

(¹神戸大・分子フォト、²JSTさきがけ、³九大院・工、⁴岡崎統合バイオ)

○水谷泰久^{1,2}、林高史³、原田勝好³、中川知之³、Biswajit Pal⁴、北川禎三⁴

ミオグロビン(Mb)のヘム周辺には水素結合ネットワークが形成されていることが知られている(図1)。ここで、ヘムは2本のプロピオン酸基を側鎖に持ち、1本は遠位側 Lys45(クジラの場合は Arg45)と、もう1本は近位側 Ser92およびHis97と水素結合を形成する。これらの水素結合が機能に果たす役割を調べるために、プロピオン酸基を選択的にメチル基に置換した再構成ミオグロビン[6位のプロピオン酸基を置換したもの、rMb(6MeP); 7位のプロピオン酸基を置換したもの、rMb(7MeP)]の構造ダイナミクスを、野生型のものと比較した。水素結合の有無による時間分解共鳴ラマンスペクトルの違いをもとにして、ヘム周辺に形成されている水素結合ネットワークの意義を議論する。

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、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¹。試料にはウマ骨格筋由来の Mb を用いた。プロピオン酸基をメチル基に置換したヘムは既報²の方法により合成し、これをアポ体 Mb に再構成して、rMb(6MeP)および rMb(7MeP)を得た。一酸化炭素(CO)結合形 Mb は、CO ガス存在下でメト形 Mb を還元して調製した。

結果 図2に、CO光解離に伴うrMb(6MeP)の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。また、比較のために、デオキシ形およびCO結合形のスペクトルをあわせて示す。CO結合形のFe-CO伸縮振動は 502 cm⁻¹に観測された。これは野生型の振動数(507 cm⁻¹)に比べかなり低い。このバンドの振動数は遠位側のヘム周辺環境に敏感である。したがって、振動数の違いは、6位のプロピオン酸基と Lys45との水素結合を欠くことによって遠位側のヘム周辺構造に変化が起きていることを示している。ヘム骨格由来の共鳴ラマンバンドの振動数は、遅延時間数ピコ秒において振動励起による低波数シフトが観られたほかは、デオキシ形のものと一致した。このことは、野生型の場合と同様に、ヘム自体の構造変化は装置応答時間内に完了していることを意味する。また、鉄-ヒスチジン伸縮振動[v(Fe-His)]バンドは 220 cm⁻¹に観測された。このバンドはヘム周辺のタンパク構造を敏感に反映しているので、構造変化のプローブとして利用できると考えv(Fe-His)振動数の時間変化を詳細に解析した。その結果を図3に示す。rMb(6MeP)の

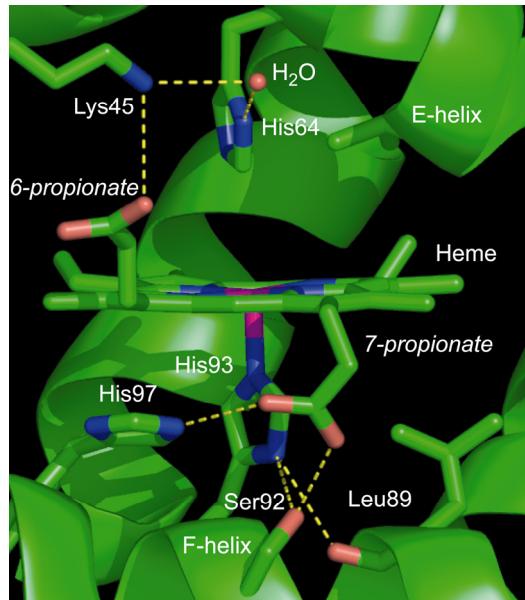


図1. ウマ骨格筋ミオグロビンのヘム周辺構造と水素結合ネットワーク。破線は水素結合を表す。

$\nu(\text{Fe-His})$ バンドは、ピコ秒領域で低波数シフトを示すという点では野生型のそれと挙動が似ているが、シフトの時定数および1000ピコ秒においてデオキシ形との間に振動数差がみられる点で野生型の場合とは異なっている。一方で、rMb(7MeP)の $\nu(\text{Fe-His})$ バンドには、上記のような野生型との違いは観られず、振動数、時定数とともに野生型のものにきわめて近い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数シフトが観測された。

