

# 時間分解振動分光法によるタンパク質のダイナミクス解析

水谷泰久

## Protein Dynamics Revealed by Time-Resolved Vibrational Spectroscopy

Yasuhisa MIZUTANI

In numerous biological processes, the ensuing protein structural changes accompanying a reaction at a specific site must spatially extend to the mesoscopic dimensions of the protein to achieve a biological function. The molecular mechanism of cooperativity in oxygen binding of hemoglobin is one of the classical problems in this aspect. Resonance Raman spectroscopy is a powerful tool for studying the structure of the ligand binding site (heme) of the hemeproteins and their protein moiety; therefore, time-resolved resonance Raman spectroscopy enables us to observe the structural changes occurring in the functioning protein. This review describes our recent works on protein dynamics of hemoglobin and myoglobin by using time-resolved resonance Raman spectroscopy.

**Key words:** protein dynamics, resonance Raman spectroscopy, time-resolved spectroscopy, heme-protein

タンパク質はその高次構造を巧みに変化させ機能している。その典型的な例がヘモグロビン (Hb) の協同的酸素親和性である<sup>1,2)</sup>。Hb は血球中で酸素 (O<sub>2</sub>) 運搬を行うタンパク質で、4 個のサブユニットからなる四量体タンパク質である (図 1 (A))。各サブユニットには酸素結合部位であるヘムが 1 分子ずつ含まれている。したがって、Hb 1 分子には最大 4 分子の O<sub>2</sub> が結合する。Hb は、酸素親和性の高い R 構造と酸素親和性の低い T 構造という 2 種類の四次構造をもつ。結合数が少ないときには T 構造が、結合数が多いときには R 構造が安定である。したがって、O<sub>2</sub> 結合数の増加に伴って酸素親和性に協同性が生まれる。すなわち、タンパク質の構造変化が Hb の機能を生み出しているのである。興味深い点は、この高次構造変化が、高々数本の共有結合の生成/切断という O<sub>2</sub> 結合部位での局所的な変化によって引き起こされているという点である。この局所的な変化から四次構造変化という大域的な変化へ至る構造変化の様子をみる事ができれば、Hb の働くしくみについて理解が大きく深まるに違いない。このよ

うな興味から、筆者らは、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて Hb の高次構造変化について研究を行っている。また、比較のため、ミオグロビン (Mb) という関連するヘムタンパク質についても研究を行っている。Mb は筋肉中で O<sub>2</sub> 貯蔵を行う単量体タンパク質で、Hb サブユニットに構造がよく似ている (図 1 (B))。このため、Hb 研究において、Mb は参照系としてしばしば用いられる。本稿では、これらのタンパク質の構造ダイナミクスについて最近の研究成果をまとめる。

### 1. Hb, Mb におけるヘムのリガンド結合/脱離

Hb, Mb ともに O<sub>2</sub> 結合部位として、ヘム (図 1 (C)) とよばれる鉄ポルフィリン錯体の一種をポリペプチド鎖中に含んでいる。ヘムおよびその軸配位子の構造を図 1 (D) および (E) に示す。鉄の軸配位座にはヒスチジン (近位ヒスチジンとよぶ) のイミダゾール環が配位している。そのトランス位に O<sub>2</sub>、一酸化炭素 (CO)、一酸化窒素 (NO) といった二原子分子が結合する。ヘムが可視光を吸収する

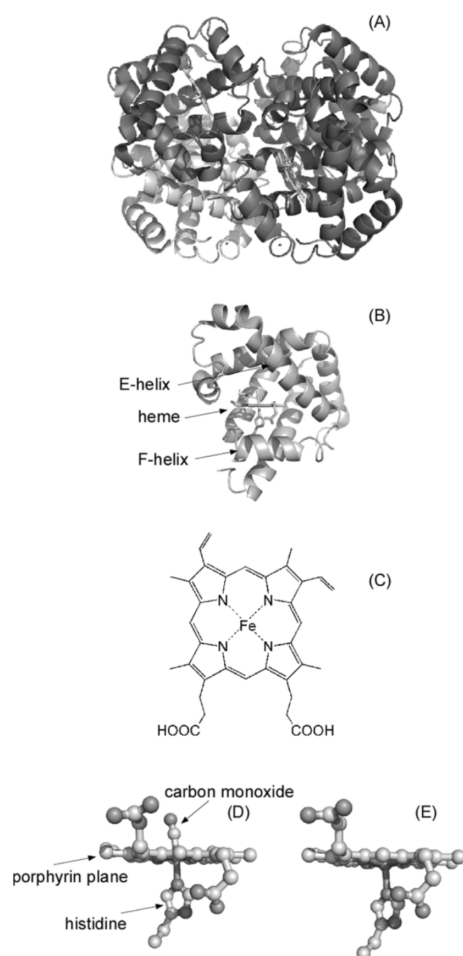


図1 ヘモグロビンおよびミオグロビンの立体構造とリガンド結合部位（ヘム）への軸配位子の結合様式。(A) ヘモグロビンの立体構造 (PDB ID code 2HHB), (B) ミオグロビンの立体構造 (PDB ID code 1BZR), (C) ヘムの分子構造, (D) タンパク質中でのリガンド結合形ヘム。ヘムの鉄イオンには近位ヒスチジンとリガンドが結合している。(E) タンパク質中でのデオキシ形ヘム。ヘムの鉄イオンはヘム平面からはずれ近位ヒスチジン側へ変位している。また、ヘムの平面性も崩れドーム形へ変形している。図はPyMOL (pymol.sourceforge.net) を用いて作成した。

