

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657107

研究課題名(和文)蛋白質の速い揺らぎの検出と動的アロステリック効果の解明

研究課題名(英文)Vibrational coherence investigation of protein fluctuations for dynamic allostery

研究代表者

久保 稔(Kubo, Minoru)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：90392878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は振動コヒーレンス分光法を用いて、ヘモグロビン(Hb)のヘムの揺らぎと酸素親和性との相関を明らかにすることを目的とした。heterotropicエフェクターにより酸素親和性を変えた5種のdeoxyHbを用いて、低振動コヒーレンス($\sim 200\text{ cm}^{-1}$ 以下)の位相緩和時間(振動バンド幅)を比較した結果、ヘムの揺らぎは酸素親和性と相関がないことが明らかとなった。一方、Fe-His伸縮振動の振動数が酸素親和性と相関があることが確認された。したがって本研究は、Perutzモデルを支持した。ただし、本研究で観測対象でなかったO₂チャンネルの揺らぎと酸素親和性との相関は、今後検証されるべき課題であろう。

研究成果の概要(英文)：Vibrational coherence spectroscopy was applied to study the correlation between fluctuation of heme and its O₂ affinity in hemoglobin (Hb). Damping times of low-frequency coherences ($<200\text{ cm}^{-1}$) of heme, including doming mode coherence, were compared between 5 deoxyHbs with different O₂ affinities, regulated by heterotropic effectors. The results showed that the damping times were not correlated with the O₂ affinities. Instead, it was confirmed that the Fe-His stretching frequencies were correlated with the O₂ affinities. Thus, this study supports Perutz model for the Hb function, although the role of fluctuation of the O₂ channel remains to be examined.

研究分野：生物物理学

キーワード：揺らぎ 振動コヒーレンス ヘモグロビン タンパク質 低振動 フェムト秒レーザー

1. 研究開始当初の背景

本研究は、タンパク質のアロステリック効果のメカニズムを明らかにすることを目指して開始した。アロステリック効果とは、活性部位の反応が、それとは離れた部位(アロステリック部位)へのエフェクター結合によって調節される効果である。この効果は、ほとんどすべてのタンパク質が備えている物性であり、この効果を利用することで、タンパク質はドメイン構造をとり、複雑な機能を実現している。

各論として、アロステリック効果のメカニズムがよく研究されているタンパク質の一つに、ヘモグロビン(Hb)がある。Hbは血液中で酸素分子(O_2)を運搬するヘムタンパク質である。 α サブユニットと β サブユニットと呼ばれる2種類のサブユニットそれぞれ2つから構成される四量体であり、各サブユニットはヘムを一つ含む。ヘムはHis残基(第五配位座)を通して蛋白部分と結合しており、酸素分子はその反対側(第六配位座)に結合する(O_2 Fe His)。Hbでは、あるサブユニットのヘムに酸素分子が結合すると、他のサブユニットのヘムの酸素親和性が上昇する。

このアロステリック効果は、Perutzモデルでよく説明される[1]。Perutzモデルでは、Hisがヘム鉄を強く引っ張れば酸素親和性が低下し(Tense状態、T状態)、その張力が弱まれば酸素親和性が上昇する(Relaxed状態、R状態)。ポイントは、あるサブユニットでの酸素分子の結合が、隣のサブユニットのHisの張力をいかに調節しうるかである。Perutzはこれを四次構造変化で説明した。T状態では、強いサブユニット間結合が、結果としてHisの張力を生み出す。

一方、各種 heterotropic エフェクターの作用を比較した最近の研究では、四次構造変化よりも寧ろ、揺らぎが酸素親和性を制御していることが示唆されている[2,3]。凝縮相の化学では、反応が環境場の揺らぎの影響を受けることは一般的によく知られており、エフェクター分子がヘムポケットや O_2 チャネルの揺らぎを変化させることで、酸素親和性をアロステリック調節している可能性は十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、振動分光法(共鳴ラマン分光法、及び振動コヒーレンス分光法[4,5])を用いて、Hb Aをモデルに、ヘムの揺らぎと酸素親和性(機能)との相関を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、酸素親和性を変化させた5種の条件でdeoxyHbのヘム低振動($\sim 200\text{ cm}^{-1}$ 以下)を観測し、振動バンドの幅から揺らぎを評価・比較する。5種の条件とは、(1) Stripped, (2) +Cl, (3) +Cl and +BZF

(bezafibrate), (4) +Cl and +IHP (inositol hexaphosphate), (5) +Cl, +BZF, and +IHPである(いずれもpH7)。Cl, BZF, IHPはアロステリック・エフェクターであり、これらの添加によって酸素親和性は大きく変化する[6]。

本研究では、Fe-His結合の伸縮振動($\sim 220\text{ cm}^{-1}$)およびヘムのドーミング振動($\sim 50\text{ cm}^{-1}$) [4,5,7]に注目する。いずれも酸素結合サイトであるヘム鉄の変位が関与する振動である。

4. 研究成果

まずは酸素親和性が異なる5種のdeoxyHbの共鳴ラマンスペクトルを442 nm励起条件で測定し、Fe-His伸縮振動の振動数を比較した。Fe-His伸縮振動の振動数は、蛋白部分からヘム鉄にかかる張力を反映し、酸素親和性と相関があることが知られている[8]。その相関は、本研究対象の5種のdeoxyHbについても確認された。ただし、5種の間のFe-His伸縮振動の振動数差は 1 cm^{-1} 程度と非常に小さなものであり、 $N=4$ のデータセットの統計値を用いて初めて信頼性の高い比較が可能であった。

