

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550145

研究課題名（和文）ブルー銅蛋白質の電子状態を制御する弱い相互作用に関する研究

研究課題名（英文）Study on the Weak Interaction Regulating the Electronic Structure of 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（和文）：

ブルー銅蛋白質シュウドアズリンの Met16 を種々のアミノ酸に置換した Met16X 変異体を作成し、分光学的性質、および電気化学的性質について検討した。電子吸収スペクトル、および EPR スペクトルから、Met16 位に導入したアミノ酸残基の側鎖によって、rhombic/axial 成分を系統的に変化させることが可能であることを見いだした。また、His 残基の導入によって pH 変化に対応した構造と機能の変換ができることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

The Met16X pseudoazurin mutants were constructed, and spectroscopic and electrochemical properties of the mutant proteins were investigated. The electronic absorption and EPR spectra of Met16X variant proteins demonstrated the axial/rhombic components are rationally changeable by the character of the side chain group of respective amino acids. Moreover the structure and function of Met16His can be modulated as a function of pH by the protonation/deprotonation of the newly introduced histidine moiety.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：ブルー銅蛋白質・弱い相互作用・シュウドアズリン・X線結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

近年、種々の蛋白質において、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、蛋白質機能との相関が検討されつ

つある。蛋白質や DNA のような生体分子における、弱い相互作用の理解は、蛋白質の構造構築原理や機能、ならびにダイナミクス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蛋白質や酵素では、弱い相互

作用によって、電子状態が変化し、反応の制御が行われている。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の報告や、カチオン- $\pi$ 相互作用についての報告が増えつつあり、蛋白質における弱い相互作用の重要性が更に認識されつつある。しかし、弱い相互作用は、分光学的にも結晶学的にも微弱な変化である場合が多く、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することは困難である。研究代表者である高妻は、1999年に世界に先駆けて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し、プラストシアニンと同様にブルー銅蛋白質に分類されるシュウドアズリンの構造の検討から、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ことを見いだした。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、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報告した。さらに、シュウドアズリンの Met16 残基を芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン及び疎水性の側鎖を有するバリン、ロイシン、イソロイシンに置換したミュータントシュウドアズリンを作製し、蛋白質内の弱い相互作用について検討を行なったところ、活性中心の電子状態の変化は、アキシヤル型とロンビック型構造の動的平衡関係に起因することを見いだした。また、弱い相互作用によって摂動を受ける活性中心構造の状態は、相互作用の様式と相関を持つことを見いだしている。また、蛋白質中における弱い相互作用が蛋白質の構造安定性にも関与していることを報告してきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果を基盤として、弱い相互作用の検出が比較的容易なブルー銅蛋白質を主として用い、蛋白質における弱い相互作用の伝達様式、加成性等を、紫外共鳴ラマンスペクトル、X線吸収スペクトル、X線結晶構造解析によって実験的に調べ、分子軌道法計算によって、分光データの詳細な解析を行ない、弱い相互作用と蛋白質構造・機能との相関を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

小さな摂動に鋭敏に応答する電荷移動吸収帯を有するため、弱い相互作用の検出が比較的容易なブルー銅蛋白質シュウドアズリン、およびその部位特異的変異体、プラストシアニンを主として用いた。蛋白質における弱い相互作用の蛋白質内・蛋白質間での伝達様式、加成性等を、共鳴ラマンスペクトル、X線吸収スペクトルならびにX線結晶構造解析によって調べた。

