

リガンド解離に誘起されるミオグロビンの高次構造変化 —ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法による部位特異的観測

○ 佐藤 亮¹、Ying Gao²、北川禎三^{2,3}、水谷 泰久^{1,4}

(¹JST CREST、²総研大院先導科学、³岡崎統合バイオサイエンスセンター、⁴阪大院理)

E-mail: aksato@kobe-u.ac.jp

【序】ヘムタンパク質には、ヘムにおける気体分子の脱着によるタンパク構造変化が機能調節に本質的役割をはたすものがある。ヘモグロビン(Hb)の協同的酸素結合はその典型例である。ミオグロビン(Mb)の立体構造(図1)はHb のサブユニットの構造に類似するため、一酸化炭素(CO)脱離後のMbの構造緩和過程は、Hb のアロステリック効果における初期過程のモデルとして詳しく研究されている。ヘムからグロビン部へと構造変化が伝播する仕組みを解明することは、グロビタンパク質における機能発現の分子機構に対する理解を深めると期待されるが、ヘムでの構造変化に応答して起こるタンパク構造変化の実体は不明である。紫外共鳴ラマン分光法ではタンパク中の芳香族アミノ酸側鎖に由来するラマンバンドを選択的に観測できる。トリプトファン(Trp)やチロシン(Tyr)のラマンバンドの振動数や強度は側鎖の構造や周囲の環境を反映するため、部位特異的なタンパク構造変化を調べることができる。本研究ではピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法によりCO光解離後におけるMbの初期構造変化を詳細に調べた。

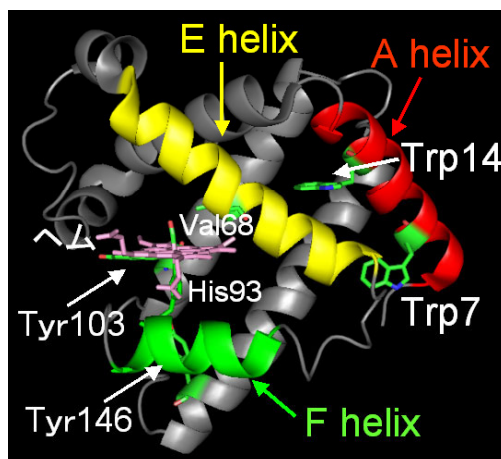


図1. CO結合形ウマミオグロビンの立体構造(トリプトファン、チロシン残基は各々2残基ずつ存在する)

【実験】ピコ秒パルスレーザー出力の2倍波 (408 nm, 繰り返し1 kHz) を用いてメタンの誘導ラマン散乱を発生させ、1 次ストークス散乱光の2倍波としてプローブ光 (232 nm) を得た。ポンプ光にはレーザー出力の2倍波を用いた。試料からのラマン散乱光はレイリー散乱光による迷光除去用に設けた前置分光器を通過させた後、主分光器で分散してCCD検出器で検出した。CO結合形Mb はリン酸緩衝液に溶解したMbをCO雰囲気下でジチオナイト還元して作成した。

【結果と考察】ポンプ光照射時の時間分解共鳴ラマンスペクトルからCO結合形Mbの共鳴ラマンスペクトルを引いた差スペクトルを図2に示す。TrpのW3、W16、W18 バンドとTyr のY8a、Y9aバンドについて負のバンドが観測された。負のバンドはCO解離後の過渡状態におけるバンド強度の減少を意味する。図3にW16とY9aバンドを例として、CO結合形Mbのバンド強度に対する相対的バンド強度変化の時間依存性を示す。いずれのTrpのバンド強度もCO解離直後に装置応答時間(〜2ピコ秒)内で減少し、その後時定数50ピコ秒程度で増加した。Tyrのバンド強度は時定数2ピコ秒で減少した後に、時定数8ピコ秒でほぼ元の強度に回復した。Tyr146の側鎖はFヘリックスの近位ヒスチジン(His93)主鎖のカルボニル基と水素結合を形成する。CO解離後にヘムのドーミングは1ピコ秒以内でほぼ完了するが、この構造変化は鉄ヒスチジン結合を

