

3P089

リガンド脱離後のヘムのダイナミクスに対するヘム周辺アミノ酸残基の効果： 時間分解共鳴ラマン分光法による研究

(¹ 阪大院理、² 北大院理) ○小林 主弥¹、石川 春人¹、内田 毅²、石森 浩一郎²、水谷 泰久¹

【序】

筋肉中で酸素貯蔵を担うミオグロビン(Mb)は、8本の α ヘリックスとヘムから出来ている球状タンパク質である。赤血球の酸素運搬体であるヘモグロビン(Hb)は四量体のタンパク質であるが、そのサブユニットの構造はMbと非常によく似ている。しかし、HbとMbのリガンド脱離に伴うダイナミクスを比較してみると、立体構造に高い類似性があるにもかかわらず、両者のダイナミクスには明白な違いがある¹。この違いは、Hbの協同性発現にとって重要であると考えられる。そこで、ミオグロビンのヘム周辺のアミノ酸残基を部位特異的に置換し²、リガンド脱離に伴うタンパク質構造変化を調べた。得られた結果を野生型のものと比較し、ヘム周辺のアミノ酸残基がダイナミクスに及ぼす影響を考察した。

【実験】

Mbの野生型および変異体試料は、プラスミドを大腸菌に形質転換して発現し、陽イオン交換カラムを用いて精製することによって得た。

本研究では、リガンドに対する立体障害を小さくするためにVal68をAlaに置換した変異体(V68A)、AヘリックスのTrp14とEヘリックスの間にHbのサブユニットに見られるような水素結合を施すためにGly73を水酸基を含むSerとThrに置換した変異体(G73S、G73T)、

ヘモグロビンのサブユニットに共通して見られることから、ヘリックスの摂動を伝搬するのに役割を担っていると考えられるEFコーナーのLys78をHisとした変異体(K78H)を用いた(図1)。

一酸化炭素(CO)結合形はハイドロサルファイトナトリウムで還元したのち、COガスにさらすことにより得た。

時間分解共鳴ラマンスペクトル測定は、波長532 nmのポンプ光と波長436 nmのプロープ光を用いたポンプ・プロープ法によって行った。

【結果】

図2にV68A変異体の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。野生型のCO結合型Mbの共鳴ラマンスペクトルには、 575 cm^{-1} にFe-C-O変角振動 $[\delta(\text{FeCO})]$ に由来するラマンバンドが観測される³。しかし、V68A変異体ではCO形においてこのバンドが現われなかった。これは、COがヘム平面に対し直立しているため $\delta(\text{FeCO})$ モードがラマン不活性になったためだと考えられる。また、時間分解スペクトルにおいて 302 cm^{-1} と 342 cm^{-1} に見られる γ_7 、 ν_8 バンドの相対強度は、野生型では時間に対してほとんど変化しなかったのに対して、V68A変異体では時間とともに ν_8 バンドの強度が相対的に増大していく変化が観測された。

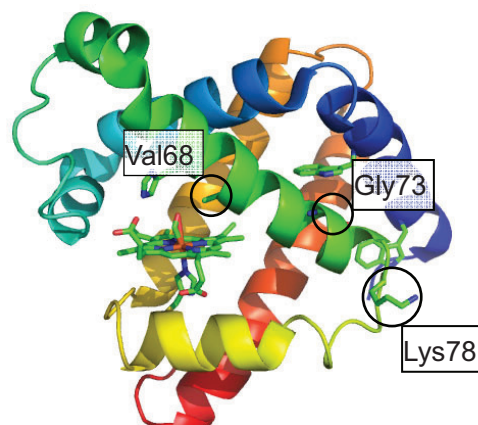


図1. CO結合型Mbの立体構造

図3にK78H変異体の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。K78H変異体においても、V68A変異体の結果と同様に $\delta(\text{FeCO})$ バンドは観測されなかった。また、 γ_7 、 ν_8 バンドの相対強度についても時間変化が観測された。

