# 機能に関係したタンパク質の構造揺らぎ

神戸大学 分子フォトサイエンス研究センター 水谷泰久*

## 1．われわれの見方と立場

タンパク質で起きる酵素反応においては、活性部位が反応の触媒として働いていると同時に、その残りの部分は媒質として酵素反応が生理的に期待される方向へ起こるよう助けている。タンパク質で起きる酵素反応を液相における化学反応として捉えた場合、媒質としてのタンパク質は反応部位を取り巻く「溶媒」と考えることができよう。タンパク質で起きる化学反応（酵素反応）の特徴を理解するうえで、その媒質としての動的な性質（溶媒効果）を調べることは非常に重要である。このように液相のダイナミクスとパラレルな見方でタンパク質のダイナミクスを理解しようというのがわれわれのアプローチである。タンパク質は反応の前後で反応部位を安定化するように構造変化を起こすが、これは液体のダイナミクスの言葉を用いると、溶媒和の再配向にあたるものである。このようなはっきりとした向きをもった構造遷移と同時に、ランダムな構造遷移（揺らぎ）のダイナミクスが存在する。タンパク質はそのエネルギーポテンシャル面に多くのローカルミニマムを持ち、これに対応したconformational substate (cs)が存在する。これもやはり液体のダイナミクスの言葉を用いると、溶媒和の揺らぎにあたるものである。タンパク質はcsの間で絶えず熱的に揺らいでおり、その階層的なポテンシャル構造はフェムト秒から秒、サブオングストロームから数十オングストロームにわたる非常に幅広い揺らぎを生み出している。溶媒和やその揺らぎは液相に共通した問題であるが、タンパク質においては幅広い時間・空間スケールを持つという点でそれが特徴的に現れている。タンパク質のそのような運動には2種類のタイプの性質が考えられる。ひとつは速い時間領域で見られるモード的な運動であり、その変位はタンパク全体に広がっている。もうひとつは拡散的（ブラウン運動）な運動で、比較的局所的なもの（アミノ酸側鎖の向きを変える運動など）である。これはモード的な運動が崩れてしまった後の遅い時間領域に見られる。運動性の同様の区分けは液体についても考えられているが、タンパク質の場合各原子が共有結合でつながっているため、モード的な運動が液体の場合に比べより強く現れると予想される。

表1. タンパク質の運動

| 時間領域 | 性質 | 表現 | 相関関数 | 空間的広がり | イメージ |
|---|---|---|---|---|---|
| 速い | モード的 | 基準振動 | ガウス型 | タンパク全体 | ばねと球 |
| 遅い | 拡散的 | FP方程式 | 指数関数型 | 1アミノ酸残基程度 | 霞 |

* 電子メール, mizutani@kobe-u.ac.jp; ウェブページ, http://www.chem.sci.kobe-u.ac.jp/~mizutani/

これらのタンパク質の運動を理解することは、凝縮相の分子科学の展開における重要な課題といえる。そこでわれわれは上に述べた次の3種類のダイナミクスについて研究を行っている。

- タンパク質の構造緩和(応答) ⇔ 溶媒和の再配向
- タンパク質の揺らぎ(動的不均一性) ⇔ 溶媒和の揺らぎ
- タンパク質の振動エネルギー緩和(動きの非調和性) ⇔ 溶媒中のエネルギー散逸

溶液に比べタンパク質の場合、上記の3つの問題に対してアプローチしやすい利点がある。例えば、タンパク質の場合、X線結晶構造解析によって静的構造、すなわち「溶媒」の静的な分布関数がはっきりとわかっている事が多い。また、そのような構造は人工的なアミノ酸置換によって改変できる。

