



Title	EPRでヘムタンパク質の何を見るか? : 活性部位の電子状態と構造機能との相関
Author(s)	堀, 洋
Citation	大阪大学低温センターだより. 2003, 121, p. 7-11
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/3788
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

EPR でヘムタンパク質の何を見るか？ —活性部位の電子状態と構造・機能との相関—

基礎工学研究科 堀 洋（内線 6551）

E-mail: hori@bpe.es.osaka-u.ac.jp

はじめに：

タンパク質は構造変化を伴って機能を調節して、それぞれ固有の活性を発揮している。ヘムタンパク質*における酸化・還元状態の認識、基質の認識、電子供与体結合の認識、配位子結合に伴う構造変化は活性中心であるヘムの電子状態とこれを取り巻くミクロ分子環境の変化として捉えられる。ヘム（図1）の電子状態の変化から逆にタンパク質の構造変化に関する情報が得られる。従って、ヘムタンパク質の機能と構造を理解する為には、活性中心であるヘムの電子状態に関する知見が重要となる。その様な知見を得る測定手段の一つとして電子スピン共鳴（EPR）法がある。固有の信号を与えるので未精製試料でも非破壊的に試料中に含まれる常磁性分子種の区別、同定、定量が可能になる。しかし、ヘム鉄の緩和時間が短いため、室温でのEPR観測は難しい。そのため、極低温での測定が一般に行われている。

本稿では、不対電子を持つ常磁性ヘム鉄をプローブとしてヘムタンパク質のある特定部位を丁寧に調べ、構造と機能との相関を研究する上で重要な研究法のひとつである「ヘムタンパク質のEPR」について紹介する。

1) 酸化型ヘムタンパク質のEPR：

Fe^{3+} ($3d^5$) 高スピニン状態（スピニン量子数 $S = 5/2$ ）の場合、軸対称なヘムでは $g_{\perp} = 6$ （磁場//ヘム面内）と $g_{\parallel} = 2$ （ヘム面垂直）に典型的な軸対称EPRを示す（図2 A）。軸配位子とヘム鉄の結合状態、配位環境が変化するとヘムの対称性が低下して $g_{\perp} = 6$ 吸収が分裂する（図2 B）。この異方性吸収からヘムの環境変化が議論できる。高磁場、高周波数EPRを用いれば Fe^{3+} 高スピニン状態における零磁場分裂に関する詳細な情報が得られる。一方、低スピニン状態 ($S = 1/2$) をと

