

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：14401
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19056013
 研究課題名（和文） 時間分解共鳴ラマン分光法によるタンパク質アロステリック機構の動的構造基盤の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of structural basis of dynamically-driven protein allostery by time-resolved resonance Raman spectroscopy
 研究代表者
 水谷 泰久（MIZUTANI YASUHISA）
 大阪大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：60270469

研究成果の概要（和文）：

時間分解共鳴ラマン分光法を用いて、タンパク質の構造ダイナミクスを観測し、その機能発現機構を調べた。時間分解共鳴ラマン分光システムを拡張・性能向上させることによって、ピコ秒からミリ秒までの幅広い時間帯について、共鳴ラマン効果による補欠分子族および芳香族アミノ酸残基に対する部位特異的観測を可能にした。この技術を用いて、ヘモグロビン、ガスセンサータンパク質、光受容タンパク質の種々のアロステリックタンパク質について、機能に関わる構造ダイナミクスを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Protein dynamics highly relevant to biological function were studied with time-resolved resonance Raman spectroscopy. Our effort on developments on the measurement system enabled us to perform site-specific observation on structural changes of proteins in wide time range from picoseconds to milliseconds. We elucidated functionally-important dynamics of various allosteric proteins such as hemoglobins, heme-based gas sensors, and photoactive proteins with the high performance of the system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,800,000	0	16,800,000
2008年度	29,700,000	0	29,700,000
2009年度	12,330,000	0	12,330,000
2010年度	11,600,000	0	11,600,000
2011年度	5,600,000	0	5,600,000
総計	76,030,000	0	76,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：ラマン分光法、生物物理学、時間分解分光法

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は柔軟性と安定性を併せ持つところに特徴があり、その構造を変化させ機能する。したがって、タンパク質の機能発現機構の理解は、静的立体構造の解明のみでは不十分で、動的な高次構造の解明によって初め

て進む。構造変化が機能を生み出す特に重要な例は、ヘモグロビンやセンサーとして働くタンパク質（センサータンパク質）にみられるアロステリック機構である。この機構においては、タンパク質分子内における局所的な構造変化をトリガーとして、大域的な高次構

造変化が引き起こされ機能制御がなされている。このような見事な変化を可能にする構造基盤を明らかにすることは、タンパク質科学としてだけでなく、物理化学としても非常に重要である。アロステリックタンパク質の研究は国内外で活発に行われているが、それらは変化の始点・終点の静的構造を調べるものがほとんどである。アロステリック機構を解明するには、変化の各ステップにおいてタンパク質のどの部位にどのような構造変化が起きているのか、そしてそれらはどのように連動しているのかを調べる必要がある。われわれはこれまでに、基本的なヘムタンパク質のひとつであるミオグロビンの構造ダイナミクスに関する研究を行ってきた。この研究で培った計測技術をさらに伸ばすことによって、よりサイズの大きなアロステリックタンパク質の問題に挑戦できると考え、本申請に至った。

2. 研究の目的

タンパク質の機能発現機構を解明するためには、機能する際に分子がどのように構造変化するかという情報が重要である。その情報を得るには、高い時間分解能をもち、かつ化学結合レベルの構造情報を与える計測技術が必要である。我々は、チタンサファイアレーザーを基にしたピコ秒時間分解共鳴ラマン分光システムを世界に先駆けて製作し、タンパク質の構造ダイナミクスを明らかにしてきた。本研究の目的は、時間分解共鳴ラマン分光システムを拡張・性能向上させ、それによって従来の方法では計測が困難であったタンパク質の機能ダイナミクスを化学結合レベルで捉え、機能発現機構を解明することにある。これによって、タンパク質の動的構造を基盤とした、タンパク質物理化学の新しい研究領域を開拓する。