とこれら二原子分子は解離するので、この光反応を利用して、 $O_2$  結合部位からリガンドが脱離する際にタンパク質がどのように応答するかを調べることができる<sup>3)</sup>。リガンドの光解離は数百フェムト秒以下と非常に速く起こるため、これを構造変化のスタートトリガーとして利用できる。リガンド結合状態では鉄はポルフィリン面にあるが、リガンドがはずれた状態（デオキシ形）では鉄がポルフィリン面より近位ヒスチジン側に約  $0.3 \text{ \AA}$  出ている、ポルフィリン面がドーム形に変形していることがX線結晶解析より報告されている<sup>4)</sup>。鉄イオンはリガンド結合形では低スピン状態、デオキシ型では高スピン状態をとっており、このスピン状態の変化が上記の構造変化の原因であ

る。リガンド脱着に伴うこのようなヘムの変形と鉄原子の変位は、タンパク質構造の変化を誘起する。これがHbにおいて四次構造変化を引き起こす最初の動きであると考えられている。

## 2. 時間分解共鳴ラマン分光法

### 2.1 共鳴ラマン分光法

共鳴効果は、他の振動分光法にはないラマン分光法の最も大きな特徴である。この効果を利用すると、ラマン散乱の励起波長を分子の電子吸収帯に合わせることによって高感度のラマン測定が可能になる。振動分光法は化学結合レベルで分子構造に関する情報を得る手法であり、特に分子の化学結合の変化を大変敏感に検出できる。しかし、タンパク質のような大きな分子を対象とする場合、観測される振動モードは非常に多くなり、必要な情報を選別して得るのは容易ではない。共鳴ラマン分光法はこの問題を解決してくれる。それは、共鳴ラマン効果によって高感度な観測ができるばかりでなく、特定部位に関する振動バンド強度が選択的に強くなるからである。このため、共鳴ラマン分光法は、多くの色素タンパク質の構造化学研究に適用されてきた。この特色の利用を、ヘムタンパク質を例に挙げて説明する。ヘムタンパク質は一般に、400 nm 付近にヘムに由来する強い吸収バンドをもっている。したがって、この領域の波長でラマン散乱を励起すると、ヘムに由来する振動スペクトルが選択的に得られる。また、トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、フェニルアラニン (Phe) の芳香族アミノ酸残基は 200~300 nm に吸収帯をもつため、この領域の波長でスペクトルを測定すると、上記のアミノ酸残基に由来する共鳴ラマンスペクトルが得られる<sup>5)</sup>。さらに、190~200 nm にあるペプチドカルボニル基の吸収バンドで共鳴効果を利用すると、アミド振動モードや  $\alpha$  炭素に結合した水素原子の面内変角振動モードによるラマンバンドが共鳴増大する<sup>6)</sup>。これらのモードの振動数やバンド強度はタンパク質の二次構造にきわめて敏感である。このように、波長を適切に使い分けることによって、タンパク質の各部位に特異的な構造情報を得ることができる。

一方この方法には、吸収分光法や蛍光分光法にくらべ感度が低い、蛍光の妨害を受けやすいなど、いくつか欠点もある。しかし、タンパク質のダイナミクスを研究するうえで時間分解共鳴ラマン分光法のもつ利点は重要であり、感度が低いことからくる実験上の困難さを考慮しても、その苦勞の見返りは十分に大きいと筆者らは考えている。

### 2.2 ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光法

高い分解能をもった時間分解測定を行うには、ポンプ-

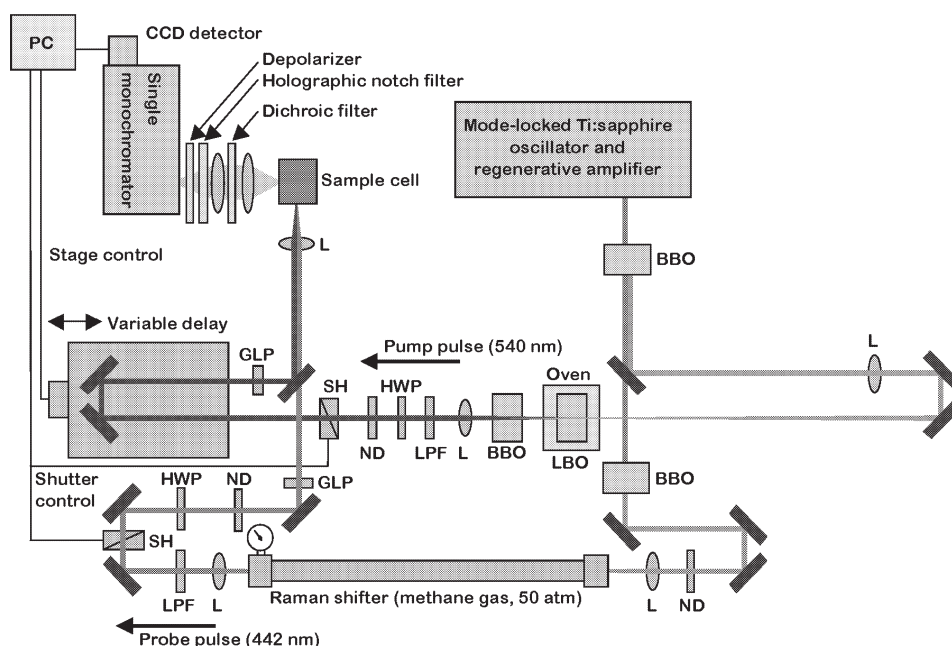


図2 筆者らが製作したピコ秒時間分解可視共鳴ラマン分光装置の概略図。BBO： $\beta$ -barium borate (非線形光学結晶)，GLP：グランレーザープリズム，HWP：1/2波長板，L：レンズ，LBO：lithium triborate (非線形光学結晶)。