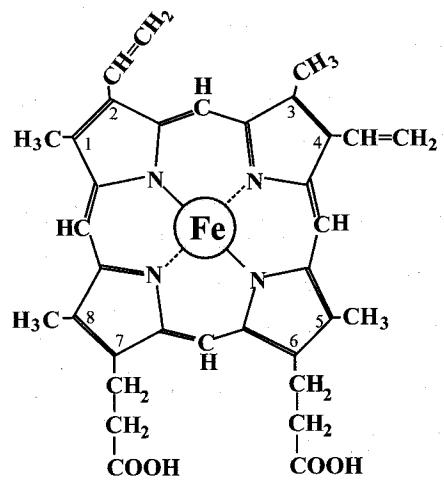


図1 代表的なプロトヘムIXの構造。
上下より第5、6軸配位子が配位する。

*この印の付いている語は、後に「用語説明」があります。

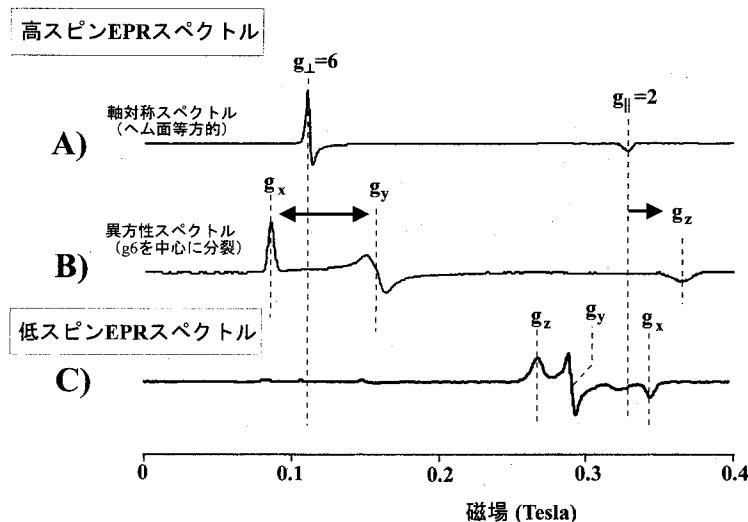


図2 酸化型ヘムタンパク質のEPRスペクトル。(A) 軸対称な酸化型高スピinnヘムタンパク質のEPR (B) ヘム面内の異方性を示す酸化型高スピinnヘムタンパク質のEPR (C) 酸化型低スピinnヘムタンパク質のEPR (測定温度はいずれも15K)。

磁性であるが、整数スピinn系であるためクラマース二重項を持たないので通常の測定法での測定が難しい。零磁場分裂の大きさによっては理論的にEPR測定は可能である。 Fe^{2+} 高スピinnの還元型デオキシミオグロビン(Mb)の10GHz帯EPR測定で零磁場近傍に幅広い吸収が報告されている^[2]。最近、筆者らもこのEPR吸収の観測によりやく成功した。しかし、この信号の理論的な解釈は未だに確定していない。

3) EPR不活性種をEPR活性化する:

低スピinn状態($S=0$)の還元型ヘムタンパク質はEPR不活性であるが、常磁性($S=1/2$)である一酸化窒素(NO)が結合するとEPR活性となり $g=2$ 付近にNO-ヘム特有の吸収を示す。この吸収の解析より還元型ヘム鉄の配位構造(5配位構造、6配位構造か)、第5配位子の核スピinnとの相互作用による超微細分裂(hfs)の解析より軸配位子の種類、配位子(NO)の周辺環境(極性、立体障害)の情報が得られる(図3)。

一方、酸化型ヘムタンパク質はEPR活性であるが、 $S=1/2$ の電子スピinnを持つNOが配位するとEPR不活性となる。この

場合、 $g=2$ を中心に $g_z > g_y > g_x$ の3本の異方性吸収が見られる(図2 C)。 g 値の異方性($\Delta g \equiv g_z - g_x$)が大きくなるとヘムの対称性が良くなるので、 g 値のシフトからヘムの対称性、軸配位子のヘム面に対する傾きが議論できる^[1]。更に、 g 値の解析より軸配位子の種類が推定できる。

2) 還元型ヘムタンパク質のEPR:

