

헤모글로빈 구조변화에 의한 부피변화

邊昌鎭 · 康順熙* · 金 健**

미국 Pittsburgh 대학교 화학과

*이화여자대학교 사범대학 과학교육과

**고려대학교 이과대학 화학과

(1985. 5. 4 접수)

The Volume Change Due to the Conformational Transition of Hemoglobin

Changho Byeon¹, Soonhee Kim Kang* and Keon Kim**

Department of Chemistry, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, U.S.A.

* Department of Science Education, Ewha Woman's University, Seoul 120, Korea

** Department of Chemistry, Korea University, Seoul 132, Korea.

(Receive May 4, 1985)

헤모글로빈이 산소와 결합할 때 헴에 있는 철이온의 산소친화도는 헤모글로빈에 산소가 붙어 있는 것일수록 점차 증가된다. 이러한 점증적인 산소친화도는 헤모글로빈과 산소와의 결합이 협동적임을 나타내며 실험적으로 산소해리곡선이 S자형태임으로써 알 수 있다.

헤모글로빈과 산소와의 결합이 이처럼 협동적인 것은 헴-헴 상호작용 때문이다. 헴-헴 상호작용은 헤모글로빈의 사차구조, 즉 산소친화도가 큰 R 구조 (relaxed 혹은 oxy 구조)와 산소친화도가 작은 T 구조 (tense 혹은 deoxy 구조) 간의 변환에 의한 것이다.

수용액에서 메트헤모글로빈은 R 구조와 T 구조가 평형을 이루고 있는데 유기 인산염이 존재하면 평형이 T 구조로 크게 이동된다. 이처럼 평형위치가 크게 이동되는 것은 유기 인산염(예를 들면 diphosphoglycerate, inositol hexaphosphoric acid sodium salt (이하 IHP 라 한다))이 T 구조를 안정화 시키기 때문이다. Diphosphoglycerate 가 T 구조를 안정화시키는 헤모글로빈의 중앙 동공에 위치한 2개의 β -소단위 내의

양이온들 즉, 2개의 히스티딘 143, 2개의 리신 82, 2개의 히스티딘 2와 여섯개의 염다리를 형성하기 때문이다.

반면에 이러한 유기 인산염이 없으면, R 구조 쪽으로 평형이 이동한다. 유기 인산염들 중에서 IHP가 헤모글로빈 유도체의 R 구조를 T 구조로 바꾸는데 널리 쓰인다³⁻⁶.

메트헤모글로빈 유도체들이 IHP에 의해 구조가 변하는 것은 몇 가지 분광학적 방법^{3,5}과 X-선 결정학^{7,8}에 의해 밝혀졌다. 한편 Perutz 등은⁸ 헴에 있는 철이온의 스핀상태를 고압력에 의해 변화시킴으로써 부피변화를 측정하였다.

그결과는 다음과 같다.

Crap azide methemoglobin-IHP; R (high spin)
→ R (low spin); $-\Delta V$ (ml/mole heme)
= 6.7 ± 1.3

Crape azide methemoglobin + IHP; T (high spin)
→ T (low spin); $-\Delta V$ (ml/mole heme)
= 13.3 ± 1.0

R 구조와 T 구조에서의 스핀상태변화에 따른 부피변화값이 -6 ml/mole·heme 정도 다르게 나타

났다. Perutz 는 이러한 실험값 차이를 높은 압력하에서 *T* (high spin) → *R* (high spin) 변환이 일어난 때문이 아니었을까하고 추론하였다.

본 연구의 목적은 헤모글로빈이 *R* 구조에서 *T* 구조로 변할 때의 부피변화를 dilatometer 로 직접 측정함으로써 위에서 Perutz 등이 의심한 점을 밝히고 *R* 구조와 *T* 구조의 차이를 알고자 하는데 있다.

