

### ポンプ - プローブ X 線溶液散乱法を用いた 100 ピコ秒～ 10 ミリ秒における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

Kyung Hwan Kim<sup>1</sup>, Srinivasan Muniyappan<sup>1</sup>, Key Young Oang<sup>1</sup>, Jong Goo Kim<sup>1</sup>, 野澤俊介<sup>2</sup>, 佐藤篤志<sup>2</sup>, 腰原伸也<sup>3</sup>, Robert Henning<sup>4</sup>, Irina Kosheleva<sup>4</sup>, Hosung Ki<sup>1</sup>, Youngmin Kim<sup>1</sup>, Tae Wu Kim<sup>1</sup>, Jeongho Kim<sup>1</sup>, 足立伸一<sup>2</sup>, Hyotcherl Ihee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), <sup>2</sup>高エネルギー加速器研究機構, <sup>3</sup>東京工業大学, JST-CREST, <sup>4</sup>The University of Chicago

### Direct Observation of Cooperative Protein Structural Dynamics of Homodimeric Hemoglobin from 100 ps to 10 ms with Pump-Probe X-ray Solution Scattering

Kyung Hwan Kim<sup>1</sup>, Srinivasan Muniyappan<sup>1</sup>, Key Young Oang<sup>1</sup>, Jong Goo Kim<sup>1</sup>, Shunsuke Nozawa<sup>2</sup>, Tokushi Sato<sup>2</sup>, Shin-ya Koshihara<sup>2</sup>, Robert Henning<sup>3</sup>, Irina Kosheleva<sup>3</sup>, Hosung Ki<sup>1</sup>, Youngmin Kim<sup>1</sup>, Tae Wu Kim<sup>1</sup>, Jeongho Kim<sup>1</sup>, Shin-ichi Adachi<sup>2</sup>, Hyotcherl Ihee<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), <sup>2</sup> High Energy Accelerator Research Organization (KEK), <sup>3</sup> Tokyo Institute of Technology and JST-CREST, <sup>4</sup> The University of Chicago

#### Abstract

血液中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、これらのユニットが相対的にねじれる運動により形が変化する様子が、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。

#### 1. はじめに

タンパク質は、アミノ酸がアミド結合を介して連結し 1 本の鎖となって折り畳まれた構造を取り、その折り畳まれた構造が、酵素活性などの生体内の生命活動にとって重要な機能に深く関わっている。特に、折り畳まれたタンパク質が、ある特定の動き (構造変化) をすることで、栄養素を分解したり、筋肉を動かしたりといった様々な機能を果たしている。しかし、実際のタンパク質が、高速に動きながら機能している姿を動的に、しかも水中で室温といった生体内の環境と極めて近い状態で観測することは困難であった。本稿では、ポンプ - プローブ X 線溶液散乱法から得られたデータを用いて、溶液中のタンパク質が光の刺激によって協同的に構造を変えていく様子を直接観測した、著者らによる最近の研究例を紹介する。

#### 2. ガス分子の解離をトリガーとしたヘモグロビンの構造変化

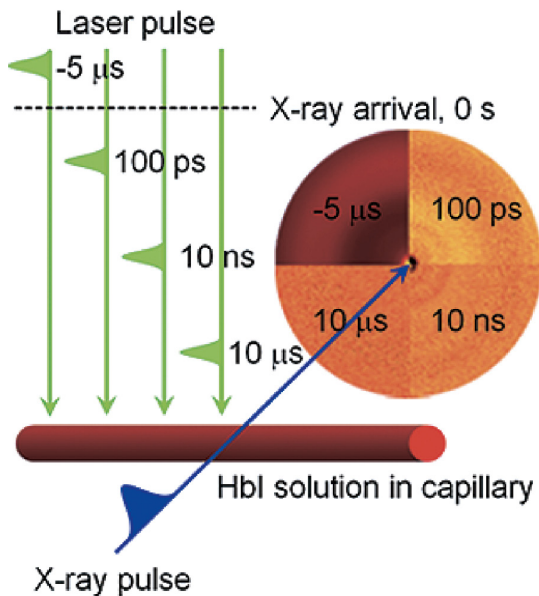
本研究の対象となったタンパク質は、二枚貝がもつヘモグロビンで、血液中中で酸素運搬の機能を担っている。二枚貝のヘモグロビンは人間の血液中にある四量体のヘモグロ

ビンとは少し異なり、二つのサブユニットが水素結合を介して弱く結合した二量体構造を取っている。二つのユニットにはそれぞれ、鉄 - ポルフィリン錯体 (ヘム) が収まっており、その鉄に酸素や一酸化炭素などのガス分子が可逆的に結合し運搬される [1-3]。