還元型ヘムタンパク質の Fe^{2+} (3d⁶)高スピinn状態($S=2$)は常

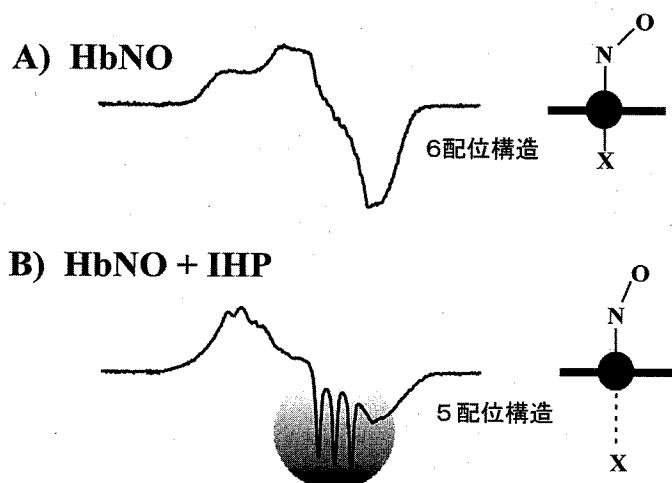


図3 NOが結合した還元型ヘモグロビン(Hb)のEPRスペクトル。Hb(2つの α 鎖と2つの β 鎖からなる4量体で4個のヘムを持つ)が酸素親和性の高い構造をとるとNO-ヘムは6配位構造のEPRを示す(A)。IHP(イノシトール六リン酸)を加えるとHbは酸素親和性の低い構造をとる。このとき α 鎖のNO-ヘムは5配位構造の¹⁴Nによる3本線のhfsをもつEPRスペクトルを示す(B)。鉄に配位していたヒスチジンの側鎖との結合が切れた事が判る。

EPR 不活性種を極低温で光照射すると、光解離した NO がヘム遠位空間内に捕捉され、ヘム鉄 ($S=5/2$) - NO ($S=1/2$) スピン系の特異な EPR 吸収を示す。ヘム空間のアミノ酸側鎖が立体障害になり NO の解離が抑えられると、スピン交換相互作用による特異な吸収を示す。一方、立体障害が少ないと解離 NO はヘム遠位空間内でヘム鉄よりかなり離れた位置に移動でき、磁気双極子相互作用による EPR 吸収を示す（図 4）。これらの EPR 吸収は光解離した NO 分子とヘム鉄間の距離、ヘム周辺のアミノ酸残基の立体構造を反映するので、アミノ酸置換した変異体ヘムタンパク質を使ってヘム空間の構造、配位子の解離・会合の動的解析と関連付けた詳細な議論が出来る^[3]。同様な $S=5/2-S=1/2$ スpin 交換相互作用を示す特異な EPR 吸収は呼吸鎖末端酸化酵素の酸化型酵素のヘム鉄 ($S=5/2$) - 銅 ($S=1/2$) 複核中心 ($S'=2$ 状態) にも観測されている。

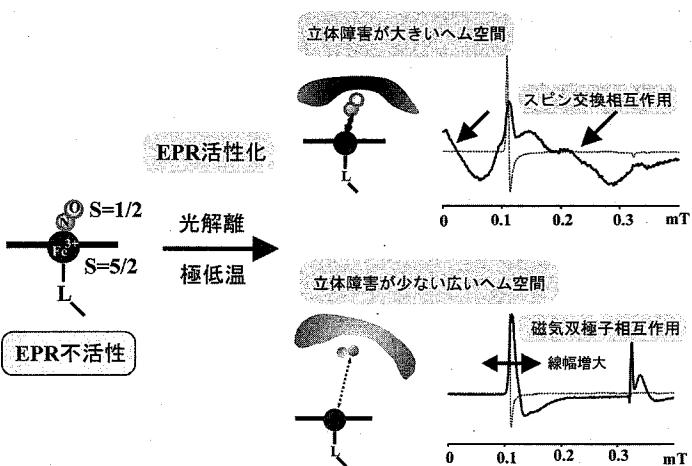


図 4 NO 結合・酸化型ヘムタンパク質の光解離中間体分子種の EPR スペクトル。ヘム空間が狭く立体障害がある場合（右上のスペクトル）。立体障害が少ない広いヘム空間を持つヘムタンパク質の場合（右下のスペクトル）。（光照射、測定温度は 5 K）

4) タンパク分子は構造変化してその機能を調節する：

EPR はタンパク質分子のある特定部位の局所局所を丁寧に調べる分光法の一つである。活性部位の EPR 信号変化（ミクロ分子環境の変化）から基質や配位子結合・解離の認識、複合体形成の認識、その情報伝達の道筋を探る事が出来る。鉄イオウタンパク質-P450複合体の協同的構造変化