プローブ法とよばれる2種類のパルス光を使った方法が一般的に用いられる。この方法では、第一の光パルス（ポンプ光）を使って光反応によりタンパク質の構造変化のトリガーをかけ、第二の光パルスで共鳴ラマンスペクトルを測定するというものである。2つのパルスの時間間隔を変えていくことによって、タンパク質の構造変化を、振動スペクトル変化を通して追跡することができる。現象観測の時間分解能は光パルスの時間幅によって決まる。この方法で最も高い時間分解能は数ピコ秒であり、このように高い時間分解能をもつという点は、X線回折法やNMR分光法にはない特色である。筆者らは、チタンサファイアレーザーをもとにした安定なピコ秒時間分解可視共鳴ラマン分光装置を世界に先駆けて製作した<sup>7,8)</sup>。その装置の概要を図2に示す。モード同期チタンサファイアレーザーの出力を増幅した784 nmのピコ秒パルス光を2つに分け、種々の非線形光学技術を用いて一方からは540 nm（ポンプ光）、他方からは442 nm（プローブ光）のパルス光を発生させた。パルス幅はどちらも約2 psである。540 nmはリガンド結合型ヘムの吸収極大に、また442 nmは解離型ヘムの共鳴ラマンスペクトル測定に有利となるよう合わせている。2つのパルス光は空間的に重ねあわせられ試料に照射されるが、ポンプ光は光学遅延路を経由しており、遅延路を制御することによってポンプ光に対するプローブ光の遅延時間を制御することができる。試料からのラマン散乱光はシングル分光器に入れ分散させた後、液体窒素冷却型CCD検

出器で検出される。異なる遅延時間の設定で共鳴ラマンスペクトルを繰り返し測定することによって、一連の時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定する。このように振動スペクトルを通して、リガンド脱離後に時々刻々と起こる構造変化をピコ秒の時間刻みで追跡することができる。また最近では、プローブ光波長を紫外域に拡張し、タンパク部分の時間分解共鳴ラマン測定を行っている<sup>9)</sup>。紫外のプローブ光を用いる場合、可視光の場合にはない技術的な難しさがある。それは、レイリー散乱光による分光器内の迷光が、可視共鳴ラマン測定の場合にくらべより問題となるという点である。紫外領域では、有効なノッチフィルターがないため、レイリー散乱光を簡単にブロックする方法がない。そこで筆者らは、リトロプリズムを用いたフィルター分光器を製作し、これを主分光器に取り付け、測定に用いている。試料からの光は、フィルター分光器に入り、ここで緩やかに波長分散した後、ラマン散乱光の波長成分のみが主分光器の入口スリットを通過するように設計されている。

### 3. Mbの構造ダイナミクス

#### 3.1 ヘムの構造変化<sup>10)</sup>

図3に、CO結合形Mbのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。ここでは、リガンドとしてCOを用いている。2章1節で述べたように、可視光をプローブ光としたMbの共鳴ラマンスペクトルには、ヘム由来の振動バ



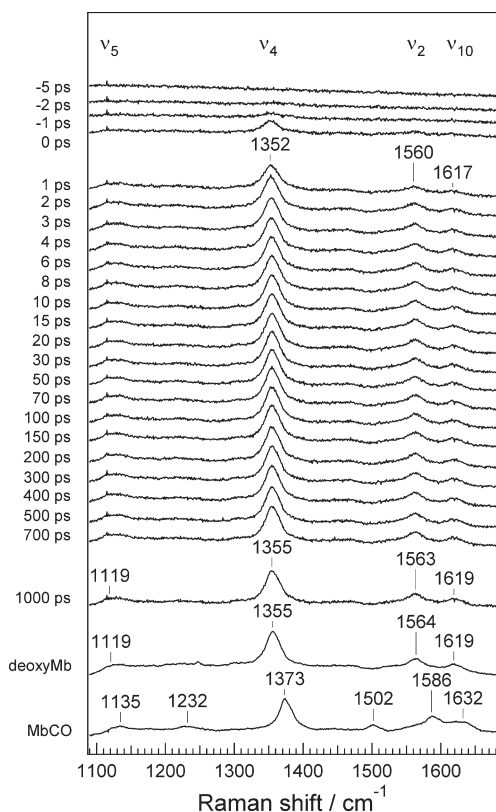


図3 CO結合形ミオグロビンの光解離についての時間分解可視共鳴ラマンスペクトル。1100~1700 cm<sup>-1</sup>の波数領域を示す。比較のため、デオキシ形、CO結合形の共鳴ラマンスペクトルをあわせて示す。

