

ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法による タンパク質高次構造変化の観測



研究ノート

水谷 泰久*

Observation of changes in higher-order protein structure

by picosecond time-resolved ultraviolet resonance Raman spectroscopy

Key Words : Raman spectroscopy, time-resolved spectroscopy, protein dynamics

1. はじめに

タンパク質機能発現の分子機構を解明するには分子結合スケールでの構造情報が必須である。ラマン分光法は分子結合スケールでの構造情報を与える。特にプローブ波長を適切に選ぶと共鳴ラマン効果によって、分子量の大きなタンパク質であっても部位特異的な構造情報を得ることができる。例えばヘムタンパク質の場合、プローブ波長を400nm付近にとるとヘムの共鳴ラマンスペクトルを、また200nm付近にとると芳香族アミノ酸残基や骨格のペプチド結合の共鳴ラマンスペクトルを観測でき、さらに、時間分解測定を行うことによって、動的な構造情報を得ることができる。ピコ秒可視パルスを使った時間分解共鳴ラマン測定は、われわれのグループを含めいくつかのグループによって方法論はほぼ確立された。これに対して、ピコ秒紫外パルスを使った時間分解共鳴ラマン分光法は技術的にいまだ未開拓であり方法論の確立を要する。本稿では、われわれが開発したピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置とそれをを用いた研究例を紹介する。

および再生増幅器で構成されるレーザーシステムの出力を基に、第二高調波(波長390-405nm)を発生させた。これをポンプ光発生用と紫外プローブ光発生用とに分割した。後者の光をメタンガスもしくは水素ガスを封入したラマンシフターに集光し、誘導ラマン散乱を発生させた。この後、(1)1次ストークスラマン散乱光の第二高調波発生、(2)1次のストークスラマン散乱光とレーザー光の第二高調波との和周波発生の二通りの方法により、204-244nmの範囲で連続的に波長可変なピコ秒の紫外プローブ光を発生させた。この広範囲の波長可変性は、共鳴効果を活用した部位選択的な観測が可能となる点でタンパク質の測定にはきわめて有効である。得られた紫外プローブ光の線幅は 16cm^{-1} であった。また、誘導ラマン効果、光パラメトリック効果を組み合わせることによって、390-610nmの広い範囲内で連続波長可変なポンプ光光源を製作した。ポンプ光の波長が広い範囲で連続波長可変であるため、広範な色素タンパク質を対象とすることができる。ポンプ光およびプローブ光はダイクロイックミラーを使って同軸上に重ね合わせ、球面レンズおよびシリ

2. 装置の構成と性能評価

図1に製作したピコ秒紫外共鳴ラマン分光装置の概略を示す。モード同期チタンサファイアレーザー

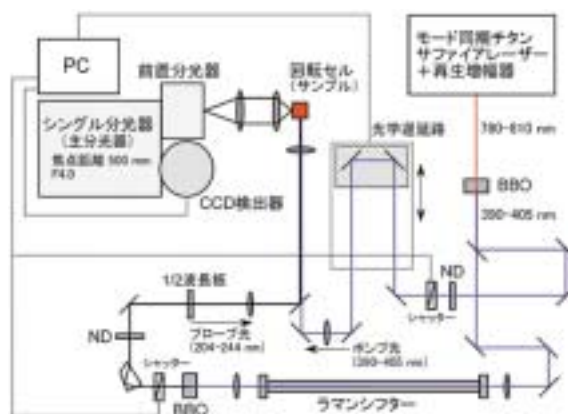


図1 ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光装置の概略



* Yasuhisa MIZUTANI
1964年3月生
1992年総合研究大学院大学数物科学研究科機能分子科学専攻修了
現在、大阪大学、大学院理学研究科化学専攻、教授、博士(理学)、生物物理化学
TEL 06-6850-5776
FAX 06-6850-5785
E-mail : mizutani@ch.wani.osaka-u.ac.jp

ンドリカルレンズを使って、 $200\ \mu\text{m} \times 5\ \text{mm}$ の形状で試料に照射した。試料は肉厚 $0.5\ \text{mm}$ の石英セルに入れ、これを自作のセルホルダーに取り付け、高速に回転させながら紫外共鳴ラマン測定を行った。試料セルを高速に回転させることで紫外パルス光による試料の損傷を大幅に抑えることができた。紫外プローブ光と可視ポンプ光との相互相関幅は $2.3\ \text{ps}$ であった。

