

CooA タンパク質の CO との一連の反応に関する理論的研究

(京都大福井セ¹、岡崎統合バイオ²) ○石田 俊正¹、青野 重利²

光合成細菌に見つかる一酸化炭素 (CO) センサー能を有する転写調節因子である CooA タンパク質中のヘム軸配位子交換反応を理論計算により検討した。

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* から初めて同定された Rr-CooA はヘム鉄を含むが、静止状態ではヘム鉄は 3 価であり、プロリン(Pro 2) とシステイン(Cys 75)を軸配位子としている。ヘム鉄が Fe²⁺に還元された状態において、システインの代わりにヒスチジン (His 77) が配位し、この還元状態において、Pro 2 が CO に置き換わりうる。CO 結合により CooA は転写活性化因子としての活性を獲得し、CO 代謝に関する

タンパク質をコードしている *coo* オペロンが発現する。図 1 に配位子の交換の様子を示す[1]。

本研究では、Pro 2 と CO とが交換する反応および、鉄の還元により Cys 75 と His 77 とが交換する反応を、クラスターモデルを用いた計算で検討した。

ヘムにプロリン残基が配位するのは Rr-CooA の他に知られていない。そこでまず配位子のプロリンの状態を調べるために、還元状態のヘムにプロリンとヒスチジンが配位した分子のモデルとして鉄ポリフィリンにピロリジンとイミダゾールが配位したモデル分子を考え、電荷・多重度を変えて計算した。計算は B3LYP 法で、基底は Fe に Hay-Wadt の内殻有効ポテンシャルとその基底、他の原子については 6-31G(d)を用いた。また、還元状態の X 線結晶データが得られている[2]ので、その構造を初期構造として最適化を行った。

表 1 には、中性(窒素にプロトンがついた状態)及び脱プロトン化状態(窒素からプロトンが解離した状態)の一重項、三重項の構造

表 1 プロリン窒素のプロトンの状態による、配位アミノ酸の窒素と Fe の距離とエネルギー差

	R(Fe-N(Pro))(Å)	R(Fe-N(His))(Å)	ΔE(kcal/mol)
1Neutral	2.188	2.016	0
3Neutral	2.493	2.484	7.1
1Deprotonated	2.040	2.152	0
3Deprotonated	1.839	2.124	-2.1
EXAFS	2.16	2.02	-

最適化の結果を示した。表 1 から、中性一重項状態で CooA の EXAFS による結合長の結果を最もよく再現することがわかった。すなわち、Pro が配位する際には窒素の水素は結合したままであると考えられる。

プロリンと CO の反応を追跡するために、ヘムの Fe とピロリジンの窒素との距離を変えながら、ポテンシャルエネルギーおよび結合長・結合角の変化を調べた。

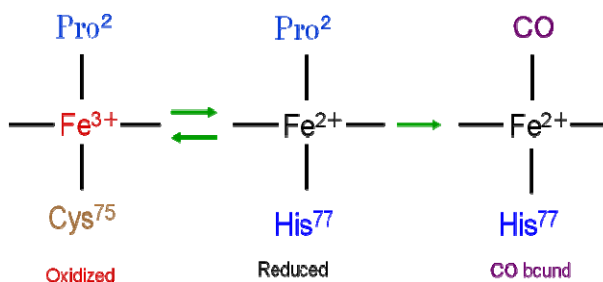


図 1 酸化状態の変化および CO との反応による配位子の交換

COがFeに対して、(1)CをFeに向けてプロリンのNH結合と同じ側、(2)プロリンのNH結合と反対側、(3)OをFeに向けて近づく場合、の3通りを調べたが、(2)の場合に障壁が最も低くなることがわかった。その結果を図2に示した。Fe-Cが3.2Åから3.1Åに近づくところでエネルギーが5kcal/molほど下がるとともに、Feとピロリジンの窒素の距離が急激に増加することがわかる。すなわち、この時点においてプロリン配位子が急に脱離すると考えられる。また、反応の障壁のエネルギーは19.0kcal/molと見積もられた。COを除いて、単にピロリジンを脱離させるときのエネルギーがやはり19kcal/molであるので、この障壁の高さは本質的にピロリジン脱離によるものと言える。一方で、CO接近によりFe-N(ピロリジン)がヘムの面に対して傾く、ヘム面のドーミングが起こるなどの構造変化が起こることも計算から示された。

