

時間分解共鳴ラマン分光法を用いたヘモグロビンの 高次構造ダイナミクス研究

山田健太¹, 石川春人¹, 水野操¹, 水谷泰久¹

阪大院理¹

【序論】 ヒトヘモグロビン (Hb) は赤血球内に含まれる酸素運搬体タンパク質であり、2種類のサブユニット α 鎖と β 鎖が2つずつ会合した四量体構造をとっている。酸素運搬に重要なHbの性質として、協同的酸素親和性がある。その仕組みは、「Hbには親和性の異なる2種類の四次構造があり、酸素分圧に応じて両者の間を遷移する」というモデルで理解されている。酸素結合数に応じてタンパク質の構造がどのように変化するかを明らかにすることは、Hbの協同性発現機構を理解する上で非常に重要である。われわれは、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、Hbの構造ダイナミクスを調べた。ここでは、 α 鎖および β 鎖の単離鎖の構造ダイナミクスに関する研究成果、 α 鎖と β 鎖を分光学的および機能的に区別した金属置換混成Hbの構造ダイナミクスに関する研究成果を報告する。

【実験】 組換えヘモグロビンは大腸菌中で発現したものを精製して得た。これに、*p*-クロロ水銀安息香酸を用いて単離鎖を調製した。また、単離 β 鎖を塩酸アセトン法によってヘムを抜き、単離 α 鎖と混成した後、Niヘムを滴下し、イオン交換カラムで精製することによって、 $\alpha\text{Fe}\beta\text{Ni}$ 混成Hbを調製した。単離鎖の測定では波長532 nmのポンプ光と波長436 nmのプローブ光を、金属置換混成Hbの測定では波長532 nmのポンプ光と波長418 nmおよび436 nmのプローブ光を用いて、一酸化炭素 (CO) 脱離に伴う時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定した。

【単離鎖の構造ダイナミクスに関する研究】 協同性を示すHb四量体と協同性を示さない単離鎖での構造変化の違いを解明することは協同性発現機構を考える上で重要である。単離 α 鎖、単離 β 鎖ともに、CO脱離した過渡種のスペクトルには、ヘム由来のラマンバンドの波数および強度の変化が観測された。それぞれのラマンバンドを指数関数でフィッティングした結果、いずれのバンドについても、 α 鎖は β 鎖に比べてスペクトル変化が速いことがわかった。これは、 α 鎖は β 鎖に比べてCO脱離に伴うヘムおよびヘム周辺の構造変化が速いことを示唆する。また、Hb四量体と比較すると、いずれのバンドについても、四量体は単離鎖に比べてスペクトル変化が速かった。これは、サブユニット間の相互作用がヘムポケットの構造変化の速度に影響を与えることを示唆する。このことは、サブユニット間の相互作用がヘムに対する張力の変化を引き起こすと仮定しているPerutzモデルと一致している。

