

ヘム蛋白質の動的挙動と分子間、分子内電子移動反応

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 森島 績

はじめに

蛋白質における電子移動 (ET) 反応を検討する際、蛋白質構造は結晶構造に見られるような静的なものではなく、その構造を変化させる動的なものであることは、ET 反応の研究においてあまり注目されていない。また、ET 速度は電子ドナーとアクセプター間の距離 (D-A 距離) に敏感であるため、蛋白質間ならびに蛋白質内の動的構造変化が ET 反応を制御することは充分考えられる。演者らはいくつかのヘム蛋白質について、分子間、分子内の動的構造変化による ET 反応の制御機構を種々の分光法を用い、加圧効果や浸透圧の効果を考慮することによって検討を行った。また、一分子測定法による検討も行った。

1 クロスリンクを利用した亜鉛置換ミオグロビンとシトクロム b_5 間での電子移動反応機構の解明¹⁾

これまでの研究からこれらのヘム蛋白質は様々な配向で複合体を形成することが示唆されてきたが、その配向と ET 反応との関連は明らかでなかった。そこで、両蛋白質が形成する複合体に化学的なクロスリンクを施すことで、複合体としての構造変化を制御し、ET 反応過程を分光学的に追跡した。その結果、ET 反応は単分子反応に見られる一相の指数関数では説明できず、その速度は、 $10^6 \sim 10^2 \text{ s}^{-1}$ にわたり分布していた。そこで、ET 速度と D-A 間距離の関係を示す Marcus の式を用い、観測された速度を解析したところ、Cyt b_5 と Mb は $13 \sim 40 \text{ \AA}$ の D-A 距離をもつ様々な複合体がクロスリンクされていることが考えられた。さらに、Cyt b_5 ・Mb 間での ET 速度は、 $13 \sim 20 \text{ \AA}$ の D-A 距離をもつ複合体によってほぼ説明されるが、それらは形成される複合体のうち約 30% しか存在しないことも分かった。この結果は蛋白質は様々な配向で複合体を形成しうるが、ET 反応を制御する D-A 距離の短い複合体は全体の少数派であることを示唆している。

2 圧力効果を利用した亜鉛置換シトクロム c とシトクロム b_5 会合体の研究²⁾

ここでは蛋白質がどのように ET 反応に重要な配向を認識するかを検討した。その際、会合定数の圧力依存性から算出される体積変化が、会合・解離に伴う相互作用 (塩橋・水素結合・疎水的相互作用) の種類に大きく依存することに着目した。その結果、ET 複合体には non-ET 複合体にない疎水的相互作用が働いており、これは電子移動前後における蛋白質の特定のアミノ酸残基の配向の変化によると解釈さ

れた。

3 ルテニウム修飾亜鉛置換ミオグロビンならびにルテニウム修飾シトクロム b_5 における蛋白質構造揺らぎが電子移動に与える効果³⁾

蛋白質表面に存在する特定のヒスチジン残基にルテニウム錯体を配位させ、ヘムとの ET 反応の圧力依存性を検討したところ、ET 速度は加圧に伴い加速され、その変化量は D-A 間に水素結合や、あるいは共有結合などのない空間部分が多く含まれている方が大きかった。これは圧力により動的構造が抑制され、水素結合などの距離が短くなったためと考えられる。

4 シトクロム P450cam とプチダレドキシン (Pdx) 間電子移動反応における水分子の役割^{4, 5)}

蛋白質が特定の相手蛋白質を認識するために会合過程で高い結合定数が要求される一方、ET 後は新たな酵素サイクルを回転させるために、各々の蛋白質は解離する必要がある。ET 反応では蛋白質間での会合定数を調節する分子認識が必要となる。P450cam/Pdx の会合は、グリセロールなどを加えることで溶液の浸透圧を増加させると、弱まり、浸透圧の増加のよって蛋白質周囲の水分子が取り去られた効果であると考えられる。両蛋白質間の会合では水分子がいわば「接着剤」のように働き、水分子を介した水素結合が両蛋白質界面において形成され、これが静電的相互作用とともに蛋白質間の特異な認識を制御していると思われる。

5 一分子測定によるシトクロム b_5 の揺らぎと分子内電子移動反応⁶⁾

蛋白質構造の変化は確率論的な事象であるため、莫大な分子数を扱う通常の測定方法では平均化されたものしか観測されない。本研究ではシトクロム b_5 に蛍光標識を施し、蛋白質構造の変化を一分子ごとに観測し、これが ET 反応に影響を与える効果を全反射蛍光顕微鏡を用いて研究した。その結果、conformational heterogeneity が ET に影響を及ぼしていることが分かった。

(文献)

- (1) Y. Furukawa, F. Matsuda, K. Ishimori, I. Morishima, *JACS*, 2002, **124**, 4008-4019.
- (2) Y. Furukawa, K. Ishimori, I. Morishima, *Biochemistry*, 2002, **41**, 9824-9832.
- (3) Y. Furukawa, K. Ishimori, I. Morishima, *J. Phys. Chem.B*, 2000, **104**, 1817-1825.
- (4) Y. Furukawa, I. Morishima, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 12983-12990.
- (5) Y. Furukawa, K. Ishimori, I. Morishima, *Biochemistry*, 2000, **39**, 10996-11004.
- (6) Y. Furukawa, K. Ishimori, I. Morishima, et al, submitted for publication.