

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19614005

研究課題名（和文） 光ラジカル化によるヌクレオチド関連酵素の活性機構の解明

研究課題名（英文） Enzyme Activation Mechanism Probed by Photoinduced Radical Generation in Proteins Related to Nucleotides

研究代表者

小堀康博 (KOBORI YASUHIRO)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：00282038

研究成果の概要（和文）：結核菌のカタラーゼ - ペロキシダーゼ(KatG)酵素における酵素反応初期過程を時間分解電子スピン共鳴法で室温において観測した。KatG-アントラキノンスルホン酸イオン（薬物）の複合体において、レーザー照射による光誘起電子移動反応を観測し、メチオニンカチオンラジカルと電子受容した薬物のアニオンラジカルで構成されるスピン相関ラジカル対をナノ秒領域で観測することに成功した。この薬物は KatG ヘムポケット内部に存在し、近傍のヘム、トリプトファン、チロシン残基を介して高速の電荷分離過程が起こっていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： To explore initial enzyme reaction processes in *Mycobacterium tuberculosis* *Catalase-Peroxidase* (KatG), time-resolved electron paramagnetic resonance (TREPR) method has been utilized. We have successfully detected the TREPR spectra of spin correlated radical pair polarization composed of methionine radical cation and radical anion of anthraquinone disulfonate at nanosecond time scale by the laser irradiation of KatG-anthraquinone disulfonate complex. It has been suggested that the quinone molecule is located inside the haem pocket region and that the fast, sequential electron transfer processes from the excited triplet quinone to methionine residue takes place via haem, tryptophan and tyrosine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 時限

科研費の分科・細目：光生命科学 9031

キーワード：スピンの化学

## 1. 研究開始当初の背景

リボヌクレオチドリダクターゼ(RNR)やカタラーゼ - ペロキシダーゼ(KatG)酵素などの様々な酵素反応において、ラジカル部位の伝達過程がタンパク質内の多段階のプロトン共役電子移動によって起こることが知られている。いくつものアミノ酸残基を介して、特定のアミノ酸残基がラジカル化されると言われている。しかしながらどのようなアミノ酸残基がラジカル伝達に重要な役割を果たすのかなどの詳細な機構は分かっていない。通常の光検出分光法などでは、ラジカル部位が伝達していく様子を直接観測することは不可能であり、ラジカルの生成や消滅のダイナミクスを直接実験的に調べる研究が酵素反応においてほとんど行われていない。

さらに、酵素内部で生じた反応中間体についてアミノ酸残基を含むラジカル対の立体配置が電子的相互作用でできる電子伝達機能をどのように制御するのかを実験的に決定した研究例はない。

三重項-三重項スピン分極移動は、励起エネルギー移動や光誘起電子移動機構を調べる有効な手段として以前から時間分解 EPR 法による研究が行われてきた。特に光励起によって生成する励起三重項状態は、項間交差および零磁場分裂相互作用の両者に大きな異方性を持っている。このため、反応前駆状態の分子配向に対する、生成系三重項状態の立体的配置がスピン分極移動で生成する時間分解 EPR 信号に大きな影響を与える。この性質を利用することによって、タンパク質中におけるリガンドの立体配置や電子供与体-受容体連結系の分子構造などナノスケールの立体構造や反応機構を特徴づけることが可能となる。このため、三重項-三重項スピン分極移動機構の理論的研究は極めて重要である。従来、スピン分極移動で生成する三重項副準位の電子スピン状態分布はスピン角運動量保存の観点で説明され、前駆三重項状態の基底スピン関数の性質を見出す確率で決まると考えられてきた。しかし、このような考え方は量子論で示されたものではなく、三重項スピン分極移動に対する理論的解釈は未だに確立されていなかった。スピン分極移動機構を精密な立体的配置の決定などに応用するためにはこの機構に対する量子論的取り扱いが必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、KatG 酵素による触媒反応の初期過程を物理化学的に解明する。この目的で、KatG タンパク質の表面領域に電子受容体やトリプトファンを含むポリペプチド鎖を分子認識させ、パルスレーザー光をトリガーとして光誘起電子移動による芳香族アミノ酸残基のラジカル化を行う。時間分解電子スピン共鳴法や蛍光検出磁気共鳴法でこれらラジカルの反応過程を観測する。

