

タンパク質分子間電子移動反応の 構造的ならびに機構的洞察



研究ノート

小手石 泰 康^{*}, 野 尻 正 樹^{**}

Structural and Mechanistic Insights into Inter-protein
Electron Transfer Reaction

Key Words : Electron Transfer, Protein, Crystal Structure

1、はじめに

私たちが身体を維持し、それを働かせるにはエネルギーが必要である。地球上の生物は数十億年もの進化の歴史を経て、生命維持に必要なエネルギーを効率よく獲得する方法を作り上げている。生体中で起こるエネルギー変換機構のことを総称して“生体エネルギー変換”といい¹⁾、1961年にPeter D. Mitchell教授(1978年にノーベル化学賞受賞)により提案された「ATP合成の駆動力は生体膜を介したプロトンの濃度勾配による」「化学浸透圧(仮説)²⁾」がその根幹にある。生体中でプロトン濃度勾配を作りだす駆動力は、様々な物質・分子間を経由しつつ、一(いち)方向に伝達される電子の移動である。一般的に物質間の電子の流れをコントロールすることは化学的にも難しく、「生物(特に蛋白質)がこの化学反応をどのようにして効率よく成し遂げているのか?」を明らかにすることが、50年以上

前から現在もなお継続される多くの科学者達の主要な研究題材の1つである。

「電子移動(伝達)反応」の研究はその歴史も古く、化学、物理学そして生物学の3分野を跨がる学際化学的な研究対象の1つである。分子内の原子は電子を介して結合しているため、その電子が移動する反応は結合の組み替えを伴う化学反応の中で最も基本的な反応である。そのため他の化学反応に比べて理論的解析も進んでおり、なかでも1992年にノーベル化学賞を受賞したRudolf A. Marcus教授によって提案された“マーカス理論³⁾”は今日の電子移動反応全般を理解する上での基礎的理論として位置付けられている。マーカス理論の概略は、電子の動きは原子の動きよりも遥かに速いというフランク-コンドン原理に基づき、溶媒も含めた核配置のゆらぎを考慮した再配列エネルギー、反応のドライビングフォースである自由エネルギー変化 G^0 、そして電子供与体(Donor)と受容体(Acceptor)の距離と配置に依存する軌道間相互作用(電子トンネリング行列要素) H_{DA} 等の各種パラメーターにより電子移動反応速度が定義されるというものである。各種パラメーター間には相互に密接な関係があり、特に興味深いのは G^0 の値に依存して電子移動速度が大きく放物線状の曲線を描き(G^0 のときに最大値となる) また G^0 のバランスによって反応全体の活性化自由エネルギー(G^\ddagger)が定義されることにある(図1)。

生体内における電子移動反応は G^0 が比較的小さく、なおかつ10 Å(オングストローム)をも超える長距離に渡って移動するのが一般的であるため、理論的には極めて効率の悪い遅い反応になるはずである。しかしながら、実際にはとても効率よく迅速に電子移動反応が起きている。それ故、生体中ではどのようにして上述の物理化学的パラメーターをう



* Hiroyasu KOTEISHI

1982年10月生
大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻
修士課程卒業(2008年)
現在、大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 博士課程 大学院生 修士(理学) 構造生物化学
E-mail : koteishi@chem.sci.osaka-u.ac.jp



** Masaki NOJIRI

1972年1月生
埼玉大学 大学院理工学研究科 生産科学専攻 博士後期課程修了(2000年)
現在、大阪大学 大学院理学研究科 化学専攻 助教 博士(工学) 構造生物化学
TEL : 06-6850-5768
FAX : 06-6850-5787
E-mail : nojiri@ch.wani.osaka-u.ac.jp

