

2C16

シリカゲル中に閉じ込めたヘモグロビンの構造ダイナミクス： ダイナミクスの四次構造依存性

(¹神戸大院自然科学、²阪大院理) ○稲垣厚志¹、水谷泰久²

【序】ヘモグロビン (Hb) は四量体のヘムタンパク質であり、それぞれのサブユニットがリガンド結合部位であるヘムを一つずつ持つ。Hb の協同的なりガンド脱着は四次構造変化によってコントロールされていると考えられている。しかし、このサブユニット界面とヘムの連動のしくみ(アロステリック機構)は、Hb の本質的なしくみであるにもかかわらず、まだ明らかではない。最近、Hb を水和したままシリカゲル中に閉じ込めることができる手法が報告された[1]。閉じ込められた Hb の四次構造変化は極めて遅く、実質的に固定されるので、四次構造に依存した三次構造ダイナミクスの違いを調べることが可能になる。よって、この手法はアロステリック機構を調べるうえで非常に有用である。本研究では、この手法を用いて、四次構造を R 構造(高親和性)または T 構造(低親和性)に固定した Hb の CO 解離に伴う構造ダイナミクスを、時間分解共鳴ラマン(TR³)分光法によって調べた。

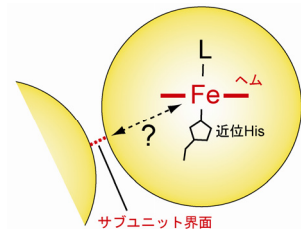


図1. Hbのサブユニットの模式図

【実験】3種類のCO結合型Hb(HbCO)試料を調製した。それぞれ、HbCO溶液をゲル中に封じ込めたもの(Rゲル)、デオキシHb溶液をゲル中に封じ込め、その後COを結合させたもの(Tゲル)およびHbCO溶液である。ナノ秒TR³スペクトル測定では波長532nmのパルスをCO光解離用のポンプ光として用い、波長436nmのパルスをラマン散乱励起用のプローブ光として用いた。また、ピコ秒TR³スペクトル測定ではポンプ光波長540nm、プローブ光波長442nmを用いた。定常状態共鳴ラマンスペクトル測定では発振波長410nmのCWレーザーを用いた。

【結果と考察】定常状態共鳴ラマンスペクトル測定の結果、1370cm⁻¹付近に観測されたν₄バンド、500cm⁻¹付近に観測されたFe-CO伸縮振動[ν(Fe-CO)]バンドおよび1950cm⁻¹付近に観測されたC-O伸縮振動[ν(C-O)]バンドの振動数は、HbCO溶液とTゲルの間で一致した。ν₄バンドの振動数は、ヘム近位側構造に敏感な鉄-ヒスチジン伸縮振動[ν(Fe-His)]バンド[2]の振動数と比例関係にあるということが報告されている[3]。このことよりν₄バンドの振動数もヘム近位側構造を間接的に反映するといえる。一方、ν(Fe-CO)およびν(C-O)バンドの振動数はヘム遠位側構造を鋭敏に反映することが知られている[4]。よって、これらの実験結果は、CO結合型の場合ではヘム周