## 4. 研究成果

ブルー銅蛋白質シュウドアズリンの Wild Type(WT)、Met16 を Phe に置換した Met16Phe 変異体、Met16 を His に置換した Met16His のタンパク質を結晶化し、X線結晶構造解析を行なったところ、Wild Type では 1.1 Å、Met16Phe 置換体では 1.4 Å、Met16His 置換体では 1.6 Å分解能で構造を決定することができた。WT の構造では活性中心の銅に二つの配座が見いだされ、それぞれの配座の占有率は、分光で得られているデータと一致しており、PAz の活性中心の Cu 原子は、二つの構造をとっていることが結晶構造解析からも明らかとなった(図1)。Met16Phe、Met16His PAz の活性中心の構造を比較したところ、Met16Phe PAz では Cu-S(Met86)の結合距離が Met16His PAz のものよりも長くなり、EPR スペクトルから観測されている異なる二つの構造のうち、より axial な構造をとっていることが判明した。また、活性中心における構造情報の詳細について X線家集スペクトルによる検討を行った。Wild type 及び Met16 変異体の EXAFS では、活性中心に配位する N 原子(His41, His81)、S 原子(Cys78)、S 原子(Met86)と Cu(II)との原子間距離が明らかになり、Wild type では、それぞれ 1.96 Å、2.17 Å、2.57 Åであった。Wild type 及び変異体間における Cu(II)と配位原子の距離は、Cu-S(Met86)で最大 0.23 Åの差(Met16Phe - Met16Val)が見られ、変異体間で Cu-N(His40, His81)と Cu-S(Cys78)の変化は小さかった(< 0.02 Å)。Cu-S(Met86)の原子間距離は、以前に EPR によって見積もられた axial 成分の変化と一致した変化をしていることが明らかとなった。

シュウドアズリンの野生型、Met16X (X=Phe, Val, Leu, Ile)変異体を作成し、NMRによる相互作用の検討を行った。1H-NMRは、750 MHz NMRによって測定した。それぞれのシュウドアズリンの TOCSY、NOESYを検討したところ、芳香族アミノ酸を導入した Met16Phe 変異体では、Cu に配位した His81C<sup>62</sup>H の NMR シグナルが野生型に比べて高磁場側にシフトしていることを見いだされた。このことは、新たに導入した芳香族アミノ酸側鎖と His81 のイミダゾール環の環電

流効果によるものであると結論された。また、溶液中の構造解析の結果から、溶液構造は結晶構造と一致していることが判明した。

さらに、本研究においては、第2配位圏における動的な弱い相互作用について検討するために、Met16位にHis残基を導入し、イミダゾール基のプロトン化/脱プロトン化による構造変化等について検討を行った。ブルー銅タンパク質において450nmと600nm

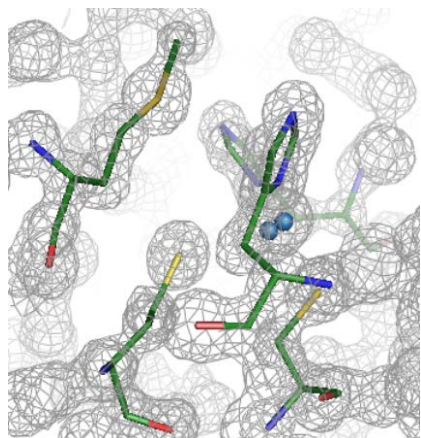


図1 Wild Type シュウドアズリンの活性中心構造 (1.1 Å分解能)

付近の電子吸収スペクトルの分子吸光係数の比( $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$ )は、活性中心構造の指標として用いられている。pH 7.0において、Met16Hisは、 $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}=0.51$ であり、Wild-Type( $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}=0.46$ )よりも、rhombic成分が多くなる。このことは、EPRスペクトルから見積もられたrhombic成分が、約84%であり、Wild Type (77%)よりもrhombic成分が増えていることから支持された。

Met16His変異体の構造に関する知見を得るために、Met16His変異体の結晶を作成し、X線結晶構造解析を行なったところ、PAzの全体構造は保持されたままであり、新たに導入したHis16イミダゾール環と、銅イオンに配位するHis81イミダゾール環同士が、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用していることが見いだされた。

