

3P112 ゲル中にトラップしたヘモグロビンの構造ダイナミクス： アロステリックエフェクターの効果

(¹神戸大院自然科学、²阪大院理) ○稲垣厚志¹、水谷泰久²

【序】ヘモグロビン(Hb)は四量体のヘムタンパク質であり、それぞれのサブユニットがリガンド結合部位であるヘムを一つずつ持つ。リガンド脱着に伴ってヘムの構造が変化し、その変化がタンパク部分に伝わり三次構造および四次構造変化を起こす。生体内での酸素運搬においてHbはこのアロステリック機構によって酸素親和性を調節しているため、この機構を理解することは非常に重要である。Hbをシリカゲル中にトラップする手法[1]を用いると、四次構造を固定した上でのリガンド脱着に伴う構造ダイナミクスを観測することが可能になり、アロステリック機構に対する新しい知見が得られると期待される。本研究では、この手法を用いて、四次構造をRまたはTに固定したHbのCO解離に伴う構造ダイナミクスを時間分解共鳴ラマン(TR³)分光法によって調べた。またHbのサブユニット界面に結合してリガンド親和性を調節するアロステリックエフェクターが、その構造ダイナミクスに与える影響を調べた。

【実験】3種類のCO結合形Hb(HbCO)試料を調製した。それぞれ、HbCO溶液をゲル中に封じ込めたもの(R)、デオキシHb溶液をゲル中に封じ込め、その後COを結合させたもの(T)およびアロステリックエフェクターを結合させたデオキシHb溶液をゲル中に封じ込め、その後COを結合させたもの(T₊)である。ここで、T₊の調製に用いたアロステリックエフェクターはBZF、IHPおよびCl⁻である。これら3種類のHbCO試料についてナノ秒TR³スペクトル測定を行った。ポンプ光として波長532 nm、プローブ光として波長436 nmの光パルスを用い、CO光解離に伴うヘムおよびヘム周辺の構造変化を観測した。

【結果と考察】得られたナノ秒TR³スペクトルにおいて、220 cm⁻¹付近に観測される鉄-ヒスチジン伸縮振動[ν(Fe-His)]バンドの振動数は、Hbの四次構造を反映することが知られている[2]。Rのν(Fe-His)バンドの振動数は溶液中におけるR状態のデオキシHbの値に近く[3]、TおよびT₊のν(Fe-His)バンドの振動数は溶液中におけるT状態のデオキシHbの値に近かった。これらの結果はHbの四次構造がシリカゲルによって正しく固定されていることを示している。

図1は、遅延時間に対するν₈バンドの強度変化を表したものである。縦軸はそれぞれのTR³スペクトルにおけるν₇バンドの強度を基準としたν₈バンドの強度である。Rの場合と比較して、TおよびT₊のν₈バンドは高い強度をもっていた。Tおよび

