

## 4A17

### リガンド脱離にともなうミオグロビンのピコ秒高次構造ダイナミクス

(JST CREST<sup>1</sup>、神戸大 分子フォト<sup>2</sup>) ○佐藤 亮<sup>1</sup>、水谷 泰久<sup>1,2</sup>

**【序】**ヘムタンパク質においては、ヘムでのリガンド脱着によって誘起されるタンパク構造の変化が機能調節に重要な役割を果たす場合がある。ヘモグロビン(Hb)のアロステリック効果はその代表例である。ミオグロビン(Mb)はHbのサブユニットに良く似た三次構造をとるので、リガンドの脱離に誘起されるMbの構造緩和はHbの機能を理解するための基本的なモデルと考えられる。過去のMbについての研究からサブピコからナノ秒にわたるタンパク構造の変化が示唆されているが、タンパク構造変化に関する議論の多くはヘムの構造変化に由来する信号の観測にもとづいていた。タンパク構造変化の直接的観測としては主鎖のアミド振動バンドについて時間分解赤外吸収測定が報告されているのみであり、Mbのタンパク部分についての部位特異的な構造変化に関する情報はこれまでなかった。

ラマン散乱励起光に200-250 nmの紫外光を用いると芳香族アミノ酸側鎖やポリペプチド主鎖の振動バンドが共鳴効果を受けるのでタンパク部分を直接に観測できる。トリプトファン(Trp)やチロシン(Tyr)のラマンバンドは側鎖周囲の構造を反映するため、部位特異的な構造ダイナミクスを調べることが可能である。我々はピコ秒でおこるタンパク構造変化を直接観測するための紫外共鳴ラマン分光装置を製作し今年の討論会で報告した。本研究ではこの装置を用いて一酸化炭素(CO)の光解離によって誘起されるMbの構造変化を調べた。

**【実験】**図1に実験で用いたピコ秒紫外共鳴ラマン分光装置を示す。モード同期チタンサファイアレーザーと再生増幅器から構成されるレーザー出力の第二高調波を、ポンプ光および紫外プローブ光発生用として利用した。この第二高調波を50気圧のメタンガス入りのラマンシフターに集光し、1次ストークスラマン散乱光の第二高調波として紫外プローブ光を得た。試料からのラマン散乱光を前置分光器の入射スリットに集光し、後段の焦点距離500 mmの主分光器において2次で分散させた後、紫外域に感度を有するCCD検出器により検出した。試料にはウマ心筋Mbのリン酸バッファー水溶液をCO雰囲気下でジチオナイト還元したものを用いた。

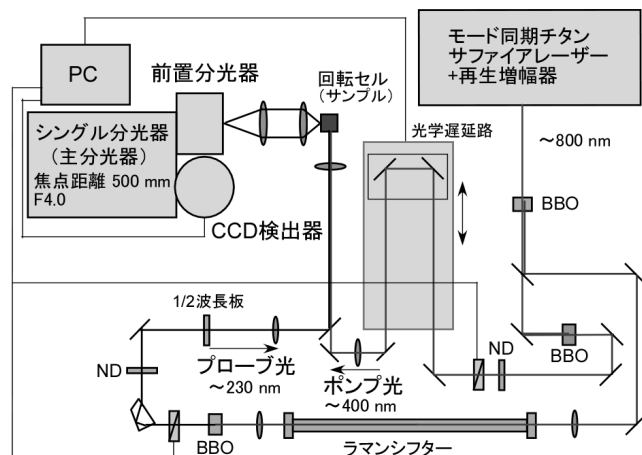


図1.ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置の概略

**【結果と考察】**図2に実験の結果得られた時間分解ラマン差スペクトルを示す。TrpのW3,W16,W18バンドとTyrのY8aバンドにおいて、ピコ秒からナノ秒の領域における段階的な強度変化が観測された。CO解離後5ピコ秒でTrpとTyrのバンドは強度減少を示し、続いて300ピコ秒程度でY8aバンドの強度が回復した。Trpのバンドは初期の強度減少の後、ピコ秒の時間領域では変化せずナノ秒以降に強度の回復を示した。