二量体ヘモグロビンの二つのユニットに結合したガス分子がタンパク質から解離すると、その協同的効果によって、二つのユニットの位置関係が相対的に変化し、ガス分子が結合しやすい構造 (R 型) から結合しにくい構造 (T 型) へと変化すると考えられていた [4-6]。しかしながら R 型と T 型の静的な構造の情報だけでは、詳しい構造の動きや中間構造についての情報を得ることはできない。特にヘモグロビンに代表されるアロステリックタンパク質では、局所的な構造変化が機能発現に重要な高次構造変化を誘起するため X 線を用いた時間分解測定によって動的構造変化を追跡していくことは重要である。そこで我々の研究グループでは、KEK の放射光科学研究施設のビームライン NW14A [7] を用いて、時間分解 X 線溶液散乱法を用いた動画撮影に挑戦した。

### 3. PF-AR NW14A におけるピコ秒 Pump-Probe X線溶液散乱実験

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線を僅かな時間差をつけて繰り返し照射し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 (Fig. 1)。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 (0.79 Å)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線フォトン数は $3 \times 10^8$  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

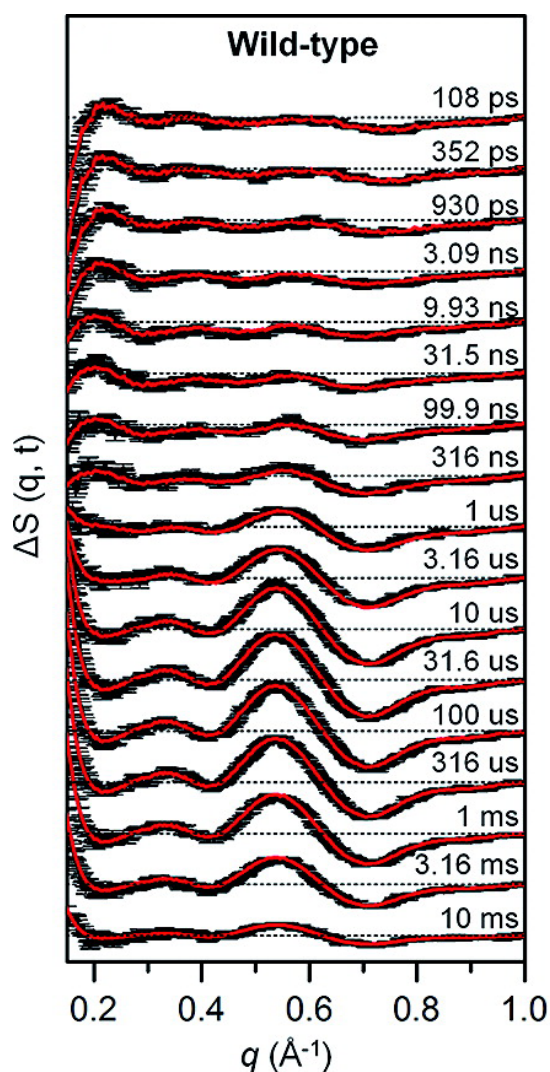


**Figure 1** Time-resolved X-ray solution scattering data were acquired using the pump-probe method at the beamline NW14A. Aqueous solution samples of HbI ligated with CO ligands [HbI(CO)<sub>2</sub>] were prepared using a previously established protocol. The sample contained in a capillary of 1 mm thickness were excited with 35 ps laser pulses at 532 nm. Time-resolved scattering curves were collected at 40–70 pump-probe time delays between the laser pump pulse and the X-ray probe pulse in the range from 100 ps to 56.2 ms as well as at a reference time delay of -5 μs. To attain a signal-to-noise ratio good enough for data analysis, about 20 images were acquired and averaged at each time delay.