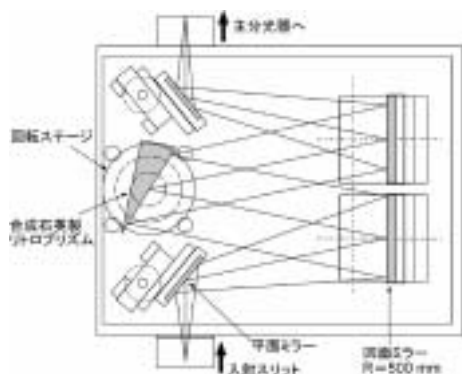


図2 製作したプリズム型前置分光器

タンパク質試料に紫外共鳴ラマン分光法を応用する場合、分子量が大きいことによる強いレーリー散乱光やトリプトファンの蛍光が、測定上大きな問題となる。これら迷光を効率的に除去するフィルターとして働くプリズム型前置分光器を製作し、CCD検出器を装着した主分光器前段に設置した。図2にその概略を示す。入射光は凹面鏡で平行化された後に、リトロプリズムで分散され、主分光器の入射スリットに再び集光される。ここでラマン散乱光のみ主分光器入射スリットを通過し、レーリー散乱光と可視域の蛍光は入射スリットに遮られるように、この位置での分散を定めてある。前置分光器のフィルターとしての性能を評価するために、主分光器の入射スリット幅を変えて、ヘモグロビン(HbA)の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した結果を図3に示す。(a)にみられるレーリー散乱による高いバックグラウンドが、スリット幅を狭めた(b)では著しく低減されていることがわかる。本前置分光器によって、タンパク質を測定対象とする場合でもレーリー散乱の妨害を受けずに質の良い共鳴ラマンスペクトルを測定できることが確かめられた。

3. リガンド脱離に伴うミオグロビンの構造ダイナミクス

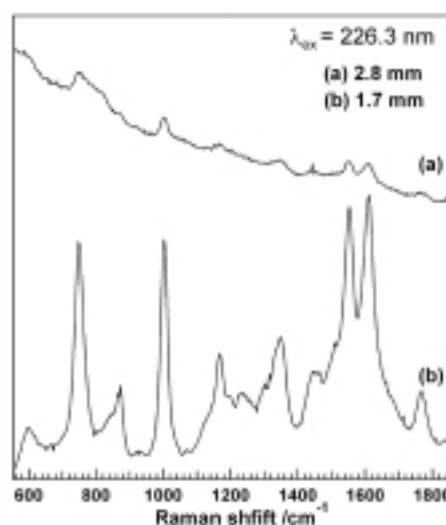


図3 ヘモグロビンの紫外共鳴ラマンスペクトル
(a) 主分光器スリット幅: $2.8\ \text{mm}$,
(b) 主分光器スリット幅: $1.7\ \text{mm}$

ヘモグロビンはリガンドの脱着に伴い、大きな構造変化を起こし、それがリガンド親和性に協同性を生み出している。本研究では、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を用い、新たに製作したピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置を使って、タンパク質の構造変化をとらえることを試みた。

製作した装置を用いて得られた、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを図4に示す。トリプトファン残基に由来するW3, W16, W18バンドとチロシン残基に由来するY8aバンドにおいて、ピ

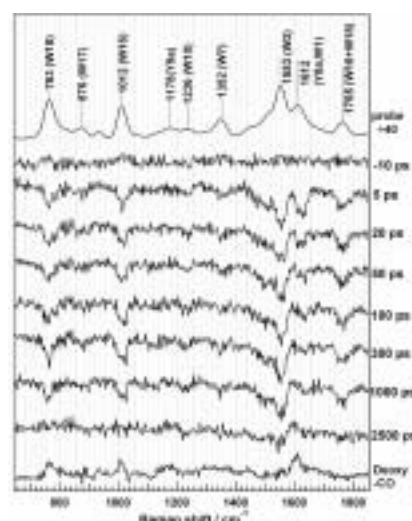


図4 一酸化炭素光解離ミオグロビンのピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。最上段および最下段のスペクトルはそれぞれCO結合形Mbのスペクトルおよびデオキシ形ミオグロビンと一酸化炭素結合形ミオグロビンの間の差スペクトルを示す