G73S、G73T変異体では、 γ_7 、 ν_8 バンドの相対強度に大きな時間変化は見られなかった。

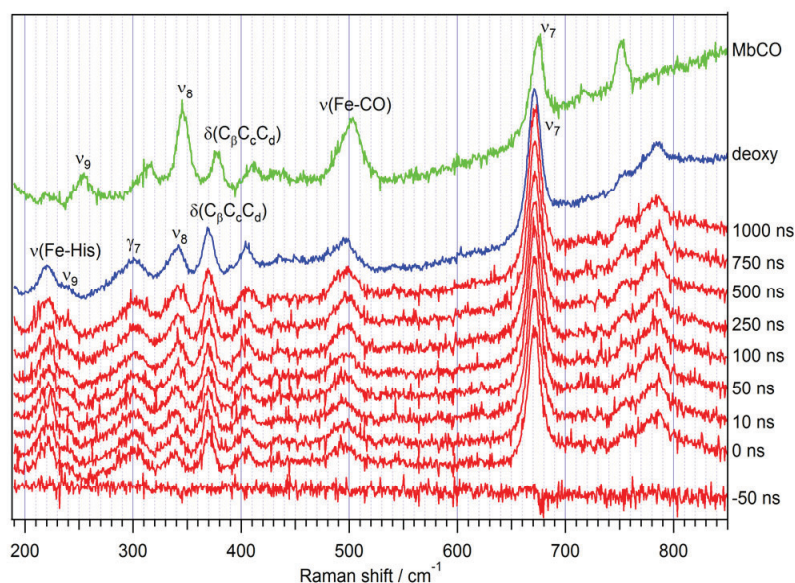


図2. V68A変異体の時間分解共鳴ラマンスペクトル

【考察】

γ_7 、 ν_8 バンドの相対強度の変化は、ヘム周辺の構造変化、特にヘムに隣接するEおよびFヘリックスの構造変化を反映していると考えられる。

V68とヘムに結合したCOの間には立体障害が生じていることが知られている。COが脱離することで、それがなくなりEヘリックスが動く4、一方、V68A変異体では、立体反発が小さくなり、Eヘリックスの動きがサブマイクロ秒に遅くなった、と考えると実験結果をうまく説明できる。

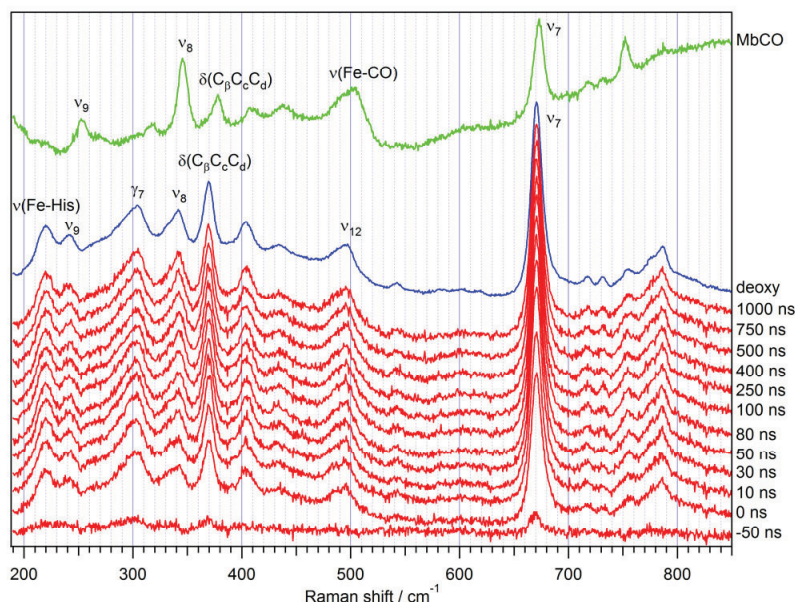


図3. K78H変異体の時間分解共鳴ラマンスペクトル

K78はEFコーナーにあり、リガンドの脱着に伴って大きく向きをかえる残基である。実際に、この残基を置換することによってEおよびFヘリックスの動きに影響が見られたことから、MbとHbのダイナミクスの違いにこの残基が関わっている可能性が考えられる。

【参考文献】

1. 水谷 泰久, 生物物理, **47**, 288-294 (2007)
2. B. A. Springer and S. G. Sligar, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 8961-8965 (1987)
3. S. Hu, K. M. Smith, and T. G. Spiro, J. Am. Chem. Soc., **118**, 12638-12646 (1996)
4. A. Sato, Y. Gao, T. Kitagawa and Y. Mizutani, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **104**, 9627-9632 (2007)