

薬物輸送タンパク質の光誘起電子移動

(シカゴ大・化) ○小堀康博 James R. Norris Jr.

【序】タンパク質活性領域の立体構造やダイナミクスさらに基質との分子間相互作用がどのように生体機能や薬理作用に貢献するかという点に大きな関心が持たれる。タンパク質表面は水素結合、親水性相互作用、疎水性相互作用、静電相互作用、立体的障害など様々な相互作用が複雑に関与する反応場である。タンパク質ポケット内の活性領域における反応場の特徴や分子運動に与える効果などタンパク質の分子科学的性質について未解明な点は数多い。今回我々はヒトの血液中で薬物輸送機能を持つヒト血清アルブミンとそれに結合したリガンドとの光誘起プロトン共役電子移動を時間分解 EPR 法および過渡吸収法により観測した。アルブミンのポケット領域内で高速電子移動に続く脱プロトン化反応が特定のトリプトファン残基(W214)から起こることを見出した。さらに、電子受容したリガンドラジカルがこのポケット領域内で一次元運動を行い、バルク水層へと脱離していくことが明らかになった。

【実験】時間分解 EPR の測定は Bruker コンソール(ESP300)により、電磁石(Varian E-112)とマイクロ波ブリッジ(Bruker ER041MR)を制御して行った。励起光は Nd:YAG レーザー (Spectra Physics, Quanta-Ray GCR-4, fwhm ~5 ns) 355 nm を用い、パルス同期した出力信号をボックスカーアベレージャーで処理した後 PC へ出力し時間分解 EPR スペクトルを得た。測定は室温で行った。

【結果と考察】図 1a-c)にヒト血清アルブミン(HSA)水溶液に 9,10-アントラキノン-2,6-ジスルホン酸イオン(AQDS²⁻)を添加したサンプルに光照射して得られた時間分解EPRスペクトルを示す。光照射直後(50 ns)は1本のブロードなマイクロ波の放出(E)信号が観測された(図 1 a)。1.5 μsでは2本のブロードなピーク信号が観測された(図 1 b)。報告されている超微細構造から図 1aはトリプトファンカチオンラジカル(W⁺)に、図 1bはW⁺が脱プロトン化したトリプトフ

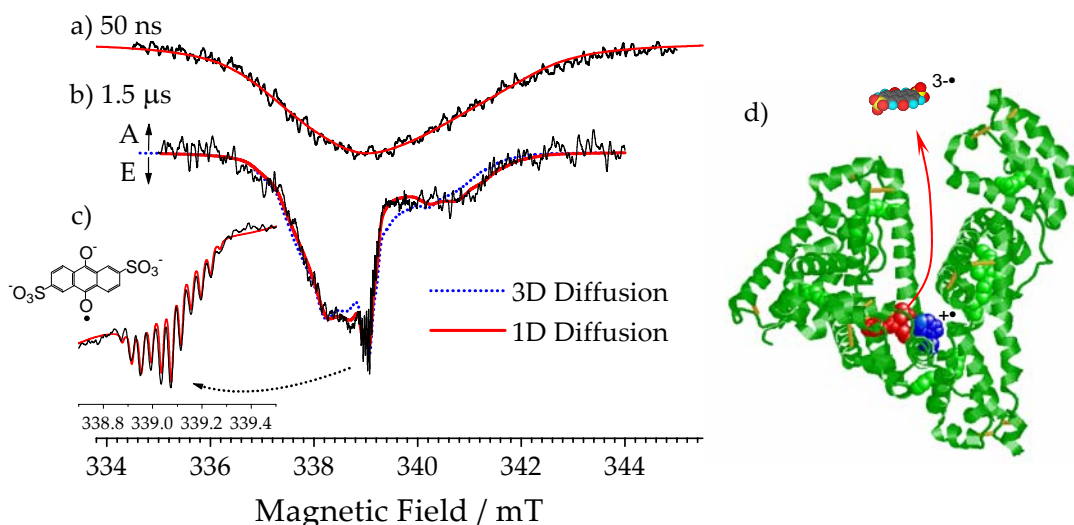


図 1. a)-c)ヒト血清アルブミン-アントラキノンスルホン酸イオン複合体の光照射で得られた時間分解EPRスペクトル。青の点線および赤の実線はそれぞれリガンドラジカルの三次元運動と一次元運動モデルによるシミュレーション。d)ヒト血清アルブミン-薬物(Warfarin)複合体の結晶構造(1Dコード 1ha2)。右側(青)は W214、左側(赤)はリガンド分子を表す。