## 3. 研究の方法

まず、確率リウービル方程式に基づいて、スピン分極移動で生成する三重項スピン状態の電子スピン状態分布を密度行列で表し、反応前駆体におけるスピン状態の量子コヒーレンスがどのように生成系のスピン分極に反映されるかを一般化する。

時間分解電子スピン共鳴法を用いて 1) タンパク質活性領域で運動中にあるリガンドの運動経路や分子配向をスピン間相互作用として検出し、タンパク質表面領域の立体構造を特定する。次に、2) この領域におけるリガンド-アミノ酸残基間の一重項-三重項エネルギー差を特定し、電荷分離状態の電子伝達に対する電子的相互作用を決定する。最後に 3) タンパク質表面領域のアミノ酸残基からのラジカル転移過程を直接観測し、このタンパク質におけるラジカル伝達過程の移動経路を調べる。

## 4. 研究成果

図 1 に電子供与体-受容体系の励起三重項を経由する光誘起電子移動過程で三重項電荷分離状態に生成する電子スピン分極のスキームを示す。まず前駆状態である励起三重項状態は図 1A) に示されるように、スピン軌道相互作用に基づく項間交差によりゼロ磁場下の固有状態である基底スピン関数( $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ )に対して異方的な分布を生じる。図 1B) の外部磁場存在下では、三重項副準位に対する固有関数は  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$  の線形結合となっている。このため、この基底関数の係数に応じて副準位に対するポピュレーションが分配され、さらに量子コヒーレンスが生じている。生成系の三重項状態では、前駆体三重項とは主軸が

異なる図 1C)のスピ基底関数( $X'$ ,  $Y'$ ,  $Z'$ )によって外部磁場中の固有状態が表現されている。(図 1D)このとき図 1)において、ゼロ磁場下の基底変換(A  $\rightarrow$  C)および、外部磁場導入による基底変換(A  $\rightarrow$  Bおよび C  $\rightarrow$  D)を表すユニタリ行列を用いて、前駆状態の固有関数(1, 2, 3)から生成系の固有関数(1', 2', 3')への基底変換  $U_{CS}$  (B  $\rightarrow$  D)を表現することができる。

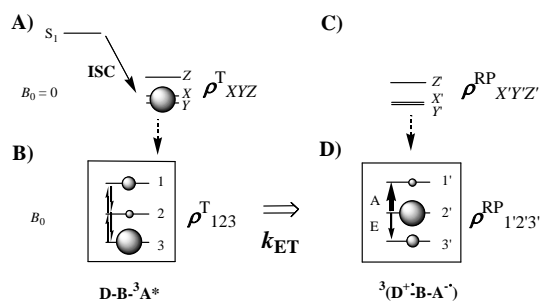


図 1. 励起三重項状態を経由した三重項-三重項電子スピン分極移動モデル

確率リウビル方程式による取り扱いから、この反応によって生成する図 1D)における電子スピン分極について、以下の 1) ~ 3) が示される。

- 1) 生成系の電子スピン状態分布を表す密度行列  $\rho^{RP}_{1'2'3'}$  は、前駆状態 B) で生じたポピュレーションとコヒーレンスから構成される密度行列  $\rho^T_{123}$  と図 1 の B  $\rightarrow$  D の基底変換  $U_{CS}$  により、ユニタリ変換  $\rho^{RP}_{1'2'3'} = U_{CS}^{-1} \rho^T_{123} U_{CS}$  で表現される。
- 2) 反応が前駆状態の外部磁場で生じた量子コヒーレンスの発展する周期より十分速い場合、このコヒーレンスは初期状態のまま上記ユニタリ変換で生成系の電子スピン分極に受け継がれる。
- 3) 反応が前駆状態における量子コヒーレンスの発展周期より十分遅い場合、外部磁場で生じた  $\rho^T_{123}$  におけるコヒーレンスは量子ビートを繰り返す。このことにより、反応によって移動されるべきコヒーレンスは事実上平均化を受けて消滅し、生成系のスピン分極に受け継がれない。このとき三重項機構による net な電子スピン分極が現れる。

