

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18550147

研究課題名（和文） 銅タンパク質における弱い相互作用の構造と機能に関する研究

研究課題名（英文） Structure and Function of Weak Interaction in Blue Copper Protein

研究代表者

高妻 孝光 (KOHZUMA TAKAMITSU)

茨城大学・理工学研究科・教授

研究者番号：50215183

研究成果の概要：

ブルー銅タンパク質に配位するヒスチジンへの弱い相互作用の様式が変化する事によって、活性中心のCu(II)の電子状態が変化し、酸化還元電位などが顕著に変化することが見いだされた。この結果は、タンパク質複合体形成などにおける弱い相互作用が生理学的に意味の有る範囲において顕著に反応性を微調整することを示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,500,000	0	1,500,000
19年度	1,200,000	360,000	1,560,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	690,000	4,490,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ブルー銅タンパク質、弱い相互作用、電子移動反応

## 1. 研究開始当初の背景

近年、種々のタンパク質において、弱い相互作用に基づくと考えられる特異的な構造が見いだされ、タンパク質機能との相関が検討されつつある。タンパク質やDNAのような生体分子における、弱い相互作用の理解は、タンパク質の構造構築原理や機能の解明を解明する上で重要である。特に、酸化還元に関わる電子伝達タンパク質や酵素では、弱い相互作用によって、電子状態が変化を受け、反応の制御が行われると考えられる。これまでに、タンパク質やDNAにおける水素結合やスタッキング相互作用について多くの研究が行われてきている。近年、フェニルアラ

ニン同士のスタッキング相互作用を導入することにより $\alpha$ -ヘリックス構造が安定化すると報告や、カチオン- $\pi$ 相互作用についての報告が増えつつあり、タンパク質における弱い相互作用の重要性が認識されつつある。しかし、弱い相互作用を検出し、その化学的意味をシステムティックかつ詳細に検討している例は少ない。

タンパク質における弱い相互作用を検出し、構造と機能との相関を調べる研究が徐々に活発化しつつある。タンパク質の構造と特異的機能および複合体形成に関する知見は、研究協力者であるオランダライデン大学のキャンタースおよびアビンクラによって主

として NMR 法によって得られている。また、アミノ酸や核酸等、分子量の小さい生体分子の弱い相互作用に関する知見は、関西大学（名古屋大学名誉教授）の山内らが、詳細に検討を行っており、タンパク質内およびタンパク質間における弱い相互作用を解明する上でよい指標となっている。近年では、芳香環の相互作用について、フロリダ大学の Castellano とスイス ETH の Diederich らのグループが、モデル化合物において顕著な成果を上げているが、タンパク質そのものを用いて、タンパク質中の弱い相互作用を特異的に検出し、その構造と機能を調べている例は、ほとんどない。

ブルー銅タンパク質の紫外共鳴ラマンスペクトルについては、米国プリンストン大学のスピロらによる研究と、研究代表者である高妻らによる研究が報告されているのみである。ブルー銅タンパク質の電子移動反応については、米国カリフォルニア工科大学のグレイらが精力的に研究を行っている。ブルー銅タンパク質の分光学的研究は、米国スタンフォード大学のソロモンらによって研究が推進されている。また、ブルー銅タンパク質の電子交換反応に関する研究は、同じく研究協力者であるアルゼンチンのヴィラおよび英国ニューカッスル大学のデニスンらによって推進されている。

研究代表者である高妻は、1999年にシダ植物の光合成系で機能するプラストシアニンを単離精製し、その構造の特異性と反応性が、活性中心の銅イオンに配位しているヒスチジンイミダゾール基と近傍のフェニルアラニン残基のベンゼン環との $\pi$ - $\pi$ 相互作用であることを突き止めた。また、微生物の脱窒系において電子伝達体として機能するシュウドアズリンの構造をみると、フェニルアラニンのかわりにメチオニン残基が位置している。そこで、シュウドアズリンのメチオニン残基をフェニルアラニンへと置換した結果、シダ植物プラストシアニンで見いだされた性質を見事に再現することに成功し、弱い相互作用が顕著に活性中心の電子状態に影響を与えることを、世界に先駆けて報告してきた。

