

ゲル中にトラップされたヘモグロビンの構造ダイナミクス

4A15

(¹神戸大・理、²神戸大・分子フォト) 上門久美子¹、○水谷泰久^{1,2}

はじめに ヘモグロビン (Hb) は、酸素 (O₂)、一酸化炭素 (CO) などのリガンドが結合した状態ではリガンド親和性の高い R 構造を、リガンドが結合していない状態 (デオキシ形とよぶ) ではリガンド親和性の低い T 構造をとることが知られている。T-R 間の構造変化が生み出す協同性は、Hb が効率的な酸素運搬を行う上で必須の性質である。したがって、四次構造変化の機構を明らかにすることは Hb の機能を理解する上できわめて重要である。最近、ゲル中にタンパク質を変性させることなく封じ込める方法が報告された¹。この手法を用いると、ゲルマトリックスとの相互作用により Hb の四次構造変化を著しく減速することができる。本研究では、ゲル中における Hb の構造ダイナミクスを、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて調べた。

実験 オルトケイ酸テトラメチル、蒸留水、0.04 M 塩酸の混合液に超音波処理を施し、これにバッファーとヒト HbA 溶液を加えてゾルを合成した。合成したゾルを測定セル中でゲル化し、吸収スペクトル、定常状態共鳴ラマンスペクトル (プローブ光波長: 410 nm)、ナノ秒時間分解共鳴ラマンスペクトル (ポンプ光波長: 532 nm、プローブ光波長: 436 nm) を測定した。

結果・考察 吸収スペクトル、定常状態共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、溶液中とゲル中でスペクトルが一致した。このことから、ゲル中でも溶液中と同様のヘムおよびヘム周辺の構造が保たれていることが確認された。次に、CO 結合形ヘモグロビン (HbCO) の CO 光解離に伴うナノ秒時間分解共鳴ラマン測定を行い、リガンド脱離後の構造変化について調べた。

鉄-ヒスチジン伸縮振動 ($\nu(\text{Fe-His})$) バンド 図 1 は、遅延時間に対して鉄-ヒスチジン伸縮振動 ($\nu(\text{Fe-His})$) バンドの振動数をプロットしたものである。Fe-His 結合はヘムとタンパク質部分とをつなぐ重要な結合であり、その伸縮振動の振動数は、タンパク質の立体構造、特に四次構造によって鋭敏に変化することが知られている。図 1 で、●は HbCO、■は [HbCO]、▲は [デオキシ Hb] に後から CO を結合させたものの結果を表す。ここでは、A という状態でゲル中に封じ込めたものを [A] と表している。まず、HbCO と [HbCO] の結果を比較する。光解離後 10 μs までは振動数はともに低波数側にシフトした。10~100 μs では、HbCO のみさらに低波数側にシフトし、[HbCO] はほとんどシフトしなかった。このときの [HbCO] の振動数は、化学修飾により R 構造を安定化したデオキシ Hb の値に近い²。また Hb の四次構造転移は 10~100 μs で起きることがわかっている³。以上の実験事実は、[HbCO] では R 構造から T 構造への四次構造変化が妨げられていることを示している。

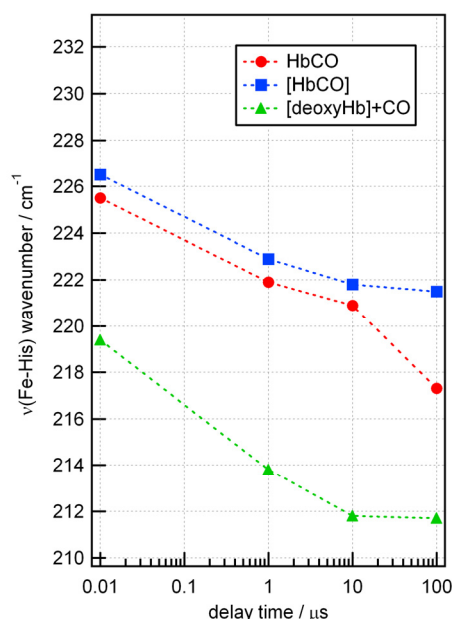


図 1. Hb の CO 脱離に伴う $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数シフト。

一方、10 μs までの振動数変化に大きな違いは見られないことから、三次構造変化への影響は少ないと考えられる。次に、[HbCO]と[デオキシ Hb]+CO の結果を比較する。光解離後 10 ns での振動数は、[デオキシ Hb]+CO の方が 7cm^{-1} 低く、10 ns 以降はともに低波数側にシフトした。このことと、10~100 μs における[デオキシ Hb]+CO の振動数が溶液中の T 構造の $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数と近いことより、[デオキシ Hb]+CO では、四次構造が T 構造で固定されたもとで三次構造変化が起きていると考えられる。以上の結果は、ゲルに封じ込めることによって、Hb の四次構造を固定してサブユニットの構造ダイナミクスを観測できることを示している。