3. 研究の方法

本研究では、酸素運搬タンパク質、ガス分子センサータンパク質、光センサータンパク質の機能発現機構の解明を目指す。これらのタンパク質の機能発現においては、アロステリック機構が本質的に重要である。そこで、リガンド結合部位あるいは発色団に起きる構造変化をスタートとして、ピコ秒からミリ秒まで9桁におよぶ幅広い時間帯でのタンパク質構造変化を、共鳴ラマン効果を最大限に活用して部位特異的に観測する。このような実験データは、アロステリック機構を生み出す動的構造基盤を具体的な形で示してくれるであろう。

4. 研究成果

(1) 高感度時間分解可視・紫外共鳴ラマン分光システムの製作

高繰り返しパルスレーザーシステムを導入し、高感度の時間分解可視・紫外共鳴ラマン分光システムを構築した。これによって、現有のシステムと併せ、ピコ秒からミリ秒の幅広い時間領域にわたって、ヘム (~400 nm にて共鳴)、芳香族アミノ酸残基 (~230 nm にて共鳴)、ペプチド骨格 (~200 nm にて共鳴) など、タンパク質の多くの部位を特異的に観測することができるようになった。この分光システムを用いて、以下の研究を展開した。

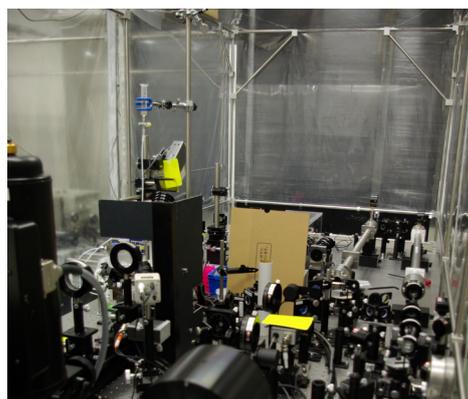


図 1. 時間分光紫外共鳴ラマン分光装置

(2) ヘモグロビンのアロステリックダイナミクスに関する研究

これまでヘモグロビンの構造ダイナミクス研究では、生理的なリガンドである酸素の代わりに、一酸化炭素がリガンドとして主に用いられてきた。これは酸素を用いた時間分解測定が困難であるためである。本研究では、上記の高感度の時間分解共鳴ラマン分光システムを用いることによって、酸素を用いた時間分解測定の問題を克服し、ヘモグロビンの生理的に重要な構造ダイナミクスをとらえることに成功した。

構造変化は、リガンドとして酸素を用いた場合、一酸化炭素を用いた場合、いずれの場合にも観測されたが、その速度はリガンドによって異なった。一方、ヘモグロビンサブユニットと類似の構造をもつミオグロビンにはリガンドによる速度の違いは観測されなかった。また、ヘモグロビン (α 鎖 2 個および β 鎖 2 個で構成される) を、 α 鎖、 β 鎖に分離した試料で測定を行うと、これらには協同性がみられないにもかかわらず (つまり、四次構造変化を起こさないと考えられるにもかかわらず)、いずれの試料に関してもヘモグロビンと類似のスペクトル変化が観測された。さらに、ヘモグロビンの四次構造を固定して同様の測定を行うと、R 構造と T 構造とでは速度が異なった。以上の実験事実は、観測されたスペクトル変化がヘモグロビンサブユニットの構造に特有のものであること、そしてその特有の変化はリガンドの種類

およびサブユニット間相互作用に依存することを示している。

さらに、タンパク質の超高速ダイナミクスについても研究を広げた。ミオグロビンについてリガンド脱離に伴うタンパク質の初期構造変化の詳細を明らかにした。特に、タンパク質部分の初期構造変化が、リガンド脱離後ピコ秒以内に起きる、ヘム近傍の2本のヘリックスの変位であることを明らかにし、ヘムからタンパク質部分への構造変化の新たな伝播経路を提案した点は極めて意義深い。