헤모글로빈의 추출은 표준방법으로 하였고⁹, 헤모글로빈에 붙어 있는 Diphosphoglycerate 는 pH 7.5에서 세파맥스 G-25를 통과시켜서 제거하였다. Diphosphoglycerate 의 존재 여부는 Ames 와 Dubin 의 방법¹⁰으로 확인하였다. $K_3[Fe(CN)_6]$ 를 가하여 메트헤모글로빈을 만들고 여기에 당량의 플루오르화나트륨을 가하여 플루오르화메트헤모글로빈을 만들었다. 농도는 Benssch-Bensch 방법¹¹인 540nm, 560nm, 576nm 에서의 흡광도를 측정하여 정하였다.

데옥시헤모글로빈⁴은 옥시헤모글로빈에 질소 가스를 5분 정도 통과시켜 만들었다. 만들어진 데옥시헤모글로빈은 곧 질소가스를 채운 잠강상 자 내에 넣고 모든 조작을 하였다. IHP 의 농도는 염에 의한 부피변화를 방지하기 위하여 플루오르화나트륨과 동일 농도가 되도록 0.02M 로 만들었다.

Dilatometer 는 Carlsberg 형으로 한 쪽에 5ml 정도의 헤모글로빈 용액을 넣고 다른 한 쪽엔 1ml 의 IHP 용액을 넣어서 *n*-노난으로 채운 다음, 연결부분을 윤활제로 잘 발라서 물이나 *n*-노난이 흐르지 않게 한 다음 항온조에 설치하였다. 항온조는 ±0.005°C 까지 조절할 수 있는 온도조절장치를 설치하여 온도를 조절할 수 있게 하였다. 30분 정도 방치한 후 두 lag 내의 물질을 잘 섞은 다음 눈금의 차이를 기록하여 부피를 측정하였다.

25°C 에서 측정한 플루오르화메트헤모글로빈 + IHP 부피 변화의 결과는 Table 1 과 같으며, 데옥시헤모글로빈 + IHP 의 부피변화의 결과는 Table 2 와 같다.

플루오르화메트헤모글로빈 + IHP 의 부피변화에는 헤모글로빈의 구조변화 이외에도 IHP 자

Table 1. Volume change of fluoromethemoglobin + IHP

F -met Hb	IHP	Volume Change
2.4×10^{-5} mole	1.8×10^{-5} mole	-0.10 ul
2.6×10^{-5} mole	2.8×10^{-5} mole	-0.05 ul
2.0×10^{-5} mole	2.4×10^{-5} mole	0.00 ul
2.5×10^{-5} mole	3.0×10^{-5} mole	0.00 ul

Table 2. Volume change of deoxy hemoglobin + IHP

Deoxy Hb	IHP	Volume Change
2.4×10^{-5} mole	2.0×10^{-5} mole	+2.0 ul
2.6×10^{-5} mole	2.5×10^{-5} mole	+2.5 ul

체가 헤모글로빈과 결합하기 때문에 생기는 부피변화등이 포함되기 때문에 데옥시헤모글로빈 + IHP 의 부피변화를 기준으로 하여야 한다. 왜냐하면 데옥시헤모글로빈은 *T* 구조이므로 IHP 에 의해서 삼차구조나 사차구조가 변하지 않기 때문이다. 따라서 Table 1 과 Table 2 를 종합하면 *R* 구조에서 *T* 구조로 변할 때 부피변화는 약 -25ml/mole·heme 이다.

데옥시헤모글로빈 + IHP 에서 부피가 증가하는 것은 IHP 가 물층에서 단백질내부로 이동하였기 때문이다. 이러한 사실은 X-선 결정학으로 밝혀져 있다⁶.

IHP 에 의한 헤모글로빈의 부피변화는 헤모글로빈의 중앙 동공^{7,12}과 IHP 의 결합에 의한 헤모글로빈 사합체의 구조변화, 또 기타 다른 글로빈부분의 구조변화로 나누어 생각할 수 있다. IHP 가 헤모글로빈 사합체의 중앙 동공에 있는 2개의 β-소단위와 옆다리를 형성할 때 두 소단위내의 H-나선과 A-나선의 위치가 변화된다.

IHP 의 결합으로 인해 두 A-나선간의 거리는 4 Å 정도 좁아지나 두 H-나선간의 거리는 다소 멀어진다¹³.

