

いくつかのヘムタンパク質においては、ヘムでのリガンド脱着がタンパク質構造の変化を誘起し、それが機能発現の源となっている。ヘモグロビン(Hb A)の協同的な酸素脱着はその典型例である。われわれはこの機構を理解するために、構造変化のスタート地点であるヘムとタンパク部分との結合に着目して構造ダイナミクスを調べている。本講演では、Hb A の構造ダイナミクスおよび Hb A のサブユニットに構造が似るミオグロビン(Mb)について構造ダイナミクスを比較して議論する。一酸化炭素 (CO) 結合形のヘムタンパク質に可視光を照射すると高収率 ( $\approx 1.0$ ) で CO が光解離する。この性質を利用して、リガンド脱離に伴うタンパク質の構造変化を調べることができる。Mb および Hb A のヘムにはヒスチジン側鎖 (近位ヒスチジン) が配位しており、鉄-ヒスチジン結合はヘムとタンパク質とを繋ぐ唯一の共有結合である。そのため、鉄-ヒスチジン伸縮振動  $\nu(\text{Fe-His})$  はタンパク質構造を反映する<sup>1</sup>。そこで、 $\nu(\text{Fe-His})$  を構造プローブとして、CO 脱離後のタンパク質構造の変化を追跡した。

**ミオグロビンの構造ダイナミクス** 図 1 は CO 結合形 Mb のピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルで、ポンプ光の波長は 540 nm、プローブ光のそれは 442 nm、相互相関幅は 2.2 ps であった。ここでは共鳴効果によってヘム由来の振動バンドが選択的に観測されている。過渡共鳴ラマンスペクトルは実測スペクトルから未反応分の CO 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あり、左側の数字は遅延時間を表す。また、デオキシ形と CO 結合形のスペクトルを比較のため下に示してある。遅延時間 1000 ps のスペクトルではポルフィリン環の振動に由来する 3 本の強いバンド [ $\nu_7$ , 671  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{C}_\alpha)$ , 369  $\text{cm}^{-1}$ ;  $\gamma_7$ , 301  $\text{cm}^{-1}$ ] が観測され、これらの振動数はデオキシ形のものと全く一致した。これらのバンドは 0 ps から現れており、ポルフィリン環の構造変化のほとんどが装置の応答時間 (2.2 ps) 以内で速く起っていることを示している。

$\nu(\text{Fe-His})$  ラマンバンドは 220  $\text{cm}^{-1}$  付近に観測された。 $\nu(\text{Fe-His})$  振動数は遅延時間 1 ps では 222  $\text{cm}^{-1}$  であったが、約 100 ps の時定数で 2  $\text{cm}^{-1}$  低波数シフトし平衡状態 (デオキシ形) の値へと近づいた (図 2)。このような  $103 \pm 7$  ps の時定数をもつ振動数シフトは、ポルフィリン環に由来するいずれのラマンバンドにもみられなかった。また、タンパク部分のないヘムのモデル化合物では  $\nu(\text{Fe-His})$  の低波数シフトは観測されなかった。したがって、この低波数シフトは CO 脱離後のタンパク質構造の緩和によるものと帰属した<sup>2</sup>。

ヒスチジン側鎖と主鎖との間の共有結合を切断した場合にこのようなタンパク質構造緩和がどのように影響を受けるかを調べるために、近位ヒスチジンをグリシンで置換し外部からイミダゾールを加えた人工変異体 [H93G(Im)] で同様の測定を行った。興味深いことに、野生型と同様  $\nu(\text{Fe-His})$  振動数は約 100 ps の時定数で低波数シフトしデオキシ形の値へと近づいた。近位ヒスチジンは Ser92 および Leu89 と水素結合を形成していることが知られている<sup>3</sup>。例えば、Ser92 あるいは Leu89 を置換し水素結合ができないようにすると、 $\nu(\text{Fe-His})$  振動数は 3  $\text{cm}^{-1}$  高波数シフトする。ヒスチジン側鎖と主鎖との間の共有結合を切断しても  $\nu(\text{Fe-His})$  バンドが振動数シフトを示すことは、近位ヒスチジンと周囲との水素結合がリガンド脱離に伴うタンパク質構造変化に重要な役割を果たしていることを示唆している。

**ヘモグロビンの構造ダイナミクス** CO 結合形 Hb A について Mb と同様の測定・解析を行った。Hb A の構造ダイナミクスは Mb のそれと似ていたものの、以下の相違点を示した。①  $\nu(\text{Fe-His})$  バンドについて、シフトの時定数が  $284 \pm 38$  ps と Mb に比べ大きかった (図 2)、②  $\nu(\text{Fe-His})$  バンドについて、1000 ps での振動数 ( $231 \text{ cm}^{-1}$ ) はデオキシ形の値 ( $215 \text{ cm}^{-1}$ ) とは一致しなかった、③  $\gamma_7$  バンドについて、1000 ps での振動数 ( $305 \text{ cm}^{-1}$ ) はデオキシ形の値 ( $300 \text{ cm}^{-1}$ ) とは一致しなかった、④ デオキシ形では  $\nu_8$  バンド ( $341 \text{ cm}^{-1}$ ) の存在が認められるが、1000 ps ではまだ現れていなかった。これらの結果は、Hb A ではヘムの構造緩和およびヘム周辺のタンパク構造変化が 1000 ps ではまだ完了していないことを意味している。