ウマMbはTrpとTyrを2残基ずつ含み、Trp7とTrp14はAヘリックスに、Tyr103

と Tyr146 はそれぞれ G および H ヘリックスに存在する。Tyr103 は CO 結合形とデオキシ形の両状態において表面に露出する一方、Tyr146 の側鎖は FG コーナーに位置し、近位ヒスチジン(His93)における主鎖のカルボニル基と水素結合している。時間分解可視共鳴ラマン測定の結果によるとヘムの構造変化は CO 解離後 2 ピコ秒以内に完了する<sup>1</sup>。ヘムの構造変化は His93 を介して F ヘリックスの変位を誘起する。したがって 5 ピコ秒での Y8a バンドの強度減少は、F ヘリックスの速やかな変位が Tyr146 と His93 間の水素結合に影響するためと解釈できる。300 ピコ秒程度で完了する Y8a の強度回復は鉄-ヒスチジン伸縮振動の波数シフトの時定数に類似するが<sup>1</sup>、これらはヘム近傍のタンパク構造の緩和を反映すると考えられる。

Trp は両残基とも A と E ヘリックスの接触部位に位置する。Trp7 はタンパク表面付近に存在する一方、Trp14 は E ヘリックス上の疎水性側鎖群に近接する。Trp バンドの強度減少は周囲の環境における疎水性の低下に起因し、A と E ヘリックス間の相対的距離の変化を反映すると考えられる。CO 結合形とデオキシ形の X 線立体構造の比較から<sup>2</sup>、CO の解離により F ヘリックスが変位するだけでなく E ヘリックスのヘム方向への変位も起こることが報告されている。立体構造から推測される CO 解離後の構造変化と Trp 周囲における疎水性の低下を考慮すると、5 ピコ秒での Trp バンド強度の減少は、E ヘリックスの変位によって A と E ヘリックス間における間隙が開くことを反映していると解釈できる。これに対しナノ秒における Trp バンドの強度回復は、A ヘリックスがヘムの方向へ移動し、E ヘリックスとの距離が再び狭まることを示唆する。Trp と Tyr のバンド強度の減少は CO 解離後 5 ピコ秒以内で F と E ヘリックスが速やかに変位することを示すが、これはヘムの構造変化にともない F と E ヘリックスが単一の構造体として、5 ピコ秒以内の時間で連動して動くことを意味する。これと同様の CO 解離後における超高速のタンパク構造変化が過渡回折法による研究からも報告されている<sup>3</sup>。Hb においても CO 解離後に Mb と同様な E と F ヘリックスの変位を示すスペクトル変化が紫外共鳴ラマン測定により観測されている、しかし Hb の場合はこの変化に数十ナノ秒の時間を要し、時間挙動は Mb と大きく異なる。

【参考文献】(1) Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem. B*, 105,10992 (2001). (2) Kachalova, G. S.; Pepov, A. N.; Bartunik, H. D. *Science*, 284,473 (1998). (3) Goodno, G. D.; Astinov, V.; Miller, R. J. D. *J. Phys. Chem. A*,103,10630 (1999).

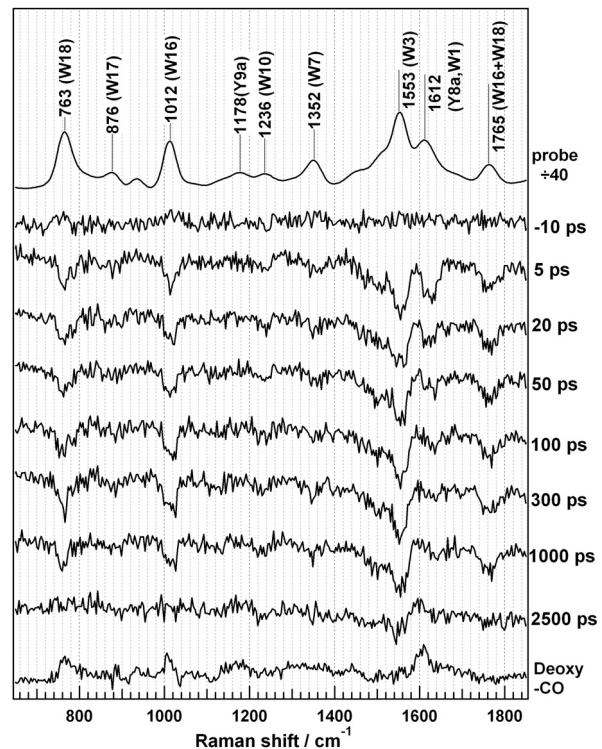


図2. CO光解離Mbの時間分解ラマン差スペクトル。最上段および最下段のスペクトルはそれぞれCO結合形Mbのスペクトルおよびデオキシ形MbとCO結合形Mbの間の差スペクトルを示す。