

## 2A08 ミオグロビンの構造ダイナミクスにおけるプロピオン酸基の効果

(<sup>1</sup>神戸大院・自然科学, <sup>2</sup>千葉大院・薬, <sup>3</sup>阪大院・理)  
○小山 舞<sup>1</sup>, 根矢 三郎<sup>2</sup>, 水谷 泰久<sup>3</sup>

**【序論】** ミオグロビン (Mb) のヘムの周辺には、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。ヘムの 2 本のプロピオン酸基も遠位側と近位側で周囲のアミノ酸残基と水素結合を形成し、このネットワークに関与している。このネットワークパターンは種を越えて保存されており、Mb の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。この役割を調べる上で有効な方法の一つは、水素結合を欠く Mb を調製し、天然のものと性質を比較することである。そこで本研究では、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、水素結合する側鎖がないエチオヘムを含む再構成 Mb(rMb)のダイナミクスを調べた。

**【実験】** rMb の調製には、根矢らの方法を用いた[1]。まず酸性条件下でヘムをはずし、アポ体を調製した。次に pH 6.5±0.2 の条件で、非天然ヘムを再構成し、精製した。時間分解共鳴ラマンスペクトル測定は、ポンププローブ法 (ポンプ波長: 532 nm または 540 nm、プローブ波長: 436 nm または 442 nm)を用いて行った。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。

**【結果と考察】** rMb について、デオキシ形の鉄-ヒスチジン伸縮振動 $v(\text{Fe-His})$ バンドと CO 結合形の鉄-CO 伸縮振動 $v(\text{Fe-CO})$ バンドの振動数は、天然 Mb(wtMb)と比べてほとんど差がみられなかった。このことは、CO 結合形、デオキシ形ともに、ヘム周辺の構造がプロピオン酸基の切断による影響を受けていないことを示唆している。rMb では、 $v(\text{Fe-His})$ バンドとメチン基のたてゆれ振動( $\gamma_7$ )バンドの二点において、CO 脱離に伴う時間変化がみられた。

**$v(\text{Fe-His})$ バンド**  $v(\text{Fe-His})$ バンドは、rMb では wtMb と同様にピコ秒領域で低波数シフトを示した[2]。しかし、wtMb は 1 ナノ秒でデオキシ形の振動数と一致したのに対して、rMb では両者は一致しなかった。6 位のプロピオン酸基を欠く非天然ヘムで再構成した Mb でも、CO 脱離後、 $v(\text{Fe-His})$ バンドは wtMb に比べて低波数シフトが遅いことが報告されており、本研究の結果と矛盾しない[3]。 $v(\text{Fe-His})$ バンドは、ヘム近位側のタンパク構造を敏感に反映することが知られている[4]。上記の結果は、rMb では wtMb に比べて近位側の構造変化が遅いことを示している。

**$\gamma_7$ バンド** 図 2 に、CO 結合形 rMb および wtMb の光解離に伴うナノ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。図には、比較のために、両者のデオキシ形のスペクトルを合わせて示している。ナノ秒領域において、rMb、wtMb とともに、 $\gamma_7$ バンドに強度変化が観測された。図 3 に、遅延時間に対してバンド強度をプロットしたものを示す。図では、デオキシ形のバンド強度との差として、各遅延時間におけるバンド強度をプロットしている。また、遅延時間 10 ns の強度で全

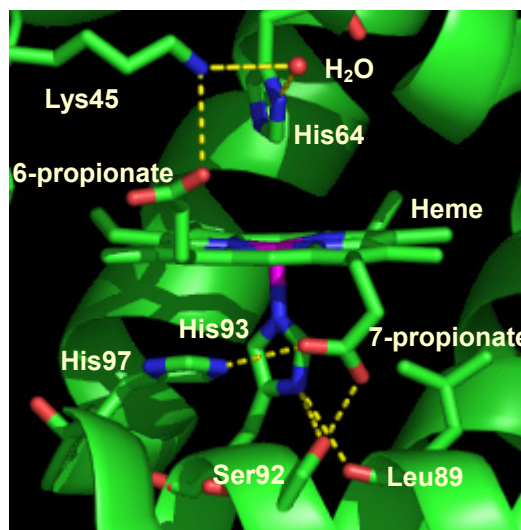


図1. ミオグロビンのヘム周辺構造と水素結合ネットワーク。破線は水素結合を表す。

体を規格化した。wtMb に比べ rMb では、 $\gamma_7$  バンドの強度は遅い時間変化を示した。 $\gamma_7$  バンドは、ヘムの面外振動に由来し、ヘムのドーミングの程度に敏感なバンドである。したがって、 $\gamma_7$  バンドの変化は、CO 脱離後、タンパク構造の変化によって、ヘムのドーミングの程度が変化することを意味する。rMb と wtMb とで、この変化の速度に差がみられたことは、このタンパク構造変化の速度がプロピオン酸基の有無によって影響を受けることを示している。