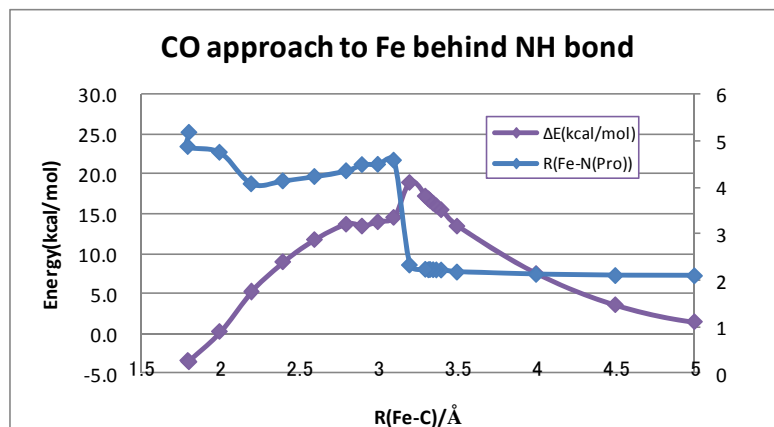


図2 ヘムFeにCOが近づくときのエネルギーとFe-N(Pro)の結合長の変化。Proはピロリジンモデルで扱っている

また、反応の障壁のエネルギーは19.0kcal/molと見積もられた。COを除いて、単にピロリジンを脱離させるときのエネルギーがやはり19kcal/molであるので、この障壁の高さは本質的にピロリジン脱離によるものと言える。一方で、CO接近によりFe-N(ピロリジン)がヘムの面に対して傾く、ヘム面のドーミングが起こるなどの構造変化が起こることも計算から示された。

表2 還元(Fe²⁺)、酸化(Fe³⁺)状態の最適化の結果

	電荷	多重度	ΔE(kcal/mol)	Fe-N(His)	Fe-S(Cys)
Fe(2+)-His-Gly-Cys	0	singlet	0.0	2.04	6.68
Fe(2+)-Cys-Gly-His	0	singlet	21.7	5.41	2.53
Fe(3+)-His-Gly-Cys	1	doublet	0.0	1.97	10.35
Fe(3+)-Cys-Gly-His	1	doublet	11.9	4.94	2.29
X-ray(Fe(2+)-His)			-	2.19	4.86
EXAFS(Fe(2+)-His)			-	2.02	-
EXAFS(Fe(3+)-Cys)			-	-	2.25

次に、ヒスチジンとシステインの交換反応の機構を調べるために、ヘム鉄、ヒスチジン、システインを含むモデルについて、還元状態・酸化状態の最適化を行った。Rr-CooAでは、Cys75とHis77の間にMet76が挟まれているが、メチオニン残基をグリシン残基に置き換えて計算の簡略化を図った。還元状態(Fe²⁺)ではHis77に結合しているときの方がCys75に結合しているときよりも安定になり、実験結果と一致したが、酸化状態(Fe³⁺)でもHis77に結合しているときのほうが安定となってしまう、実験結果と一致しなかった。この際、Cys75とFe³⁺の距離(10.35Å)が大きく伸びており、タンパク質中では実現しにくい構造となっているので、タンパク質中では、ヒスチジンが配位した構造が折りたたまれてエネルギー的に不安定になることにより、相対的にシステインが配位した構造が安定になっていると推測される。現在、ONIOM法を用いた計算を実行し、この推測の正否を検討中である。さらに、反応機構を議論する予定である。

[1] S. Aono, Acc. Chem. Res., 36, 825(2003)

[2] W. N. Lanzilotta et al, Nature Struct. Bio., 7, 876 (2000).