

共鳴ラマン分光法の蛋白質構造研究へ応用黎明期

北川 禎三 (きたがわ ていぞう)

1. はじめに

私は阪大工学部で熱化学の研究に携わった後、理学部大学院化学の修士課程に進学の際、ポリペプチドの2次構造を赤外吸収で解明する研究の国際的最前線におられた蛋白研の宮澤辰雄先生の門を叩いた。しかし先生は「物理化学専攻の学生が生体分子を測定する事を勧めない、先ず基礎をしっかりやれ」と云われ、ポリエチレン結晶の振動スペクトルと固体物性の関係を調べるよう助言を受けた。学位論文は、直鎖炭化水素の極限とも云えるポリエチレンの結晶振動を分子間相互作用の存在下で計算し、赤外・ラマンのデータ以外に、比熱、ヤング率、X線回折温度因子、中性子非弾性散乱の断面積、分散曲線、音波の伝搬速度を統一的に説明するものになった。分光測定の結果を分子間力の存在を仮定して計算すると、当時日本では測定できなかった中性子非弾性散乱スペクトルの異方性を見事に説明する事ができ¹、原子炉設計に重要なデータになったのでイギリスから学位論文の請求が来た。その後宮澤研の助手にさせていただき、ミネソタ大学への留学が決まった。Brice L. Crawford, Jr.先生²の元で、純液体のn(屈折率)やk(吸光係数)を内部反射法で正確に決め、それより液体分子の分子運動を論ずる研究をしていた。帰国すると、宮澤先生は東大・理・教授に移動され、後任の京極教授の方針は「蛋白質構造化学」になった。筆者は研究内容を完全に変わるか、研究室を替えるかの選択に迫られ、前者を選んだ。その選択がその後の自分の人生を決めた。

2. 振動分光研究

この時代に、アルゴンレーザーが実験室でも使えるようになりつつあった。留学中の私は、赤外内部反射法を用いた純液体測定用の高屈折率半円柱を応用し、自分の合成したPOM固体の異方性nと

kを決めようと実験していたが、円柱面とPOM固体表面の接触度が問題になり、結果的にはうまくいかなかった。しかしこの時に電磁波と物質の相互作用を基礎から勉強した。この不毛の時代が私にポテンシャルを付けてくれたと思える。

帰国した頃(昭49)、阪大基礎工助手の飯塚哲太郎さんが、封鎖中の大学でミオグロビン(Mb)単結晶の磁化率測定をしておられた。私はMb単結晶をいただき、高屈折率半円柱の平面側に吸着させ、円柱側からレーザー光を全反射の角度で入れて、しみ込み光によるラマン散乱を観測する装置を作った。しみ込み光なら照射によるサンプルの破壊は少ないと期待し、蛋白結晶のラマン散乱を観測したいと思ったからである。ラマンのシグナルは弱く見えたが、Mb結晶に照射点の跡形が残っていたので、結局この方法をあきらめた。しかしこの頃から飯塚さんと色々なヘム蛋白質の共鳴ラマンスペクトルを測定し始め、その意義を考えた。

ヘム鉄にはFe²⁺とFe³⁺があり、それぞれに高スピンと低スピン、或は5配位と6配位があつて共鳴ラマンスペクトルが違った。経験則で分類したが³、振動分光法と云う分子科学の立場で観測データを意義付ける為には、ラマンスペクトルの帰属を避けては通れなかった。生物の持つヘムは置換基の存在の為に対称性が低くて計算できないが、対称性の高い合成金属ポルフィリンでヘムの共鳴ラマンバンドを帰属する事が第1と考えた。それが溶媒に溶け、そのラマンスペクトルがヘムのそれに近いものとして、Ni-octaethyl-porphyrin (Ni-OEP)を選び、京大工学部の生越久靖先生に合成してもらった。面識の無い生越先生を訪問し、自己紹介して共同研究を申し込んだ。そして、同位体ラベルNi-OEPも含めて3種の試料それぞれに基音、倍音、結合音等、約80本のラマン線を観測して、

基準振動計算によりそれを帰属した。このとき提案したモード番号⁴が、今ではヘム蛋白の共鳴ラマンの世界で国際的に用いられており、世に残る仕事となった。

3. 研究と研究環境

しかし当時は講座制の強い時代であった。ヘム蛋白の振動分光実験に1人で奮闘している変わり者の万年助手が蛋白研にいる事が、阪大医学部長であった山野俊雄先生に伝わり、阪大医学部修士課程創設に当り、医学部助教授にいただいた。その幸運無しには、振動分光の研究は継続できなかった。というのは、恩師の宮澤先生から、蛋白研助手を辞して私大に移る事を強く勧められていたからである。「万年助手でいいよ」と言ってくれた家内の言葉に今も感謝している。

