント Hb A (rHb A) の常磁性シフトした領域の 400 MHz ^1H NMR スペクトル

(A) SP-1, (B) SP-2, (C) SP-3 はそれぞれ SP-セファローズカラムクロマトグラフィーで分離された (図9参照) rHb A の画分である. A-F と a-f のシグナルは以下の通り帰属されている. α サブユニットのノーマル型ヘム側鎖の (A) 12- CH_3 , (C) 2- CH_3 , (E) 18- CH_3 , β サブユニットのノーマル型ヘム側鎖の (B) 12- CH_3 , (D) 2- CH_3 , (F) 18- CH_3 , α サブユニットのリバー型ヘム側鎖の (a) 18- CH_3 , (c) 8-ビニルの C_αH , (E) 12- CH_3 , β サブユニットのリバー型ヘム側鎖の (b) 18- CH_3 , (d) 8-ビニルの C_αH , (f) 12- CH_3 . Reprinted with permission from *Biochemistry*, **47**, 517 (2008). Copyright 2008 American Chemical Society.

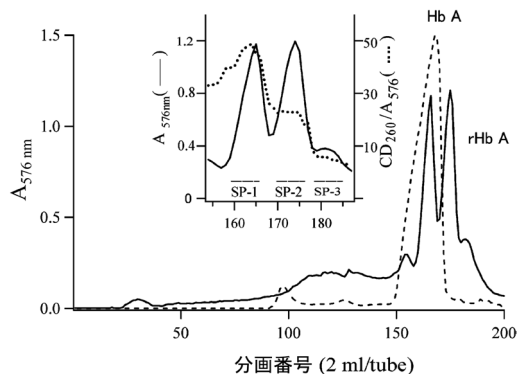


図9 SP-Sepharose fast-flow カラムによる rHb A と Hb A の溶出パターンの比較

縦軸は吸光度、横軸は分画番号。Hb A は rHb A に対して用いられた方法と同じ手順でヘモリザートから精製した。Reprinted with permission from *Biochemistry*, 47, 517 (2008). Copyright 2008 American Chemical Society.

260 nm の CD (円偏光二色性) のバンド強度比 ($CD_{260\text{ nm}}/A_{576\text{ nm}}$)。その $CD_{260\text{ nm}}/A_{576\text{ nm}}$ が 45~50, ~25, 10 以下である分画をそれぞれ SP-1, SP-2, SP-3 画分として集めた。SP カラムでの溶出パターンは、図9に示すように、①ほぼノーマル型 (図9のインセットのSP1)、②ノーマルとリバース半々型 (図9のインセットのSP2)、③ほぼリバース型 (図9のインセットのSP3) に分かれて溶出された。①、②、③とも、分子量は同じで、正味の電荷も同じである。ただし、ヘムの配向が異なるので①、②、③の Hb A の電荷の偏りは異なっているかもしれない。つまり、Hb A 表面電荷の分布の違いがあると推測される。①、②、③とも α サブユニット、 β サブユニットは全く同一であるので、ヘムの配向のみが異なるのであるが、イオン交換型の SP カラムクロマトグラフで①、②、③の配向が何故区別できる (②はノーマル、リバースが半々なので、本質的には①と③の区別になる) のか、詳述すると正味の電荷が等しいにもかかわらず、電荷の分布の違いを SP-Sepharose fast-flow column の陽イオン交換体がどのように認識して分けているかについて未解決である。

3.2 近位ヒスチジンをグリシンに置換した (His → Gly) リコンビナント Hb の Q-Sepharose fast-flow カラムによる二量体と四量体の分離¹⁴⁾

近位ヒスチジンをグリシンに置換した (His → Gly) リコンビナント Hb のうち、 β サブユニットの His92 が Gly に置換したリコンビナント Hb (以後 rHb (β H92G) と呼ぶ) は、Hb A と 92 番目のアミノ酸残基が異なる。遺伝子工学的にこの変異 β サブユニットを調製し、正常 α サブユニットと混合し、さらに (His の代わりとして His の側鎖にある 5 員環の) イミダゾールを添加することで、あたかも His92 の C_{α} - C_{β} - C_{γ} 間の共有結合が消失した Hb を作成できる (図10)。