ンドが観測される。図中のスペクトルは実測スペクトルから未反応分のCO結合形のスペクトルを差し引いた差スペクトルとして表してあり、左側の数字は遅延時間を表す。0 psを境にして、プラスの時間帯では反応生成物（すなわち解離形ヘム）のラマンバンドが現れているのがわかる。また、デオキシ形とCO結合形のスペクトルを比較のため下に示してある。1000 psのスペクトルでは4本の面内振動（ $\nu_5$ , 1119 cm<sup>-1</sup>;  $\nu_4$ , 1355 cm<sup>-1</sup>;  $\nu_2$ , 1563 cm<sup>-1</sup>;  $\nu_{10}$ , 1619 cm<sup>-1</sup>）がみえており、デオキシ形のスペクトルと誤差範囲内で一致する。これらのバンドは0 psから現れており、ヘムの構造変化のほとんどが装置の時間分解能以下で非常に速く起こっていることを示している。0~10 psの間では中心波数やバンド幅に変化がみられるが、これらの変化はCO解離直後の反応余剰エネルギーが散逸する過程によるものである<sup>7)</sup>。

次に、同じ過程について測定した低波数側の共鳴ラマンスペクトルを図4に示す。解離形ヘム由来のラマンバンドが早い時刻から現れ、デオキシ形の波数と一致する点は高波数側のスペクトルの特徴と共通している。ここで、220 cm<sup>-1</sup>付近に観測されたラマンバンドに着目する。これは

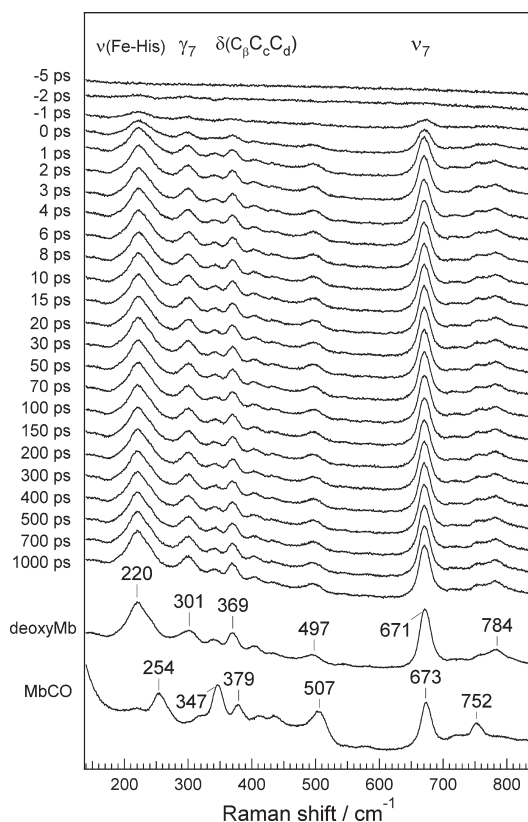


図4 CO結合形ミオグロビンの光解離についての時間分解可視共鳴ラマンスペクトル。150~850 cm<sup>-1</sup>の波数領域を示す。比較のため、デオキシ形、CO結合形の共鳴ラマンスペクトルをあわせて示す。

鉄-近位ヒスチジン間 (Fe-His) 結合の伸縮振動 [ $\nu(\text{Fe-His})$ ] である。Fe-His結合はヘムとタンパク質部分をつなぐ唯一の共有結合であり、したがって  $\nu(\text{Fe-His})$  バンドはヘム周辺のタンパク質構造に敏感であろうと予想される。実際に、 $\nu(\text{Fe-His})$  波数はHbの四次構造のよいマーカーとなる<sup>11)</sup>。このバンドを高次構造変化のプロープとして詳しく調べたところ、約100 psの時定数でデオキシ形の値220 cm<sup>-1</sup>へ緩和することが明らかになった。これは、数ps以下のヘムの構造変化によって生じたヘム周囲の歪みが、タンパク質構造の緩和とともに解消されていく過程を反映している。

### 3.2 タンパク質の構造変化<sup>9)</sup>

ピコ秒時間分解可視共鳴ラマン分光法を用いることによって、Mb中のヘムの構造変化の時間スケールが明らかになった。次に明らかにすべき点は、この変化の次のステップ、すなわちタンパク質部分の構造変化である。これを調べるために、筆者らは芳香族アミノ酸残基の時間分解共鳴ラマンスペクトル測定を行った。その結果を図5に示す。一番上に示したスペクトルはCO結合形のスペクトルである。このプローブ光波長では、共鳴効果によってTrpお

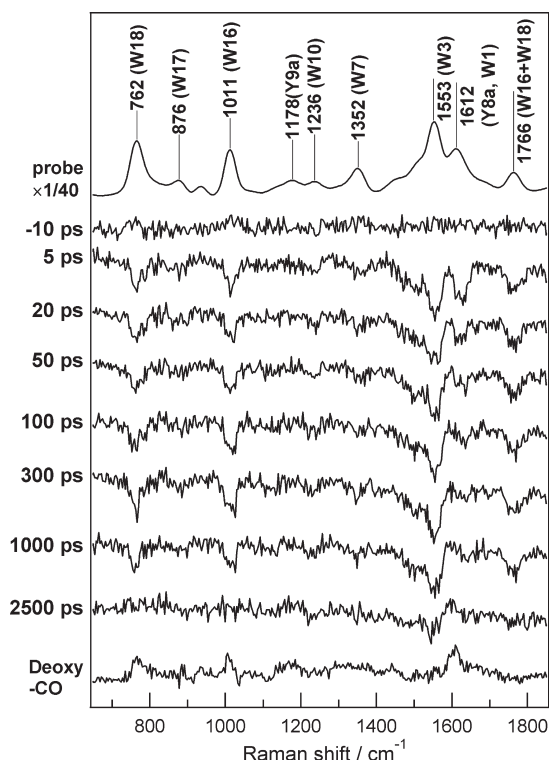


図5 CO結合形ミオグロビンの光解離についての時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。650~1850 cm<sup>-1</sup>の波数領域を示す。一番上に、プローブ光のみを照射して測定した、CO結合形ミオグロビンの紫外共鳴ラマンスペクトルを示している（ただし、強度は40で割ってある）。一番下は、デオキシ形のスペクトルからCO結合形のスペクトルを引いたものである。