Hb A と Mb とのこれらの違いが、Hb A の四量体形成や協同性に直接関係する相互作用によるものなのか、それとも Mb と Hb サブユニット固有の性質の違いによるものかを調べるために、単離 $\alpha$ 鎖、単離 $\beta$ 鎖について時間分解共鳴ラマン測定を行った。その結果、上に挙げた 4 つの相違点は、単離鎖と Mb との比較においても同様にみられることがわかった (図 2)。したがって、上記の相違点は、Hb A の四量体形成や協同性に直接関係する相互作用によるものではなく、Mb と Hb サブユニット固有の性質の違いによるものであると考えられる。すなわち、Hb A はサブユニットの段階ですでに、Mb とは異なる動的性質を持っている。そのような性質が Hb A の協同性発現にどのように関わっているかを明らかにすることが今後の課題である。

**謝辞** 本研究は、Biswajit Pal 博士、北川禎三教授 (統合バイオサイエンスセンター) および長井雅子教授 (金沢大医) との共同研究である。

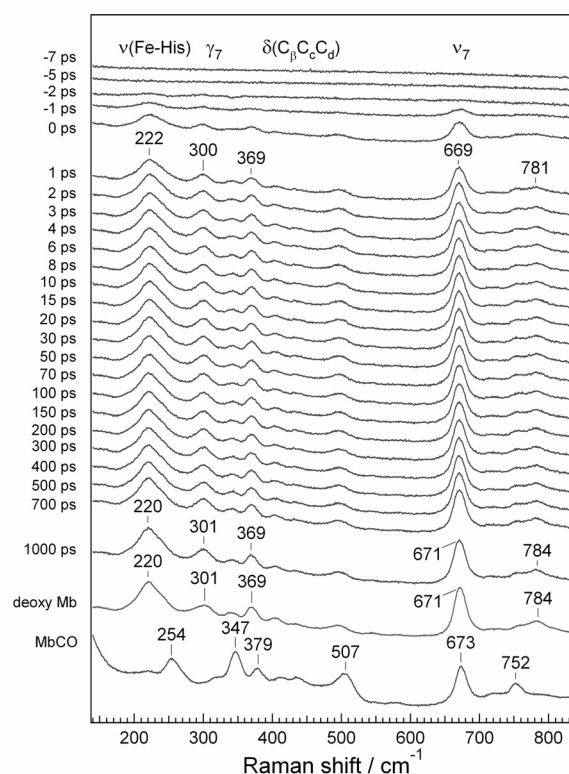


図 1. Mb の時間分解共鳴ラマンスペクトル

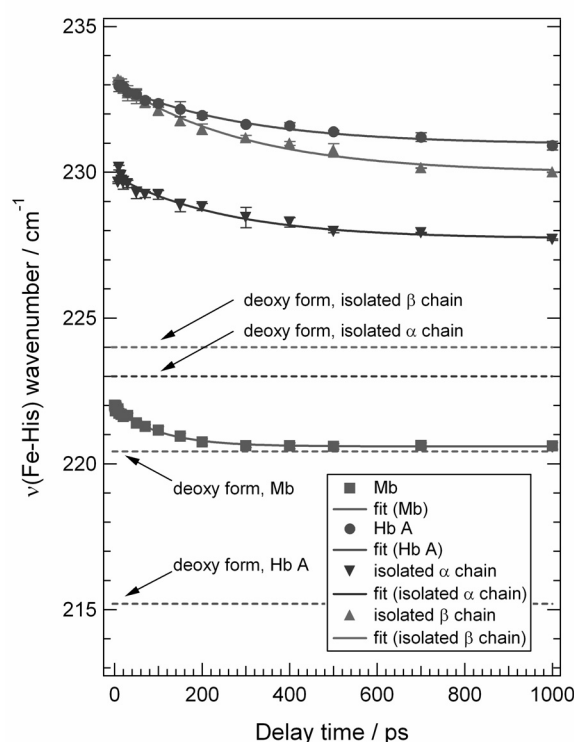


図 2. Mb、Hb A およびその単離鎖の  $\nu(\text{Fe-His})$  バンドの振動数シフト。対応するデオキシ形の値を破線で示す。

- 1 T. Kitagawa, Biological Applications of Raman Spectroscopy, T. G. Spiro Ed., John Wiley & Sons, 1987; Vol. III; p 97.
- 2 Y. Mizutani and T. Kitagawa, J. Phys. Chem. B, **105**, 10992 (2001).
- 3 E. S. Peterson, J. M. Friedman, E. Y. T. Chien, S. G. Sligar, Biochemistry **37**, 12301 (1998).