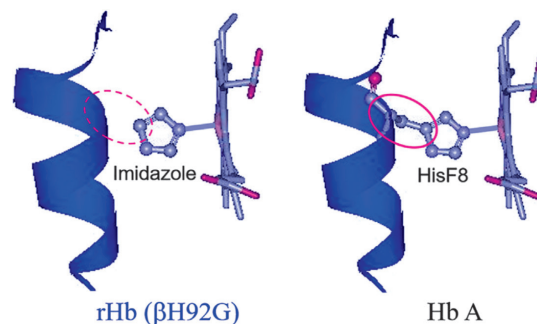


図10 (左) rHb (β H92G) (右) Hb A におけるヘムと F-ヘリックス (青リボン) の間の結合状態の比較

Hb A の正常 β サブユニットは Fe-His 結合 (鉄と近位ヒスチジンの配位結合) をもつので、 β 92His (His F8) のイミダズル環と F-ヘリックスの間に共有結合を有するが、rHb (β H92G) の β サブユニットは Fe-Im 結合 (鉄とイミダズールの配位結合) となるので、イミダズル環と F-ヘリックスの間に共有結合を有しない。なお、Hb A の図 (右) は PDB: 2DN2 を用い、rHb (β H92G) の図 (左) は PDB: 2DN2 の当該共有結合を削除して作成している。Reprinted from Publication, *Biophys. J.*, 120, 2734 (2021), Copyright (2021), with permission from Elsevier.

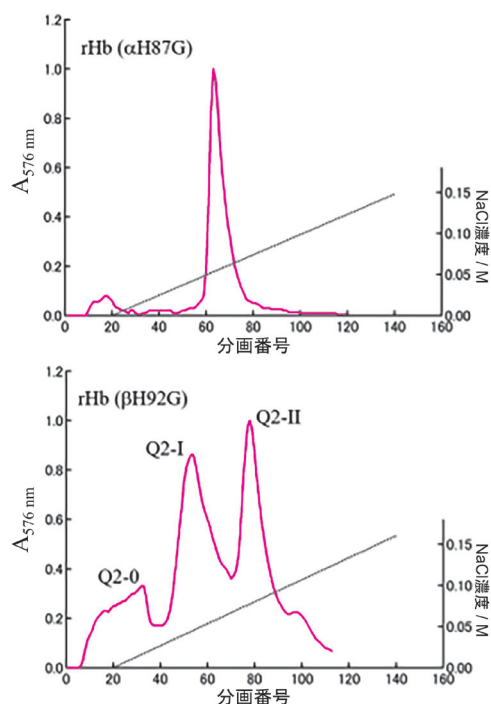


図11 (上) rHb (α H87G) と (下) rHb (β H92G) の Q-Sepharose fast-flow カラムクロマトグラフィーの溶出図

縦軸は吸光度、横軸は分画番号。各々の溶出図の黒点線は NaCl の濃度勾配 (0~0.16 M) を示す。Reprinted from Publication, *Biophys. J.*, 120, 2734 (2021), Copyright (2021), with permission from Elsevier.

この rHb (β H92G) は、His92 の C_{α} - C_{β} - C_{γ} 間の共有結合がないため、四量体構造が Hb A よりも不安定であり、四量体 $\rightleftharpoons 2 \times$ 二量体の平衡が Hb A と比べて二量体の方に著しく偏っている。実際に Q-Sepharose fast-flow カラムによるイオン交換クロマトグラフィーを行うと、二量体 (Q2-I) が先に溶出され、次いで四量体

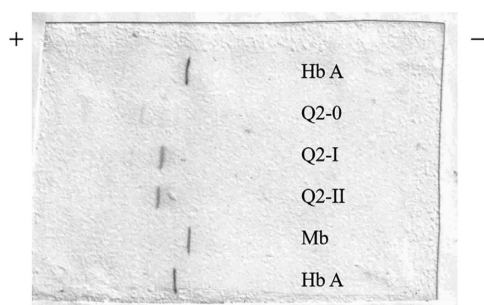


図 12 rHb (βH92G) の Q-Sepharose fast-flow カラムクロマトグラフィーからのピーク画分 (比較のためにウマ心筋ミオグロビン (Mb) と Hb A も加えている) のアンフォライン平面ゲル (pH 3.5–9.5) を用いた等電点電気泳動パターン

Q2-0, Q2-I, Q2-II はそれぞれ図 11 のピーク画分である。Hb A は電気泳動が正しく進行しているかどうかを評価するためにゲルの両側に載せた。Reprinted from Publication, *Biophys. J.*, **120**, 2734 (2021), Copyright (2021), with permission from Elsevier.