新たに導入したHisへのプロトン化の効果を調べるために、酸性条件下における分光学的挙動を検討した。pH 4.0では、Met16HisのCT吸収帯の強度比 $\epsilon_{450}/\epsilon_{600}$ は0.31へと変化し、新たに導入したHisイミダゾール基のプロトン化によってrhombic成分が顕著に減少した。EPRから求めたrhombic成分は、約65%であった。pH 3付近において、Met16Hisの可視部のCT吸収帯が消失するが、Wild Typeでは、CT吸収帯は保持されることが見いだされた。CDスペクトルの検討結果から、Met16Hisは、部分的にUnfold

構造となり、Cu原子が脱離したアポ型になっていることが明らかとなった。このことは、16位Metが、シュウドアズリンの構造形成において、何らかの重要な役割を有していることを示唆するものである。

Met16位の変異が蛋白質の構造安定性に及ぼす効果について、ESI質量分析法によって検討したところ、wild type及びMet16変異体のESIマスペクトルは、pH 8で、主たる電荷状態が+7のものが主であることが見出された。pH 3では、+14のを中心とした+9~+15の電荷状態を有する事が見出された。図1に、ESIマスペクトルから見積もった、wild type及びMet16変異体のfolded-holo、folded-apo、unfoldedの割合の酸性条件下における変化を示した。pH 3において、Met16Phe変異体のfolded-holoの割合の減少が、wild type及びMet16Val、Met16Ile、Met16His変異体よりも小さく、folded-apoの割合も最も小さかった。この事から、活性中心が抜け落ちにくくなっている事が考えられた。また、unfoldedの割合は、Met16Phe変異体で最も小さくなり、タンパク質の構造が、弱い相互作用によって安定化されていると結論した。

シダ植物由来のブルー銅蛋白質であるプラストシアニンは、通常的高等植物型プラストシアニンとは異なり、活性中心のHis残基近傍にフェニルアラニンを有し、高等植物型プラストシアニンとは異なる電子移動反応を示す。本研究においては、オシダ*Dryopteris crassirizhoma*由来のプラストシアニンと、高等植物型の*Ulva pertusa*由来のプラストシアニンの電子状態等をX線吸収スペクトルによって調べた。オシダ由来プラストシアニンと*Ulva*由来プラストシアニンのCu(II)のX線吸収スペクトルでは、オシダ由来プラストシアニンのCu-K edge positionは、*Ulva*由来プラストシアニンより低エネルギー側に得られた。このことから、オシダ由来プラストシアニンの活性中心の銅は、*Ulva*由来よりもより電子密度が高くなっていると結論づけた。また、酸性条件下におけるCu(I)のX線吸収スペクトルは、*Ulva*由来プラストシアニンでは高等植物型プラストシアニンで見いだされる3配位構造に特徴的なスペクトルを与えるのに対し、オシダ由来プラストシアニンのX線吸収スペクトルは4配位構造に特徴的なスペクトルを与えたことから、オシダ由来プラストシアニンにおいては、第二配位圏の芳香族アミノ酸が活性中心の電子状態に影響を及ぼし、銅イオンに配位しているヒスチジンイミダゾール基の解離が妨げられていると結論した。

シュウドアズリン、プラストシアニンの活性中心近傍における弱い相互作用に関する、分光学的検討、X線結晶構造解析、電気化学

的知見から、弱い相互作用は、ブルー銅蛋白質の構造や性質に顕著に影響を及ぼすことが明らかとした。今後、そのメカニズムの解明を行い、弱い相互作用を戦略的に導入する事による蛋白質機能のデザイン等の研究を推進する予定である。