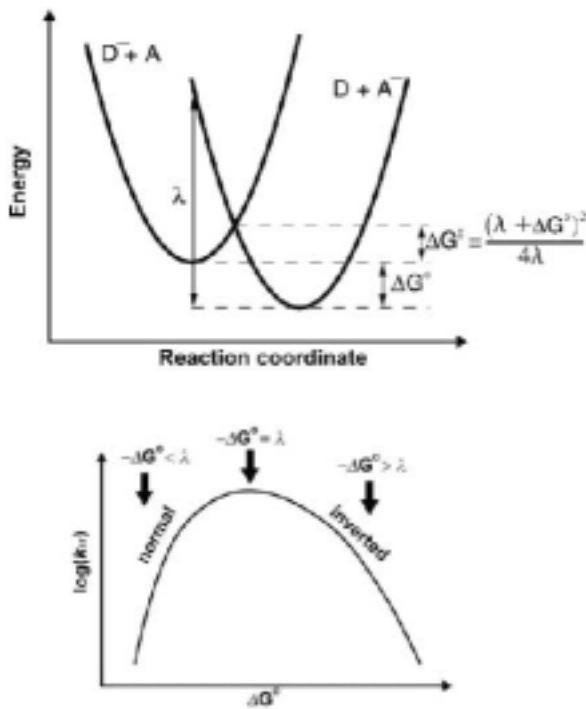


図1. 上) 電子移動反応のエネルギーダイヤグラム。
下) 電子移動反応のエネルギーギャップ則。

まくコントロールして、迅速且つ一方向性の電子移動反応を実現しているのか？を明らかにする事が当面の解決すべき課題となってくる。

筆者らは、このからくりを紐解くべく、分子間で電子移動反応を行う2つの蛋白質がお互いに相互作用している様子をX線結晶構造解析法によって明らかにし、その立体構造をもとに本課題に対する簡単な洞察を行ったのでここに紹介する。

2. 銅含有亜硝酸還元酵素の分子間電子移動反応と過渡的複合体結晶

銅含有亜硝酸還元酵素 (CuNiR) は生物学的脱窒過程 (嫌気呼吸の一種) に関与する酵素で、亜硝酸イオン (NO_2^-) を1電子還元して一酸化窒素 (NO) にする反応を触媒する。本酵素は分子内にそれぞれ役割の異なる、タイプ1銅 (T1Cu)、タイプ2銅 (T2Cu) と呼ばれる2つの銅結合部位を持つ。T1Cuは電子供与パートナー蛋白質から触媒反応に必要な電子を受け取る“電子受容部位”として、一方、T2CuはT1Cuで受け取った電子を使って NO_2^- をNOに還元する“触媒部位”として働く。T1Cuは2つのヒスチジンとシステイン、そしてメチオンが配位した歪んだ四面体構造をとり (図2)、そ

の酸化還元電位と酸化還元に伴う再配列エネルギーはそれぞれ +0.23 ~ 0.3V (vs. NHE) と ~ 0.7 eV 程度と見積もられている⁴⁾。一方、今回用いた電子供与パートナー蛋白質はチトクロム c551 (Cyt c551) と呼ばれ、c型ヘムを1つ持つ分子量約9,000の蛋白質である。その酸化還元電位とは +0.24 V (vs. NHE) と 0.5 ~ 1.5 eV 程と見積もられている⁵⁾。単純にそれらの値から推測される CuNiR と Cyt c551 分子間の電子移動反応の G^0 は +0.01 ~ -0.05 V 程度の極めて小さい値となり、且つ、予想される G^0 が 0.6 ~ 1.1 eV 程で推測 G^0 値に対し極めてアンバランスな理論的にもさぞかし非効率的な電子移動反応になると予想される。しかしながら、ストップフロー法により実測した分子間電子移動反応の二次速度定数は生体反応としては十分効率的な $\sim 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ オーダーであり、ましてや“戻り (逆方向)”の電子移動反応なども観測されず、ほぼ100%順方向 (ヘムから T1Cu へ) のみの電子移動活性をしめす。これはいったい何故だろうか？ そんな漠然とした疑問が筆者らの好奇心を駆り立て、今回の CuNiR と Cyt c551 の電子伝達蛋白質複合体の立体構造を解析することを計画するに至った。

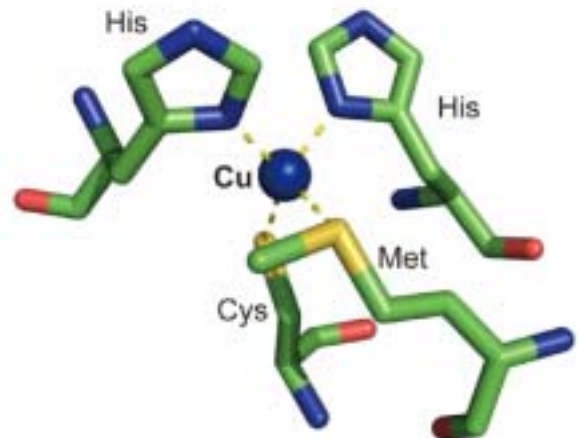


図2. T1Cuの構造。

一般に、電子伝達パートナー分子同士によって形成される過渡的な複合体は弱く短寿命な一過性のものであり、その不安定さからその立体構造解析に成功した例は非常に少ない。しかしながら、筆者らは上述の課題を克服するため、より精度の高い構造情報を得る必要性からX線結晶構造解析法をその解析手段に選び、2つのタンパク質の複合体状態での