アン中性ラジカル(W^{\bullet})にそれぞれ帰属された。図 1 bの中央付近を拡大した領域のスペクトルを図 1 cに示した。この超微細構造はAQDS²⁻が電子受容したアニオンラジカル(AQDS^{3•-})に帰属された。過渡吸収法でもマイクロ秒領域でAQDS^{3•-}と W^{\bullet} による吸収を確認した。基底状態の可視紫外吸収スペクトルからHSA-AQDS²⁻系では350 nmから600 nmの波長領域にブロードな吸収が観測され、このスペクトルはトリプトファン-AQDS²⁻錯体の電荷移動吸収の波長領域と一致した。この結果は図 1dのHSA-薬物複合体の結晶構造のようにAQDS²⁻がHSA中のトリプトファン残基(W214)近傍のポケット領域(サブドメインIIA)にバインドされていることを示している。観測されたEPR信号が三重項機構によるE分極を示したことから、励起三重項状態³AQDS^{2•-}とW214との電荷分離過程でAQDS^{3•-}とW214^{•+}のラジカルイオン対が形成され、引き続きW214^{•+}のプロトン脱離でW214[•]が生成している。

図 1aとbで見られるように、トリプトファンラジカルの線幅が広いことはこれらのラジカルの超微細相互作用やゼーマン相互作用の異方性が平均化されていないことを示している。これはタンパク質の巨大な分子サイズにより分子回転が極めて遅いためである。一方でAQDS^{3•-}はバルク水溶液中と同様のシャープな超微細構造を示している。このことは生成したリガンドラジカルはHSAにバインドされておらず、バルク水層へ脱離したことを意味する。また図 1 すべての信号において低磁場側の信号強度が高磁場側のものより強い。これはラジカル対機構によるE/A型(Aはマイクロ波の吸収)の電子スピン分極に由来する。この効果はラジカルの並進運動によるスピン間交換相互作用の揺らぎによって生成するため、リガンドラジカルAQDS^{3•-}が結合領域から脱離する際のスピン間の相対運動を反映している。

ラジカル対機構の理論に従って図 1 に示すようにスペクトルのシミュレーションを行った。電子スピン分極強度と共鳴磁場を計算するためにW214^{•+}とW214[•]では超微細相互作用とゼーマン相互作用に異方性を考慮している。通常バルク系反応によるラジカル対生成過程では

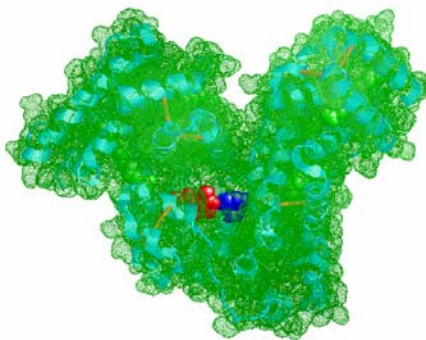


図 2. ヒト血清アルブミンのポケット領域の上面図。中央右側がW214でその左側にリガンドの一部が見える。

ラジカルの三次元的な相対拡散運動によって電子スピン分極が説明される。しかしながらこの三次元運動モデルは今回の結果を説明することができなかった(図 1b点線)。一方でラジカルが一次元の並進拡散を行うモデルでは実線のように測定結果を再現することができた。すなわち、リガンド分子はタンパク質ポケットにより制限された一次元運動を行いながらバルク水層へと脱離している(図 1d矢印)。この結果は図 2 に示したW214 周囲のポケット領域の空間サイズとも合致した。

【結論】 電子移動反応に伴ってHSAに対するリガンドの結合性が大きく変化した。これはアントラキノンのカルボニル部位の電子構造の変化によって疎水性相互作用による結合から親水性相互作用によるバルク領域への水和へとスイッチしたことに起因する。今回の結果により、本手法によって1)薬物輸送や酵素反応にとって重要なタンパク質特定領域の立体構造の特徴(ポケット構造など)および、2)リガンドとの反応やリガンド脱離運動などの生体機能や薬理作用の分子機構に重要な動的過程と反応場の性質を明らかにすることができる。