よび Tyr 残基のラマンバンドがおもに観測されている。COの脱離に伴うスペクトル変化は小さいため、時間分解スペクトルからCO結合型のスペクトルを1:1で差し引いた差スペクトルとして表している。負の遅延時間では差はないが、0 psを境にして差スペクトルに負のバンドが現れていることがわかる。これは、CO結合形に比べ、過渡種のラマンバンド強度は小さいということに対応している。Trp残基のW3, W16, W18バンドとTyr残基のY8aバンドにおいて、ピコ秒~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 psでTrpとTyr残基のバンドは強度減少を示し、続いて300 ps程度でY8aバンドの強度が回復した(1612 cm<sup>-1</sup>のバンド強度のうち、W1バンドの寄与は小さい)。Trp残基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。実験に用いたウマ由来のMbには、TrpおよびTyr残基がそれぞれ2個ずつ含まれている。そのうち、Trp14およびTyr146がこれらの差バンドに大きく寄与していると帰属された。また、Trp14の変化はEヘリックス(図1(B)を参照のこと)の動きに、Tyr146の変化はFヘリックスの動きに対応づけられた。

帰属の詳細は文献9を参照いただきたい。重要な点は、この差が5 psですでに大きく現れているということである。このことは、リガンドの脱離に対してEFヘリックスの動きが非常に速く起こっていることを意味する。最近筆者らは、さらに詳細な測定を行い、Eヘリックスはヘムの構造変化に対して1 ps以下の遅れで、非常に速く追隨して変化することを明らかにした<sup>12)</sup>。

可視および紫外共鳴ラマン分光の結果から明らかになったMbの構造ダイナミクスの描像は次のとおりである。リガンドの脱離に伴って、ヘム鉄は低スピン型から高スピン型へ変化する。これによって、ヘムの構造は平面形からドーム形へ変化する。これらの変化は2 ps以内に完了する。一方、ヘムを上下からはさむように位置するEFヘリックスも、ヘムの構造変化にほとんど遅れなく追隨して応答する。その後100 psのオーダーでFヘリックス側に構造緩和が起こり、ナノ秒の時間領域でデオキシ形の構造までタンパク質構造が緩和する。

## 4. Hbの構造ダイナミクス

### 4.1 CO脱離に伴うダイナミクス<sup>13)</sup>

HbについてCO脱離後のダイナミクスを研究した結果を、Mbの結果と比較しながら説明する。図6は、CO光解離に伴うHbの時間分解共鳴ラマンスペクトルである。ポルフィリン環由来のほとんどのラマンバンドは、早い段階でデオキシ形と同じ波数を示した。この点についてはMbの場合と似ていたが、いくつかの相違点もみられた。デオキシ形のスペクトルにおいては341 cm<sup>-1</sup>に $\nu_8$ バンド(ヘム鉄-ピロール窒素間の全対称伸縮振動)が観測されるのに対して、時間分解スペクトルでは1000 psにおいても、バンド強度はみられなかった。また、 $\gamma_7$ (メチン面外振動)バンド、 $\nu$ (Fe-His)バンドの振動数は、デオキシ形と1000 psの過渡種とで異なっていた。その後ナノ秒~マイクロ秒にかけて、スペクトルは変化し、10  $\mu$ sにおいて $\nu_8$ ,  $\gamma_7$ バンドはデオキシ形のものとは一致した。これらの結果は、Mbとは対照的にHbではヘムの構造緩和が1000 psではまだ完了していないことを意味している。

3章2節において、MbのEFヘリックスの動きについて述べた。Hbについても、同様のEFヘリックスの構造変化がナノ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光による先行研究からすでに明らかになっている<sup>14)</sup>。その研究によると、Hbの場合は10 nsのオーダーで変化が起こり、これは5 ps以内にEFヘリックスの変化が起こるMbの場合とは大きく異なる。以上のように、Hbでは、ヘムおよびEFヘリックスに、Mbにはみられなかったナノ秒領域の構造