また、5種のdeoxyHbのFe-His伸縮振動のバンド形を詳細に比較すると、バンドの低振動数側(α サブユニット由来の信号)と高振動数側(β サブユニット由来の信号)とで異なる挙動を示すことが示唆された。しかし、 α サブユニット由来の信号と β サブユニット由来の信号は互いに近接しており、それらを分割するfitting解析は困難であった。

次に435 nm共鳴条件で、5種のdeoxyHbの低振動コヒーレンスを測定した。分子にフェムト秒パルスを照射すると、振動状態のコヒーレンス(複数の振動固有状態の重ね合わせの状態)が生成される。それを時間領域で観測し、フーリエ変換もしくはfitting解析(LPSVD解析)をすることで、振動スペクトルを得ることができる。振動コヒーレンスは、揺らぎによってピコ秒で消失するので(位相緩和)、その位相緩和時間から揺らぎを評価することが可能である(これは振動バンド幅を用いた評価と等価である)。振動コヒーレンス分光法の利点は、共鳴ラマン分光法と異なり、 200 cm^{-1} 以下の低振動が観測可能な点である。

ヘムの低振動コヒーレンスは、5種のいずれのdeoxyHbにおいても、 $\sim 47\text{ cm}^{-1}$ 、 $\sim 92\text{ cm}^{-1}$ 、 $\sim 160\text{ cm}^{-1}$ 、 $\sim 211\text{ cm}^{-1}$ から成っていた(ただし、使用したフェムト秒レーザーの関係で、高波数になるほど波数誤差が大きい)。 $\sim 47\text{ cm}^{-1}$ のモードがヘムのドーミング振動である。5種のdeoxyHbで、このモードの位相緩和時間と酸素親和性(MWCパラメータの K_T)との相関を調べた結果、それらの間に明瞭な相関は認められなかった。また、その他のモードについても結果は同様であった。

したがって本研究から、少なくともヘムにおける揺らぎは酸素親和性と相関がないことが明らかとなった。一方、前述のように、heterotropic エフェクターの作用においても、Fe-His 伸縮振動の振動数が酸素親和性と相関を示すことが明らかとなった。この結果は Perutz モデルを支持するものである。ただし、本研究はヘムの揺らぎを観測したものであり、O₂ チャネルの揺らぎは観測対象となっていない。O₂ チャネルの揺らぎと酸素親和性との相関は、今後実験的に検証されるべき課題であろう。

<参考文献>

- [1] Perutz, M. F. Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide. (1990) *Annu. Rev. Physiol.* 52, 1-25.
 - [2] Yonetani, T., Kanaori, K. How does hemoglobin generate such diverse functionality of physiological relevance? (2013) *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1873-1884.
 - [3] Yonetani, T., Laberge, M. Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1146-1158.
 - [4] Zhu, L. Sage, J. T., Champion, P. M. Observation of coherent reaction dynamics in heme proteins. (1994) *Science* 266, 629-632.
 - [5] Kubo, M., Gruia, F., Benabbas, A., Barabanschikov, A., Montfort, W. R., Maes, E. M., Champion, P. M. Low frequency mode activity of heme: Femtosecond coherence spectroscopy of iron porphyrin halides and nitroprophyrin. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 130, 9800-9811.
 - [6] Yonetani, T., Park, S. Tsuneshige, A., Imai, K., Kanaori, K. Global allostery model of hemoglobin: cooperativity, and Bohr effect by heterotropic allosteric effectors. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 34508-34520.
 - [7] Klug, D. D., Zgierski, M. Z., Tse, J. S., Liu, Z., Kincaid, J. R., Czarnecki, K., Hemley, R. J. Doming modes and dynamics of model heme compounds. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12526-12530.
 - [8] Matsukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y., Kitagawa, T. Correlation between the iron-histidine stretching frequencies and oxygen affinity of hemoglobins. A continuous strain model. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 1108-1113.
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 2 件)
- [1] Kubo, M., Okuyama, O., Kitagawa, T., Shigeta, Y. DFT analysis of low-frequency heme vibrations in soluble guanylate cyclase: Raman mode enhancement by propionate-protein interactions. (2012) *Chem. Lett.* Vol. 41, 860-862. doi:10.1246/cl.2012.860
 - [2] El-Mashtoly, S. F., Kubo, M., Gu, Y., Sawai, H., Nakashima, S., Ogura, T., Aono, S., Kitagawa, T. Site-specific protein dynamics in communication pathway from sensor to signaling domain of oxygen sensor protein, HemAT-Bs: Time-resolved ultraviolet resonance Raman study. (2012) *J. Biol. Chem.* Vol. 287, 19973-19984. doi: 10.1074/jbc.M112.357855
- [学会発表](計 3 件)
- [1] 久保 稔 X線結晶構造解析と振動分光法の併用によるタンパク質の動的精密構造解析 .大阪大学蛋白質研究所セミナー “結晶構造を併用したハイブリッド構造研究の最前線”, 大阪大学蛋白質研究所(大阪府・吹田市), 2014年2月8日(招待講演).
 - [2] 久保 稔 蛋白質水溶液を扱える高感度赤外分光装置の開発: 酵素反応の生理条件下での測定を目指して .第36回溶液化学シンポジウム プレシンポジウム, 北海道大学(北海道・札幌市), 2013年10月8日(招待講演).
 - [3] 久保 稔 酵素反応の観測を可能にする振動分光技術の開発と展望 .第13回日本蛋白質科学会年会, ワークショップ “蛋白質機能を化学的に理解するために”, とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市), 2013年6月12日(招待講演).
- [図書](計 0 件)
- [産業財産権]
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)
- [その他]
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者
久保 稔(KUBO, Minoru)
理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員
研究者番号: 90392878

(2)研究協力者

長友 重紀 (NAGATOMO, Shigenori)

筑波大学・数理物質系化学域・講師

研究者番号：80373190