幸運にも、医学部分子生理学講座助教授に採用されたが、助手も学生もいないうえ、ラマン分光器も無い条件下でも講義の義務はあった。ラマンという言葉が通じない医学部の環境下で研究を続ける為には、自分が周囲の人を理解して良い討論をすることにより、自分がその人達に理解されるようになる事が大事である事を、私は若い人に強調したい。私の場合は、それ迄皆勤であった分子構造討論会に出席する事をやめ、日本生化学会に出席するようになった。臓器機能の調べ方等、学部学生の実習指導を行うために、まず自分が周りの助手の人達から実習指導を受けた。その時代はかなり負担に思っただ事自分の糧となつて、その後生体分子科学の道を拓く事ができたのだ、と今しみじみと思う。

医学部でそう云う努力をしている時に、分子科学研究所の教授公募に応募してみたはどうか、という話が宮澤先生より来た。幸運にも面接に呼ばれ、「分子研でどんな研究がしたいか？」と尋ねられた。分子研は生体分子を毛嫌いするところである事はよく聞かされていたが、「蛋白中での分子振動の観測により、生体中での酸素分子の活性化機構を解明したい」と正直に述べたところ、最終的には受け入れられた。複雑な系はすっきりした説明

ができないので分子科学として成立し難い。結果を精緻な理論で美しく説明できる小分子の系が当時の所員には好まれていた。しかし私の考えは、「理論で見事な説明ができるなら原理はわかっている、それがわからない泥臭い問題に挑戦する」という発想で、自分の研究を進めることにした。今でこそ「生体分子は化学者の研究対象である」と堂々と云えるが、当時はそれを分子研で云えない後ろめたさがあった。分子研所長だった長倉三郎先生は「皆が右向いて走るなら、自分は左向きに進むという精神が分子科学に必要」と教授会で話された事をいい事に、私は分子研の伝統に合わない動きをしていた。それを温かく見守って下さった主幹の先生方、特に後に所長になられた井口洋夫先生が強く支援して下さい、感謝に堪えない。

4. 蛋白高次構造と分子機能

昨今は数多くの蛋白質の分子構造が原子レベルの分解能で決められているが、それはある条件下の静止構造である。蛋白質は構造が揺らいでいる柔らかいところのある事に特色があり、それが合成高分子と異なる点である。ヘリックス等の規則構造をとらない、その繋ぎの部分の揺らぎが大きくて重要である。具体的に例を語る方がわかり易い。

蛋白質の中で最も良く調べられているもので、筋肉にあり O_2 を貯蔵するミオグロビン (Mb, Mr = ~17,000) と血液にあって O_2 を運搬するヘモグロビン (Hb, Mr = ~64,000) は共にヘム蛋白で、その Fe^{2+} に O_2 が結合する。Mb はモノマーであるが、Hb は大まかには Mb の4量体である。モノマー間には共有結合は無く、バラバラにするとそれぞれは Mb と同様、 O_2 を可逆的に脱着する。しかし Mb を血管に入れても O_2 運搬機能は果たせない。Mb と Hb 間の決定的な違いを生み出すものは何か？に構造化学から挑戦したく思った。両分子共に精緻な構造が決められているが、それをいくら眺めていてもその解答は得られない。

Hb の構造は M. Perutz により決められ⁵、その業績に対して 1962 年のノーベル賞が授与された。ヒトの Hb には Fe^{2+} を1つ持つサブユニットが4つあり、1分子あたり4個の O_2 分子が結合するが、

その親和性が、1つ目より2つ目、2つ目より3つ目方が高い、という「協同性」を示す。Fe²⁺同士は15Å以上離れているのにFe²⁺間で情報伝達が行われ、その事がHbのO₂運搬機能に本質的であるので、Hbは一般的アロステリック蛋白のモデル分子として、あらゆる物理的方法の研究対象として詳しく調べられてきた。