## 2. 研究の目的

タンパク質における弱い相互作用の構造と機能との相関をシステムティックに検討し、構造と機能との相関を考察することにより、タンパク質の特異的反応機構解明の一助とすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

電子スピン共鳴スペクトル (EPR) は、X-Band、77K で、共鳴ラマンスペクトル (RR) の測定は、647.1 nm 励起 (20 mW)

により行ない、Cu K-edge の X 線吸収スペクトル (XAS) は、スタンフォードシンクロトロン軌道放射光施設 BL7-3 において 10 K で行なった。酸化還元電位は、サイクリックボルタンメトリーによって決定した。

## 4. 研究成果

シュウドアズリンの Met16 残基は、活性中心である Cu(II) に配位する His81 残基の近傍に存在している (図 1)。この Met16 残基を芳

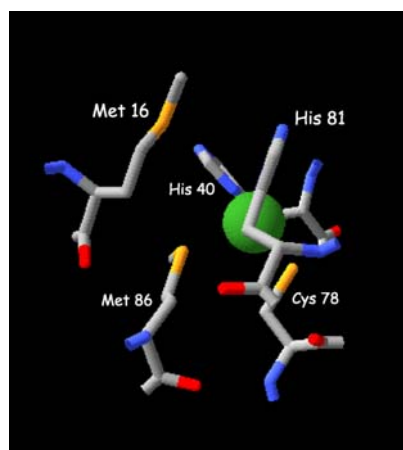


図 1 シュウドアズリンの活性中心構造

香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンに置換したところ、450 nm の CysS から Cu(II) の電荷移動吸収帯の強度が低くなると同時に、600 nm の電荷移動吸収帯が長波長側へとシフトし、顕著に強度が高くなることが認められた (図 2)。

EPR スペクトルにおいては、アキシシャル型構造の組成が多くなると認められた (図 3)。

シュウドアズリンの Met16X 変異体の酸化還元電位を測定したところ、芳香族アミノ酸を導入し、アキシシャル型構造の寄与が大きくなると、酸化還元電位が高くなることが認められた。

また、疎水性の側鎖を有するバリン (Met16Val)、イソロイシン (Met16Ile) に置換した脂肪族アミノ酸置換体では、CysS から Cu(II) への LMCT に由来する吸収帯の強度が低くなることが認められた。また、脂肪族アミノ酸置換体の EPR スペクトルは、ロンビック型構造の組成が多くなり、Met16Val と Met16Ile では、ロンビック型の構造が、ほぼ完全に支配的となることが判明した。

647.1 nm 励起による共鳴ラマンスペクトルは、芳香族アミノ酸置換体では、Cu(II)-S<sub>Cys</sub> が高波数側 (1~2 cm<sup>-1</sup>) へとシフトしたのに対し、脂肪族アミノ酸置換体では、低波数側 (4~10 cm<sup>-1</sup>) へとシフトすることが見いださ

れた。

Cu K-edge の X 線吸収スペクトルにおいて  $1s \rightarrow 3d(+4p)$  に由来するプレエッジバンドは、芳香族アミノ酸置換体では、ブロードニングをおこすのに対し、脂肪族アミノ酸では、強度が高くなり、比較的シャープなプレエッジ