単結晶化を試みた。幸いにも、ポリエチレングリコール (PEG) を中心に結晶化条件の探索を進めたところ、19% (w/v) PEG3350 を沈殿剤としたときに、薄紫色 (ヘムの赤色と T1Cu の青色の混在した色) の棒状晶を得た。この結晶を用いて SPring-8 BL44XU (大阪大学蛋白質研究所: 生体超分子複合体構造解析ビームライン) において X 線回折強度データの収集を行い、その立体構造を 1.7 Å で決定する事に成功した⁶⁾。

3. CuNiR と Cytc551 の複合体構造と分子間電子移動反応機構への洞察

結晶中の CuNiR と Cytc551 はモル比 1 対 1 (CuNiR は三量体) で複合体を形成していた。複合体構造において Cytc551 のヘムと CuNiR の T1Cu は大変近い位置関係にあり (ヘムのエッジ (CBC) 炭素原子と T1Cu までの距離が 10.5 Å)、計算から求められたこの立体配置での H_{DA} 値は 2.76×10^{-4} であった (図 3)。これは量子力学的に電子移動反応が起きると考えるのに十分な距離と配置であると考えられる⁷⁻⁹⁾。両分子間の相互作用境界面では、Cytc551 および CuNiR 双方から合計 21 アミノ酸残基が会合面に位置しており、その面積は双方合計で約 1000 Å² であった。この値は分子全体の表面積の約 5 ~ 15% に相当し、この 2 つの分子間の相互作用が極めて弱く過渡的であることを支持している¹⁰⁾。境界面に存在する原子の半分以上は非極性であり、特に Cytc551 の 4 残基 (Val22、Val28、Ala61、および Pro63) と CuNiR の 4 残基 (Ala86、Met87、

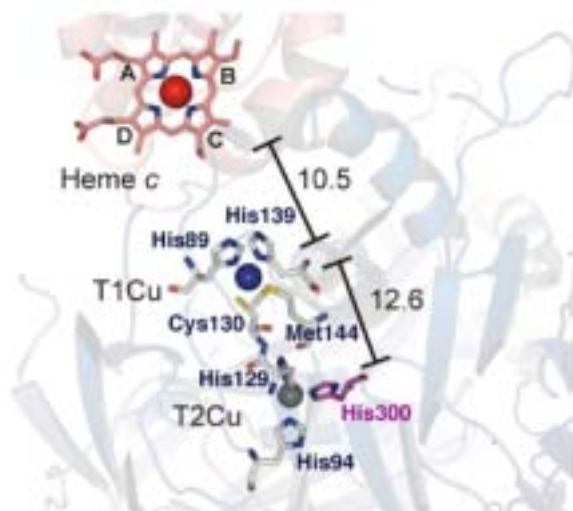


図 3. 複合体中の酸化還元中心の位置関係。

Met135 および Trp138) が双方の酸化還元中心近傍の疎水的な環境作りに大きく貢献していた。両分子単独の構造解析では Cytc551 のヘム近傍表面と CuNiR の T1Cu 近傍表面にはそれぞれ水分子が複数存在しているが、それらは複合体を形成する事で相互作用境界面の中心から完全に排除されていた。違う見方をすれば、お互いの酸化還元中心間に水分子が入り込む程の隙間なく近づいて相互作用していることになる。水分子はタンパク質分子に比べ大きな誘電率を持つため、分子間相互作用に起因した境界面における水分子の排除は、その後続く電子移動反応機構における (特に外圏型) を大きく減少させる効果が十分に期待できる⁵⁾。

また、複合体形成時には、Cytc551 側からの Val 残基の接近により CuNiR の Met135 側鎖が T1Cu 配位子の 1 つである His139 の上部に覆いかぶさる構造をとっていた (図 4)。この構造変化は還元型 CuNiR 単独の立体構造でも見られ、すなわち、複合体