Perutzは、Hbには酸素親和性の高いRと低いTという2種の4次構造が共存していて、その存在比率がO₂の結合により変わる事に特色があると説明していた⁵。それで私は共鳴ラマン分光法を用いて、Mbの鉄-ヒスチジン(His)伸縮振動($\nu_{\text{Fe-His}}$)をFe同位体を用いて帰属する事に初めて成功した⁶後、当時は阪大基礎工の学生で、後にMRCの所長になり現在はイギリスRoyal Societyのフェローである長井 潔博士と「HbのTとRでは $\nu_{\text{Fe-His}}$ のみが異なる」事を、明らかにした⁷。「Tではサブユニット間相互作用が強くなり、内部に張力が生じてHisを引っ張り、Fe-His結合が歪んで、そのトランス位置へのO₂結合が起こりにくくなる」という、Perutzモデルの実験的証拠を初めて得たことにな

るが、Perutzは国際電報でそれを喜んでくれた。

Hbは α が2個と β が2個の $\alpha_2\beta_2$ テトラマーであるが、 α や β だけの会合体ではその張力は生じない。 $\alpha_2\beta_2$ の時のみ張力が生まれ、その大きさは α の方が β より大きい事がラマン分光の実験で初めて明らかになった⁸。またアミノ酸置換のあるHbを持つ人は10人に1人いて貧血を起こす事もあるが、そのような $\alpha_2\beta_2$ の観測から、 $\nu_{\text{Fe-His}}$ 振動数が6 cm⁻¹低いとO₂親和性は100倍低くなる事も、後の研究で明らかになった⁹。2002年のPerutzさんのご逝去に際して葬儀参列者全員に配られた挨拶状に、上記の研究成果を意味するPerutzシーソーの図(図1)が載っていた事を、後に息子さん(Robin Perutz、ラマン分光学者)が送って下さった手紙で明らかになり、私はこの成果を誇りに思っている。

5. 呼吸とエネルギー産生

酸素で生きる生物は全てO₂をH₂Oに還元する過程で生体エネルギーを作り出す。1928年に呼吸酵素の存在がO.H.Warburgにより証明され(1931

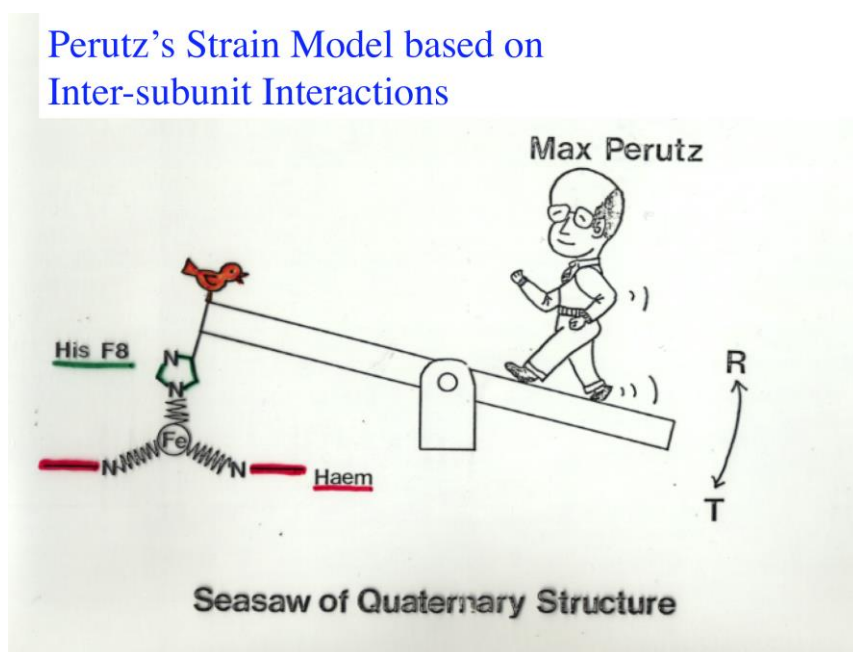


図1。Hbの四次構造変化を表すシーソー。Perutz博士がシーソー中央に向かって歩くと、各サブユニット界面のサブユニット間相互作用が弱くなり(R)、鉄はへム面に動く。その結果、鉄の向かい側の位置にO₂は結合し易くなる(高い親和性)。(図は長井 潔博士作)