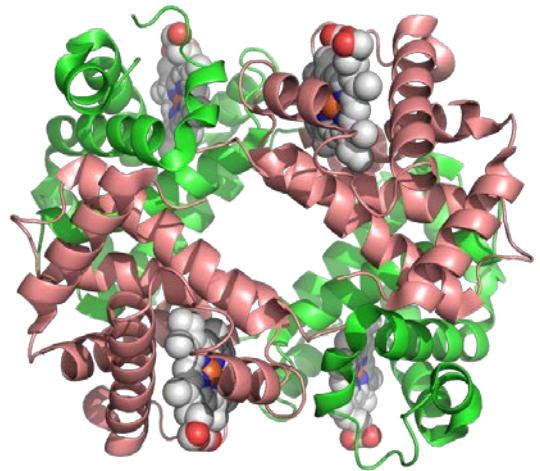


図1. ヒト成人ヘモグロビンの立体構造。ヒト成人ヘモグロビンは α 鎖（オレンジ色）と β 鎖（緑色）の2種類のサブユニットから構成されている。

【金属置換混成 Hb の構造ダイナミクスに関する研究】 サブユニット間を伝播する構造変化を追跡するために、 β サブユニットのヘムを Ni ヘムに置換した混成 Hb ($\alpha\text{Fe}\beta\text{Ni}$ 混成 Hb) の構造ダイナミクスを調べた。波長 436 nm のプローブ光を用いることで、 $\alpha\text{Fe}\beta\text{Ni}$ 混成 Hb 中の αFe ヘムに由来するラマンバンドを、また波長 418 nm のプローブ光を用いることで、 βNi ヘムに由来するラマンバンドを選択的に観測することに成功した。CO 脱離後の過渡種のスペクトルには、 αFe ヘム由来のバンドおよび βNi ヘム由来のラマンバンドともに波数の変化が観測された。 αFe ヘム由来のバンドの変化は、その時定数が、金属置換をしていない Hb から得られた時定数と一致した。これは、金属置換が Hb の構造ダイナミクスに影響を与えていないことを示している。また、 βNi ヘムに由来するラマンバンドの変化は、時定数を約 20 μs とする単一の指数関数でよくフィットできることがわかった。得られた時定数から、 αFe ヘムで CO 脱離後に起きた構造変化がサブユニット界面を介して βNi ヘムに数十マイクロ秒で伝播することが示唆された。過去の研究で、Hb のサブユニット界面には 2 つの成分（時定数 2 μs および 20 μs ）の変化があることが報告されており、 βNi ヘムの構造変化はサブユニット界面の変化とほぼ同期して起きていると考えられる。この研究は、ひとつのサブユニットから界面を介して伝わる隣接するサブユニットの構造変化を観測した最初の例である。

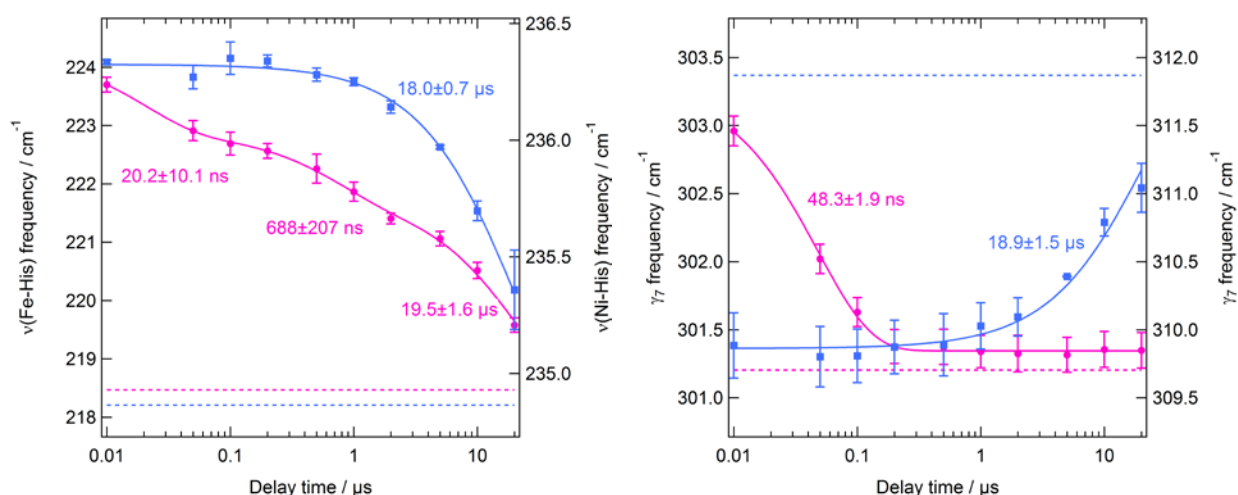


図 2. $\alpha\text{Fe}\beta\text{Ni}$ 混成 Hb のリガンド脱離に伴う波数シフト。左は鉄-ヒスチジン伸縮振動バンドおよびニッケル-ヒスチジン伸縮振動バンド、右はヘムの面外振動のひとつである γ_7 バンドの結果を示す。桃色は αFe ヘム、青色は βNi ヘムの値である。指数関数へのカーブフィッティングによって得られた時定数を図中に示す。破線はデオキシ形（定常状態においてリガンドが結合していない状態）の値である。

【参考文献】 (1) Yamada, K.; Ishikawa, H.; Mizutani, Y. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 1992-1998.

