

鉄-ヒスチジン伸縮振動バンドをととして観た還元型チトクロム *c* の構造ダイナミクス

(神戸大理¹、神戸大分子フォト²、科技団さがけ研究²¹³) ○昼間祐介¹、水谷泰久^{1,2,3}

【序】 還元型チトクロム *c* は天然状態でヘム鉄にヒスチジン(His18)とメチオニン(Met80)が配位した 6 配位低スピン状態で存在し、ここに変性剤(塩酸グアニジン、GdnHCl)を加えると Met80 が解離し 5 配位高スピンの変性状態になる。変性状態で一酸化炭素(CO)が存在する場合、解離した Met80 に代わって CO が結合する。適度な GdnHCl 濃度のもとで CO 結合形変性チトクロム *c* を光励起し CO を光解離させると、変性状態から天然状態への構造変化が起こる¹。この構造変化を、ヘム鉄とタンパク部分をつなぐ共有結合である鉄-ヒスチジン結合の伸縮振動 $[\nu(\text{Fe-His})]$ バンドに注目して追跡した。

【実験】 ウマ由来のチトクロム *c* を精製せずに用い、pH 6.5、0.1 M リン酸バッファーに溶かし窒素(N_2)雰囲気下で還元した。そこに GdnHCl を加えた後 CO を加えた。既報の装置²を用いてポンプ光(波長 540 nm あるいは 550 nm)、プローブ光(波長 442 nm)を発生させ、ポンプ-プローブ法による時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。

【結果と考察】 GdnHCl 添加によるチトクロム *c* の可視・紫外吸収スペクトルの変化を測定した。図 1 は Soret 帯のピーク波長を GdnHCl の濃度に対してプロットしたものである。CO 雰囲気下では 3.6 M 付近でピーク波長が 415 nm から 413 nm へシフトした。 N_2 雰囲気下では 5.3 M 付近でピーク波長が 415 nm から 418 nm へシフトした。

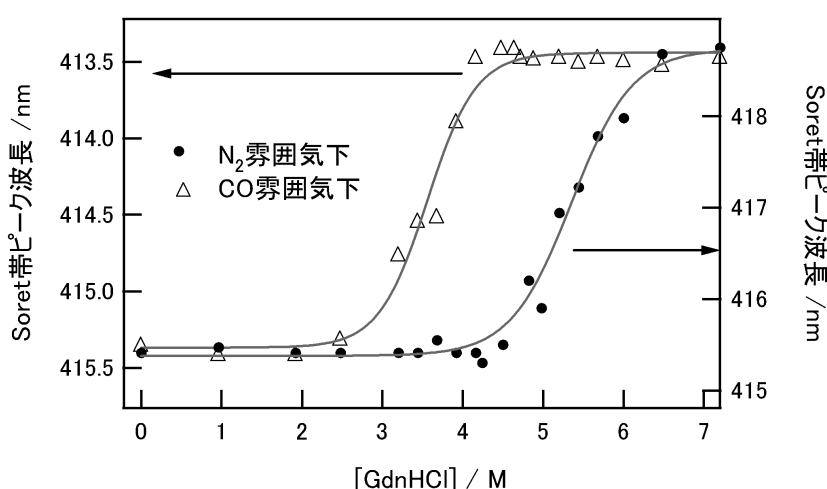


図 1. GdnHCl 添加による Soret 帯のピーク波長シフト。

●は N_2 雰囲気下、△は CO 雰囲気下での値を表す。

GdnHCl を加えることによってヘムから Met80 が解離し変性状態になるが、CO 存在下では、Met80 が解離したヘムに CO が結合する。このため CO 雰囲気下では Met80 の解離が促進され、低い GdnHCl 濃度で変性が起こると考えられる。GdnHCl が 4.5 M 中では、CO 雰囲気下では CO がヘムに結合した変性状態で存在し、 N_2 雰囲気下では天然状態で存在している。この変性がかかる転移濃度差を利用すると、CO 光解離によって変性状態から天然状態へのタンパク質の構造変化を誘起できると期待される。

GdnHCl 4.5 M 中で時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。ポンプ照射後の、1300~1600 cm^{-1} に観測されたヘムのラマンバンド(ν_2, ν_3, ν_4)から 5 配位状態のヘムが生成していることが確認された。図 2(A)、(B)はそれぞれ CO 光解離後 20 ピコ秒と 1000 ピコ秒の時間分解共鳴ラマンスペクトルである。20 ピコ秒では $\nu(\text{Fe-His})$ バンドは 228 cm^{-1} に観測され、その後 1000 ピコ秒においてもバンド強度、振動数ともに変化は見られなかった。