時間分解共鳴ラマンスペクトル

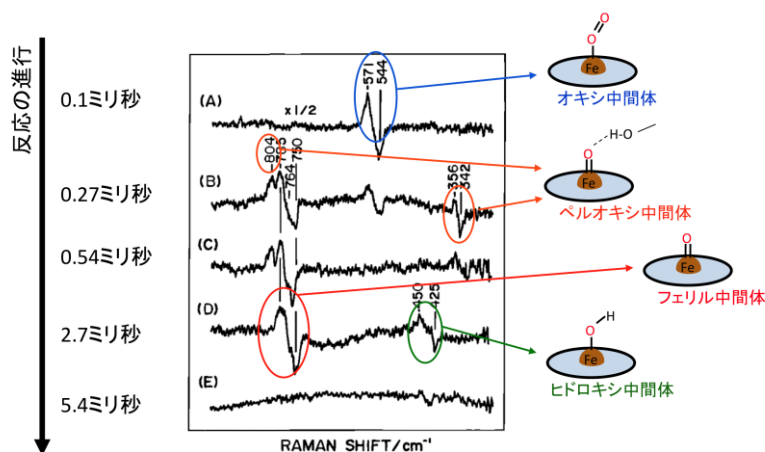


図2. ウシシトクロム酸化酵素の O_2 との反応に沿った時間分解共鳴ラマンスペクトルと、その鉄-酸素振動の意味する中間体の構造。スペクトルは $^{16}O_2$ 中間体と $^{18}O_2$ 中間体との差スペクトルとして描かれており、反応開始からの経過時間をミリ秒単位で左側に示してある。酸素同位体シフトを示すラマンバンドに丸印でマークを付け、それに対応するヘム構造を右側に図示してある。

年のノーベル賞)、それがヘム蛋白質である事が1953年にB.Chanceにより証明された。分子量21万のウシ心筋呼吸酵素のX線結晶解析が月原/吉川らの共同研究で成就された事⁹は特筆すべき成果であった。しかし、その O_2 活性化機構については未解決のままだった。筆者らのグループは時間分解共鳴ラマン分光法で全反応中間体の鉄-酸素振動を観測する事に世界で初めて成功した¹⁰。それぞれ $^{16}O_2$ と $^{18}O_2$ を反応させて作った中間体間の差ラマンスペクトルを、構造と関係付けて図2に示す。それまで30年間、生化学界では最初の間体はペルオキシ体と考えられてきたが、実はそれはO-O結合の切れたオキシ体である事を、小倉ら¹¹が $^{16}O^{18}O$ という酸素分子を使って1993年に証明した。それが世界で受け入れられるのにその後10年以上かかったものの、最近では国際的な教科書¹²に図2の反応機構が掲載されるようになり、後の世に残る結果となった。そのオキシ中間体から「所謂フェリル中間体」に移る速度が H_2O 中と D_2O とで非常に異なり、そのステップが H^+ の能動輸送を電子移動とカップルさせる点である事が共鳴ラマンの研究で初めて明らかになった¹⁰。

6. 蛋白の超高速ダイナミクス

蛋白質は柔軟な3次元構造を持つ事に特色があり、それが機能実行に必須である事は誰も知っている。しかし、どの程度の大きさの動きがどの程度速く起こるかを示した実験はあまり無かった。というのは、蛋白質の溶液構造の解明に威力を發揮するNMR法では、分子と電磁波との相互作用時間がマイクロ秒程度に長い為に、それより速い構造変化は検出できないからである。光と分子の相互作用時間は非常に短いので、私はラマン分光学でこれに挑戦した。

MbのCO結合体では、 Fe^{2+} 原子が低スピンのヘム面内に位置しているが、CO脱離状態では Fe^{2+} は高スピン状態となり、ヘム面よりHis側に少し出てヘムはピラミッド形になる。Fe-CO結合の光切断は50 fsで完了しているが、それに伴うヘムの膨張、 Fe^{2+} 原子のヘム面外への移動、Fe-His伸縮振動数の変化を引き起こす蛋白構造変化は0~100 psの間に順次起こる事が時間分解可視共鳴ラマン分光の実験で明らかになった¹³。ヘリックスの動

き等、蛋白質の速い動きは紫外共鳴ラマン分光で観測できるが、ヘムの直ぐ上にある E-及び A-ヘリックスの動きが ps で起こる事がピコ秒時間分解紫外共鳴ラマンの実験で明らかになっている¹³。Fe-CO 結合の光切断後にヘムは一瞬~1000 K の高温になるが、水谷らは¹⁴、それが 10 ps 程度の時定数で冷却していく事を、高温のヘムのラマンバンドのみを選択的に観測する時間分解アンチストークスラマン分光の実験で、初めて明らかにして国際的に注目された。