ヘム由来のラマンバンド HbCO、[HbCO]

いずれについても、ナノ秒領域において γ_7 バンドの低波数シフト、 ν_8 バンドの強度増大が観測された(図2)。これに対して、[デオキシ Hb]+CO では、 γ_7 バンドの振動数が 10 ns においてほぼ緩和し、また ν_8 バンドの強度増大が早い時間帯で起きていることがわかる。このことは、R 構造のもとと T 構造のもとでは、ヘムの構造緩和の速度が異なることを示している。これらの点は、ヘムのスペクトル変化の原因となる三次構造変化が四次構造変化とが互いに関係していることを示唆している。ナノ秒の時間領域において、 γ_7 バンドの低波数シフト、 ν_8 バンドの強度増大が見られる点は、Hb のサブユニットに類似の構造を持つミオグロビンには見られない Hb 特有の点である⁴。また、これらのスペクトル変化は、リガンドとして O_2 を用いた場合と CO を用いた場合とで異なった時間変化を示すことが最近のわれわれの研究⁵からわかっている。これらのことから示唆されるように、 γ_7 バンド、 ν_8 バンドの変化は Hb のダイナミクスに特徴的なものだと考えられるが、それが四次構造に依存していることは Hb の構造ダイナミクスを考えるうえで大変興味深い。

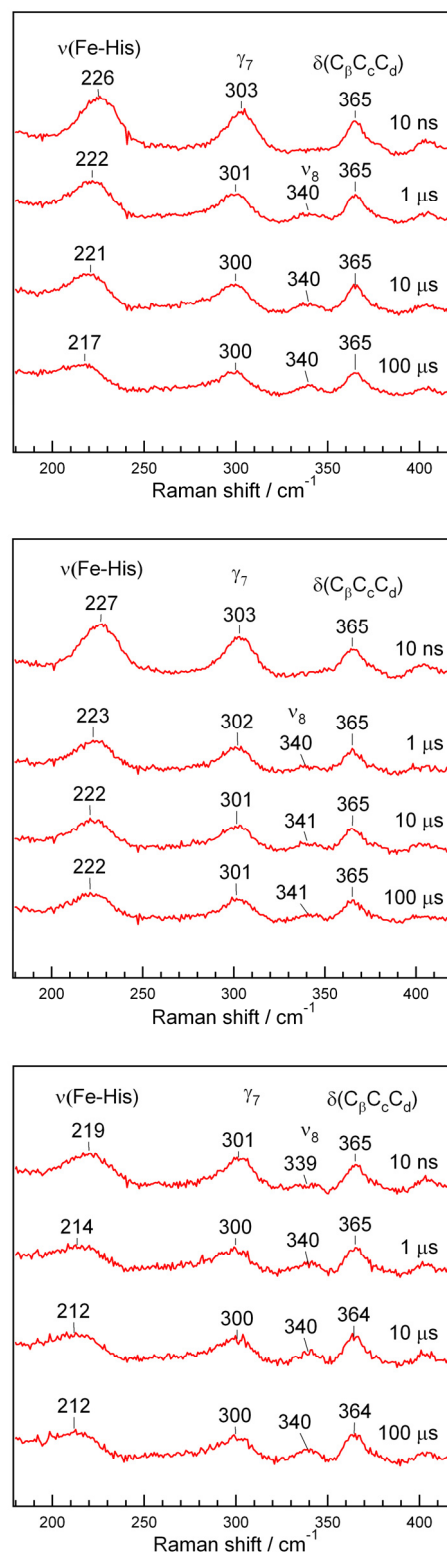


図2. Hb の CO 脱離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトル。HbCO (上)、[HbCO] (中)、[デオキシ Hb]+CO (下)。

¹ N. Shibayama and S. Saigo, *J. Mol. Biol.*, **251**, 203 (1995); I. Khan et al., *Biochemistry*, **39**, 16099 (2000).

² K. Nagai, T. Kitagawa, and H. Morimoto, *J. Mol. Biol.*, **136**, 271 (1980).

³ S. Kaminaka and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3256 (1992).

⁴ Y. Mizutani and M. Nagai, 投稿準備中。

⁵ 村川由佳、水谷泰久、2005 年分子構造総合討論会講演要旨集、4A16。