

ポンプ-プローブ X線溶液散乱法を用いた二量体ヘモグロビンの
協同的構造ダイナミクスの直接観察

Direct Observation of Cooperative Protein Structural Dynamics of Homodimeric
Hemoglobin with Pump-Probe X-ray Solution Scattering

足立伸一^{1,*}, Kyung Hwan Kim², Srinivasan Muniyappan², Key Young Oang², Jong Goo Kim², 野澤
俊介¹, 佐藤篤志¹, 腰原伸也³, Robert Henning⁴, Irina Kosheleva⁴, Hosung Ki², Youngmin Kim²,
Tae Wu Kim², Jeongho Kim², Hyotcherl Ihee²

¹放射光科学研究施設, 〒305-0801 つくば市大穂 1-1

²Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST)

³東京工業大学、⁴The University of Chicago

1 はじめに

血液中で酸素分子を運搬するタンパク質であるヘモグロビン分子に短時間のレーザー光を照射し、照射後に進行するタンパク質の分子構造変化を、ポンプ-プローブ X線溶液散乱法によって追跡した。レーザー照射による一酸化炭素分子の光解離をトリガーとして、ヘモグロビン分子が 100 億分の 1 秒(100 ピコ秒)から 100 分の 1 秒(10 ミリ秒)程度の時間内に徐々に構造変化し、二つのユニット間の距離が短くなるとともに、二つのユニットが相対的にねじれる運動により形を変化する様子が、100 億分の 1 秒精度の X線動画として直接観測された。この手法は、生体環境に極めて近い室温の水溶液中で、様々なタンパク質が実際に働く自然な姿を動画として捉えることを可能とする画期的な手法であり、生命活動にとって重要なタンパク質の分子機能を解析するための新技術として大いに期待される。

2 実験

この実験では、一酸化炭素分子が結合した二量体ヘモグロビンを含む溶液にレーザー光と X線をほぼ同じタイミングで繰り返し照射して X線散乱データを測定することにより、最終的にタンパク質の構造変化の情報を取り出すことができる。NW14A は周期長が異なる 2 つのアンジュレーターが設置されているが、測定に十分な X線強度を保つために 2 つのアンジュレーターのギャップを閉じることで 15.7 keV (0.79Å)の高強度 X線を作り出し、なおかつ、溶液散乱曲線の高分解能な測定が可能となるように、X線多層膜ミラーを用いることでエネルギースペクトルが 5%エネルギー幅の対称構造を持つようにした。この際、1 パルスあたりの X線光子数は 3×10^8 photons/pulse である。PF-AR リングから発せられる 100 ピコ秒パルス X線の周波数は 794 kHz であるが、ヘモグロビンにおける光励起状態が基底状態へ緩和する時間を考慮し、かつレーザーの周波数に合わせたポンプ-プローブ測定を行うため、X線はチョッパーと高速シャッターによって 10 Hz に間引

かれてサンプルに入射する。ヘモグロビンの励起には、光パラメトリック増幅器で 532 nm に波長変換した光を用いるが、ピコ秒～ナノ秒、およびナノ秒～ミリ秒の時間スケールの変化を追跡する際は、それぞれ NW14A に設置されている Ti:Sapphire フェムト秒レーザー、および Nd:YAG ナノ秒レーザーを用いて時間分解測定を行っている。フェムト秒レーザーを用いる時はその高い先頭値強度によるサンプルへのダメージを考慮し、光学グレーティングによって数ピコ秒のパルス幅に伸ばしてからサンプルを励起している。ここで、レーザーのエネルギー密度は $\sim 0.5 \text{ mJ/mm}^2$ に調整され、レーザーと X線は、ほぼ同軸からサンプルに入射し、サンプル表面においてマイクロメートルの位置精度で両者が重なるように調節される。X線サンプル表面散乱イメージは 165mm 径を持つ二次元 CCD 検出器 (MarCCD 165, MarUSA) を用いて測定された。He パスを用いることでバックグラウンドとなる空気散乱を抑え、カメラ長を $\sim 300 \text{ mm}$ にすると q 値が $0.15 \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$ の散乱イメージを取得できるため、ヘモグロビンの光反応における構造変化を $d = 0.1 \text{ \AA}$ 程度の分解能で捉えることが可能となる。

3 結果および考察

本研究では、常温で試料にレーザー光を照射し、二量体ヘモグロビン分子内のヘムと一酸化炭素の結合を切断して、瞬間的に一酸化炭素がタンパク質から解離した状態を作り出した。そして、この過渡的な状態から始まるタンパク質の構造変化を、時間分解 X線溶液散乱法を用いて、レーザー光と X線の時間を系統的にずらしながら逐次観測した。図 1 における、エラーバー付きのプロットで示した各時間における差分スペクトルは、光励起前のリファレンス溶液散乱曲線との差分を取ったものであり、赤線は解析によって得られたフィット結果である。解析は各時間点における“ヘモグロビンの構造”と“ヘモグロビンと溶媒との相互作用”を分子動力学シミュレーション、および量子化学計算によって見積り、