#### 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・査読有り] (計5件)

- ① Hiromi Togashi, Junko Yano, Vittal K. Yachandra, and Takamitsu Kohzuma, X-ray Absorption Spectroscopy of an Unusual Plastocyanin from a Fern, *Dryopteris crassirhizoma*, *Chem. Lett.*, **42**, 89-90 (2013). DOI: 10.1246/cl.2013.89
- ② K. Fujita, M. H.-Fujita, D. E. Brown, Y. Obara, F. Ijima, T. Kohzuma, D. M. Dooley, Direct electron transfer from pseudoazurin to nitrous oxide reductase in catalytic N<sub>2</sub>O reduction, *J. Inorg. Biochem.*, **115**, 163-173 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.07.013>
- ③ Naoto Yamaguchi, Tatsuya Naiki, Takamitsu Kohzuma, Toshikazu Takada, Fumihiko Sakata, Seiji Mori, Theoretical studies on model reaction pathways of prostaglandinH2 isomerization to prostaglandin D2/E2, *Theor Chem Acc* (2011) 128:191–206. DOI: 10.1007/s00214-010-0814-7
- ④ Yoshiko Uchida, Yoshihiro Urade, Seiji Mori, and Takamitsu Kohzuma, UV Resonance Raman Studies on the Activation Mechanism of Human Hematopoietic Prostaglandin D<sub>2</sub> Synthase by a Divalent Cation, Mg<sup>2+</sup> *J. Bioinorg. Chem.*, **104**, 331-340 (2010). DOI:10.1016/j.jinorgbio.2009.12.003
- ⑤ Marzena B. Fitzpatrick, Yuji Obara, Koyu Fujita, Doreen E. Brown, David M. Dooley, Takamitsu Kohzuma, Roman S. Czernuszewicz, Non-covalent interactions in blue copper protein probed by Met16 mutation and electronic and resonance Raman spectroscopy of *Achromobacter cycloclastes* pseudoazurin, *J. Bioinorg. Chem.*, **104**, 250-260 (2010). DOI:10.1016/j.jinorgbio.2009.11.004

[学会発表] (計19件)

- ① T. Yamaguchi, Y. Nihei, S. Asamura, D. Sutherland, M. Stillman, T. Kohzuma, Weak Interaction Effects on the Protein Stability of Blue Copper Protein,

Pseudoazurin from *Achromobacter cycloclastes* IAM 1013, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2012年9月, Granada (スペイン)

- ② Takamitsu Kohzuma, Sayaka Asamura, Yuko Nihei, and Maski Unno, Effect of “Proton Switch” Induced by the Newly Introduced Uncoordinated Histidine in the Vicinity of the Blue Copper Active Site: High Resolution X-ray Crystallographic, Spectroscopic, and Electrochemical Studies of Met16His Pseudoazurin, 金属の関連す生体関連反応シンポジウム、2012年6月、金沢大学
- ③ 山口峻英, 仁平裕子, 松儀可奈子, Duncan Sutherland, 矢野淳子, Vittal Yachandra, Martin Stillman, 高妻孝光, ブルー銅タンパク質シュウドアズリンにおける弱い相互作用の効果、日本化学会第92春季年会、2012年3月、慶應義塾大学日吉キャンパス
- ④ 山口峻英, 仁平裕子, 浅村紗矢香, Duncan Sutherland, Martin Stillman, 高妻孝光, ブルー銅タンパク質シュウドアズリンにおける弱い相互作用の加成性、第22回日本化学会茨城地区研究交流会、2011年11月、東海村
- ⑤ T. Kohzuma, Y. Nihei, S. Asamura, M. Unno, Y. Obara, T. Yamaguchi, K. Matsugi, R. S. Czernuszewicz, D. Sutherland, M. Stillman, and R. K. Szilagy, Effect of the non-covalent weak interaction on the electronic structure of blue copper protein, Parry Sound, Canada, May, 2011.
- ⑥ T. Yamaguchi, Y. Nihei, S. Asamura, T. Kohzuma, Additivity of Weak Interaction Effect in a Blue Copper Protein, Met16His/Thr36Lys Pseudoazurin, 3rd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2011年5月, Parry Sound (カナダ)
- ⑦ Tomonori Muroya, Rika Takahashi, Hideto Terakado, Masanori Kaminaga and Takamitsu Kohzuma, Alkaline Structural Transition of Laccase from *Rhus vernicifera* of Okukuji Area, Ibaraki Prefecture, Japan, 3rd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2011年5月, Parry Sound (カナダ)
- ⑧ Akiko Takashina, Masaki Unno and Takamitsu Kohzuma, Atomic Resolution X-ray crystallographic Analyses and Spectroscopic Studies of a Cytochrome c' from *Alcaligenes xylosoxidans*, 2011年5月, Parry Sound (カナダ)