(Q2-II) が溶出される (図 11 下)。Q-Sepharose fast-flow カラムは、陰イオン交換体 (6 % 架橋アガロース、強陰イオン交換体、交換基- $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (quaternary ammonium)、粒子サイズ 45–165 μm (Amersham Biosciences 社)) である。カラム (1.5×17 cm) は 10 mM のイミダゾールを含む 20 mM の Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 8.3) で平衡化された。rHb (αH87G) と rHb (βH92G) が Q-Sepharose fast-flow カラムに載せられた後、上に記した平衡化に用いた緩衝溶液で洗い、0–0.16 M の NaCl 線形濃度勾配 (全 300 mL) で溶出された。二量体も四量体も正味の電荷は等しいので等電点は両者で等しいと予測されるので、イオン交換クロマトグラフィーでは区別できないように思われる。実際に等電点電気泳動を用いると、両者は同じ位置に現れる (図 12)。これは両者が同一の等電点をもつことを意味する。等電点電気泳動は等電点の違いという平衡に基づく分離方法 (等電点と等しい pH のところでタンパク質の正味の電荷が 0 になり、移動が止まる) であるが、一方、イオン交換クロマトグラフィーでは、Q-Sepharose fast-flow カラムが作る「細孔」にタンパク質が入り、細孔から出る、という拡散速度と分配係数が分離と分離能に関係する分離方法であるが、同一の等電点をもつ rHb (βH92G) の二量体 (Q2-I) が先に溶出され、四量体 (Q2-II) がその後に溶出されるように両者がイオン交換クロマトグラフィーでは分離可能であった (なお、Q2-0 は不純物)。しかし、そのメカニズムについては未解決の問題である。

なお、近位ヒスチジンをグリシンに置換した (His → Gly) リコンビナント Hb のうち、 α サブユニットの His87 が Gly に置換したリコンビナント Hb (以後 rHb (αH87G) と呼ぶ) は、二量体になることはなく、Hb A と同様四量体である (図 11 上)。このことから

Hb A では α サブユニットと β サブユニットは異なる性質を有し、とりわけ近位ヒスチジンとヘムとの配位結合 (Fe-N (His)) は α サブユニットと β サブユニットで異なる性質をもつことがわかる。Hb A は酸素結合の途中で自身の酸素親和性が低から高へ変化する協同性を示すが、この性質は例えば β サブユニットのみが四量体になった場合には示さない^{15) 16)}。このことから、Hb A が酸素結合に伴う協同性を有するには α サブユニットと β サブユニットの両方が必要であることがわかる。

3・3 SP-Sepharose fast-flow カラムによるリコンビナント Hb (rHb (αH87G), rHb (βH92G)) のイオン交換クロマトグラフィー

3・1 の Hb A の結果から、SP カラムはヘムの配向を区別できることがわかる。そこで四量体の rHb (αH87G) と rHb (βH92G) に関しても SP カラムを用いた分離を試みた。その溶出図を (図 13) に示す。rHb (αH87G) の場合は、10 mM のイミダゾールを含む 20 mM の Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.4 でカラムを平衡化し、pH 7.4 (0.02 M) から pH 8.3 (0.02 M) の Tris-HCl 緩衝溶液の pH 勾配により溶出した。rHb (βH92G) の場合は、10 mM のイミダゾールを含む 20 mM の Tris-HCl 緩衝溶液 pH 7.2 でカラムが平衡化し、pH 7.2 (0.02 M) から pH 8.3 (0.02 M) の Tris-HCl 緩衝溶液の pH 勾配により溶出した。なお、rHb (αH87G) の平衡化において pH 7.2 にしなかったのは、pH 7.2 での平衡化では、rHb (αH87G) がカラムに非常に強く結合し、pH 7.2 から pH 8.3 の Tris-HCl 緩衝溶液では溶出できなかったからである。