変化の相が現れる点が特徴である。

#### 4.2 四次構造による違い

Hb を多孔性シリカゲル中に水とともに閉じ込めると、四次構造変化の速度が著しく減速されることが知られている<sup>15)</sup>。溶液中では数十  $\mu\text{s}$  で起こる R-T 転移が、シリカゲル中では数時間かかるので、実質的に四次構造を R あるいは T に固定して Hb の三次構造変化を調べることができる。そこで、四次構造を T 構造および R 構造に固定した Hb (それぞれ T 固定 Hb, R 固定 Hb とよぶことにする) を調製し、これらの構造ダイナミクスを観測した<sup>16)</sup>。ヘム由来のラマンバンドを R 固定 Hb の場合と T 固定 Hb の場合で比較すると、Hb にみられるナノ秒の相、すなわち  $\nu_8$ ,  $\gamma_7$  バンドのデオキシ形への変化は、T 固定 Hb のほうが速いことがわかった。一方、CO 結合形について共鳴ラマンスペクトルを比較すると、ヘム由来のバンドの振動数、結合した CO 由来のバンドの振動数いずれも、T 固定 Hb と R 固定 Hb とではほとんど違いはなかった。このことは、リガンド結合状態においては、ヘムおよびヘム周辺の構造は T 構造と R 構造とでほとんど違いがないにもかかわらず、リガンド脱離後では T 構造のほうが R 構造よりもナノ秒の相の速度が速いことを示唆する。

#### 4.3 O<sub>2</sub> 脱離に伴うダイナミクス—CO 脱離の場合との違い<sup>17)</sup>

ここまで、CO 脱離に伴う Hb, Mb の構造ダイナミクスについて述べてきた。O<sub>2</sub> 運搬を行う Hb, O<sub>2</sub> の貯蔵を行う Mb に対して、CO をリガンドとして用いた研究に疑問を感じられた読者もおられるであろう。しかし、これまで Hb, Mb の構造ダイナミクスの研究においては、ほとんどの場合、リガンドとして O<sub>2</sub> の代わりに CO が用いられてきたというのが現状である。これは O<sub>2</sub> 結合型を用いた時間分解測定が難しいためである。その理由はおもに 2 つある。1 つは光解離の量子収率が CO の場合の 3 分の 1 から 4 分の 1 であるということ<sup>18)</sup>、もう 1 つは自動酸化のためヘム鉄が測定中に徐々に酸化形に変化してしまうということである。しかし、Hb, Mb の生理的なりガンドは O<sub>2</sub> である。CO 脱離の実験は比較的容易であるがゆえに質の高い詳しいデータが得られるが、CO を使った研究から得られた描像がはたして生理的な構造変化を反映しているか疑問が残る。筆者らは、装置の感度向上によって、上記の測定上の困難さが克服できると考え、O<sub>2</sub> 脱離の時間分解測定に挑戦した。その結果を図 7 に示す。CO 脱離後 1000 ps 後の時間分解スペクトルでは、デオキシ形のスペクトルとの間に、 $\gamma_7$  バンドの振動数および  $\nu_8$  バンドの強

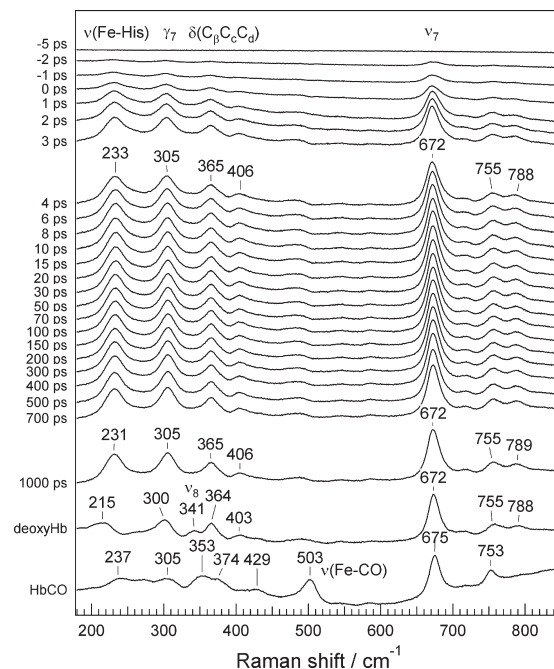


図6 CO 結合形ヘモグロビンの光解離についての時間分解可視共鳴ラマンスペクトル。150~850  $\text{cm}^{-1}$  の波数領域を示す。比較のため、デオキシ形、CO 結合形の共鳴ラマンスペクトルをあわせて示す。

度について違いがみられた。これに対し、O<sub>2</sub> 脱離後の時間分解スペクトルでは、同様の点で違いはみられたものの、その程度はかなり小さかった。一方、Mb の O<sub>2</sub> 結合形および CO 結合形では、リガンド脱離後 1000 ps のスペクトルとデオキシ形のスペクトルとの間にはほとんど違いはなかった。以上の実験結果は、いずれのリガンドの場合も、Mb においては 1000 ps でヘムの構造緩和がほぼ完了しているのに対し Hb においてはまだ完了していないこと、Hb において、O<sub>2</sub> 脱離の場合と CO 脱離の場合とではヘム周辺構造の緩和速度が異なることを意味する。さらに、 $\nu(\text{Fe-His})$ ,  $\gamma_7$  バンドの振動数のナノ秒領域における時間変化は 1 桁近く異なることが明らかになった。このように、Hb に特徴的にみられるナノ秒の相について、リガンドによる差がみられたということは大変興味深い。このスペクトル変化の速度は報告されているリガンドの再結合速度と高い相関を示す。このことは、リガンド脱離直後ではヘムは再結合しにくい構造をとっているが、ナノ秒の相の構造変化とともに再結合しやすい構造に変化することを示唆する。一方、Mb においてはリガンドによる違いはみられなかった。これは、もともとデオキシ形への緩和が速く、ナノ秒領域の相がないため当然のことかもしれない。