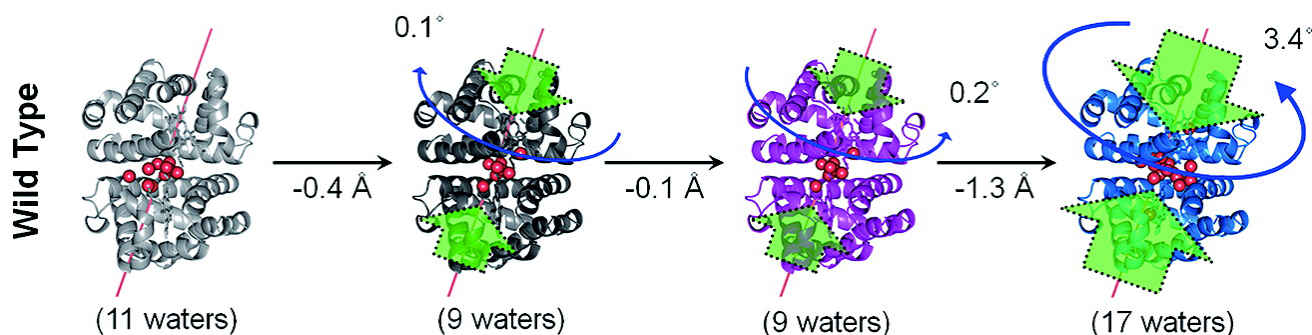
Nd:YAG ナノ秒レーザーを用いて時間分解測定を行っている。フェムト秒レーザーを用いる時はその高い尖頭値強度によるサンプルへのダメージを考慮し、光学グレーティングによって数ピコ秒のパルス幅に伸ばしてからサンプルを励起している。ここで、レーザーのエネルギー密度は $\sim 0.5$  mJ/mm<sup>2</sup>に調整され、レーザーとX線は、ほぼ同軸からサンプルに入射し、サンプル表面においてマイクロメートルの位置精度で両者が重なるように調節される。X線散乱イメージは165 mm径を持つ二次元 CCD 検出器 (MarCCD 165, MarUSA) を用いて測定された。He パスを用い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 $\sim 300$  mm にすると q 値が $0.15 \sim 2$  Å<sup>-1</sup>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 $d = 0.1$  Å程度の分解能で捉えることが可能となる [8]。

### 4. ねじれ運動によるガス分子の放出

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。Fig. 2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。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、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構造解析を行う。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。Fig. 3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 $3.2 \pm 0.2$  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 $I_3$ 中間状態が生成する。 $I_2$ 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 $730 \pm 120$  ナノ秒であり、



**Figure 2** Picosecond pump-probe X-ray solution scattering for wild-type HbI(CO)<sub>2</sub>. Time-resolved difference X-ray solution scattering curves,  $\Delta S(q, t)$ , measured for solution samples of wild-type HbI are shown. The time delay after photoexcitation is indicated above each curve. For clarity, only data at selected time delays are shown. Experimental curves (black) are compared with theoretical curves (red) that were generated from linear combinations of three time-independent species-associated scattering curves extracted from the kinetic analysis.



**Figure 3** Structural dynamics of HbI extracted from the species-associated scattering curves using structure refinement. The green and blue arrows are used to indicate the relative magnitudes and directions of the changes in the heme-heme distance and subunit rotation angle relative to HbI(CO)<sub>2</sub>. The structural transitions induce a change in the number of interfacial water molecules (shown in red), well-organized at the interface of the two subunits.

後者では  $5.6 \pm 0.8$  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 [9]。

## 5. おわりに

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。

本記事では割愛させて頂いたが、本研究の原著論文 [9] 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。「タンパク質構造全体が協同的に変化して、その機能を発揮する」という生体物質の本質に対して、そのベールを解き放つ鍵としての新技術がまさに我々の手元に届きつつある。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。

本成果は、JST さきがけ研究領域「光エネルギーと物質変換」研究課題名：「時間分解 X 線構造解析法による光エネルギー変換機構の分子動画観測」研究者：足立伸一（高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所教授）、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」研究課題名：「光

技術が先導する臨界的非平衡物質科学」研究代表者：腰原伸也（東京工業大学大学院理工学研究科教授）によって得られたものである。

（原稿受付日：2012年7月4日）

### 引用文献

- [1] M. F. Perutz, *Nature*, **228**, 726 (1970)
- [2] W. A. Eaton et al., *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 351 (1999).
- [3] S. Adachi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 7039 (2003).
- [4] E. Chiancone et al., *J. Mol. Biol.*, **152**, 577 (1981).
- [5] E. Antonini et al., *J. Biol. Chem.*, **259**, 6730 (1984).
- [6] A. Mozzarelli et al., *J. Biol. Chem.*, **271**, 3627 (1996).
- [7] S. Nozawa et al., *J. Synchrotron. Rad.*, **14**, 313 (2007).
- [8] K. Ichiyangi et al., *J. Synchrotron. Rad.*, **16**, 391 (2009).
- [9] K. H. Kim et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7001 (2012).

### 著者紹介

Kyung Hwan Kim

Center for Time-Resolved Diffraction, Department of Chemistry,  
Graduate School of Nanoscience & Technology (WCU), KAIST,  
Ph. D student  
Daejeon, 305-701, Republic of Korea