これらの結果は、CO 脱離後、ピコ秒、ナノ秒の時間領域で起こるヘム周辺のタンパク構造の変化が、ヘムとタンパク部分の水素結合を欠くことによって遅くなることを示唆している。

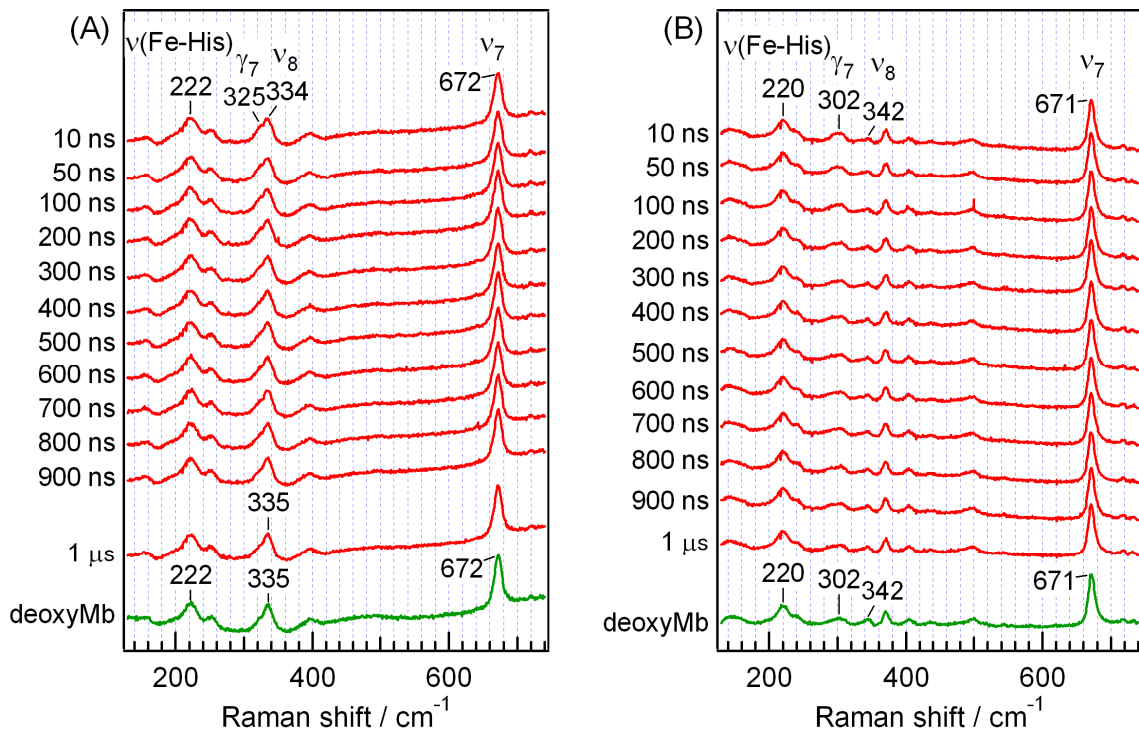


図 2. CO 結合形 rMb(A)および wtMb(B)の光解離に伴うナノ秒時間分解共鳴ラマンスペクトル。

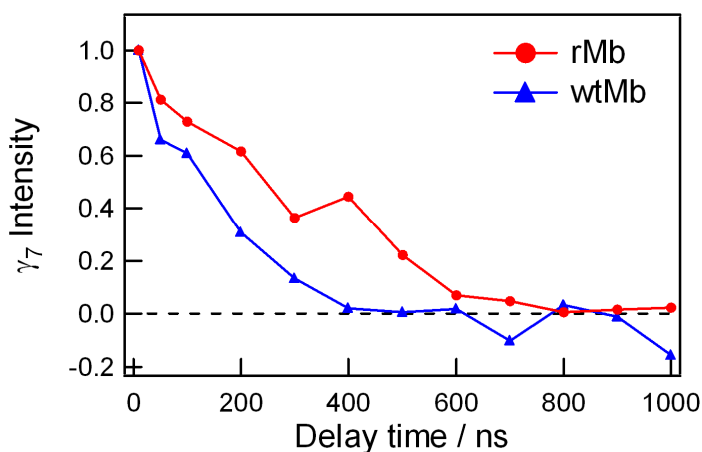


図 3. rMb および wtMb の CO 脱離に伴う  $\gamma_7$  バンドの強度変化。

【文献】

- [1] S. Neya, N. Funasaki and K. Imai, *Biochim. Biophys. Acta*, **996**, 226–232 (1989).
- [2] Y. Mizutani and T. Kitagawa, *J. Phys. Chem. B* **105**, 10992–10999 (2001).
- [3] 水谷ら, 2004 年分子構造総合討論会要旨集, 2A10.
- [4] T. Kitagawa, *In Biological Applications of Raman Spectroscopy* Vol. III, p 97 (1987).