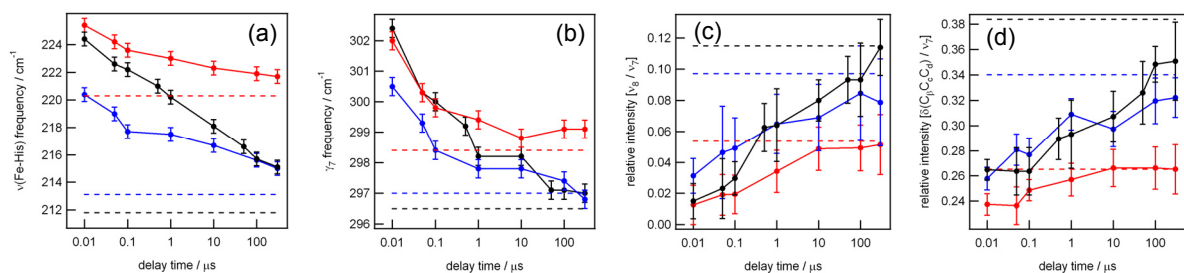


図2. CO解離後におけるラマンバンドの時間変化。Rゲルを赤、Tゲルを青、HbCO溶液を黒で示す。破線はそれぞれのデオキシ型の値である。

辺構造は四次構造によらずほぼ同様であるということを示している。

図 2 は、ナノ秒 TR³ スペクトルにおいて時間発展がみられた 4 つのバンドの振動数または強度を遅延時間に対してプロットしたものである。それぞれ、220 cm⁻¹ 付近に観測されたν(Fe-His) バンドの振動数シフト(a)、300 cm⁻¹ 付近に観測されたγ₇ バンド(メチン基の縦ゆれ振動)の振動数シフト(b)、340 cm⁻¹ 付近に観測されたν₈ バンド(鉄-ピロール伸縮および置換基の変角振動)の強度変化(c)および 360 cm⁻¹ 付近に観測されたδ(C_βC_cC_d) バンド(プロピオン酸基の変角振動)の強度変化(d)である。これらのバンドの時間発展は R ゲルと T ゲルとでは異なっていた。

共鳴ラマン分光法を用いたヘムタンパク質や金属ポルフィリンの研究から、これら 4 つのバンドの振動数や強度はヘムおよびヘム周辺構造を反映するということが明らかにされている[2, 5, 6]。よってナノ秒 TR³ スペクトルの結果は、CO 解離後ナノ秒からマイクロ秒の時間領域で、R ゲルと T ゲルとではヘムおよびヘム周辺構造が異なる、ということを示している。

ピコ秒 TR³ スペクトル測定の結果、遅延時間 10 ピコ秒の時点で、R ゲルと T ゲルのν(Fe-His) 振動数に 7 cm⁻¹ の差がみられた。この実験結果は、R ゲルと T ゲルのヘム周辺構造の差異が CO 解離後 10 ピコ秒以内に現れるということを示唆している。以前のピコ秒 TR³ スペクトル測定から、R 構造をもつ溶液中の HbCO において、CO 解離後 10 ピコ秒から 1 ナノ秒の間ではヘム周辺の構造はほとんど変化していないことが示されている。溶液中の HbCO と初期構造が同様の R ゲルにおいても、この時間領域でヘム周辺の構造はほとんど変化していないということが推測される。よって今回のピコ秒 TR³ スペクトル測定の結果は、R ゲルとは異なり、T ゲルにおいては CO 解離後にヘム周辺構造に非常に速い変化が起きていることを示唆している。T 構造の HbCO は非常に不安定であり、溶液中では速やかに R 構造へ変化する。よって、ゲル中における T 構造の HbCO は、構造上ひずみをもっていると考えられる。それにもかかわらず、定常状態共鳴ラマンスペクトル測定は、T ゲルのヘム周辺構造が R 構造をとる HbCO 溶液のそれとほぼ同様であることを示していた。したがって、T ゲルではサブユニット界面の相互作用部位にひずみを有していると考えられる。本研究により明らかになった、T ゲルのヘム周辺の速い構造変化は、このひずみを解消するためのタンパク質骨格の協同的な動きを反映したものであると考えられる。

以上の結果から、四次構造によってリガンド脱離後の構造緩和の速度が異なることが明らかになった。

参考文献

- [1] Shibayama, N.; Saigo, S. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 203-209.
- [2] Kitagawa, T. The Heme Protein Structure and the Iron Histidine Stretching Mode; In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed. John Wiley & Sons: New York, 1987; pp 97-131.
- [3] Ondrias, M. R. et al. *Biochemistry* **1982**, *21*, 3428-3437.
- [4] Spiro, T. G.; Wasbotten, I. H. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 34-44.
- [5] Li, X. Y. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7012-7023.
- [6] Gottfried, D. S. et al. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 12034-12042.