それぞれ、最大の溶出部分に関して、ノーマル型とリバース型の割合を評価できる $\text{CD}_{260\text{ nm}}/\text{A}_{576\text{ nm}}$ の比を比較すると、rHb (αH87G) と rHb (βH92G) とともに 50 近くの値であり、これはほぼノーマル型の配向のみであることを示す (図 14, 表 1)。

表 1 は rHb (αH87G) のピークの画分 (図 14 左) を 3 つの画分に分け、測定方法の精度を上げて、 $\text{CD}_{260\text{ nm}}/\text{A}_{576\text{ nm}}$ の値を求め、Hb A のそれと比較したものである。3 画分いずれも 45 以上の値になり、リバース型の分子

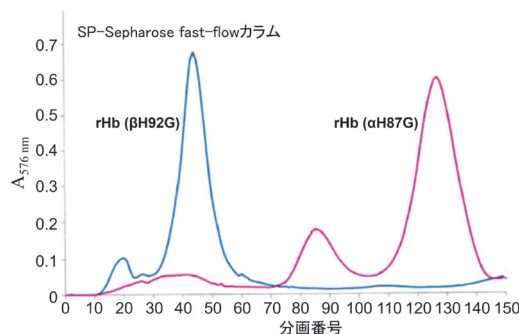


図 13 (左) rHb (βH92G) (水色) と (右) rHb (αH87G) (赤紫) の SP-セファローズカラムクロマトグラフィーの溶出図 縦軸は吸光度、横軸は分画番号。

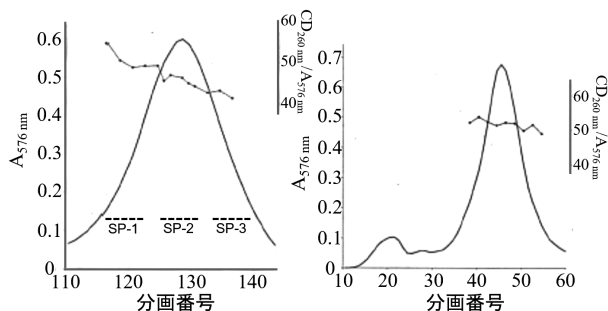


図 14 (左) rHb (α H87G) と (右) rHb (β H92G) の SP-セファローズカラムクロマトグラフィーの溶出図
折れ線グラフは図 9 の caption で紹介した各々の Hb の 576 nm の吸光度 ($A_{576\text{ nm}}$) に対する 260 nm の CD (円偏光二色性) のバンド強度比 ($CD_{260\text{ nm}}/A_{576\text{ nm}}$)。

表 1 rHb (α H87G) と Hb A の $CD_{260\text{ nm}}/A_{576\text{ nm}}$ の比較

Mutant	Fraction	$CD_{260\text{ nm}}/A_{576\text{ nm}}$
rHb (α H87G)	SP-1	55.3
	SP-2	50.1
	SP-3	47.7
HbA	—	51.1

が含まれていないか、含まれていたとしても、この方法では検出できないくらいの少量であることがわかる。

四量体の rHb (α H87G) と rHb (β H92G) に関しても SP カラムを用いた分離状態は、rHb A の場合とは異なり、リバース型は非常に少なく、事実上、ノーマル型が主であった。ピーク分離も rHb A よりもよくなかった。rHb (α H87G) の α サブユニットのヘム、rHb (β H92G) の β 鎖サブユニットのヘムはポリペプチド鎖からの近位 His による配位結合がないので、ヘムが (近位 His による配位結合がある場合よりも) 動きやすく、熱力学的に安定なノーマル型をとることが考えられるが、rHb (α H87G) の β サブユニットのヘム、rHb (β H92G) の α 鎖サブユニットのヘムは近位 His による配位結合があるので、リバース型が存在することが予想されるが、この結果から判断すると、ノーマル型が多いと考えられる。この結果より、ヘムが apo ヘモグロビン (ヘムのないヘモグロビン) に組み込まれるとき、 α サブユニット、 β サブユニットが独立して組み込まれるのではなく、最初にヘムが組み込まれた α サブユニット、あるいは β サブユニットの配向がもう片方の β サブユニット、あるいは α サブユニットの配向に影響しているように思われる。この指摘は、先行研究 (石森と森島, 1988 年¹⁷⁾), (長井ら, 2016 年¹⁸⁾) でも指摘されている。そのため、rHb (α H87G) と rHb (β H92G) に関しても SP カラムを用いた分離は、rHb A の場合とは異なりリバース型が観測されず分離もよくなかったが、これは His $\rightarrow$ Gly 置換により His によるヘムの配位がなくなったことで His 配位のないヘムの配向がノーマル型