7. 終わりに

Mb で観測されたような構造変化が Hb でも起こり、1つのサブユニットへのリガンド結合が蛋白質のメーション変化を通してとなりのサブユニットに伝達され、そこでのリガンド親和性を変えている。そのようなアロステリック効果の構造化学が Hb で一番詳しく解明されており、紫外共鳴ラマン分光を用いて、特定アミノ酸残基の水素結合の生成切断が四次構造変化を引き起こし、それが協同的酸素結合機能の源になっている事が満足に解明されるに至っている¹⁵。つまり、原子レベルの構造や僅かな構造変化が、蛋白質分子としての機能に直接関係している事が分子科学として説明される時代になった。

最近では、遺伝子解析により情報伝達を機能とする新しいヘム蛋白質が次々と見つかっている。蛋白質がどのようにして 2 原子分子を特異的に認識し、その検出をどのようなコンフォメーション変化で機能実行部に伝達しているか等、センサーとしてのシグナル伝達の構造化学やそのダイナミクスが、筆者のその後の研究テーマとなった。振動分光学という 1 本刀をシャープに活かして生体分子科学の未解決問題に挑戦していくという方針で進んできた人生であったと振り返っている。



写真：これはインドの C. V. Raman がノーベル賞をもらう元になった「ラマンスペクトルを観測したオリジナル装置」に私が左手で直接触れている現場で、Indian Association for the Cultivation of Science にて撮影したものです。現在では、もう直接触れる事はできなくなっています。「このような簡単な写真器でノーベル賞」には強い影響を受けました。写真撮影の日は 1994 年 11 月 29 日で、Prof. M. Chowdhury による。

文 献

1. Kitagawa, T. and Miyazawa, T. (1972) Adv. Polymer Sci. 9, 336-414. (レビュー)
2. Kitagawa, T and Goplen, T. (2015) Am. Philos. Soc. (Sept. 2014)
<http://www.amphiloc.org/sites/default/files/proceedings/> in press.
3. Kitagawa, T., Kyogoku, Y. Iizuka, T. and Ikeda-Saito, M. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98, 5169-5173. (オリジナル論文)
4. Kitagawa, T. Abe, M. and Ogoshi, H. (1978) J. Chem. Phys. 69, 4516-4526. (オリジナル論文)
5. Perutz, M. F. Annu. Rev. Biochem. (1979) 48, 327-386. (レビュー)
6. Kitagawa, T., Nagai, M. and Tsbaki, M. (1979) FEBS Lett. 104, 376-378. (オリジナル論文)

7. Nagai, K., Kitagawa, T. and Morimoto, H. (1980) J. Mol. Biol. 136, 271-289. (オリジナル論文)
8. Kitagawa, T. in Biological Applications of Raman Spectroscopy (Spiro, T.G. ed) (1988) John Wiley & Sons, New York, Vol. 3, 87-131. (書籍)
9. Matsukawa S, Mawatari K, Yoneyama Y, and Kitagawa T. (1985) J. Am. Chem. Soc. 107, 1108-1113. (オリジナル論文)
10. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) Science 269, 1069-1074. (オリジナル論文)
11. Kitagawa, T., Ogura, T. in Progress Inorg. Chem. (Karlin, K. D. Ed.) (1996) Wiley & Sons, New York, 45, 431-479. (書籍)
12. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appelman, E. H., and Kitagawa, T. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 8527-8536. (オリジナル論文)
13. Lodish, H. et al. 著 'Molecular Cell Biology' Ver.4.0, (日本語訳、野田春彦ら、分子細胞生物学第4版(下)、p.568,図 16.36、東京化学同人).(教科書)
14. Mizutani, Y. and Kitagawa, T. (2001) Chem. Rec. 1, 258-275. (レビュー)。
15. Mizutani, Y. and Kitagawa, T. (1997) Science 278, 443-446. (オリジナル論文)
16. Nagatomo, S. Nagai, M. and Kitagawa, T. (2011) J. Am. Chem. Soc. 133, 10101-10110. (オリジナル論文)

北川禎三先生ご略歴：

- 1940年 京都府に生まれる。
- 1963年 大阪大学工学部応用化学科卒業
- 1966年 大阪大学蛋白質研究所助手
- 1969年 大阪大学 理学博士
- 1980年 大阪大学医学部助教授
- 1983年 岡崎国立共同研究機構 分子科学研究所教授
- 2006年 自然科学研究機構 分子科学研究所名誉教授