われわれは上に書いたような問題意識から最も基本的なヘムタンパク質であるミオグロビンのダイナミクスについて研究を行っている。ヘムタンパク質とは、ヘム(鉄ポルフィリン錯体の一種)を補欠分子として持つタンパク質の総称であるが、その中でもミオグロビンは構造が単純でありこれまでに最もよく研究されてきたタンパク質である(これをもってヘムタンパク質における「水素分子」という人もいる)。ミオグロビンは約150個のアミノ酸からなるポリペプチド鎖に1個のヘムを含んでいる。ヘムはヒスチジン残基を通してタンパク部分と結合しており、その反対側に酸素($O_2$)、一酸化炭素(CO)、一酸化窒素(NO)などのリガンドが結合する。ミオグロビンの場合、活性部位とその周りをとりまくタンパクとは比較的独立しており、「ヘムという溶質がタンパクという溶媒に溶けている」という見方から研究を進めるのに向いている。われわれはミオグロビンのダイナミクスを調べるために、ヘムに結合したリガンドの光解離反応を利用している。リガンドが結合した状態では、ヘムはほぼ平面構造を持っており、鉄原子も平面内にいる。これに対して、リガンドが結合していない状態ではヘムはややドーム形に変形し、鉄原子も平面からヒスチジン方向へずれる。上にあげたリガンドは可視光により光解離するが、光解離後このような構造変化はサブピコ秒でほぼ完了していることがわれわれの研究によって明らかになっている[1]。したがってヘムの変化はタンパク部分に対してステップ関数的な摂動を与える。このこともわれわれがミオグロビンを対象として選んでいる理由の一つである。すなわち、立ち上がりのだらだらとした摂動では、タンパク質の速い応答を調べることはできない。ヘムが時間的にシャープな摂動を与えるということはタンパクのダイナミクスを調べる上で重要な利点なのである。このようタンパク質の動きはタンパク質の機能の点でも意味を持っている。例えば、リガンド脱着によって誘起された一連のタンパク構造の変化はヘモグロビンの協同性を生み出す上で重要な役割を果たしていることが知られている[2]。タンパク質の研究では、いろいろなタンパク質を調べ、その共通する点、しない点を分類・整理することでタンパク質を理解するというアプローチもあるだろう。しかし、われわれは最も基本的な分子を徹底的に調べることによってタンパク質を理解するという立場でミオグロビンの研究を行っている。

われわれは実験手法として時間分解共鳴ラマン(time-resolved resonance Raman, TR³)分光法を用いて

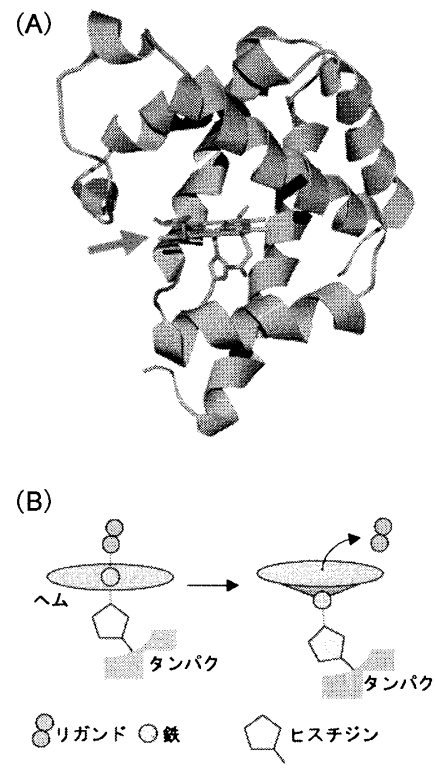



図1. (A)ミオグロビンの立体構造。矢印の部分が鉄ポルフィリン(ヘム)。下側に見える5員環がヒスチジンのイミダゾール環でその窒素原子が鉄に配位している。そのトランス位に O2, CO, NO などが結合する。(B)ヘム近傍の模式図。リガンドが結合した状態では、ヘムはほぼ平面構造を持っており、鉄原子も平面内にいて、低スピン状態をとる。これに対して、リガンドが結合していない状態(deoxy 形とよぶ)ではヘムはややドーム形に変形し、鉄原子も高スピン状態をとって近位ヒスチジン方向へずれる。

いる。その利点をあげると、TR³分光法の特徴・利点は、

- ラマン分光法は主に振動遷移をみるものであり，そのため分子構造について詳細な情報を与える。一般に、液相中では電子吸収スペクトルや蛍光スペクトルは、線幅が広くなり、振動モードごとの情報を取り出すことは非常に難しい
- タンパク質のような複雑な分子であっても共鳴効果によって選択的にある部分をプローブすることができる。同様に溶媒によるラマン散乱の影響をあまり受けずにすむ(赤外分光では水溶液の場合水の強い吸収による妨害が大きい)。
- ラマン分光法の場合、広い振動数領域が観測可能であるということ(赤外分光で広い振動数領域(300-3000 $cm^{-1}$)を測定することは困難である)。
- ラマン散乱には振動量子数が増える向きの遷移に対応するストークス散乱と振動量子数が減る向きの遷移に対応するアンチストークス散乱の2種類がある。アンチストークス散乱は振動励起状態からのみ生じるため、振動励起状態の選択的なプローブとなる。たとえば、アンチストークス/ストークスバンド強度比より振動温度を求めることができる。

