

研究課題別評価

1 研究課題名: タンパク質機能の構造揺らぎの検出と制御

2 研究者氏名: 水谷 泰久

3 研究の狙い:

タンパク質はそのエネルギーポテンシャル面で多くのローカルミニマムを持ち、その階層的なポテンシャル構造は非常に幅広い揺らぎを絶えず生み出している。この特徴はタンパク質中で起こる化学反応を理解する上で極めて重要なものである。本研究では、機能に関係した構造揺らぎを、時間分解振動分光法によって直接捉え、揺らぎと機能との速度論的な関係を詳細に調べる。これによって、構造揺らぎとそれを生み出す不均一性の要因を明らかにする。タンパク質の構造がどのように機能を生み出すかという概念を動的な側面から肉付けすることを目指す。

4 研究成果:

(1) 速度論的ホールバーニングのラマン検出に向けた高感度ラマン分光装置の開発

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、conformational substate (cs) ごとの反応速度の不均一性によるスペクトルバンド形変化を調べるものである。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。そこで、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。

(2) ミオグロビンの構造揺らぎと反応性

KHB 法を用いて、ミオグロビン(Mb)のリガンド結合過程に関係する構造揺らぎを調べた。Mb、ヘモグロビン(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、いくつかの実験および分子動力学計算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。そこで、鉄原子の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、KHB のラマン検出を行った。NO の脱離後、時間分解共鳴ラマンスペクトルには解離形に由来する共鳴ラマンバンドが観測された。その後、再結合に対応して、解離形の $\nu(\text{Fe-His})$ バンドに強度減衰がみられた。減衰過程におけるバンド形変化を詳細に調べた結果、不均一性によって広がったバンド

全体のうち、早い段階で再結合する成分ほど高い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数をもっており、時間とともに再結合する成分の振動数が低下していくことがわかった。再結合の時間帯による振動数の違いは、Fe-His 結合の不均一な構造分布と再結合の速度分布に相関があることを意味している。また、高い $\nu(\text{Fe-His})$ 振動数をもつ cs ほど再結合が速いということは、Fe-His 結合にかかる張力が弱い cs ほど再結合速度が速いという予想と一致する。NO 再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の構造不均一性によるものと考えられている。今回の結果は、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を示すものである。さらに、時間差スペクトルでのバンド位置がこのように時間とともにシフトしていくという実験事実から、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が明らかになった。

(3) ヘモグロビンの構造揺らぎと反応性

Hb についても、Mb と同様に、NO 再結合速度と相関をもつ構造不均一性が観測された。不均一性の大きさおよび揺らぎの速度は、Hb と Mb との間で大きな違いはみられなかった。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。Hb を構成する α 鎖、 β 鎖の一方のみを選択的に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ことからくる不均一性ではなく、サブユニット自身も持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 のリガンド結合過程を対象に、機能の不均一性と構造不均一性とを、速度論的に関係付けることができた。これによって、従来の手法にはなかった KHB のラマン検出手法としての特色を具体的に示すことができた。

5 自己評価:

本研究で行った KHB 法による揺らぎの観測には、用いる時間分解共鳴ラマン測定装置にきわめて高い観測感度が要求された。それに必要なレベルにまで装置を高感度化することに成功した点は満足できる点だと考えている。高感度化は予想以上に難しい作業ではあったが、いくつかの技術的な工夫を積み重ね、測定感度の向上を図ることができたのは、手ごたえの感じられる過程であった。この点に関しては、研究期間の早い段階で高額の実験装置の購入を認めていただいた、研究総括に大変感謝している。また、装置の計測性能を極限に高めることで、従来の装置では不可能であったいくつかの測定が可能になった。例えば、酸素脱離に伴う構造ダイナミクスの研究(酸素は生理的なリガンドでありながら、測定の困難さのためにほとんど行われていない)、量の少ない試料(変異体試料など)の測定が可能になった。このような本装置の新しい可能性も今後探していきたい。

本研究においては、KHB のラマン検出を行うことで、タンパク質の不均一な構造分布と再結合の速度分布との相関を求める測定手法を確立することができた。これは、従来行われていた吸収や蛍光などの電子遷移を用いる検出からは本質的に困難なことであり、化学結合のレベルで構造情報を与える振動遷移を観測することによって初めて可能になったことがらである。測定感度の低さを克服して、これを可能にした点は大きな意義を持っていると考えている。しかし、全体として装置開発に時間がかかり、研究を当初計画していたスケジュールどおり進められなかった点が反省点として残る。未完了な部分に関しては今後も引き続き行い、できるだけ早く研究を完了させたいと考えている。それから、研究成果の論文発表が非常に遅れている点も大きな反省点である。現在、その作業を急いでいる。

6 研究総括の見解:

独自の工夫を重ねた装置改造により、高感度観測を可能にして揺らぎの測定手法を確立したことは評価できる。分光学におけるフェムト秒分光グループの若手チャンピオンであり、国内では第一人者である。世界的には研究人口の多い分野であり、その中で重要な地位を占めるよう期待する。

7 主な論文等:

論文

1. Shigenori Nagatomo, Masako Nagai, Yasuhisa Mizutani, Takashi Yonetani, and Teizo Kitagawa, Quaternary Structures of Intermediately Ligated Human Hemoglobin A and Influences from Strong Allosteric Effectors; Resonance Raman Investigation, Biophys. J. in press.

出版物

1. 水谷泰久、タンパク質の構造揺らぎと反応の相関 - 実験的研究法, 生物物理, 44, 222-225 (2004).

招待講演

1. Yasuhisa Mizutani, Vibrational Energy Redistribution of Heme in Proteins Probed by Picosecond Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy, XVIIIth International Conference on Raman Spectroscopy, Budapest, Hungary, 2002 年 8 月 25 日-30 日
2. 水谷泰久、時間分解共鳴ラマン分光法で観たミオグロビンおよびヘモグロビンの構造ダイナミクス、2003 年分子構造総合討論会 (シンポジウム「分子科学と生体科学との接点」)、京都、2003 年 9 月 24 日-27 日
3. Yasuhisa Mizutani, Ultrafast Protein Dynamics of Myoglobin and Hemoglobin Studied by Picosecond Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy, The 3rd Asian Conference on Ultrafast Phenomena, Beijing, P. R. China, 2004 年 3 月 18 日-20 日