

タンパク質はそのエネルギーポテンシャル面に多くのローカルミニマムを持ち、これに対応した conformational substate (cs)が存在する。タンパク質は cs 間で絶えず熱的に揺らいでおり、その階層的なポテンシャル構造はフェムト秒から秒、サブオングストロームから数十オングストロームにわたる非常に幅広い揺らぎを生み出している。揺らぎは凝集相に共通した問題であるが、タンパク質においては幅広い時間・空間スケールを持つという点でそれが特徴的に現れている。われわれは時間分解振動分光法を用いて、タンパク質の機能に関係した構造揺らぎの検出を試みている。これまでヘムタンパク質の構造揺らぎは主にヘムの可視・近赤外吸収スペクトルなどから調べられてきた。振動分光法は吸収分光法と比較すると感度の点で不利であるが、スペクトル情報を分子の構造情報と直接対応付けられる点で非常に有利である。本研究ではこの点に着目して、ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、一酸化窒素 (NO) 再結合の時間スケールにみられるミオグロビン (Mb) の構造揺らぎを調べた。この結果を、一酸化炭素 (CO) 結合形 Mb について観測された構造揺らぎと比較して議論する。

実験 モード同期チタンサファイアレーザーの出力を再生増幅器 (繰り返し 1 kHz) で増幅して得られたパルス光より、自作の波長変換システムを用いてプローブパルス (波長 442 nm) およびポンプパルス (波長 540 nm) を得た。ポンプ・プローブ法 (相互相関幅 2.2 ps) によって時間分解ラマンスペクトルを測定した。試料にはウマ骨格筋由来の Mb を用いた。CO 結合形 Mb および NO 結合形 Mb は、それぞれ CO ガスおよび水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した NO ガスを還元形 Mb 溶液に加え調製した。

一酸化窒素再結合過程にみられる構造揺らぎ Mb において鉄原子のヘム平面からの変位には大きな不均一性があることが知られている¹。変位が小さいほど結合速度は速いと考えられるので、このような鉄原子の変位の不均一性はリガンドの結合速度に不均一性を生み出すと予想される。そこで、再結合の速い NO について、Mb での再結合過程を詳しく調べた。報告されているように、解離した NO のヘムへの再結合が 10 ピコ秒の時間領域で観測され、解離形ヘムのバンド強度がこの時間スケールで減少した。この再結合に伴って、解離形ヘムの鉄-ヒスチジン伸縮振動バンドにバンド形の変化がみられた。図 1 に NO 光解離後 3 ピコ秒(A)および 20 ピコ秒(B)の時間分解共鳴ラマンスペクトルにおいて観測された $\nu(\text{Fe-His})$ ラマンバンドを示す。時間分解スペクトルは実測スペクトルから未反応分の NO 結合形のスペクトルを差し引いた差スペクトルとして表している。3 ピコ秒と 20 ピコ秒の $\nu(\text{Fe-His})$ バンド形状を比較すると、バンドの高波数側の形状に違いがみられた。図 1 (C)に 3 ピコ秒と 20 ピコ秒の時間分解スペクトルの差スペクトルを併せて示す。遅延時間 3 ピコ秒と 20 ピコ秒の間の $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの変化分は、元のバンドとは異なる振動数に重心を持つことがわかる。これは、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの不均一広がり的高振動数成分がより速い再結合速度を持つことを示唆しており、再結合過程において cs の非平衡分布が生じている可能性を示している。この解釈が正しいとすると、図 1 に示す結果は、NO 再結合速度と Fe-His 結合の強さとの間に相関があること、かつ cs 間の揺らぎの速度が再結合速度と同程度かそれ以下であることを意味する。 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数の不均一性が、ヘモグロビン²と同様に F ヘリックスからの張力と相関があると仮定すると、 $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数が高いほど張力が弱く、したがって NO の再結合速度が速いことが予想される。観測されたバンド形状の変化はこの予想と一致している。

一酸化炭素解離直後にみられる構造揺らぎ CO 光解離後 500 ps までのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンド形の変化に着目した。 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドのバンド幅は、