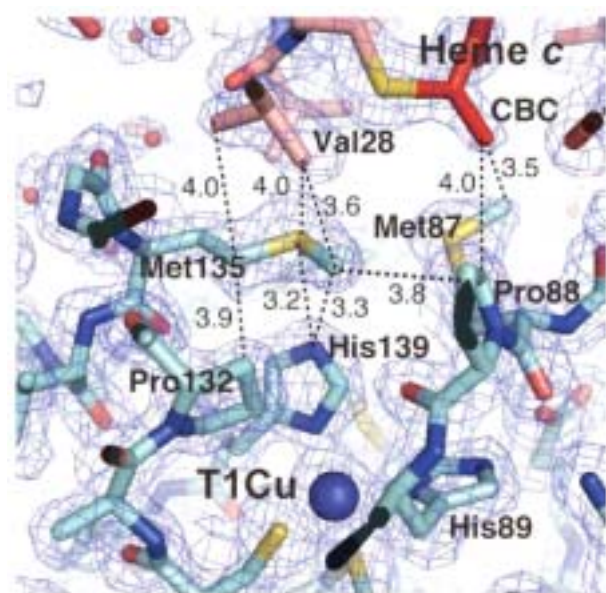


図 4. 複合体中の Met135 の構造 (図内点線と数値はファンデルワールス相互作用と原子間距離を示す)。

状態では Cytc551 が結合することで CuNiR 側の立体構造 (特に T1Cu 部位周辺) がすでに還元型で安定な構造へと変化していることが強く示唆される。これは、上述の水分子排除効果と同様に分子間で電子移動反応が起きる前の “分子間会合” 段階ですでに、CuNiR 分子側に電子を受け取れるような状態へと立体構造 (T1Cu 周辺の原子環境) 変化が誘起され、結果として分子間電子移動反応をよりスムー

ズに進行させるような活性化自由エネルギー障壁 G^\ddagger を下げる効果が期待される。また、His139 残基周辺の原子環境変化がドラスティックに T1Cu の酸化還元電位に影響を及ぼす事も知られている¹¹⁾。一方、Cytc551 においては、複合体形成に伴ってヘム鉄原子への配位子である Met 残基の構造変化が観測された。これは T1Cu 同様にヘム側でも G^0 をより負に大きくする機構がその立体構造変化に起因して起こり得るものであり、今後のさらなる解析に期待がもてる。

4、おわりに

今回、CuNiR と Cytc551 分子間で起きる電子移動反応を例に、タンパク質分子間電子移動反応の研究意義と過渡的複合体結晶構造を用いた反応機構への構造的洞察の概略を述べた。生体中で拡散的に会合/解離を繰り返す分子間で、且つ小さな G^0 で長距離電子移動させるために、過渡的なそれら分子間会合時にそれぞれの酸化還元中心近傍の立体構造を僅かに変化させることで反応に関わるパラメータをコントロールする機構の存在が強く示唆された。そして精度の高い複合体構造解析から、その迅速且つ一方向性の電子移動を可能にするメカニズムのより信憑性の高い構造的基盤を発見できたと考えている。

1956年に端を発した¹²⁾「マーカス理論」が今日まで発展してきた起因の1つは、1984年のMillerらの「電子移動する2分子間を共有結合でつなくことで反応次数を二次(分子間)から一次(分子内)へと簡便化し、実験的にマーカス理論の“逆転領域”の存在を証明した^{13,14)}」ことにあると言っても過言ではない。しかしながら、近年の目覚ましい科学技術の進歩により一昔前までは不可能であった研究も可能になりつつある現在は、先人達が避けてきた複雑な系に対しても新たな解析技術でもって果敢に挑戦する姿勢が必要とされる。生体中の分子間電子移動反応もその1つであり、分子間相互作用が一過

性であるためにこれまで未解析となっていた機構に対し、解決の糸口を与える有効な手段として期待される技術の1つに、過渡的電子伝達タンパク質複合体の高分解能立体構造解析も今後、含まれてくるであろう。

- 1) 垣谷俊昭, 三室守, 電子と生命, 共立出版 (2000).
- 2) P. Mitchell, *Nature*, **191**, 144-148 (1961).
- 3) R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265-322 (1985).
- 4) S. Wherland, O. Farver and I. Pecht, *Chem Phys Chem*, **6**, 805-812 (2005).
- 5) K. A. Sharp, *Biophys. J.*, **74**, 1241-1250 (1998).
- 6) M. Nojiri, H. Koteishi, T. Nakagami, K. Kobayashi, T. Inoue, K. Yamaguchi and S. Suzuki, *Nature*, **462**, 117-120 (2009).
- 7) C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Fraid and P. L. Dutton, *Nature*, **355**, 796-802 (1992).
- 8) C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen and P. L. Dutton, *Nature*, **402**, 47-52 (1999).
- 9) J. N. Onuchic, D. N. Beratan, J. R. Winkler and H. B. Gray, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 349-377 (1992).
- 10) J. Janin, R. P. Bahadur and P. Chakrabarti, *Q Rev. Biophys.*, **41**, 133-180 (2008).
- 11) G. W. Canters, U. Kolczak, F. Armstrong, L. J. Jeuken, R. Camba and M. Sola, *Faraday Discuss.*, **116**, 205-220 (2000).
- 12) R. A. Marcus, *J. Chem. Phys.*, **24**, 966-978 (1956).
- 13) J. R. Miller, L. T. Calcaterra and G. L. Closs, *J Am. Chem. Soc.*, **106**, 3047-3049 (1984).
- 14) J. R. Miller, J. V. Beltz and R. K. Huddleston, *J Am. Chem. Soc.*, **106**, 5057-5068 (1984).