

タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御

研究者 水谷 泰久
神戸大学

概要

高感度の時間分解振動分光システムを製作し、タンパク質機能に関係した構造揺らぎを検出する手法を確立した。揺らぎと反応との速度論的な相関について注目し、タンパク質構造が反応性に及ぼす効果を動的側面から明らかにした。

はじめに

タンパク質は、時間平均で見ればある安定な立体構造をとっており、その構造は X 線結晶構造解析によって精密に求められる。タンパク質の立体構造は、最安定構造を中心に多くの準安定構造を持っていて、これらは、conformational substate (cs) とよばれる^{1,2}。これら準安定構造間のエネルギー障壁は、熱エネルギー程度であるので、室温溶液中においては、cs 間で遷移が起きる。これが、タンパク質の構造揺らぎである。タンパク質の立体構造は安定性と柔軟性を併せ持つことに特徴があり、平均的にはある立体構造を保ちつつも、その周辺で揺らぐことがタンパク質の機能発現に重要な役割を果たす。構造揺らぎの機能発現における役割を深く理解するには、cs 間の構造不均一性と反応速度の不均一性（機能における不均一性）との関係を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、タンパク質機能に関係した構造揺らぎを検出する手法を開発し、これをヘムタンパク質の構造ダイナミクス研究に適用した。

速度論的ホールバーニングのラマン検出

速度論的ホールバーニング (KHB) 法は、反応に伴い観測される、cs ごとの反応速度の不均一性に由来するスペクトルバンド形変化を調べるものである。cs の構造不均一性はバンドの不均一広がりとして反映される。タンパク質の反応速度に不均一性が生じるとすると、不均一広がりをもつスペクトルバンドは、反応に伴い形を変えながら減少（あるいは増加）する。したがって、バンド形時間変化の解析から、バンドの不均一広がりの原因となる cs 分布が反応速度に不均一性を生んでいるかどうかを区別することが可能である。KHB 法は、構造不均一性と反応速度の不均一性との関係を高い時間分解法で調べることができる。しかし一方で、実験データの解析においては微小なスペクトル変化を捉えねばならず、定量的な解析に耐えうるには、S/N 比のきわめて高いスペクトルデータが必要になる。

KHB の検出には、検出感度の問題から、これまでタンパク質中に含まれる色素の紫外可視吸収^{3,4}が用いられてきた。しかし、これらのスペクトルでみられる不均一広がりが構造上のどのような違いに由来するかは自明ではない。そこで、われわれは KHB のラマン分光法による検出を行った。ラマン検出は、紫外可視吸収、蛍光による検出に比べ感度は劣るものの、分子振動の振動数が化学結合レベル

のより細かな構造情報を与える点で有利である。また振動スペクトルでは、バンドの不均一広がりとの構造の不均一分布との関係付けが明確である。例えば伸縮振動においては、 ν_{cs} の分布を、着目している化学結合の強さに関してスペクトル上で展開していることになる。

高感度ラマン分光装置の開発

KHB のラマン検出には通常の時間分解共鳴ラマン測定と同様にポンプパルス（反応開始用パルス）とプローブパルス（ラマン測定用）の 2 種類のパルス光を用いる。測定の時間分解能および振動数分解能は実質的にはこれらパルス光のパルス幅およびスペクトル幅によって決まる。KHB のラマン検出においては、構造の不均一性と機能の不均一性との関係を、ラマンバンド形変化を通して検出するわけであるから、時間分解能と振動数分解能の両面について高い分解能が必要になる。また共鳴ラマン効果を最大限に活かすことができるようプローブパルスの波長可変性も重要である。さらに、微弱光であるラマン散乱を検出し、その微小なスペクトル変化を検出するためには、高感度の検出系が必要である。われわれはこれまでに高い分解能と波長可変性をもったピコ秒時間分解共鳴ラマン分光装置を開発してきた^{5,6}が、KHB のラマン検出に向けさらに波長変換システムの安定化、検出系の高感度化などを行った。その結果、波長変換システムについては、出力が 35~40% 向上し、パルス間の強度揺らぎが 10% から 7% に改善された。また、検出器に低雑音の液体窒素冷却型 CCD 検出器を用いることにより、検出感度を約 2 倍向上させた。このほか、測定試料を安定な状態に長時間保つための、機密性の高い回転セルの設計・製作、参照スペクトルの同時測定が可能な光学系の製作を行い、測定精度を向上させた。以上の装置上の改良を行うことによって、測定時間を従来の 1/4~1/5 に短縮することができた。これは単に測定時間を短縮化するというだけでなく、同程度の S/N 比を得るために必要な試料の量を減らすことにより、大量調製の困難な試料に対しても測定を可能にするというメリットを生んでいる。実際に、これによって、従来の性能では測定が不可能であった変異体試料についても、必要な S/N 比をもったスペクトルの測定が可能になった。