回転セルでセルを一定速度で回転させながら cw レーザーを照射して共鳴ラマンを測定すると、高回転数では CO 結合形のみが、低回転数では CO 結合形と解離形によるラマンバンドが観測された。この解離形由来のスペクトル成分はレーザービーム内での滞在時間内に解離したものの共鳴ラマンスペクトルを表している。ビーム内の滞在時間はサブミリ秒であるため、CO 光解離後サブミリ秒内での分子構造を反映していると考えられる。

このときの $\nu(\text{Fe-His})$ バンドは 220 cm^{-1} に観測された(図 2(C))。したがって、CO 光解離後ピコ秒からサブミリ秒にかけて 228→220 cm^{-1} の $\nu(\text{Fe-His})$ の振動数シフトは、変性状態から天然状態へ向けての構造変化によるものと考えられる。一方で、ピコ秒の時間領域では振動数シフトは観測されなかったことから、チトクロム *c* のヘム周辺のタンパク構造に変化はまだ起きておらず、ナノ秒以降の遅い時間領域で起こる考えられる。これは、ミオグロビンにおいて CO 光解離後約 100 ピコ秒の時定数で 2 cm^{-1} の低波数シフトが見られる³ことと対照的である。

天然状態の還元型チトクロム *c* を光励起すると、Met80 が過渡的に解離することが知られている⁴。図 2(D)に示した Met80 光解離後 2 ピコ秒の時間分解共鳴ラマンスペクトルでは、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドは 217 cm^{-1} に観測された。光解離直後のヘムは 5 配位状態であるが、Met80 の再結合が 6.4 ピコ秒と非常に速いことを考えるとタンパク構造は天然状態に非常に近いと考えられる。そこで、この振動数を天然状態の仮想的な $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数とみなす。以上のことから、還元型チトクロム *c* の $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの振動数は、変性状態から天然状態へ 228 cm^{-1} (ピコ秒)→220 cm^{-1} (サブミリ秒)→217 cm^{-1} (天然状態)と変化すると考えることができる。

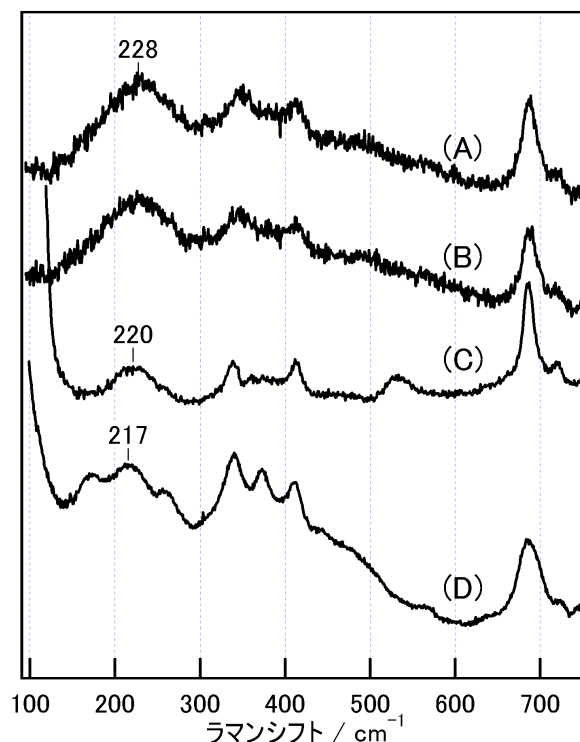


図 2. 還元型チトクロム *c* の共鳴ラマンスペクトル。

(A)、(B)、(C)はそれぞれ CO 光解離後 20 ピコ秒、1000 ピコ秒、サブミリ秒のスペクトル、(D)は Met80 光解離後 2 ピコ秒のスペクトル。

¹ C. M. Jones, E. R. Henry, and W. A. Eaton. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90. **1993**, 90, 11860.

² Y. Mizutani and T. Kitagawa. Chem. Rec. **2001**, 1, 258.

³ Y. Mizutani and T. Kitagawa. J. Phys. Chem. B **2000**, 105, 10992.

⁴ W. Wang, X. Ye, and P. M. Champion. J. Phys. Chem. B **2000**, 104, 10789.