Hb の構造ダイナミクスは、リガンドとして CO を用い、これまでさまざまな時間分解分光法によって調べられてき



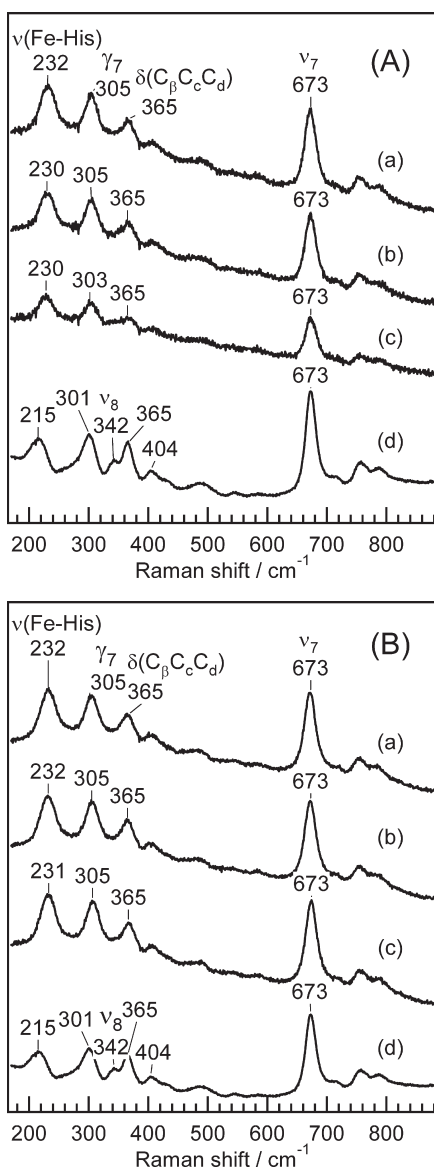


図7 O<sub>2</sub>脱離 (A) および CO脱離 (B) についてのヘモグロビンの時間分解可視共鳴ラマンスペクトル. 150~850 cm<sup>-1</sup>の波数領域を示す. (A), (B)ともに, (a), (b), (c), (d)はそれぞれリガンド脱離後10 ps, 100 ps, 1 ns, デオキシ形のスペクトルである.

た. 本研究の結果は, Hbの構造ダイナミクスが, O<sub>2</sub>とCOとで異なること, したがって, これまでのCOを使った研究によって得られた描像を再検討する必要があることを示している.

ここで, O<sub>2</sub>を使ったヘムタンパク質の時間分解測定の意義について触れておきたい. ダイナミクス研究において, O<sub>2</sub>の代わりにCOを用いるという事情は, Hbに限らず, センサーヘムタンパク質などについても同様である. しかし, O<sub>2</sub>センサータンパク質については, COを使った研究のみでは本質的理解に到達するのは難しいと考えられる. なぜなら, センサーは対象ガス分子の検知だけ

ではなく, 他のガス分子との識別が必要であるからである. したがって, O<sub>2</sub>とそれ以外のリガンドで起こる構造変化は異なるはずである. 実際に, 筆者らはO<sub>2</sub>センサータンパク質であるFixLについて, 時間分解共鳴ラマンスペクトル測定を行い, O<sub>2</sub>脱離とCO脱離の場合とではスペクトル変化が異なることを見いだした<sup>19)</sup>. Hb, Mbは古くから研究されてきたタンパク質であり, 多くの物理化学的手法が適用されてきた. そのためやりつくされた感があるが, 機能に本質的な構造ダイナミクスには未解決の問題が依然として多いということを指摘しておきたい.

## 5. Hbのダイナミクスの特徴

Mbではナノ秒以内にヘムの緩和がほぼ完了するのに対して, Hbではナノ秒領域にν<sub>8</sub>, γ<sub>7</sub>バンドの時間変化がみられるのが特徴である. ヘムのみを有機溶媒中に溶かす, あるいはミセル中に可溶化して, CO光解離の実験を行うとMbの場合と同様に, ヘムの構造変化は数ピコ秒で完了する<sup>10)</sup>. したがって, ナノ秒の相をもつことはヘムの特性とは考えにくい. むしろ, Hb中では, リガンドが脱離してもヘムが最安定な構造をとることを周囲のタンパク部分が妨げ, タンパク部分の構造変化とともに最安定構造に緩和すると考えられる. ここで興味深い点は, Hbにおいては, リガンド脱離後のEFヘリックスの構造変化がMbにくらべて遅いという点である. したがって, Hbにおいては, リガンドが脱離してもすぐにはこれらのヘリックスが変化せず, ヘリックスの構造変化とともに最安定構造に緩和すると考えれば実験結果をうまく説明することができる. リガンドの種類, 四次構造によってナノ秒領域の変化速度が異なるという事実は, 2種類の三次構造が存在し, 両者の間の平衡がリガンドの種類, 四次構造によってシフトするというを示唆している.

ナノ秒の相は, リガンドの種類, 四次構造の種類というHbにとって重要なパラメーターに依存することが明らかになった. したがって, この相はHbの単なる性質ではなく, その機能にとって重要な意味をもっていると考えられる.