ミオグロビン、ヘモグロビンについての、機能に関係した構造揺らぎの観測

KHB 法を用いて、ミオグロビン (Mb)、ヘモグロビン (Hb) のリガンド結合過程に関係する構造揺らぎを調べた。Mb、Hb において、ヘムの軸配位座にはヒスチジンのイミダゾール環が配位している。そのトランス位に CO、NO、O₂ といった二原子分子（リガンド）が結合する。ヘム平面からの鉄原子の変位には、相当な不均一性があることが、いくつかの実験^{7,8}および分子動力学計算⁹から示唆されており、これがリガンド結合反応の反応速度不均一性を生んでいる可能性がある。つまり、鉄原子の変位が大きいほどリガンドは結合しにくいと、変位の大きさに不均一分布があれば、それは結合速度の不均一性となって現れてくるであろう。そこでわれわれは、変位に関係する分子振動として、鉄-ヒスチジン伸縮振動 [$\nu(\text{Fe-His})$] バンドに着目した。

図 1 に NO 結合形 Mb の光解離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。これらのスペクトルは、解離形の寄与のみを差計算によって取り出したものである。共鳴効果によってヘムの振動バンドが選択的に現れていて、注目する $\nu(\text{Fe-His})$ ラマンバンドは 220 cm⁻¹ 付近に観測されている。スペクトル (A)、

(B) はそれぞれ、2 ピコ秒、3 ピコ秒での時間分解共鳴ラマンスペクトルである。スペクトル (C) は、これらの間の差をとったもので、再結合によって解離形の量が減ったために、その分が差となってあらわれている。すなわちこれは2 ピコ秒から3 ピコ秒の間に再結合した成分の寄与を表している。

(A)、(B)と比較してみると、(C)では $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数が 4 cm^{-1} 高波数側にシフトしていることがわかった。このような振動数シフトは、他に見られるヘム骨格に由来するラマンバンドには全く観測されなかった。この再結合成分の $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数 226 cm^{-1} が、解離形全体の平均値である 222 cm^{-1} と異なるということは、2 ピコ秒と3 ピコ秒との間に再結合した成分（全体のうち約 6%）は集団平均より高い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数を持っていることを意味している。重要なのは、スペクトル

(A)と(B)で $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数に見かけ上変化はみられないという点である。したがって、2 ピコ秒と3 ピコ秒との間に解離形の構造に構造緩和は起きていない。以上の理由から、この $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数のずれを cs の不均一分布によるものと解釈した。これと同じ要領で、他の時刻での時間差スペクトルを求めたものが図2である。上に述べたように、2 ピコ秒から3 ピコ秒の間の再結合成分は、 4 cm^{-1} 高波数側に現れたが、バンドの位置は時間とともに低波数側へとシフトしていき、10 ピコ

秒から11 ピコ秒の時間差スペクトルでは、バンドの位置は集団平均のものとはほぼ一致した。 $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの幅は他のバンドに比べて広く、鉄原子の変位分布を反映して不均一広がりの方が大きいと考えられる。そのような不均一分布のうち、速い時間帯に再結合する成分ほど高い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数を持っているということをこの結果は示している。さらに、時間差スペクトルでのバンド位置がどのように時間とともにシフトしていくという実験事実は、構造揺らぎの速度とリガンド再結合速度は同程度で、再結合の時間スケールでは cs の分布は平均化されていないということを意味している。

Hbについても、NOの再結合過程において、再結合する cs の振動数が時間とともに低下していく様子が観測された。したがって、この不均一な構造分布と再結合の速度分布との相関は、MbとHbに共通する性質であると考えられる。次に、Hbを構成する α 鎖、 β 鎖の一方のみを選択的にニッケル置換したハイブリッドHbを作成し、四量体内での α 鎖と β 鎖の構造揺らぎを選択的に観測した。 α 鎖、 β 鎖の