の例を示す。一原子酸素添加酵素系の反応で P450cam *への直接の電子伝達は電子供与体鉄イオウタンパク質（非ヘムタンパク質）であるプチダレドキシン（Pdx）によってなされる。この電子伝達反応において Pdx は P450cam と 1 : 1 の複合体を形成する。基質の結合した酸化型 P450cam 単独では EPR 活性で高スピン型 EPR を示すが、酸化型 Pdx（EPR 不活性）と 1 : 1 複合体が形成されると酸化型 P450cam は低スピン型に変化する。複合体形成によるヘム近傍の配位構造の変化を示している。

一方、還元型 Pdx（EPR 活性）と還元型 P450cam（EPR 不活性）との複合体で

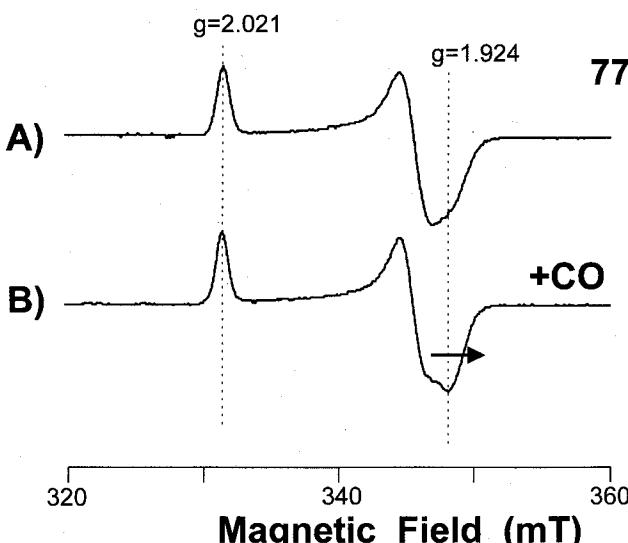


図 5 還元型 P450cam・Pdx 複合体中の Pdx の EPR スペクトル変化。(A) ヘム鉄に一酸化炭素 (CO) が非結合の場合、(B) ヘム鉄に CO が結合の場合（測定温度は 77K）

P450cam の還元型ヘム鉄に配位子 (CO、O₂、NO) が配位すると還元型 Pdx の EPR スペクトルが変化する (図 5)。P450cam のヘム鉄に配位子が結合した事による構造変化が P450分子内部から表面に及び、複合体の相手 Pdx に伝わった結果と考えている^[4]。複合体中の Pdx の電子・核二重共鳴 (ENDOR) 測定も行っている。

5) 反応中間体の検出：

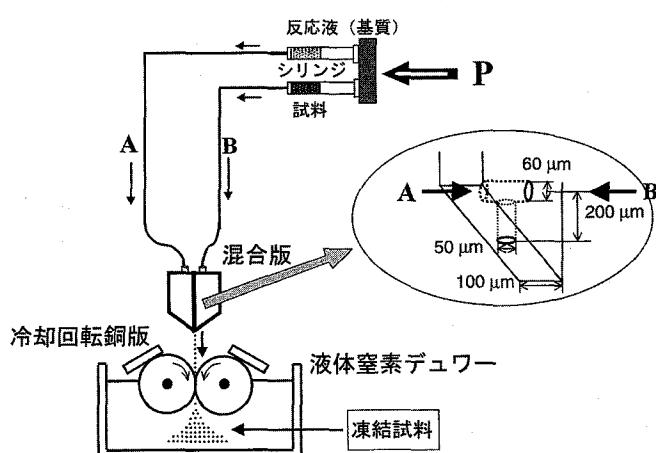


図 6 高速混合凍結装置。2つのシリンジ内の反応液 (A、B) をピストン (矢印 P) で押して混合版に導き、細いノズル内 (径50~60ミクロン) で混合し、液体窒素で冷やした回転冷却板に吹き付けて凍結させる。液体窒素中のフレーク状になった凍結試料を液体窒素中で EPR 試料管に詰め、酸素を除去した後 EPR 測定する。混合凍結速度はピストンの速度、混合版一回転冷却版の距離で調節できる。