以上の理論的考察に基づき、時間分解 EPR スペクトルのシミュレーションを行うことによって、様々な実験結果を合理的に説明することができた。

例として、図 2 にフラレンと亜鉛ポルフィリンとをジフェニルジシランで連結した分子の光誘起分子内電荷分離過程を観測した結果を示す。レーザー励起後 1 マイクロ秒以降に観測された時間分解 EPR 信号はフラレン励起三重項状態を経由して生成した

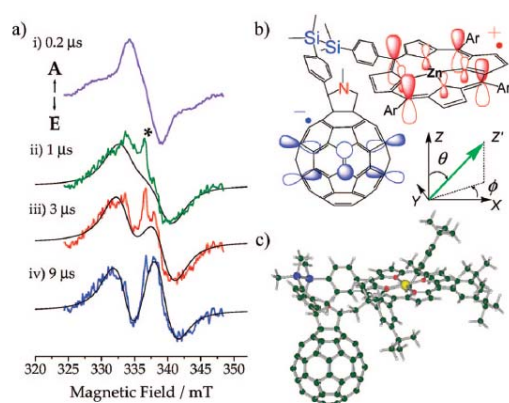


図 2. フラレン-ポルフィリン連結分子のレーザー照射で得られた時間分解 EPR スペクトルおよび三重項-三重項スピン分極移動モデルによるシミュレーションから明らかになった電荷分離状態の立体構造

電荷分離状態に帰属された。上で述べた三重項-三重項電子スピン分極移動モデルに従ってスペクトルシミュレーションを行い、電荷分離状態の立体配置を図 2b) のように決定することができた。さらに交換相互作用の値を得ることができた。この値から電子的相互作用の大きさが  $4 \text{ cm}^{-1}$  と比較的小さいことが分かった。この弱い相互作用から、電荷分離状態における不對電子軌道間が直交した立体配置(図 2b)のために軌道の重なりが小さくなり、電荷再結合を大きく抑制していることが具体的に明らかにされた。以上の結果は光エネルギー変換効率の高いナノ分子システム的设计において極めて有用なデータである。

次に KatG-アントラキノンスルホン酸(薬物)の複合体において、レーザー照射による光誘起電子移動反応を観測し、メチオニンカチオンラジカルと電子受容した薬物のアニオンラジカルで構成されるスピン相関ラジカル対をナノ秒領域で観測することに成功した。得られた測定結果から、この薬物は KatG ヘムポケット内部に存在し、近傍のヘム、トリプトファン、チロシン残基を介して高速の電荷分離過程が起こっていることが示唆された。これまで、77K における Kat 酵素反応中間体の電子スピン共鳴測定では、ヘム近傍のチロシン残基が酵素反応によってラジカルとなっていることが報告されている。今回の光ラジカル化による時間分解電子スピン共鳴測定の結果から、室温では、酵素反応においてメチオニンが酸化されることを示した。以上のことから、本酵素反応機構を明らかにする上で極めて

て重要な結果が得られたと考えている。

得られた電荷分離状態による時間分解共鳴スペクトルから、立体配置、距離や電子の相互作用を特徴づけるための量子論に基づく解析手法を確立した。励起三重項状態の量子コヒーレンスの効果を考慮に入れたスピン分極移動モデルを構築した。このモデルにより電子スピン共鳴スペクトルから、メチオニラジカルにおける立体構造、ラジカル対の相対分子配向、ラジカル間の距離および交換相互作用から得られる電子的相互作用の値を決定しヘムポケット内部における薬物分子の位置や電子的相互作用を同時に特徴づけることに成功した。

