

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770163

研究課題名 (和文) 呼吸鎖複合体蛋白質における電子・プロトン移動の理論計算による解析

研究課題名 (英文) Computational analysis of electron/proton transfer in membrane protein complexes

研究代表者 石北 央

(ISHIKITA HIROSHI)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・特定助教

研究者番号：00508111

研究成果の概要 (和文)：

蛋白質の立体構造を用いた理論化学計算により、膜蛋白質や酵素における電子移動・プロトン移動反応を複数の蛋白質で行った。蛋白質中の全てのアミノ酸残基の効果を考慮して蛋白質活性部位の解離性アミノ酸残基の pKa 値や酸化還元電位を計算しその結果を解析することにより、蛋白質中のプロトン結合サイト、酸化還元活性部位が蛋白質環境によっていかに巧妙に制御されているか、その仕組みを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Electron/proton transfer reactions in membrane-protein complexes or enzymes were analyzed using computational approaches and protein crystal structures. As a result, contributions of the protein environments to (i) protonation/deprotonation reactions in the proton binding sites or (ii) redox potentials of the redox active sites were revealed in the present study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物

1. 研究開始当初の背景：生体中では、巧妙な分子制御によりエネルギーの変換が非常に高効率に行われている。特に、ミトコンドリア内膜では ATP 合成に直接的に関わる呼吸鎖電子伝達酵素群が存在し、生命活動に必須のエネルギー生産を担っている。哺乳類ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (complex I)、コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素 (complex II)、ユビキノール-シトクロム c 酸化還元酵素

(complex III)、シトクロム c 酸化酵素 (complex IV)、ATP 合成酵素 (complex V) 等の複合体蛋白質によって成り立っている。これらの蛋白質内では、flavin、Fe-S cluster、heme 等が共役して電子移動・プロトン移動反応におけるドナー、アクセプターとなり、ミトコンドリア内膜に電気化学ポテンシャル勾配を形成し、complex V における ATP 合成の駆動力を与える。一般に、電子移動 (プロトン移動反応) の駆動力 driving force は、

donor-acceptor 間の酸化還元電位(pKa)の差である。しかし、巨大な蛋白質複合体において酸化還元電位や pKa 値を実験的手法によって測定することは、困難であることも多い。一方、理論計算的手法では、蛋白質の立体構造が既知であれば、光合成反応中心蛋白質のような巨大蛋白質中の酸化還元電位や pKa 値等も計算可能である。また、それらにおける蛋白質構成要素（アミノ酸残基、バックボーン等）の寄与も計算できるので、複雑な蛋白質の解析において理論計算による解析は特に有力な解析手法である。理論計算手法を用いて、complex I 等のコファクターである鉄・硫黄クラスター、ヘム、フラビン分子等を合理的にかつ正確に取り扱う手法を確立することが望まれる。

2. 研究の目的：呼吸鎖膜蛋白質として生体内のエネルギー変換に重要な役割を持つ蛋白質複合体の一群「complex I から complex V における電子移動・プロトン移動反応の解明」を念頭に置きつつ、その中の鉄・硫黄クラスター、フラビン分子間の電子移動・プロトン移動反応機構の解明に焦点を絞る。蛋白質環境における鉄・硫黄クラスター、フラビン分子を含む系の電子移動反応に関する理論計算研究は、ほとんど前例がない。したがって、これらの分子を含む蛋白質を適宜モデル蛋白質として研究対象とし、鉄・硫黄クラスター、フラビン分子を含む蛋白質の理論計算系を確立する。

3. 研究の方法：計算に用いる蛋白質の立体構造データは Protein Data Bank (www.rcsb.org) で得られるもの及びそこに掲載予定のものを利用した。その構造に適用する force field、parameter set として、CHARMM、all-atom CHARMM22 (Brooks et al. *J. Comput. Chem.* 4(1983) 187)、あるいは Molaris (Lee, Chu, Warshel, *J. Comput. Chem.* 14(1993) 161)を用いた。parameter set に含まれていない cofactor 等の部分電荷の計算・小分子系のエネルギー計算は、量子化学計算プログラムである Jaguar(Schrodinger 社)、あるいは Gaussian 03 を用いた。蛋白質の titration に関しては、蛋白質立体構造を homogeneous な electrostatic continuum model として取り扱うことができるプログラムである MEAD (Bashford & Karplus, *Biochemistry* 29(1990) 10219)によって、linearized Poisson-Boltzmann 方程式を解くことにより行った。その output (intrinsic pKa や interaction term) をサンプリングに