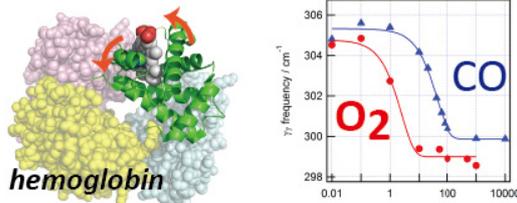


図 2. ヘモグロビンの構造変化にリガンドによる速度の違いがあることを発見

(3) ヘム含有酸素センサータンパク質に関する研究

ガス分子による活性制御機構の解明を目的に、酸素センサータンパク質である HemAT および FixL について、リガンド脱離に伴う構造ダイナミクスを調べた。その結果、酸素リガンドに特異的なスペクトル変化を新たに見出し、これを基にタンパク質によるリガンド識別機構のモデルを提案した。

酸素センサータンパク質のひとつである HemAT について、リガンド脱離に伴う構造ダイナミクスを調べた。その結果、酸素リガンドに特異的なスペクトル変化を見出した。また、センサードメインのみを切り出したタンパク質と、全長タンパク質の結果を比較したところ、構造変化の速度に大きな違いがみられた。これは、センサードメインと機能ドメインとの間のカップリングに起因すると考えられ、センサードメインから機能ドメインへの構造変化の伝達を考えるうえで興味深い。

酸素センサータンパク質である FixL について、リガンド脱離に伴う構造ダイナミクスを調べた。リガンド脱離後、ヘムの構造に、酸素脱離に特異的な変化が観測された。これは、ヘムの遠位側に存在するアルギニン残基が酸素脱離に特異的に配向を変えろというこれまでのモデルとコンシステントである。また、チロシン残基のスペクトルにも酸素脱離に特異的な変化が観測された。変異体のスペクトルとの比較から、この変化を示すチロシン残基はヘムの近位側に存在する残基であると同定された。さらに、チロシン残基の変化の時定数はヘムのそれに誤差範囲内で

一致した。このことは、遠位側と近位側の構造変化が連動していることを示している。これまでのモデルでは酸素脱離に伴う構造変化として遠位側を主に考えられてきたが、本研究の結果はその変化は近位側にも広がったものであることを示している。

これまで酸素ガスセンサータンパク質の構造ダイナミクス研究では、実験上の難しさから生理的リガンドである酸素を用いた研究は皆無で、代わりに非生理的リガンドである一酸化炭素を用いたものであった。しかし、センサータンパク質は酸素とそれ以外のガス分子を識別しているため、センシングに関わっている構造変化は酸素を用いなければわからない。本研究は酸素に特異的なダイナミクスを見出し、観測の重要性を実証した点においても非常に重要である。

(4) 光受容タンパク質に関する研究

光センサータンパク質では、タンパク質に含まれる発色団に光化学反応が起きることによって局所的な構造変化が誘起される。これがタンパク質の大域的な構造変化を起こし、活性制御がなされる。また、光駆動イオンポンプでは、局所的な構造変化に誘起された大域的な構造変化がイオン輸送を引き起こす。これらの機構を明らかにするために、光受容タンパク質について、光化学反応に伴う構造ダイナミクスを調べた。

プロトンポンプであるバクテリオロドプシンでは、トリプトファン、チロシン側鎖それぞれの振動バンドに時定数 30 ピコ秒をもつ変化が観測された。バクテリオロドプシンは超高速分光法による多くの研究がなされているが、発色団の光異性化に伴うタンパク質の初期構造変化を観測した例はなく、本研究が初めての例である。また、トリプトファンおよびチロシン側鎖の振動バンドのスペクトル変化には、異なる時間挙動を示すものがあることがわかった。これは、少なくとも2つのトリプトファン残基と少なくとも2つのチロシン残基の構造変化がスペクトル変化に寄与していることを示唆している。

塩化物イオンポンプであるハロロドプシンについて、光異性化に伴う構造ダイナミクスを調べたところ、トリプトファン残基のラマンバンドに変化が観測され、その時定数は約 20 ピコ秒と求められた。この値は、これまでに報告された古細菌型ロドプシンの値とよく似ている。構造ダイナミクスに対する塩化物イオンの効果を調べたところ、トリプトファン残基のラマンバンドの変化は、イオンの有無によってほとんど差がないことがわかった。塩化物イオンは発色団の電子状態に影響を与えることが知られているが、本研究の結果からタンパク質の初期応答には大きな影響を与えないことが明らかになった。