本稿では, MbとHbを中心に, 筆者らが行ってきた時間分解共鳴ラマン分光の研究成果を述べた. 可視共鳴ラマン分光法と紫外共鳴ラマン分光法を組み合わせ, 時間分解測定を行うことにより, ヘムの構造変化とタンパク質部分の構造変化との関係が詳細に調べられるようになった. この長所は, Hb, Mbだけでなく, 今後, 特にガスセンサータンパク質, 光センサータンパク質のセンシング機構の

解明に威力を発揮すると期待される。

共鳴ラマン分光法によるタンパク質の構造化学研究はすでに30年近い歴史がある。最近では、安定なパルスレーザー、波長変換システム、低雑音高感度の光検出器の出現によって、高い時間分解能で時間分解共鳴ラマンスペクトルが得られるようになった。一方で、タンパク質科学の分野では、ゲノム配列の解読により多くのタンパク質が新たに発見され、また発現系の開発により、これまでは微量にしか得られなかったタンパク質も大量に得られるようになってきた。このように、多くの種類の新規なタンパク質が分光研究の射程圏内に入ってきている。タンパク質構造の変化を化学結合レベルで、かつ高時間分解能で検出できるという特色は、他の手法にはない、時間分解振動分光法にユニークなものであり、今後タンパク質科学研究において、この手法の果たす役割はますます大きくなっていくものと思われる。

本稿で述べた研究成果は、北川禎三教授（分子科学研究所名誉教授、豊田理化学研究所）、長井雅子教授（法政大学）、佐藤亮博士（科学技術振興機構）、村川由佳さん（神戸大学）、稲垣厚志君（神戸大学）、上門久美子さん（神戸大学）との共同研究の成果である。共同研究者に感謝する。

## 文 献

- 1) D. Voet and J. G. Voet: *Biochemistry*, 3rd ed. (John Wiley & Sons, New York, 1995) pp. 215-250.
- 2) R. E. Dickerson and I. Geiss: *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology* (Benjamin Cummings, Menlo Park, 1983).
- 3) J. S. Olson and G. N. Phillips, Jr.: "Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin," *J. Biol. Chem.*, **271** (1996) 17593-17596.
- 4) G. S. Kachalova, A. N. Pepov and H. D. Bartunik: "Steric mechanism for inhibition of CO binding to heme proteins," *Science*, **284** (1999) 473-476.
- 5) S. Asher: "UV resonance Raman studies of molecular structure and dynamics: Applications in physical and biophysical chemistry," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **39** (1988) 537-588.
- 6) A. V. Mikhonin, S. V. Bykov, N. S. Myshakina and S. A. Asher: "Peptide secondary structure folding reaction coordinate: Correlation between UV Raman amide III frequency, Ramachandran angle, and hydrogen bonding," *J. Phys. Chem. B*, **110** (2006) 1928-1943.
- 7) Y. Mizutani and T. Kitagawa: "Direct observation of cooling of heme upon photodissociation of carbonmonoxy myoglobin," *Science*, **278** (1997) 443-446.
- 8) Y. Mizutani and T. Kitagawa: "Ultrafast dynamics of myoglobin probed by time-resolved resonance Raman spectroscopy," *Chem. Rec.*, **1** (2001) 258-275.
- 9) A. Sato and Y. Mizutani: "Picosecond structural dynamics of myoglobin following photodissociation of carbon monoxide as revealed by ultraviolet time-resolved resonance Raman spectroscopy," *Biochemistry*, **44** (2005) 14709-14714.
- 10) Y. Mizutani and T. Kitagawa: "Ultrafast structural relaxation of myoglobin following photodissociation of carbon monoxide probed by time-resolved resonance Raman spectroscopy," *J. Phys. Chem. B*, **105** (2001) 10992-10999.
- 11) T. Kitagawa: "The heme protein structure and the iron histidine stretching mode," *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, ed. T. G. Spiro, Vol. III (John Wiley & Sons, New York, 1987) pp. 97-131.
- 12) A. Sato, G. Ying, T. Kitagawa and Y. Mizutani: "Primary protein response after ligand photodissociation in carbonmonoxy myoglobin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** (2007) 9627-9632.
- 13) Y. Mizutani and M. Nagai: "Primary structural changes of hemoglobin heme after ligand dissociation in carbonmonoxy hemoglobin," manuscript in preparation.
- 14) V. Jayaraman, K. R. Rodgers, I. Mukerji and T. G. Spiro: "Hemoglobin allostery: Resonance Raman spectroscopy of kinetic intermediates," *Science*, **269** (1995) 1843-1848.
- 15) N. Shibayama and S. Saigo: "Kinetics of the allosteric transition in hemoglobin within silicate sol-gels," *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 444-445.
- 16) A. Inagaki and Y. Mizutani: "Dynamics of hemoglobin in fixed quaternary structure," *Abstract of Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan*, 1P166 (Okinawa Convention Center, Okinawa, 2006).
- 17) Y. Murakawa, Y. Mizutani and M. Nagai: "Ligand dependence in structural dynamics of hemoglobin: Differences between oxygen and carbon monoxide," manuscript in preparation.
- 18) X. Ye, A. Demidov and P. M. Champion: "Measurements of the photodissociation quantum yields of MbNO and MbO<sub>2</sub> and the vibrational relaxation of the six-coordinate heme species," *J. Am. Chem. Soc.*, **124** (2002) 5914-5924.
- 19) Y. Hiruma, A. Kikuchi, A. Tanaka, Y. Shiro and Y. Mizutani: "Resonance Raman observation of the structural dynamics of FixL on signal transduction and ligand discrimination," *Biochemistry*, **46** (2007) 6086-6096.

(2007年5月7日受理)