考察 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの時間挙動を野生型のそれと比較したところ、遠位側とヘムとの水素結合を欠くrMb(6MeP)では振動数シフトの速度の低下とナノ秒以降の遅い相の出現がみられた。しかし、rMb(6MeP)のデオキシ形においては、水素結合の欠如による遠位側の構造変化の影響は、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの振動数に表れていない。したがって、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの時間挙動の違いは、水素結合の欠如によって変化した遠位側の構造ダイナミクスがFe-His結合に直接影響を与えていたと考えにくい。むしろ、遠位側の構造変化と近位側の構造変化とが協同的に起きるために、遠位側のダイナミクスの違いが $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの時間挙動に表れているのではないかと考えられる。ヘモグロビンにおいて、リガンド脱離に伴うEヘリックスとFヘリックスとの協同的な動きが観測されており³、この考え方を支持する。一方、近位側とヘムとの水素結合を欠くrMb(7MeP)では、 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドのシフト速度に野生型との違いは見られなかった。このことは、7位のプロピオン酸基の形成する水素結合が、Fe-His結合近傍の構造ダイナミクスに大きな影響は与えていないことを示唆している。

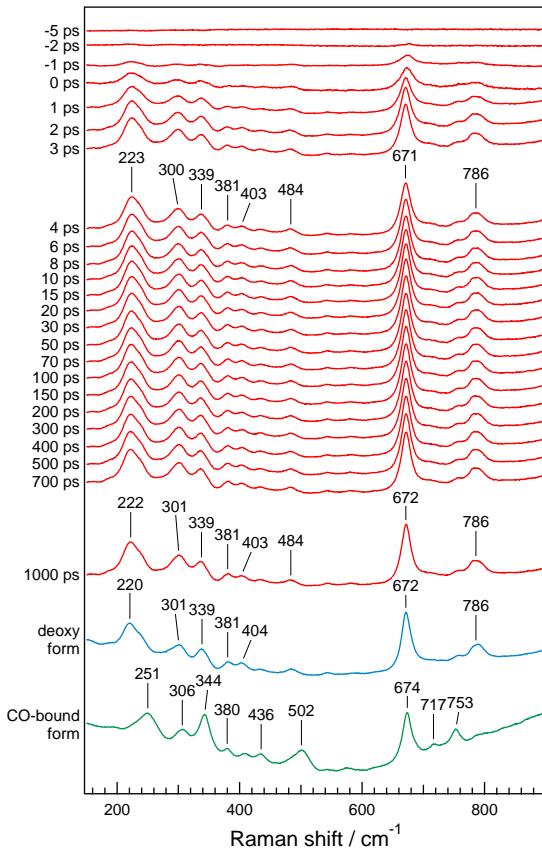


図2. CO光解離に伴うrMb(6MeP)の時間分解共鳴ラマンスペクトル。未反応分の寄与は差し引いてある。

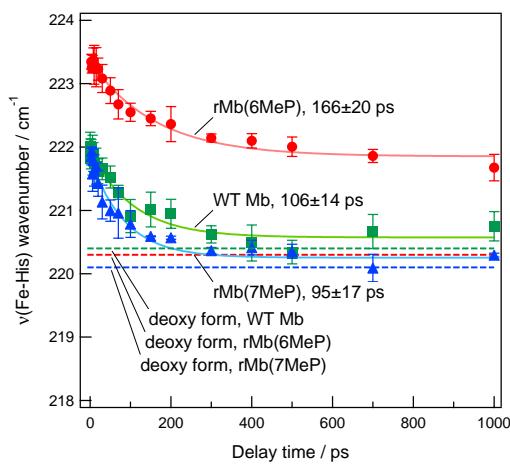


図3. 野生型Mbおよび再構成Mbの $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数変化。デオキシ形の $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数を破線で表す。

¹ Y. Mizutani and T. Kitagawa, Chem. Record, **1**, 258-275 (2001).

² K. M. Smith and G. W. Craig, J. Org. Chem., **48**, 4302-4306 (1983).

³ K. R. Rodgers and T. G. Spiro, Science, **265**, 1697-1699 (1994).