光センサータンパク質センサーロドプ

シン II では、発色団近傍のチロシン残基の水素結合強度が発色団の異性化に伴い数ピコ秒で変化することを明らかにした。このチロシン残基は過去の生化学実験からトランスデューサーへの信号伝達に重要であることがわかっている。本研究の結果は、このチロシン残基が光サイクルの早い段階で変化して光吸収の信号を伝達していることを示唆している。

最近ラン藻から発見されたアナベナセンサリーロドプシンは、発色団が全トランス形だけでなく、13-シス形においても安定であり、光励起によって相互変換する性質を示す。そこで、この性質を利用して2方向の光異性化に伴うタンパク質ダイナミクスを調べた。トリプトファン残基のラマンバンドに時定数 30 ピコ秒の変化が観測され、この値はどちらの光異性化に対しても違いはなかった。

以上のように、古細菌型ロドプシンについて、光異性化に伴うタンパク質構造変化を系統的に調べた。その結果、タンパク質の種類によらずタンパク質は約 30 ピコ秒の時定数の応答を示すことを明らかにした。さらに、この時定数はイオンや光異性化の違いによる影響をほとんど受けないことを見出した。このことは、約 30 ピコ秒の時定数をもつ構造変化が古細菌型ロドプシンの発色団周囲のタンパク質構造に普遍的な性質であることを示唆する。

紅色光合成細菌の光センサータンパク質であるイエロープロテインでは、発色団とそれに隣接するチロシン残基間の水素結合の強度が、光反応に伴って変化することを明らかにした。また、発色団を含む水素結合ネットワークの運動性を観測することにも成功した。

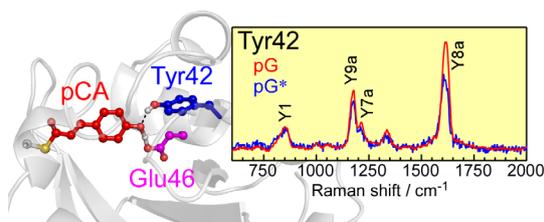


図 3. イエロープロテインの発色団周囲の水素結合ネットワークについて、その水素結合強度が光反応に伴い時間変化することを見出した

(5) まとめ

安定な時間分解共鳴ラマン分光装置を製作し、これを用いてヘモグロビン、ガスセンサータンパク質、光受容タンパク質の種々のアロステリックタンパク質について、機能に関わる構造ダイナミクスを明らかにした。分光装置の性能向上によって、これまでは観測が困難であった酸素脱離に伴う多くのヘムタンパク質の構造変化を観測できたのは本

研究の最も重要な成果である。また、領域内の共同研究によって、当初は計画していなかった光受容タンパク質の構造ダイナミクスに関する研究についても多くの知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. "Differences between Protein Dynamics of Hemoglobin upon Dissociation of Oxygen and Carbon Monoxide", Yuka Murakawa, Masako Nagai and Yasuhisa Mizutani, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1434-1437 (2012). 査読有 DOI: 10.1021/ja209659w
2. "Protein Dynamics of Isolated Chains of Recombinant Human Hemoglobin Elucidated by Time-resolved Resonance Raman Spectroscopy", Kenta Yamada, Haruto Ishikawa, and Yasuhisa Mizutani, *J. Phys. Chem. B*, 116, 1992-1998 (2012). 査読有 DOI: 10.1021/jp2114303
3. "Direct observation of the structural change of Tyr174 in the primary reaction of sensory rhodopsin II", Misao Mizuno*, Yuki Sudo*, Michio Homma and Yasuhisa Mizutani, *Biochemistry*, 50, 3170-3180 (2011). (*These authors equally contributed to this work) 査読有 DOI: 10.1021/bi101817y
4. "Changes in the Hydrogen-Bond Network around the Chromophore of Photoactive Yellow Protein in the Ground and Excited States", Misao Mizuno, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka and Yasuhisa Mizutani, *J. Phys. Chem. B*, 115, 9306-9310 (2011). 査読有 DOI: 10.1021/jp2029399
5. "Direct observation of vibrational energy flow in cytochrome c", Naoki Fujii, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, *J. Phys. Chem. B*, 115, 13057-13064 (2011). 査読有 DOI: 10.1021/jp207500b
6. "Protein Conformational Changes of the Oxidative-Stress Sensor, SoxR, upon Redox Change of the [2Fe-2S] Cluster Probed with Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy", Kazuo Kobayashi, Misao Mizuno, and Yasuhisa Mizutani, *Biochemistry*, 50, 9468-9474 (2011). 査読有 DOI: 10.1021/bi201526y
7. "Picosecond Time-Resolved Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of Bacteriorhodopsin: Primary Protein