などがあげられる。もちろん欠点もあり、

- 吸収や蛍光分光にくらべ感度が低い。
- 振動数分解能と時間分解能の限界はプローブ光のスペクトル幅とパルス幅で決まってしまう。

などがあげられる。しかし、タンパク質のダイナミクスを研究するうえでTR³分光法のもつ利点は重要であり、感度が低いことからくる実験上の困難さを考慮しても、その苦労の見返りは十分に大きいとわれわれは考えている。

ここでは、われわれの研究も含めたミオグロビンのダイナミクスについてこれまでの研究をまとめる。より詳しい内容は最近のわれわれの総説を参照していただきたい[3, 4]。

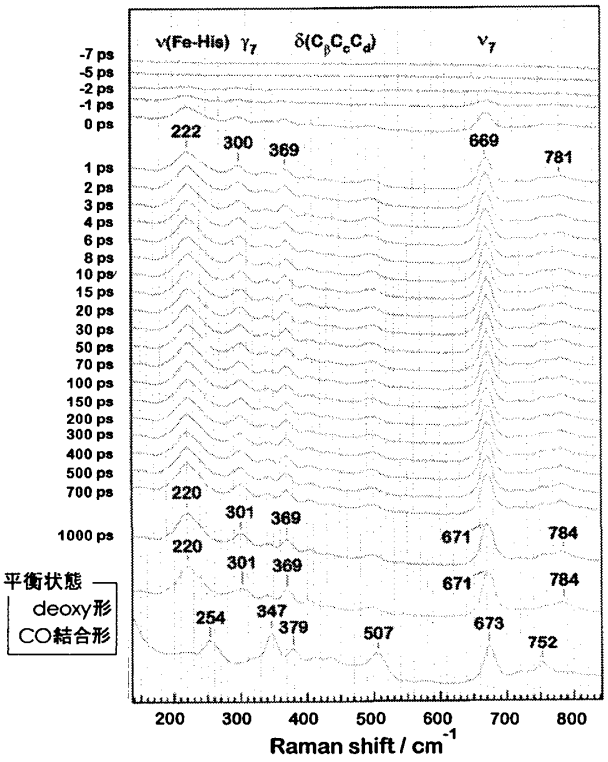
## 2．タンパク質の揺らぎ

揺らぎを検出するには主に、次の2種類の方法がある。

- 位相緩和を見る方法(非線形分光法、特にフォトンエコー)[5, 6]
- 非平衡な分布をつくり、その緩和を見る方法(ホールバーニング)[7, 8]

また、これ以外にも将来の可能性として、単一分子の実時間計測をあげることができる[9]。

ここでは、これまでに室温で観測されたミオグロビンの揺らぎについて紹介する。リガンドの脱着に関して重要な揺らぎとして次の2つが考えられる。ひとつはリガンドの通過経路における揺らぎであり、もうひとつは鉄原子のヘム平面からの変位に関する揺らぎである。



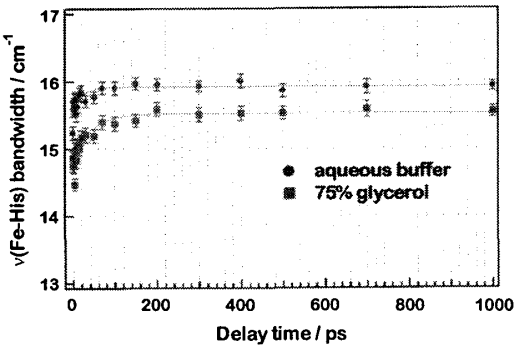




図2. (左)ミオグロビンの光解離後のストークス時間分解共鳴ラマンスペクトル。ポンプ光、プローブ光の波長はそれぞれ540 nm、442 nmで相互相関幅は2.3 ps。deoxy形とCO結合形の共鳴ラマンスペクトルを併せて示してある。

図3. (右)ミオグロビンのν(Fe-His)バンド幅の時間依存性。●印は50 mM Tris•HCl バッファー中での結果、■印はグリセロールを75%含んだバッファー中での結果を表す。

**リガンドの通過経路における揺らぎ**　Championのグループは、open form(リガンドが通り抜けやすい状態)とclosed form(リガンドが通り抜けにくい状態)の2つの状態を考慮することによって、リガンドの結合過程をうまくモデル化し、同時にこの2状態間の遷移速度について見積もった。彼らのエレガントかつ丁寧な研究については文献[10]にうまくまとめられている。彼らは速度論的にcsの非平衡な分布をつくり、それが$1.4\times10^6$ $s^{-1}$の速さで平衡な分布へ緩和することを見出した[8]。このことはリガンドの通過経路にマイクロ秒前後の揺らぎがあることを示している。

