

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：60 270469

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. 研究計画の概要

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。

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。このようなユニークな実験データは、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。

### 2. 研究の進捗状況

(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。

#### (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、生理的なり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極めて困難であるためである。本研究課題では、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困難を克服し、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。さらに、ヘモグロビンのサブユニットに構造が似たミオグロビンについてもリガンド脱離に伴うタンパク質の初期構造変化を明らかにした。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。

#### (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 FixL および 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。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

新たに製作した時間分解共鳴ラマン分光システムは順調に稼働している。また、本研究課題において、遺伝子組換え、組換えタンパク質の発現・精製のための実験機器を整備することができ、ひとつの研究室内で、タンパク質試料の大量調製（人工変異体の作成を含む）、時間分解スペクトル測定が一貫して行えるようになった。このおかげで、これまで困難であった、いくつかの不安定なタンパク質試料のスペクトル測定が可能になった。これらスペクトルデータを基に、アロステリック機構の解明に進んでいる。また、本領域内の他の研究グループとの共同研究によって、光センサータンパク質およびチャンネルタンパク質に関する研究も新しく始まっている。

### 4. 今後の研究の推進方策

ヘムタンパク質を中心としたこれまでの研究をさらに進展させると同時に、共同研究も積極的に進めていく。センサータンパク質以外にも、イオンポンプ、イオンチャンネルなどの物質輸送に係わる膜タンパク質に関する構造ダイナミクス研究を新しく推進する。

### 5. 代表的な研究成果

(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 12 件)

1. "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

2. "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

3. "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

4. "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

[学会発表] (計 51 件)

1. "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

2. "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)

[その他]

ホームページ

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