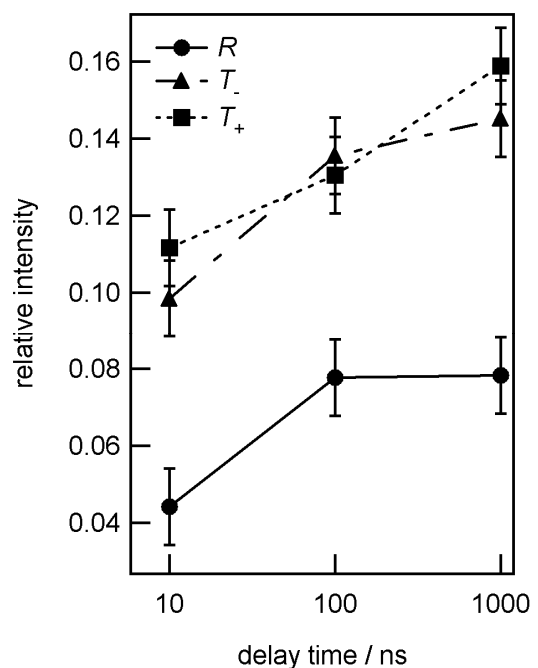


図1 Hbのν₈バンドの強度変化

び T_4 の ν_8 バンドの強度増大の挙動は似ているので、四次構造の違いが ν_8 バンドの強度増大の挙動の違いをもたらす要因であると考えられる。ここで R と T および T_4 との間に違いが生じる原因について考察する。溶液中において、 R 状態の HbCO は CO 光解離後、数十ナノ秒から数マイクロ秒にかけて三次構造変化を起こし、数十マイクロ秒以降に四次構造変化を起こし T 状態のデオキシ Hb となり構造変化が完了する[4]。この過程で ν_8 バンドの強度が増大することが知られている。よって T 状態のデオキシ Hb に近い構造をもつ過渡種ほど、 ν_8 バンドの強度が大きいと考えられる。 R は CO 光解離後、溶液中の R 状態の HbCO と同様の三次構造変化を経て四次構造変化が起こる前の段階、すなわち R 状態のデオキシ Hb の段階で構造変化がストップする。一方で T および T_4 の CO 光解離直後の構造はすでに T 状態のデオキシ Hb に近く、 R の場合と比較して CO 光解離後の構造変化が小さいと考えられる。したがって T および T_4 は R と比較して、 CO 光解離直後においてすでに ν_8 バンドの強度が大きいたことが予想される。このことは実験結果をうまく説明する。

次に、得られた結果を TTS モデル[5]に基づいて考察する。TTS モデルは個々のサブユニットが高親和性の r または低親和性の t のいずれかの三次構造をとると仮定するモデルであり、四次構造が R であればサブユニットは r に平衡が偏り、 T であればサブユニットは t に平衡が偏る。またこのモデルにおいてアロステリックエフェクターは t を安定化する。このモデルによれば、 T_4 ではすべてのサブユニットが t 状態をとるのに対し T ではいくらかのサブユニットが r 状態をとる。実際に、Viappiani らは、今回の測定で用いた試料と同様のものを用いて光解離に伴う CO 再結合速度を測定し、 T および T_4 の CO ジェミネート再結合速度に差があるということを見出した[6]。 CO ジェミネート再結合速度はヘムの構造およびヘムの遠位側の構造を反映することが知られている[7]。ところが、今回の測定で得られた T および T_4 のヘム領域のナノ秒 TR^3 スペクトルには大きな差は見られなかった。TTS モデルが妥当であるとする、これらの実験結果は r と t の構造的な差異はヘムにあるのではなく、ヘムの遠位側にあることを示唆している。

ヘムの遠位側の構造を調べるために、 T および T_4 の定常状態の共鳴ラマンスペクトルを測定した。得られたラマンスペクトルにおける、鉄- CO 伸縮振動バンドおよび C-O 伸縮振動バンドの振動数は両者でほぼ一致した。鉄- CO 伸縮振動バンドおよび C-O 伸縮振動バンドの振動数はヘムの遠位側の構造を反映することが知られている。このことより、 CO 結合形の r および t のヘムの遠位側構造は似ているということが明らかになった。以上の実験事実は、 CO 光解離後において r と t の遠位側構造に差が現れるということを示唆している。

参考文献

- [1] N. Shibayama and S. Saigo, *J. Mol. Biol.* **251**, 203-209 (1995)
- [2] T. Kitagawa, *In Biological Applications of Raman Spectroscopy* Vol. III, p 97 (1987)
- [3] K. Nagai, T. Kitagawa, H. Morimoto, *J. Mol. Biol.* **136**, 271-289 (1980)
- [4] G. Balakrishnan *et al.*, *J. Mol. Biol.* **340**, 843-856 (2004)
- [5] E. R. Henry, S. Bettati, J. Hofrichter, W. A. Eaton, *Biophys. Chem.* **98**, 149-164 (2002)
- [6] C. Viappiani *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14414-14419 (2004)
- [7] E. E. Scott and Q. H. Gibson, *Biochemistry* **36**, 11909-11917 (1997)