酸素センサータンパク質 FixL のリガンドに依存した

構造変化の観測

矢野真司¹, 山脇竹生¹, 石川春人¹, 水野操¹, 中村寛夫², 城宜嗣², 水谷泰久¹

阪大院理¹, 理研・城生体金属科学²

【序論】 FixL は、酸素濃度に応じてキナーゼ活性を制御するセンサーキナーゼであり、転写調節因子 FixJ とともに窒素固定関連遺伝子の発現制御を行っている。FixL はセンサードメインとキナーゼドメインからなり、センサードメインにガス分子結合部位としてヘムを含む。酸素の脱着に応じてセンサードメインが構造変化し、その変化が触媒ドメインへと伝搬し、キナーゼ活性を変化させる。すなわち、酸素が脱離した状態ではキナーゼ活性をもつものに対し、酸素が結合した状態ではキナーゼ活性が大きく抑制されている。キナーゼ活性抑制の度合いは他のガス分子と比較して酸素で特に顕著であり、このことは FixL が酸素結合に対して特異的な構造変化を示すことを意味している。本研究では紫外共鳴ラマン分光法を用いて、FixL のタンパク質構造を調べた。その結果、ガス分子に依存したタンパク質の構造変化を見出した。また、時間分解スペクトルデータに基づいて、その変化の速度を求めた。

【実験】 スペクトル測定は FixL のセンサードメインについて行った。その野生型および変異体の試料は大腸菌を利用して発現させ、カラムクロマトグラフィーによって精製した。定常状態紫外共鳴ラマン分光測定はプローブ光波長 225 nm で行った。ナノ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光測定はポンプ-プローブ法によって行い、ポンプ光に波長 532 nm、プローブ光に波長 225 nm のパルス光を用いた。

【結果・考察】 リガンド脱離に伴うセンサードメインの構造変化を明らかにするために、センサードメイン試料についてスペクトル測定を行った。図 1 は FixL センサードメインのデオキシ形（定常状態においてリガンドが結合していない状態）、酸素結合形（オキシ形）、一酸化炭素（CO）結合形の、それぞれの定常状態紫外共鳴ラマン分光測定を比較したものである。デオキシ形とオキシ形、デオキシ形と CO 結合形、それぞれの差スペクトルから、1610 cm^{-1} 付近に観測される、チロシン残基に由来する Y8a バンドの強度が、オキシ形のみ他の 2 種よりも強くなっていることがわかる。これは酸素結合に特異的な構造変化を反映していると考えられる。そこで、スペクトル変化に寄与しているチロシン残基を特定するために、ヘム近傍に存在するチロシン残基を置換した 3 種の変異体 Y190F、Y197F、Y201F を作製し、同様の測定を行った。その結果、Y201F 変異体でのみ、WT で見られた強度変化が見られなかった。この結果に基づき、Y201 がスペクトル変化の原因であり、酸素結合に特異的に構造変化していると帰属した。この結果は結晶構造に見られるアミノ酸残基の配向変化とも矛盾しない。次に、時間分解紫外共鳴ラマン分光測定によって、Y201 由来のラマンバンドの時間変化を観測した。その結果を図 2 に示す。時間分解スペクトルには、Y8a

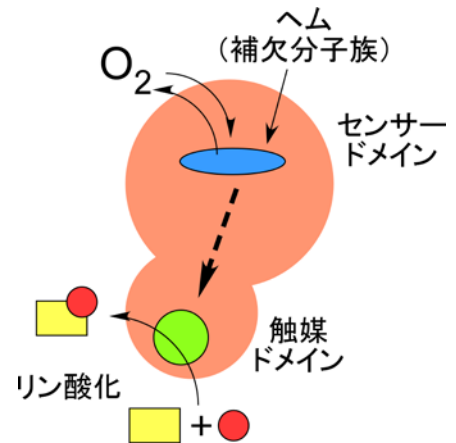


図 1. 酸素センサータンパク質 FixL の作動機構

バンドに強度変化が観測された。その変化を解析したところ、強度変化はサブマイクロ秒の時定数で起きることがわかった。この結果は、酸素脱離後Y201 周辺にサブマイクロ秒の時定数で変化が起きることを示している。また、酸素の認識とキナーゼ活性抑制に重要な役割を果たしているアミノ酸残基R214 を置換した変異体R214Aを作製した。この変異体はキナーゼ活性抑制不能となることが明らかになっている。R214AについてWTと同様の測定を行うことによって、R214 の構造変化と、Y201 の構造変化の関連について考察した。