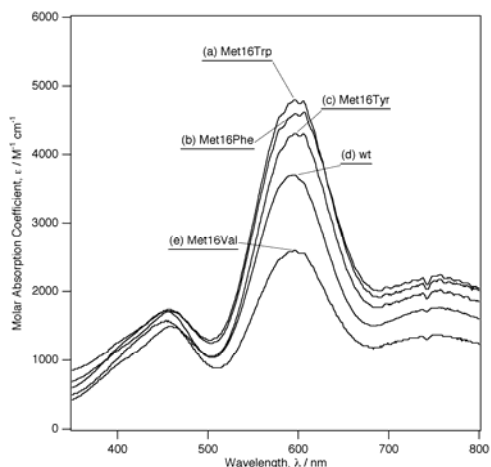


図2 シュウドアズリン Met16 変異体の電子吸収スペクトル

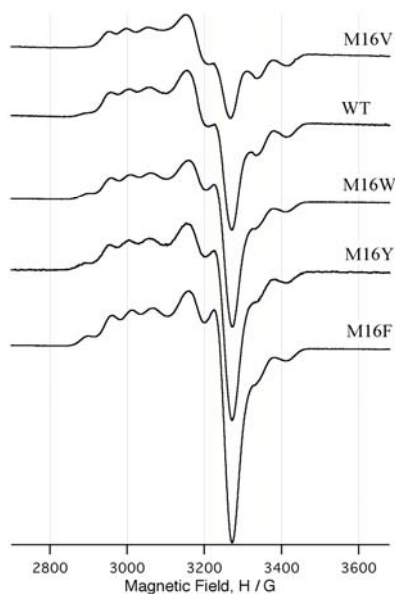


図3 シュウドアズリン Met16 変異体の電子スピン共鳴スペクトル (77 K).

バンドを与えることが判明した。

450 nm と 600 nm の CysS<sup>-</sup> から Cu(II) の電荷移動吸収帯の強度比が小さくなるとアキシャル型に、大きくなるとロンビック型になることが知られている。シュウドアズリンの Met16 位アミノ酸置換体の 450 nm と 600 nm

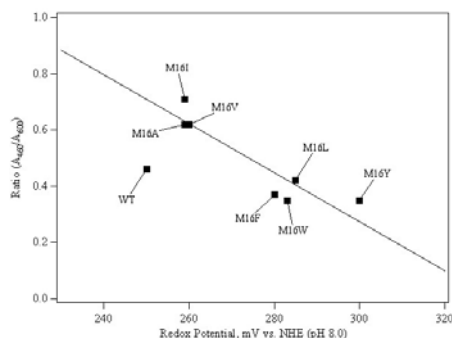


図4 Met16X シュウドアズリンの 450 nm と 600 nm の電荷移動吸収帯の強度比と酸化還元電位の相関

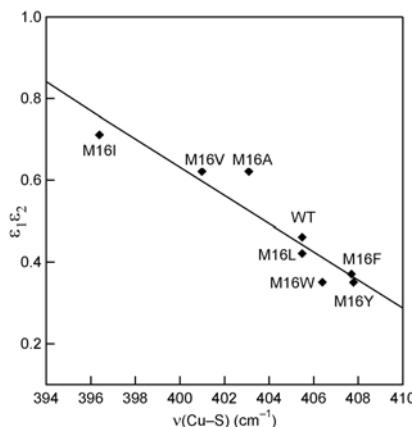


図5 Met16X シュウドアズリンの 450 nm と 600 nm の電荷移動吸収帯の強度比と Cu(II)-S<sub>Cys</sub> 伸縮振動との相関

の電荷移動吸収帯の強度比は、Met16Phe で、0.37 であり、Met16Ile で 0.71 であった。また、EPR スペクトルの解析から、芳香族アミノ酸置換体では、アキシャル型の構造が支配的になり、脂肪族アミノ酸置換体ではロンビック型の構造が支配的になること、そして、X 線吸収スペクトルのプレエッジバンドの強度の変化から、芳香族アミノ酸置換体においては、Cu(II)-S<sub>Cys</sub> の結合が強くなっていることが示唆された。450 nm と 600 nm の電荷移動吸収帯の強度比と EPR から得られるアキシャル/ロンビック構造の組成比との間に、強い相関があることが判明した。また、450 nm と 600 nm の電荷移動吸収帯の強度比と酸化還元電位との間にも強い相関が有ることが判明した (図4)。さらに、共鳴ラマンスペクトルから得られる Cu(II)-S<sub>Cys</sub> 伸縮振動と電荷移動吸収帯の強度比との間にも強い相関が認められた (図5)。