光合成光学系 II 反応中心において光電荷分離状態の電荷再結合過程で生成する励起三重項状態の時間分解電子スピン共鳴スペクトルを観測した。極低温では、電荷分離状態における一重項から三重項ゼロ量子準位への変換を経た三重項電荷再結合でアクセサリクロロフィルに生じた励起三重項状態に帰属された。一方、89 Kにおいては、アクセサリクロロフィルとフェオフィチンの両者の励起三重項信号の重ね合わせによるスペクトルが得られた。さらに、この信号はZカノニカル成分の信号のみが著しく減少した。以上の結果について、三重項スピン分極移動機構に基づく解析を行ったところ、初期電荷分離状態において異方的な一重項-三重項スピン緩和が起こること、および三重項電子スピン分極移動により、フェオフィチン-アクセサリクロロフィル間の三重項エネルギー移動が起きることが明らかになった。この結果は1)光励起初期過程で生成する初期電荷分離状態において、アクセサリクロロフィルとフェオフィチン色素分子間で電子のホッピングによる交換が起こり、2)生成した励起三重項状態においても両色素間の励起子移動によるホッピングが起こることを示した。この研究成果は高等植物の光合成初期過程で起こる電子伝達経路を明らかにするものであり、今後さらに詳細な検討を進めていく予定である。

#### 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3件)

(1) "Time-Resolved EPR Characterization of a Folded Conformation of Photoinduced Charge-Separated State in Porphyrin-Fullerene Dyad Bridged by Diphenyldisilane" Y. Kobori, Y. Shibano, T. Endo, H. Tsuji, H. Murai, K. Tamao, J. Am. Chem. Soc., 131, 1624-1625 (2009).

(2) "Magnetophotoselection in the Spin-Polarized Triplet State Radical-Ion Pair Formed in the Photo-Induced Solvent-Mediated Electron Transfer Reaction from *N,N*-Diethylaniline to Xanthone in Viscous Solution" A. Ishigaki, Y. Kobori, H. Murai, J. Phys. Chem. A, 113, 633-638 (2009).

(3) "Encapsulated-guest rotation in a self-assembled heterocapsule directed toward a supramolecular gyroscope" H. Kitagawa, Y. Kobori, M. Yamanaka, K. Yoza, K. Kobayashi, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 106, 10444-10448 (2009).

[学会発表] (計5件)

(1) 朽方将登、村井久雄、吉松勝彦、藤原健智、小堀康博 「時間分解 ESR 法によるキノン類と酵素 KatG の光誘起電子移動の観測」2008 年光化学討論会 2008 年 9 月 11 日大阪府立大学学中百舌鳥キャンパス

(2) 遠藤 翼・柴野佑紀・辻 勇人・村井久雄・玉尾皓平・小堀康博 「オリゴシランで連結したフラレン-ボルフィリン系の光電荷分離状態の立体構造」2008 年光化学討論会 2008 年 9 月 11 日大阪府立大学学中百舌鳥キャンパス

(3) 小堀康博・婦木正明・村井久雄 「タンパク質-リガンド間の光誘起電子移動で生成したスピン相関ラジカル対の立体配置」第 47 回電子スピンサイエンス学会年会 2008 年 10 月 2 日九州大学医学部百年講堂

(4) 片桐秀輔 近藤 徹 三野広幸 小堀康博 「光合成光学系 II 反応中心の光電荷再結合で生成する励起三重項状態」第 47 回電子スピンサイエンス学会年会 2008 年 10 月 2 日九州大学医学部百年講堂

(5) 片桐秀輔 近藤 徹 三野広幸 小堀康博 「光合成光学系 II 反応中心の光電荷再結合で生成する励起三重項状態」第 89 日本化学会春季年会 2009 年 3 月 29 日日本大学理工学部船橋キャンパス

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小堀康博 (KOBORI YASUHIRO)  
静岡大学・理学部・准教授  
研究者番号：00282038

(2) 研究分担者

村井久雄 (MURAI HISAO)  
静岡大学・理学部・教授  
研究者番号：50142261

(3) 連携研究者