コ秒から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ピコ秒でトリプトファンとチロシンのラマンバンドは強度減少を示し、続いて300ピコ秒程度でY8aバンドの強度が回復した。トリプトファンのラマン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。

ウマミオグロピンはトリプトファンとチロシンを2残基ずつ含み、Trp7とTrp14はAヘリックスに、Tyr103とTyr146はそれぞれGおよびHヘリックスに存在する。Tyr103はCO結合形とデオキシ形の両状態において表面に露出する一方、Tyr146の側鎖はFGコーナーに位置し、近位ヒスチジン(His93)における主鎖のカルボニル基と水素結合している(図5(A))。時間分解可視共鳴ラマン測定の結果によるとヘムの構造変化はCO解離後2ピコ秒以内に完了する。ヘムの構造変化はHis93を介してFヘリックスの変位を誘起する。したがって5ピコ秒でのY8aバンドの強度減少は、Fヘリックスの速やかな変位がTyr146とHis93間の水素結合に影響するためと解釈できる。

トリプトファンは両残基ともAとEヘリックスの接触部位に位置する。Trp7はタンパク表面付近に存在する一方、Trp14はEヘリックス上の疎水性側鎖群に近接する(図5(B))。トリプトファンバンドの強度減少は周囲の環境における疎水性の低下に起因し、AとEヘリックス間の相対的距離の変化を

反映すると考えられる。CO結合形とデオキシ形のX線立体構造の比較から、COの解離によりFヘリックスが変位するだけではなくEヘリックスのヘム方向への変位も起こることが報告されている。立体構造から推測されるCO解離後の構造変化とトリプトファン周囲における疎水性の低下を考慮すると、5ピコ秒でのトリプトファンバンド強度の減少は、Eヘリックスの変位によってAとEヘリックス間における間隙が開くことを反映していると解釈できる。これに対しナノ秒におけるトリプトファンバンドの強度回復は、Aヘリックスがヘムの方向へ移動し、Eヘリックスとの距離が再び狭まることを示唆する。トリプトファンとチロシンのバンド強度の減少はCO解離後5ピコ秒以内でFとEヘリックスが速やかに変位することを示すが、これはヘムの構造変化にともないFとEヘリックスが単一の構造体として、5ピコ秒以内の時間で運動して動くことを意味する。

4. まとめ

以上のように、ピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光法を用いることによって、タンパク質で起きる速い構造変化を明らかにすることができた。ピコ秒の時間分解能でタンパク質の構造ダイナミクスを部位特異的に観測できるという利点は、タンパク質の立体構造研究に広く用いられているX線回折法やNMR法にはない、紫外共鳴ラマン分光法の特色である。現在われわれは、この手法を用いて、ここで報告した2種類のタンパク質以外にも種々のヘムタンパク質および光センサータンパク質の構造ダイナミクスについて研究を開始している。タンパク質の構造変化に見られる共通性、特異性を明らかにすることで、「構造変化がタンパク質の機能をどのようにして生み出すか」という問題を理解したいと考えている。

参考文献

1. " Picosecond Protein Dynamics of Myoglobin upon Ligand Dissociation Studied by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy ", Akira Sato and Yasuhisa Mizutani, *Biochemistry*, 44, 14709-14714 (2005).

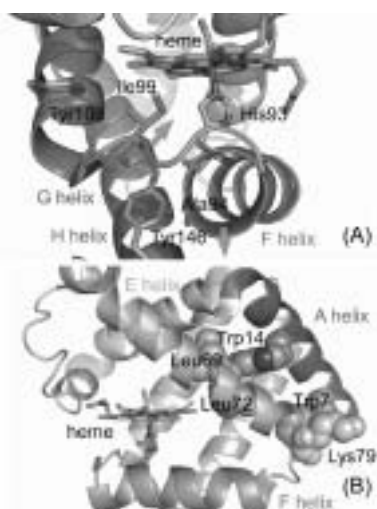


図4 ミオグロビンの立体構造
(A) チロシン残基周辺の拡大図
(B) トリプトファン残基周辺の拡大図