シュウドアズリンは、pH11 くらいのアルカリ性条件下において、ロンビック構造がアキシャル構造に転移する。興味深いことに、

Met16 残基をバリンやイソロイシンに置換した変異体では、アルカリ性条件下での構造転移が pH10 付近で起こると同時に、pH11 では、タンパク質全体の構造が部分的に変成することを見いだした。このことは、Met16 位のアミノ酸残基との相互作用が、タンパク質全体の構造のキープポイントとなっていることを示唆するものである。

これらのことを総合して考察すると、ブルー銅タンパク質に配位するヒスチジンへの弱い相互作用の様式が変化する事によって、活性中心の Cu(II) の電子状態が変化し、酸化還元電位などが顕著に変化するものと結論される。この結果は、タンパク質複合体形成などにおける弱い相互作用が生理学的に意味の有る範囲において顕著に反応性を微調整することを示唆するものであり、特にタンパク質の電子移動反応において、弱い相互作用の構造と機能が重要であることを意味するものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Rehab F. Abdelhamid, Yuji Obara, Yoshiko Uchida, Takamitsu Kohzuma, David M. Dooley, Doreen E. Brown, and Hiroshi Hori,  $\pi$ - $\pi$  Interaction between Aromatic Ring and Copper Coordinated His81 Imidazole Regulates the Blue Copper Active Site Structure □□ *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 165-173 (2007). (査読あり)

② Rehab F. Abdelhamid, Yuji Obara, Takamitsu Kohzuma, *Alkaline Transition of Pseudoazurin Met16X Mutant Proteins: Protein Stability Influenced by the Substitution of Met16 in the Second Sphere Coordination*, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1373- 1379 (2008). (査読あり)

③ Sachiko Yanagisawa, Peter B. Crowley, Susan J. Firbank, Anne T. Lawler, David M. Hunter, William McFarlane, Chan Li, Takamitsu Kohzuma, Mark J. Banfield, and Christopher Dennison, p-Interaction Tuning of the Active Site Properties of Metalloproteins, *J. Am. Chem. Soc.*, (査読あり)

[学会発表] (計 3 4 件)

① Takamitsu Kohzuma, Rehab F. Abdelhamid, Yuji Obara, The role of 2nd coordination sphere in a blue copper protein, pseudoazurin □□ 9th European Conference of Biological Chemistry, Broclow, Poland, September, 2008 (招待講

演)

② Takamitsu Kohzuma, UV Resonance Raman Spectroscopic Studies of Human Hematopoietic Prostaglandin D<sub>2</sub> Synthase, International Symposium on Biological Application of Vibrational Spectroscopy, Center for Advanced Science and Technology, Hyogo, Japan, March, 2007 (招待講演)

③ Takamitsu Kohzuma, Perturbation of the Protein Electronic Structure through Weak Chemical Interaction, 6th China-Japan Crossover Science Symposium, Zhengzhou, China, October, 2008. (招待講演)

[図書] (計 1 件)

元素 1 1 1 の新知識 第 2 版

桜井 弘、荒野 泰、上山憲一、小谷 明、高妻孝光、佐治英郎、鈴木晋一郎、寺嶋孝仁、中山祐正、根矢三郎、廣田 俊、藤井敏司、吉村哲彦、講談社、2009 年、4 6 1 ページ

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高妻 孝光

茨城大学・理工学研究科・教授

研究者番号：50215183

(2) 研究分担者

鳥飼 直也

高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学

研究所・准教授

研究者番号：70300671

(3) 連携研究者