よって酸化還元活性部位の redox probability、アミノ酸解離基の protonation probability を求めた。

4. 研究成果

蛋白質の X 線結晶構造解析結果を用いて 1) 酵素 acetoacetate decarboxylase における活性部位の塩基性アミノ酸残基 (Lys115) の解離度が異常に高い(= pKa 値が異常に低い)ことを解明すべく、蛋白質中の全アミノ酸の解離度を適切に求めた上で Lys115 の pKa を計算した。その結果、Lys115 の pKa 値が低い理由は、蛋白質中での正電荷間の反発ではなく、むしろ蛋白質環境の疎水性が理由であることを突き止めた。2) 神経系制御に関わるチャネル蛋白質 ASIC1 におけるプロトン結合サイトを特定し、その成果を論文発表した。3) 生体内電子伝達系に関わる蛋白質 rubredoxin における活性部位鉄・硫黄クラスターの関与する電子移動反応を解析した。鉄・硫黄クラスターの酸化還元電位には、配位子である Cys のアミノ酸主鎖のコンフォメーションも重要であることがわかった。4) フラビンと鉄・硫黄クラスターを含む蛋白質 xanthine oxidoreductase に関する酵素活性に関する研究を開始した。この蛋白質は細菌から高等動物まで幅広く存在する酵素であり、抗高尿酸血症薬、抗痛風薬としての尿酸生成阻害剤の標的酵素である。通常は NAD⁺ を電子受容体とする xanthine dehydrogenase (XDH) として組織中に存在する。しかし哺乳動物に限って、酸素を電子受容体とする xanthine oxidase (XO) へと活性が変換する。両酵素は同じアミノ酸配列、同じコファクターを持つにもかかわらず、全く異なる酵素活性を持ち、フラビン部位の性質が XDH と XO で異なることに起因する。本研究でフラビンの酸化還元電位計算を行った結果、フラビン周辺のアミノ酸 422-433 からなるループ部のコンフォメーションの違いが、XDH と XO の電位差に最も重要であることが解明できた (論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① **Hiroshi Ishikita**, Koji Hasegawa, and Takumi Noguchi *Biochemistry* (2011) in press "How does the Q_B site influence propagate to the Q_A site in Photosystem II?"(査読有)
- ② **Hiroshi Ishikita** *PLoS One* 6 (2011) e16920, 1-7 "Proton-binding sites of

acid-sensing ion channel 1” (査読有)

- ③ Ana Patricia Gamiz-Hernandez, Gernot Kieseritzky, Hiroshi Ishikita and Ernst-Walter Knapp *J. Chem. Theory Comput.* **7** (2011) 742-752

”Rubredoxin function: redox behavior from electrostatics” (査読有)

- ④ Hiroshi Ishikita *FEBS Lett.* **584** (2010) 3464-3468 ”Origin of the pK_a shift of the catalytic lysine in acetoacetate decarboxylase” (査読有)

- ⑤ 石北 央 生物物理 209 (2010)

生物物理学会会誌 総説「光合成蛋白質における酸化還元電位制御の理論解析(査読無)

- ⑥ Hiroshi Ishikita and E.-W. Knapp, *J. Biol. Inorg. Chem.* **14** (2009) Supplement 1, 173 “Oxidation power of the chlorophyll pair P680 in Photosystem II” (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 【ポスター発表】 2011/3/28, JST さきがけ研究領域合同シンポジウム「人類の危機に挑む研究開発：光と太陽エネルギー」(神奈川県、神奈川県)
- ② 【招待講演】 石北 央 「水分子酸化を可能とする光合成系 II 内の電子移動」 2011/3/25-28, 日本物理学会 第 66 回年次大会 (新潟大学、新潟)
- ③ 【招待講演】 石北 央 「水分子酸化を可能とする光合成反応中心蛋白質の電子移動」、2011/3/9-10, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子科学と生理学が解き明かす植物の光エネルギー変換の新展開」(大阪大学蛋白質研究所、大
- ④ 【招待講演】 Hiroshi Ishikita

“Oxidation power of the chlorophyll pair P680 in Photosystem II” 2011/3/1-5, 日本-フィンランド 2 国間セミナー「Future prospects of photosynthetic organisms: from genomes to environment」(岡山ロイヤルホテル、岡山)

- ⑤ 【招待講演】 石北 央 「光合成反応中心タンパク質における酸化還元電位の理論解析」

2011/1/20, 分子科学研究所オープンセミナー (分子科学研究所、愛知)

- ⑥ 【招待講演・組織委員】 Hiroshi Ishikita “Oxidation Power of the Chlorophyll Pair P680 in Photosystem II” 2010/12/4-6, 第 70 回分子科学国際研究会 (分子科学研究所、愛知)

- ⑦ 【ポスター発表】 2010/11/12-14, Frontiers in the Simulations of Macromolecules, Symposium in Honor of Arie Warshel (Los Angeles, USA)

- ⑧ 【口頭発表】 Hiroshi Ishikita “Hydrogen bonding pattern controls the electron transfer energetics between quinones in photosynthetic reaction centers” 2010/9/20, 第 48 回日本生物物理学会年会 (東北大学、仙台)

- ⑨ 【口頭発表】 Hiroshi Ishikita “Analyzing protein bioenergetics using 3D structural information” 2010/9/15, CBI 学会 2010 年大会 (一橋記念講堂、東京)

- ⑩ 【ポスター発表】 2010/8/22-28, 15th International Congress on Photosynthesis (北京、中国)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Ishikita/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石北 央 (ISHIKITA HIROSHI)

京都大学・生命科学系キャリアパス形

成ユニット・特定助教

研究者番号 00508111