生体内で起こる化学反応の多くは、活性中心に金属を持つ金属酵素によって触媒される。反応サイクルに於ける短寿命不安定中間体である様々なラジカル分子種、高酸化状態のヘム鉄を捕捉し、これらの活性中心の電子状態を EPR 法で研究することで酵素の持つ高効率で選択性の高い反応のメカニズムが理解できる。生体化学反応は酵素と基質を混合することで開始される。反応中間体を安定に捕捉し、その EPR スペクトル測定のためには、短時間内に酵素と基質を混合し、さらに反応を止めるために迅速に凍結する必要がある。しかし、生体反応初期における短寿命の反応中間体の電子状態を実験的に検出する技術が乏しい。従来の高速混合・凍結装置ではミリ秒以内の高速生体反応の測定は全くできない。

共同研究者の京都大学工学研究科の高橋聰博士らによって開発された高速溶液混合凍結装置 (図 6) を用いて^[5]、溶液の混合凍結時間を200マイクロ秒に短縮し、シトクロム酸化酵素の反応中間体を EPR で検出する事に成功した。この装置は数多くの金属酵素の反応初期過程を研究する上で不可欠のものとなろう。

本稿では、EPR でヘムタンパク質を研究しているものの立場からヘム鉄の電子状態で見るタンパク質の構造と機能の相関について基礎的な実験例を概説してみた。タンパク質の構造と機能に関する研究、ヘムタンパク質の EPR 測定・解析法に興味をもたれるきっかけになれば幸いである。

参考文献

- [1] H.Hori; Biochim. Biophys. Acta 251, 227-235 (1971)
- [2] M.P.Hendric & P.G.Debrunner, Biophys. J., 56, 489-506 (1989)
- [3] H.Hori, F.Masuya, Y.Dou, and M.Ikeda-Saito; J. Inorg. Biochem. 82, 181-187 (2000)
- [4] H.Shimada, S.Nagano, Y.Ariga, M.Unno, T.Egawa, T.Hishiki, Y.Ishimura, F.Masuya, T.Obata, and H.Hori; J. Biol. Chem. 274, 9363-9369 (1999)

- [5] M.Tanaka, K.Matsuura, S.Yoshioka, S.Takahashi, K.Ishimori, H.Hori, and I.Morishima; Biophysical J. 84, 1-7 (2003)

用語説明

*ヘムタンパク質

ヘムタンパク質とは、鉄ポルフィリン錯体であるヘム（図1）を持つタンパク質の総称である。地球上に酸素分子が出現する以前はヘムタンパク質の機能は電子伝達だけであったが、酸素の出現後は酸素がヘム鉄に配位して様々な触媒反応を受けるようになり、ヘムタンパク質の機能は多様化していったと考えられる。

* P450cam

シトクロムP450は動物、植物、細菌を含めて広く自然界に分布しており、種々の生理活性脂質、薬・毒物などを代謝する一群のヘムタンパク質である。分子状酸素を活性化して基質に酸素原子を添加する反応を触媒する。数多くのP450の中で、最も構造と機能の解析が進んでいるのがカンファー（樟脑）を唯一の炭素源として生育する *Pseudomonas putida* という緑膿菌のカンファー水酸化に関与するP450camである。

お詫びと訂正

前号（No.120、2002年10月号）に掲載しました「大阪大学低温センターだより総目次（No.101～120）」において一部に間違いがありました。関係の皆様には大変ご迷惑をお掛けしましたことを深くお詫び申し上げます。ここに謹んで訂正させていただきます。

No.120（2002年10月号）掲載

「大阪大学低温センターだより総目次（No.101～120）」第27頁 下から2行目

【誤】

2次元空間におけるスピントン拡散 …… (理) 植田 研二・田畠 仁・川合 知二 103-13

【正】

2次元空間におけるスピントン拡散 …… (理) 上田 貴洋……103-8

遷移金属酸化物人工格子におけるスピントン秩序のコントロール

…… (産) 植田 研二・田畠 仁・川合 知二……103-13