- ⑨ Hiromi Togashi, Sayaka Asamura, Junko Yano, Vittal Yachandra, Fuminori Yoshizaki, and Takamitsu Kohzuma, X-ray Absorption Spectroscopic Studies of Blue Copper Proteins, Fern Plastocyanin and Pseudoazurin, 3rd Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2011年5月, Parry Sound (カナダ)
- ⑩ Akiko Takashina, Masaki Unno, Takamitsu Kohzuma, Atomic resolution X-ray crystallographic analyses, spectroscopic and kinetic studies of a cytochrome *c'* from *Alcaligenes xylosoxidans*, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 2010, Hawaii Convention Center (アメリカ)
- ⑪ Takamitsu Kohzuma, Yuji Obara, Yuko Nihei, Koyu Fujita, Doreen E. Brown, David M. Dooley, Roman Czernuszewicz Structure and Functions of Non-Covalent Weak Interaction Probed with a Blue Copper Protein, Met16X Pseudoazurin Variants, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 2010, Hawaii Convention Center (アメリカ)
- ⑫ Yuji Obara, Marzena B. Fitzpatrick, Roman S. Czernuszewicz, Takamitsu Kohzuma, Effect of Weak Interaction on the Electronic Structure and Electrochemical Properties of Pseudoazurin Met16X mutants, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 2010, Hawaii Convention Center (アメリカ)
- ⑬ 高階明子, 海野昌喜, 高妻孝光、超高分解能X線結晶構造解析によるヘムタンパク質シトクローム*d*の特異的構造変化、第21回日本化学会関東支部茨城地区研究交流会、2010年11月、東海
- ⑭ T. Kohzuma, Y. Nihei, S. Asamura, Y. Obara, and M. Unno, Regulation of the Structure and Protein Stability through the Weak Interaction in the 2nd Coordination Sphere of a Blue Copper Protein, Pseudoazurin, XI International Symposium, 2010年9月、Kudowa (ポーランド)
- ⑮ T. Kohzuma, Regulation of the structure and protein stability through the weak interaction in the 2nd coordination sphere of metalloproteins, 10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010年9月、Thessalonike (ギリシャ)
- ⑯ 高階明子, 海野昌喜, 高妻孝光、Atomic

Resolution X-ray crystallographic Analyses and Spectroscopic Studies of a Cytochrome *c'* from *Alcaligenes xylosoxidans*, 第48回日本生物物理学会年会、2010年9月、東北大学

- ⑰ 小原裕二、仁平裕子、大上利恵、高妻孝光、Effect of Weak Interaction on the Electronic Structure and Electrochemical Properties of Pseudoazurin Met16His/His6Val double mutant, 第48回生物物理学会年会、2010年9月、東北大学
- ⑱ 高妻孝光、仁平裕子、浅村紗矢香、小原裕二、海野昌喜、弱い化学的相互作用によるタンパク質の電子状態制御、日本化学会関東支部、2010年7月、筑波大学
- ⑲ 高妻孝光、仁平裕子、浅村紗矢香、小原裕二、海野昌喜、ブルー銅タンパク質シユドアズリンにおける弱い相互作用の効果、第37回生体分子科学討論会、2010年6月、山口大学

〔図書〕(計1件)

元素111の新知识 第2版増補版、講談社ブルーバックス、2013年2月20日、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、羽場宏光、廣田 俊、藤井敏司、吉村哲彦 著、総ページ数463ページ。

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

海野 昌喜 (UNNO MASAKI)  
茨城大学・フロンティア応用原子科学研究センター・准教授  
研究者番号：10359549