- Response to the Photoisomerization of Retinal", Misao Mizuno, Mikihiro Shibata, Junya Yamada, Hideki Kandori, and Yasuhisa Mizutani, *J. Phys. Chem. B*, 113, 12121-12128 (2009). 査読有
DOI: 10.1021/jp904388w
8. "Photoinduced Electron Transfer in Glucose Oxidase: a Picosecond Time-resolved Ultraviolet Resonance Raman Study", Akiko Fujiwara and Yasuhisa Mizutani, *J. Raman Spectrosc.*, 39, 1600-1605 (2008). 査読有
DOI: 10.1002/jrs.2077
9. "Resonance Raman Observation of the Structural Dynamics of FixL on Ligand Recognition and Signaling", Yusuke Hiruma, Akihiro Kikuchi, Atsunari Tanaka, Yoshitsugu Shiro, and Yasuhisa Mizutani, *Biochemistry*, 46, 6086-6096 (2007). 査読有
DOI: 10.1021/bi062083n
10. "Primary protein response after ligand photodissociation in carbonmonoxy myoglobin", Akira Sato, Ying Gao, Teizo Kitagawa, and Yasuhisa Mizutani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 9627-9632 (2007). 査読有
DOI: 10.1073/pnas.0611560104

[学会発表] (計 73 件)

1. "Watching energy flow in heme proteins", Yasuhisa Mizutani, Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics, August 1-5, 2011, Telluride, Colorado, USA. 招待講演
2. "Protein dynamics of photosensory proteins as studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy", Yasuhisa Mizutani, The 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, July 30-August 1, 2011, 奈良県立新公会堂. 招待講演
3. "Elucidation of ultrafast protein dynamics by picosecond time-resolved visible and ultraviolet resonance Raman spectroscopy", Yasuhisa Mizutani, Pacificchem 2010, December 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA. 招待講演
4. "Protein dynamics of sensory proteins as studied by time-resolved resonance Raman spectroscopy", Yasuhisa Mizutani, Pacificchem 2010, December 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA. 招待講演
5. "Primary Protein Responses to Chromophore Isomerization of Photosensory Proteins", Yasuhisa Mizutani, 22nd International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS 2010), August 8-13, 2010, Boston, USA. 招待講演

6. "Primary protein responses to chromophore isomerization: picosecond time-resolved resonance Raman studies", Yasuhisa Mizutani, The 6th Asian Conference on Ultrafast Phenomena, January 10-13, 2010, Taipei. 招待講演
7. "Ultrafast protein response to photodissociation and photoisomerization: Myoglobin and bacteriorhodopsin", Yasuhisa Mizutani, 3e cycle lecture tour in Switzerland: Protein dynamics and function, Universität Basel, October 14, 2009. 招待講演
8. "Hemoglobin allostery: dynamics and function", Yasuhisa Mizutani, 28th Annual Pittsburgh Conference Lectures, April 16, 2008, University of Pittsburgh, USA. 招待講演

[図書] (計 1 件)

1. 「みず学への誘い」, 大阪大学出版社, 水谷泰久, 88-97 (2008) 総ページ数 300.

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 泰久 (MIZUTANI YASUHISA)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：60270469

(2) 研究分担者

石川 春人 (ISHIKAWA HARUTO)
大阪大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：40551338

水野 操 (MIZUNO MISAO)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10464257