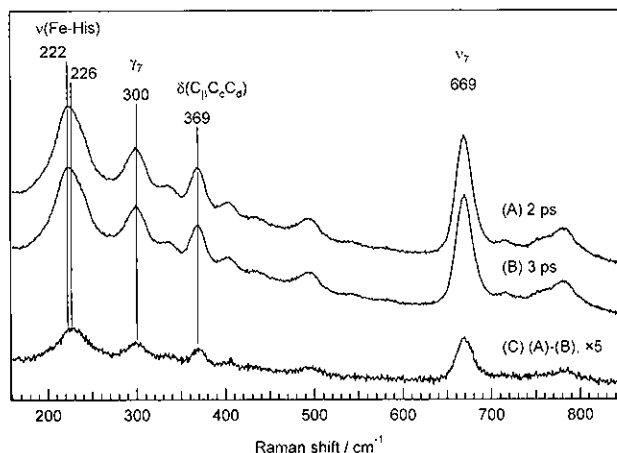


図1. NO再結合に伴うMbのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトル

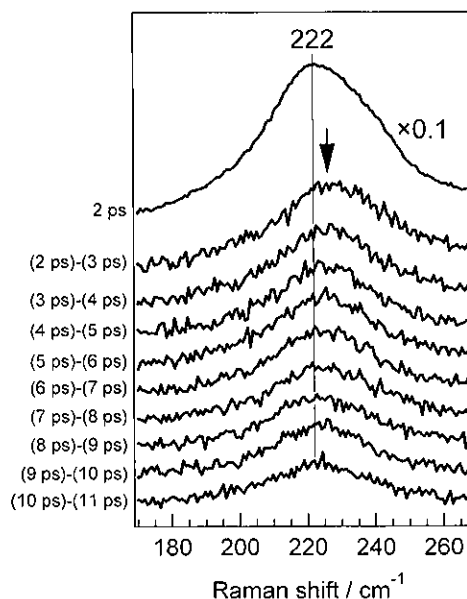


図2. NO再結合に伴う時間差スペクトル： $\nu(\text{Fe-His})$ バンドの時間変化

間には揺らぎに差はみられなかったことから、Hb について観測された不均一性は、Hb が 2 種類のサブユニットから構成されているというところからくる不均一性ではなく、サブユニット自身もっている不均一性によるものであることがわかった。さらに、pH およびアロステリックエフェクターの濃度を制御し、四次構造が異なる状態で構造揺らぎを観測した。その結果、四次構造の違いによって揺らぎの大きさあるいは速度が異なることを新たに見出した。これは、サブユニット間相互作用が、Fe-His 結合に、平均構造の側面だけでなく、揺らぎの側面においても影響を与えていることを示している。

Mb、Hb について観測された結果を理解するために、反応座標と構造揺らぎの座標をもつ 2 次元ポテンシャル上での拡散モデルをたて、この計算結果を、観測されたバンド形変化の結果と比較した。モデルのパラメータとして、反応速度定数の分布を実験的に観測された不均一広がりから評価し、揺らぎの時定数と反応速度の時定数を等しく（ともに 10 ピコ秒）設定した。この拡散モデルによって、バンドの時間変化をほぼ定量的に説明することができた。NO 結合のキネティクスは非指数関数的振る舞いを示すことが知られており、これはヘムポケットにおける構造不均一性によるものと考えられている。本研究の結果は、Fe-His 結合がそのような構造不均一性に大きく寄与していること、揺らぎによって反応速度の高い cs に遷移することがリガンド結合の重要な経路になっていることを示している。

まとめ

揺らぎが機能発現に重要であるということは、概念としては理解されていても、個々のタンパク質において具体的にははっきりしていない。揺らぎの役割を明らかにするためには、機能の不均一性と構造不均一性を速度論的に具体的に関係付けることが重要である。本研究では、反応に伴うバンド形変化を詳細に調べることで、反応に関係する構造揺らぎとその不均一性の要因を明確にすることができた。

引用文献

1. Austin, R. H.; Beeson, K. W.; Eisenstein, L.; Frauenfelder, H.; Gunsalus, I. C. *Biochemistry* **1975**, *14*, 5355-73.
2. Ansari, A.; Berendzen, J.; Bowne, S. F.; Frauenfelder, H.; Iben, I. E.; Sauke, T. B.; Shyamsunder, E.; Young, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5000-4.
3. Campbell, B. F.; Chance, M. R.; Friedman, J. M. *Science* **1987**, *238*, 373-6.
4. Huang, J.; Ridsdale, A.; Wang, J.; Friedman, J. M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14353-65.
5. Uesugi, Y.; Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, *68*, 4001-4008.
6. Mizutani, Y.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 10992-10999.
7. Parak, F.; Knapp, E. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7088-92.
8. Srajer, V.; Reinisch, L.; Champion, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6656-6670.
9. Nadler, W.; Brunger, A. T.; Schulten, K.; Karplus, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7933-7.