CO の解離後 13 ± 3 ps の時定数で約 1 cm^{-1} の広がり
を示した。バンドの広がり、光解離後にできた鉄-
ヒスチジン結合に関する cs 間の非平衡な分布が緩
和していく過程に対応していると解釈した。CO が
解離する前は、タンパクは CO 結合形のポテンシ
ヤル面上でその細かなローカルミニマムに対応した
cs の平衡分布を持つ。CO の解離が起こるとこの分
布は解離形のポテンシヤル面上へ移されるが、タン
パク質の動きに比べて解離は非常に速く起きるので
CO 結合形の cs 分布はそのまま解離形のポテンシ
ヤル面上へ投影されると考えられる。CO 結合形の cs
の平衡分布は解離形のポテンシヤル面上においては
平衡分布ではないので、この面上において新たな平
衡分布に向かって緩和が起きると予想され、それが
バンド幅の広がりとして観測されていると解釈でき
る。この解釈に基づくと、観測されたバンド広がり
の時定数 13 ± 3 ps は、Fe-His 結合部分の構造揺らぎ
の時定数に対応する。

考察 上に述べたように、本研究では 2 種類の
過程において、Fe-His 結合部分の不均一性あるいは
構造揺らぎに帰属できる 10 ピコ秒オーダーのバン
ド形状の時間変化が観測された。サブナノ秒領域で
の NO の再結合は非指数関数的振る舞いを示すこと
が知られている³。これは、cs の構造不均一性が再結
合速度の不均一性として現れているためと考えられ
ている。本研究の結果は、なかでも Fe-His 結合部
分の構造不均一性がその重要な因子であることを示
唆する。タンパク質内でのヘム周辺の空間について、
リガンドの結合する側を遠位側、ヒスチジンが配位
している側を近位側とよぶ。遠位側の重要な動きと
してはリガンドの通過経路における揺らぎがあげら
れる。これは、open form (リガンドが通り抜けや
すい状態) と closed form (リガンドが通り抜けにく
い状態) の 2 つの状態を考慮することによってうま
くモデル化されていて、両者の間の遷移速度として
 $1.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ の値が見積もられている⁴。一方、近位側
については、現在のところ室温において観測した報
告例はない。今回の結果は、室温での近位側の構造
揺らぎの観測の可能性を示すものである。

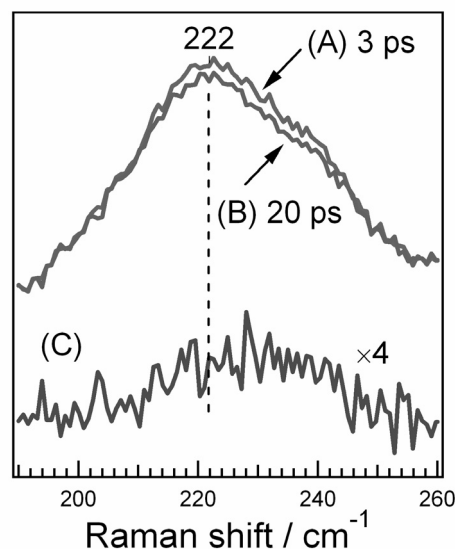


図 1. NO 光解離後の Mb の時間分解共鳴ラ
マンスペクトル。(A)遅延時間 3 ピコ秒、(B)
遅延時間 20 ピコ秒、(C) (A) と (B) の差スペ
クトル (4 倍拡大したもの)。

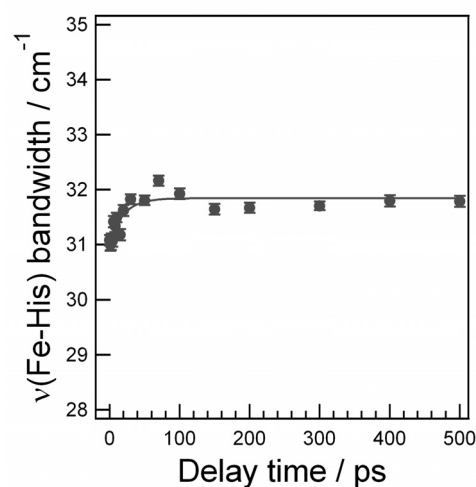


図 2. CO 光解離形 Mb の $\nu(\text{Fe-His})$ バンド
幅の時間依存性。実線はバンド幅の実測値を
指数関数でフィットしたもの (時定数 13 ± 3
ps)。

¹ F. Parak and E. W. Knapp, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7088 (1984).

² S. Matsukawa, K. Mawatari, Y. Yoneyama, and T. Kitagawa, J. Am. Chem. Soc. **107**, 1108 (1985).

³ J. W. Petrich, J.-C. Lambry, K. Kuczrea, M. Karplus, C. Poyart, and J.-L. Martin, Biochemistry **30**, 3975 (1991).

⁴ W. D. Tian, J. T. Sage, P. M. Champion, E. Chien, and S. G. Sliger, Biochemistry **35**, 3487 (1996).