になり、この配向がもう片方ヘムの配向に影響した (主としてノーマル配向をとった) というのではないかと考えられる。3・1 と 3・3 の結果より、SP カラムは正味の電荷が等しいにもかかわらず、ヘムの配向に由来する電荷の分布の違いを認識していることが一層明白になるが、どのような機構 (メカニズム) で分かれているかについては、未解決の問題として残されている。

謝辞 本解説の執筆にあたり、リコンビナント Hb の調製に関して、福井医科大学名誉教授長井幸史先生にご指導いただきましたこと、筑波大学名誉教授中谷清治先生、金沢大学名誉教授長井雅子先生より多くの助言をいただきましたことに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Miyagawa, S. Nagatomo, H. Kazami, T. Terada, K. Nakatani : *Langmuir*, **37**, 12697 (2021).
- 2) F. W. J. Teale : *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, 543 (1959).
- 3) S. V. Evans, G. D. Brayer : *J. Mol. Biol.*, **213**, 885 (1990).
- 4) E. M. Rekin : *J. Gen. Physiol.*, **38**, 225 (1954).
- 5) A. Miyagawa, S. Nagatomo, H. Kuno, T. Terada, K. Nakatani : *Langmuir*, **39**, 11329 (2023).
- 6) S. Longeville, W. Doster, G. Kali : *Chem. Phys.*, **292**, 413 (2003).
- 7) L. De Silva, L. Yao, Y. Wang, S. Xu : *J. Phys. Chem. B*, **117**, 7554 (2013).
- 8) A. Miyagawa, H. Kuno, S. Nagatomo, K. Nakatani : *Anal. Sci.*, **40**, 1545 (2024).
- 9) M. Nagai, Y. Nagai, Y. Aki, K. Imai, Y. Wada, S. Nagatomo, Y. Yamamoto : *Biochemistry*, **47**, 517 (2008).
- 10) S.-Y. Park, T. Yokoyama, N. Shibayama, Y. Shiro, J. R. H. Tame : *J. Mol. Biol.*, **360**, 690 (2006).
- 11) Y. Yamamoto, G. N. La Mar : *Biochemistry*, **25**, 5288 (1986).
- 12) A. Sato, H. Tai, S. Nagatomo, K. Imai, Y. Yamamoto : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 1107 (2011).
- 13) S. Nagatomo, H. Hamada, H. Yoshikawa : *J. Phys. Chem. B*, **115**, 12971 (2011).
- 14) S. Nagatomo, T. Kitagawa, M. Nagai : *Biophys. J.*, **120**, 2734 (2021).
- 15) I. Tyuma, K. Shimizu, K. Imai : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 423 (1971).
- 16) G. E. Borgstahl, P. H. Rogers, A. Arnone : *J. Mol. Biol.*, **236**, 831 (1994).
- 17) K. Ishimori, I. Morishima : *Biochemistry*, **27**, 4747 (1988).
- 18) M. Nagai, Y. Nagai, Y. Aki, H. Sakurai, N. Mizusawa, T. Ogura, T. Kitagawa, Y. Yamamoto, S. Nagatomo : *Chirality*, **28**, 585 (2016).



長友 重紀 (NAGATOMO Shigenori)

筑波大学数理工学系化学域 (〒305-8571 茨城県つくば市天王台 1-1-1)。大阪大学大学院理学研究科無機及び物理化学専攻博士課程単位取得退学。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》タンパク質の分離機構およびヘモグロビンの機能と構造。《主な著書》S. Nagatomo, M. Nagai, T. Kitagawa : "Hemoglobin : Recent Developments and Topics", pp37-61, (2011)。《趣味》読書。
E-mail : nagatomo@chem.tsukuba.ac.jp