介してFヘリックスを変位させると考えられる。したがってTyrのバンド強度減少は、ヘムの構造変化に誘起されたFヘリックスの変位がTyr146とHis93間の水素結合に影響することが原因であると解釈した。TrpはAヘリックスに2残基存在するが、Trp7はEFコーナーに近接する一方、Trp14はEヘリックス上の疎水性側鎖(Leu69、Leu72)に近接する。Trp変異体の時間分解紫外共鳴ラマン測定から、野生形で観測されるバンド強度変化にはTrp14周囲の環境変化が主に寄与していると結論された。高分解能X線回折から得られたCO結合形とデオキシ形Mbの構造を比較した結果、Eヘリックスがヘム方向へ変位することが指摘されている[1]。Trpのバンド強度減少はTrp14側鎖とEヘリックスの疎水性側鎖との相互作用の低下を反映すると考えられるが、これはEヘリックスのヘム方向への変位が原因として考えられる。以上のことからグロビン部位の初期応答は、CO解離後2ピコ秒以内に起こるFおよびEヘリックスのデオキシ形構造へ向けた変位であることが明らかとなった。過渡回折測定からCO解離後500フェムト秒以内にヘム法線方向へのMbの変形が指摘されている[2]が、その実体はこのEFヘリックスの構造変化と考えられる。本測定においてEヘリックスの変位がFヘリックスの変位よりも早く起こることを見出したが、このことはヘムからグロビン部分への構造変化の伝播機構の点で示唆的である。すなわちヘムのドーミングが鉄ヒスチジン結合の変化を介してタンパクの構造変化を誘起するだけではなく、Eヘリックス上のVal68側鎖とヘム結合COとの間に存在する原子間接触の変化といった、COの解離による遠位リガンド結合サイトでの局所的構造変化もタンパク構造変化の引き金として働くと考えられる。

【参考文献】[1] G. S. Kachalova et al. *Science* 284 (1999) 473. [2] G. D. Goodno et al. *J. Phys. Chem. A* 103 (1999) 10630.

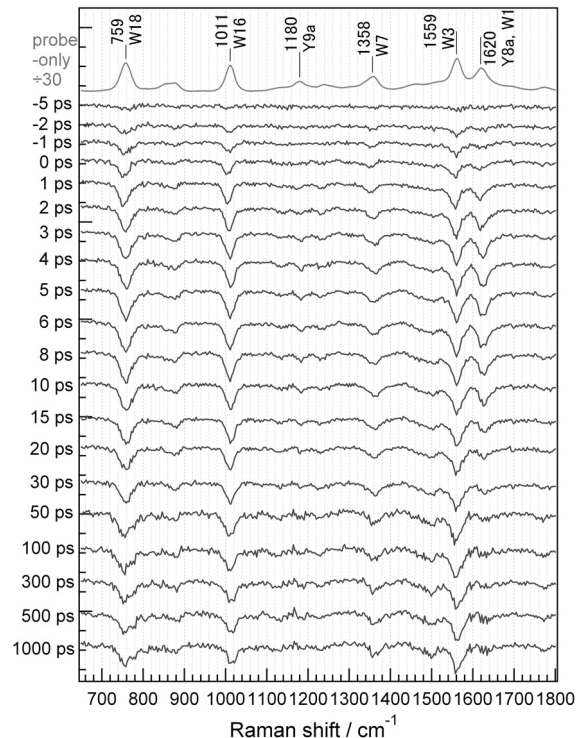


図2. CO光解離ウマ骨格筋Mbの時間分解紫外共鳴ラマン差スペクトル

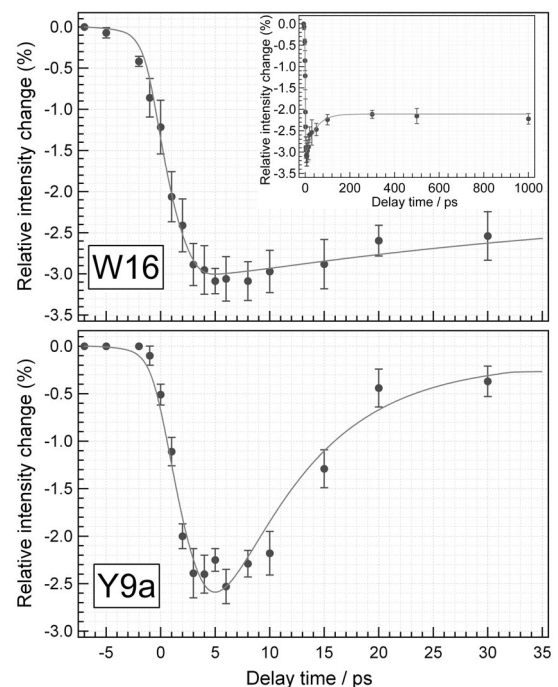


図3. W16バンド、Y9aバンドにおける強度変化の時間依存性(CO解離後-5ピコ秒から30ピコ秒の領域を示す。挿入図には1000ピコ秒までの領域を示してある。)