플루오르화메트헤모글로빈에서는 플루오르리간드의 결합으로 인해 파괴되었던 subunit 들간의 옆다리가 IHP 와의 결합에 의해 다시 형성됨으로써 IHP 와의 결합이 없었을 때보다 각 소단위들 사이는 더욱 촘촘하고 견고해진다³. 이것

으로 보아서 사차구조에 의한 부피변화는 마이 너스 방향임을 추측할 수 있다.

소단위 들간의 염다리형성이 α_2 과 β_1 소단위내 의 잔기들간의 염다리형성을 용이하게 함으로써 삼차구조 변환이 비롯되어 근접 히스티딘과 porphyrine 고리평면 파의 거리가 변한다. 즉 플 루오르화메트헤모글로빈에 IHP가 없는 경우 근 접히스티딘의 질소와 porphyrine 고리평면간의 거리가 2.07\AA 이다. 플루오르화메트헤모글로빈 에 IHP가 결합한 경우에는 2.3\AA 으로 늘어난 다^{4,8}. 이러한 근접 히스티딘의 이동으로 말미암 아 헴-철은 0.2\AA 정도 평면 밖에 위치하며 이 때문에 헴-철과 리간드와의 결합길이가 0.08\AA 정도 늘어난다. 그러나 이와 같은 헴부근의 변 화에 의한 부피변화는 플러스방향이지만 $(0.08\text{\AA})^3 \approx 0$ 으로 거의 영향을 미치지 못 할 것이다.

기타 다른 곳에서 삼차구조에 의한 부피변화 는 현재까지의 실험적 사실로는 추측할 수가 없 지만 그렇게 크게 변하리라고는 생각지 않는다. 이렇게 볼 때 R구조에서 T구조로 변할 때의 -25ml/mole heme 의 부피변화는 주로 사차구 조의 변화때문이라고 추측되지만 삼차구조에 의 한 것도 전혀 배제할 수는 없다.

Perutz는 high spin 상태의 R구조를 압력에 의해서 low spin으로 바꾸었을 때의 부피변화 값과 high spin 상태의 T구조를 압력에 의해서 low spin으로 바꾸었을 때의 부피변화값과의 차 이가 약 -6ml/mole heme 임을 밝히고 이 부피 변화의 차이를 높은 압력에서 T구조가 R구조 로 바뀌어짐으로써 나타난 값이 아닌가 추론하

였다. 본 연구 결과는 이러한 추론이 틀렸음을 보여주고 있는데, 이것은 Carey¹⁴가 고압에서 R-T전이 가 없다고한 실험을 뒷받침해주고 있다.

본 연구는 한국과학재단 연구비로 이루어진 것이며 저자들은 재단 당국에 사의를 표한다.

인 용 문 헌

1. O. Roughton and K Lyster, *Proc. Roy. Soc.*, **114**, 29 (1955).
2. M.F. Perutz, *Nature*, **237**, 495(1972).
3. M.F. Perutz, E.J. Ladner, J.E. Ladner, J.G. Bettlestone, C. Ho and E.F. Slade, *Biochem.*, **13**, 2187 (1974).
4. M.F. Perutz, J.K.M. Sanders, D.H. chenery, R. W. Noble, R.R. Pennery, L.W.M. Fung, C. Ho, I. Giannini, D. Pörske, and H. Winkler. *Biochem*, **17**, 3640 (1978).
5. M.F. Perutz, **17**, 3652 (1978).
6. A. Arnone, *Nature*, **249**, 34 (1974).
7. H. Muirhead, *J. Mol. Biol.*, **28**, 117 (1967).
8. G. Fermi and M.F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, **114**, 421 (1977).
9. C. Byeon, Master Thesis, Korea University (1982)
10. B.N. Ames and D.T. Dubin, *J. Biol. Chem.*, **235**, 769 (1960).
11. B.E. Bensch and R. Bensch, *Biochem*, **11**, 3576 (1972).
12. L. Pauling, F. Stiff, and C.D. Corgell, *J. Amer Chem. Soc.* **59**, 633 (1937).
13. M.F. Perutz, *Nature*, **228**, 726 (1970).
14. F.G. Carey, *J. Biol. Chem.* **252**, 4102 (1977).