**鉄原子のヘム平面からの変位に関する揺らぎ**　鉄原子のヘム平面からの変位には非常に大きな不均一性があることが知られている[10, 11, 12, 13]。鉄原子のヘム平面からの変位はリガンドの結合速度に影響を及ぼすと考えられる(変位が小さいほど結合速度は速い)。われわれはCO光解離後1 nsまでのピコ秒時間分解共鳴ラマンスペクトルを測定し、ν(Fe-His)バンド形の変化に着目した。ν(Fe-His)バンドのバンド幅は、COの解離後10-20 psの時定数で1 $cm^{-1}$程度の広がりを示した。われわれはいまのところ、バンドの広がりは光解離後にできた鉄-ヒスチジン結合に関するcs間の非平衡な分布が緩和していく過程に対応しているのではないかと考えている。COが解離する前は、タンパクはCO結合形のポテンシャル面上でその細かなローカルミニマムに対応したcsの平衡分布を持つ。COの解離が起こるとこの分布は解離形のポテンシャル面上へ移されるが、タンパク質の動きに比べて解離は非常に早く起きるのでCO結合形のcs分布はそのまま解離形のポテンシャル面上へ投影されると考えられる。CO結合形のcsの平衡分布は解離形のポテンシャル面上においては平衡分布ではないので、この面上において新たな平衡分布に向かって緩和が起きると予想され、それがバンド幅の広がりとして観測されているのではないかと解釈している(図4)。

この他、低温(10 K-200 K)で揺らぎを観測した例があるが、ここでは文献をあげるにとどめる[14, 15]。

## 3．次の課題：構造揺らぎの側面から見たヘモグロビンの協同性の理解

タンパク質の媒質として重要な性質にアロステリック効果と協同性がある。これらの性質は「ある部位に構造変化が起こると、それがタンパク質内を伝播し別の部位の性質を変化させる」という考え方でしばしば説明されている。この場合想定されている構造変化の伝播は、ちょうどドミノ倒しのような機械的な硬いイメージをあたえるものであり、そこにはタンパク構造が動的に揺らぐという柔らかさの概念は入っていない。タンパク質の機能発現のメカニズムを真に理解するには、平均立体構造だけから議論するのではなく、むしろそれを土台にして、その平均構造を中心としてどのような構造揺らぎがあるのか、そしてそれがタンパク質でおきる反応（機能）とどのように係わっているのかを理解する必要がある。すなわち、「ある部位の構造変化がタンパク質内を伝播し、別の部位の構造揺らぎをどのように変化させるのか、そこに協同性はどのような形で現れてくるのか、またそれが機能とどのように関係しているか」というように構造揺らぎの観点からアロステリック効果や協同性を見直す必要がある。

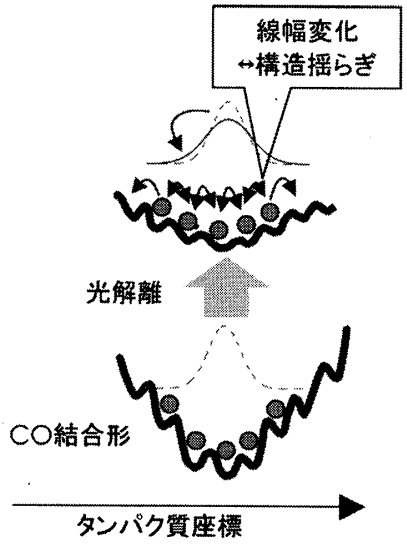



**図4．** 光解離に伴う非平衡分布の生成とその緩和。
曲線はそれぞれの状態のポテンシャル面、丸は分布を表す。

次の研究課題として、協同性の問題の典型として取り上げられてきたヘモグロビンについて、構造揺らぎがその機能にどのように係わっているかを調べようと考えている。ヘモグロビンは非常に荒っぽい言い方をすると、ミオグロビンが 4 つ会合したような四量体構造をとっている。したがって、ヘモグロビン 1 分子は 4 つのヘムをもっており、それぞれのヘムには酸素が 1 分子ずつ結合する。ヘモグロビンのヘモグロビンたるところは、それぞれのヘムが独立に酸素分子を付けたり離したりするのではなく、お互いに影響を及ぼしあっているところにある。ヘムグロビンのいずれかのヘムに酸素分子が結合すると、別のヘムの酸素親和性が増すのである。このため、ヘムグロビンに酸素分子がいったんつき始めるとますますついていくし、逆に離れ始めるとますます離れて行く。このような性質はヘモグロビンが血液中で酸素運搬体として働くうえで極めて重要な性質である（酸素運搬体として働くには肺でできるだけたくさん酸素を取り込み、末端組織でできるだけたくさん離さなければならない）。すなわち、「ヘモグロビン＝ミオグロビン×4」ではなく「ヘモグロビン＝ミオグロビン×4＋α」であって、このαにあたる分子機構（協同性）を知ろうと多くの研究者ががんばっている。