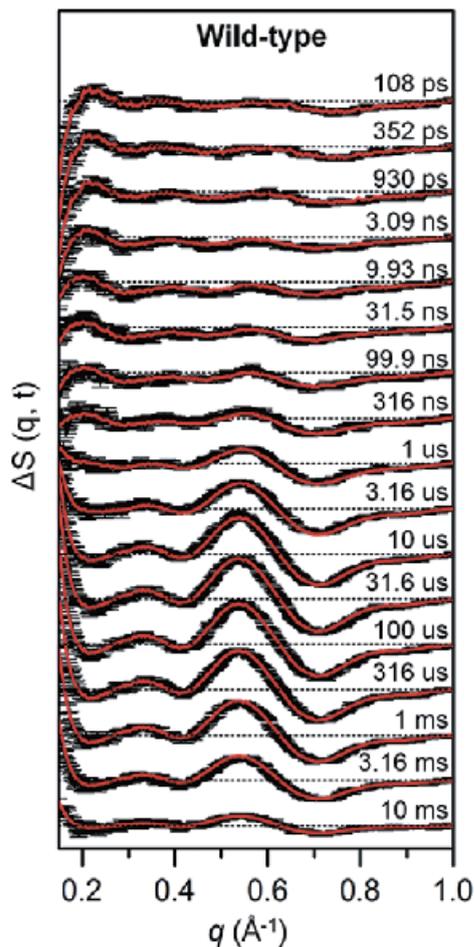


図1：溶液散乱の差分スペクトル。

そこで得られた値を元にグローバル・フィッティングによるを行うことで構造解析を行う進められる。反応進行度の時間変化を特異値分解法により詳しく解析すると、光励起後 100 ピコ秒～10 ミリ秒の時間スケールにおける励起状態において 3 つの独立な中間状態 (I_1 , I_2 , I_3) が存在し、それぞれの比率が刻々と変化している様子が、さらには一つのユニットから一酸化炭素が光解離した状態と、両方のユニットから解離した状態が存在し、それらの状態は同じ構造変化を引き起こすことが明らかになった。図 2 は中間状態の構造における 2 つのユニットの距離（それぞれのヘム間の距離）、相対的な角度、および、

構造変化によってユニット間界面において出し入れされる水分子（赤丸）の数を示したものである。波長 532 nm のパルスレーザー照射による一酸化炭素の光解離をトリガーとして、R 型に類似した解離状態である I_1 中間状態がは光励起後 100 ピコ秒以内に生成され、その後 R 型に類似した別の解離状態 I_2 中間状態へと 3.2 ± 0.2 ナノ秒の時定数を持って変形する。続いて、ユニットの回転と、ヘム間距離の減少、およびユニット間界面における水分子の増加を経て T 型に類似した I_3 中間状態が生成される。 I_2 中間状態から I_3 中間状態への変形が起こる時定数は、一酸化炭素の解離が 1 つのサブユニットで起きたか、両方のサブユニットで起きたかに依存して異なる値を取り、前者では 730 ± 120 ナノ秒であり、後者では 5.6 ± 0.8 マイクロ秒となることが明らかとなった。その後、一酸化炭素が再結合し系は基底状態へと戻る。このようにして、一酸化炭素の光解離をトリガーとしてヘモグロビン分子が 100 億分の 1 秒 (100 ピコ秒) から 100 分の 1 秒 (10 ミリ秒) 程度の時間内に徐々に構造変化し、二つのユニット間の距離が短くなるとともに、二つのユニットがねじれ運動で形を変化する様子が、100 億分の 1 秒精度の X 線動画として直接観測されたわけである[1]。

4 まとめ

本研究で用いた時間分解 X 線構造解析法により、タンパク質の静止した構造だけでなく、その機能に深く関連して時々刻々と構造が変化する様子を、二枚貝のヘモグロビンを一例として直接的に動画化できることが証明された。本研究の原著論文[1]においては、アロステリック転移に重要なアミノ酸残基 1 か所を変異させたタンパク質体における構造変化の伝播の違いや、各ユニットにおける光解離比率のレーザーエネルギー密度依存性による中間状態構造の評価等、ヘモグロビンの動的構造変化について更に詳細な解析が行われており、構造変化と機能発現機構について理解が大きく深まるものとなっている。この技術は、他の多くの機能性タンパク質分子にも原理的に適用可能なものであり、機能解析のための分子動画作成技術の可能性が膨らみつつある。この技術がさらに発展すれば、新薬を設計する上で重要な指針・情報を与えることが期待される。

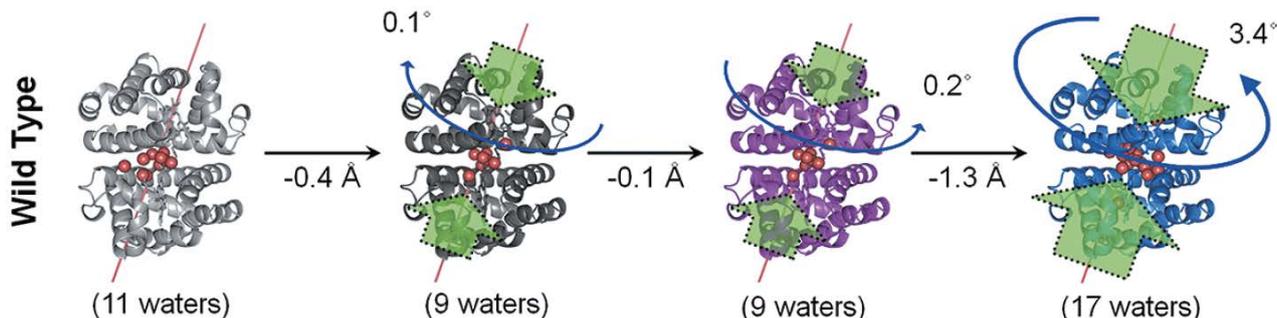


図2 中間状態の構造における 2 つのサブユニットの相対位置関係

謝辞 (オプション)

本成果は、JST さきがけ研究領域「光エネルギーと物質変換」、JST 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 研究領域「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」によって得られたものである。

参考文献

[1] K. H. Kim et al., J. Am. Chem. Soc., 134, 7001 (2012)..

* shinichi.adachi@kek.jp