次に、触媒ドメインの構造変化を明らかにするために、全長タンパク質試料についてスペクトル測定を行った。野生型と変異体のスペクトルの比較から、全長タンパク質においても、酸素脱離に伴って Y201 周辺に構造変化が起きることがわかった。さらに、触媒ドメインに含まれる 3 個のチロシン残基にもスペクトル変化が観測され、ヘムから酸素が脱離するのに伴って、触媒ドメインにも構造変化が起きることが具体的に示された。現在全長タンパク質の結晶構造解析はなされておらず、触媒ドメインに関する立体構造情報が乏しいため、この知見は極めて重要である。今後は全長タンパク質に対しても、リガンド脱離に伴う時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを測定し、触媒ドメインの構造変化がどのように起きるのかを調べる予定である。

【参考文献】 (1) Hiruma, Y. Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y. *Biochemistry* **2007**, 46, 6086-6096.
(2) Yoshida, Y.; Ishikawa, H.; Aono, S.; Mizutani Y.; *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* **2012**, 1824, 866-872.

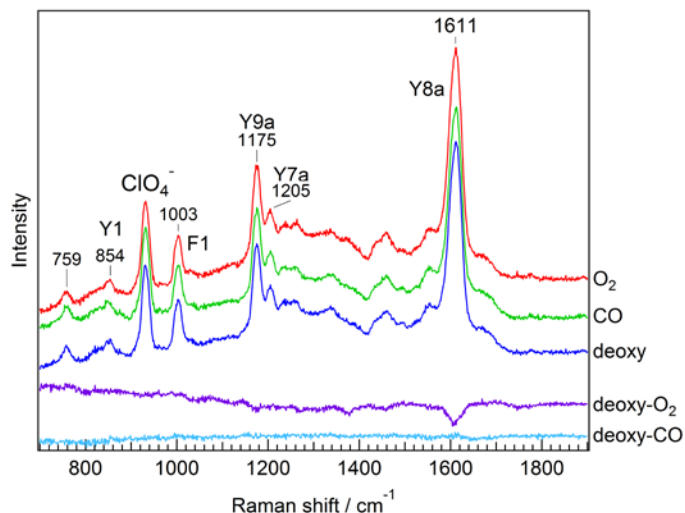


図2. FixL のオキシ形、CO 結合形、デオキシ形の紫外共鳴ラマンスペクトル。リガンド結合に伴うスペクトル変化を、差スペクトルの形で下に示している。

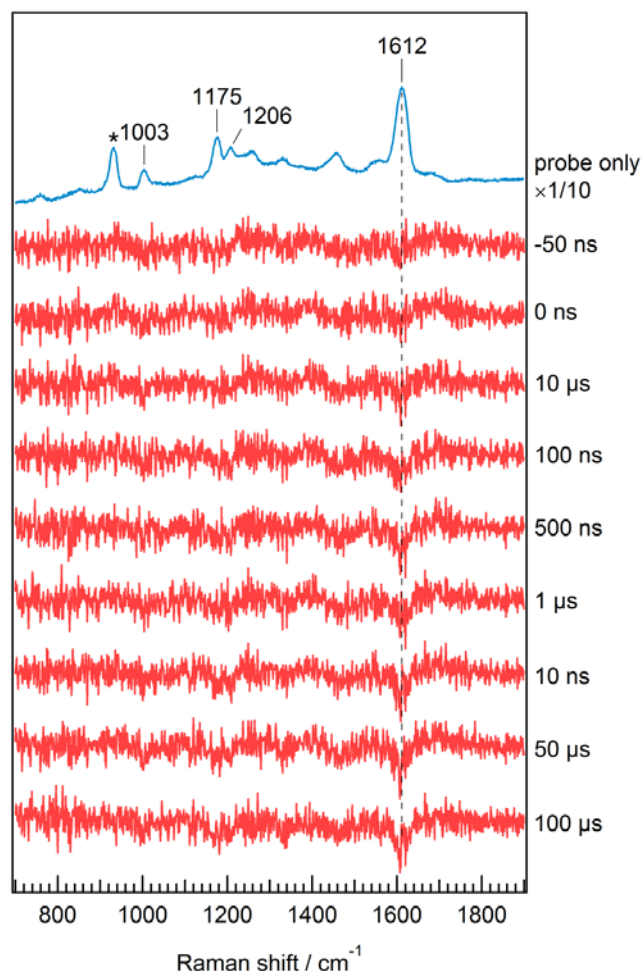


図3. FixL の酸素脱離に伴う時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。