ヘモグロビンの協同性の説明には、MWC モデルをベースとし、酸素親和性の低い T 構造と酸素親和性の高い R 構造の二状態を考える Perutz のモデルがよく知られている。このモデルは「タンパク質からの張力が鉄－ヒスチジン（Fe-His）結合を通してヘムにかかり、それが鉄原子をヘム平面に対してずらすことによってヘムとの酸素親和性がコントロールされている、またそのような張力はサブユニット界面を通して隣のサブユニットに伝わる」という仮説のもと、ヘモグロビンの協同性を非常にうまく説明した（図5）。しかし、このモデルは本質的に静的な平均構造に関するものであり、そこには構造揺らぎの概念は入っていない。一方で前述のように、鉄－ヒスチジン部分の構造には大きな不均一性があることがいくつかの研究から示唆されている。このような不均一な構造間の揺らぎが酸素分子などリガンドの結合と速度的に拮抗する場合、揺らぎはリガンドの結合過程に大きな影響を与える。この影響は平均構造のみをもとにした考察からは決して予想できないものである。さらに、平均構造と同様このような揺らぎの様子も、T 構造と R 構造とで協同的に変化している可能性がある。とすれば、ヘモグロビンの協同性は静的および動的構造の両面から生み出されていることになる。このような考察を踏まえ、ヘモグロビンの機能に関係した構造揺らぎを時間分

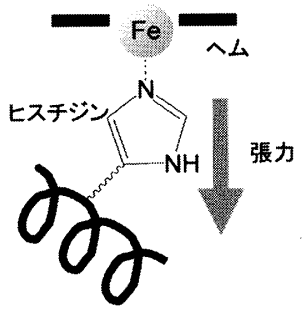



**図5．** Perutz の張力モデル。
太い横棒はヘム平面を横から見た様子を表す。

解振動分光法によって直接捉え、協同性発現のメカニズムを揺らぎの観点から再検討するということが次の課題である。

**謝辞**　本稿で述べたわれわれの研究結果は、すべて岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター、北川禎三教授との共同研究の成果である。また、液体およびタンパク質の超高速現象の問題に目を向けるきっかけは、著者のポスドク時代のボスである米国・ペンシルバニア大学、Robin M. Hochstrasser教授による。共鳴ラマン分光とヘムタンパク質の面白さを教えてくださった北川教授と、超高速分光の面白さを教えてくださったHochstrasser教授に深く感謝する。

## 参考文献

[1] Mizutani and Kitagawa, Science **278**, 443 (1997).
[2] 例えば、L. Stryer, *Biochmistry*, forth ed. Chapter 7 (W. H. Freeman, New York, 1995).
[3] 北川禎三、水谷泰久、「ヘムタンパク質の超高速ダイナミクス」、超高速化学ダイナミクス（季刊化学総説No.43）、寺嶋正秀、山内薫編、学会出版センター、162 (2000).
[4] Mizutani and Kitagawa, The Chemical Record **1**, 258 (2001).
[5] C. W. Rella, A. Kwok, K. Rector, J. R. Hill, H. A. Schwettman, D. D. Dlott, and M. D. Fayer, Phys. Rev. Lett. **77**, 1648 (1996).
[6] M. Lim, P. Hamm, and R. M. Hochstrasser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 15315 (1998).
[7] Y. Shibata, A. Kurita, and T. Kushida, Biochemistry **38**, 1789 (1999).
[8] W. D. Tian, J. T. Sage, P. M. Champion, E. Chien, and S. G. Sliger, Biochemistry **35**, 3487 (1996).
[9] M. A. Bopp, A. Sytnik, T. D. Howard, R. J. Cogdell, and R. M. Hochstrasser, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 11271 (1999).
[10] P. M. Champion, J. Raman Spectrosc. **23**, 557 (199 1 2).
[11] V. Šrajer, L. Reinisch, and P. M. Champion, J. Am. Chem. Soc. **110**, 6656 (1988)
[12] F. Parak and E. W. Knapp, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7088 (1984)
[13] W. Nadler, A. T. Brunger, K. Shülten, and M. Karplus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7933 (1987)
[14] B. F. Campbell, M. R. Chance, and J. M. Friedman, Science **238**, 373 (1987).
[15] J. Huang, A. Ridsdale, J. Wang, and J. M. Friedman, Biochemistry **36**, 14353 (1997).