

フェレドキシンの活性中心 構造とシステインの分布

長谷 俊治* 松原 央**

生体の構成成分である蛋白質は、ペプチド結合によりアミノ酸が一定の順序で重合した1本、あるいは複数のポリペプチド鎖で構成され、複合蛋白質は、さらに糖、ヘム、フラビン、ビタミン、金属等の補欠分子族を含んでいる。われわれが扱っているフェレドキシンは、約50~130残基のアミノ酸より成る1本のポリペプチド鎖蛋白質で、分子内に、非ヘム鉄と無機イオウを含み、非光合成嫌気性細菌、光合成細菌、好気性細菌、各種藻類、高等植物と広範囲の生物群に分布している。一般に、フェレドキシンの酸化還元電位は非常に低く(約400mV)、生理的に重要な光合成、窒素固定、ピルビン酸の酸化等、各種の酸化還元反応の電子伝達として機能している。

酸化還元反応は、非ヘム鉄、無機イオウ、蛋白質部分のシステインのイオウとから成る活性中心で行なわれ、この活性中心として、2種類の配位構造が明らかになっている。図1に示す様に、4原子ずつの鉄とイオウと4残基のシステインより成る構造(4Fe-4S型)と、2原子ずつの鉄とイオウと4残基のシステインより成るもの(2Fe-2S型)とが認められている。また1分子内に、4Fe-4S型の活性中心を、2個持つフェレドキシン(8Fe-8S)も知られてい

る。これらいずれの構造も、蛋白質の変性剤存在下や酸性条件下では不安定であり、鉄、イオウを取り除いたアポフェレドキシンが容易に得られ、また一方、アポフェレドキシンに、塩化第2鉄と硫化ナトリウムを加えることにより、元のフェレドキシンに再構成することが可能である。ここで注目すべき事は、2Fe-2S型、または4Fe-4S型の活性中心を持つフェレドキシンは、各々、元の活性中心構造を持つフェレドキシンに再構成される点であり、蛋白質部分の構造が、何らかの形で、フェレドキシンの成し得る配位構造に強い規制を与えているものと考えられる。

われわれは、約20種余りの各種フェレドキシンの一次構造(アミノ酸配列順序)を決定して来たが、これらフェレドキシンの構造比較より認められる構造上の類似性が、機能するフェレドキシン分子にとって、最小限どれだけの構造が必須かという目安を与えるものと思われる。以下、各種フェレドキシンの配位構造に注目しながら、蛋白質部分のシステイン残基の、一次構造上での分布を調べる。

8Fe-8Sフェレドキシンは8残基の、4Fe-4Sフェレドキシンは4残基の、そして、2Fe-2Sフェレドキシンは4残基のシステインが活性中

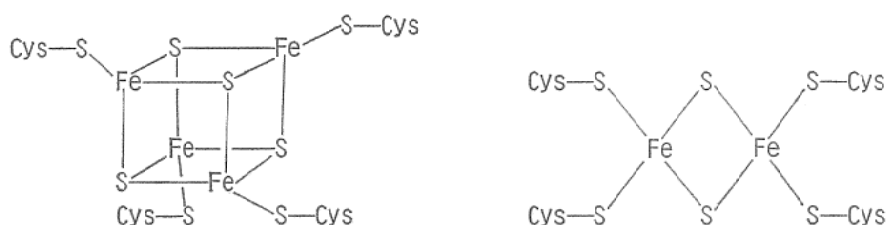


図1 フェレドキシンにみられる鉄、イオウ、システインの活性中心、左は4Fe-4S型、右は2Fe-2S型。

*長谷 俊治 (Toshiharu HASE), 大阪大学, 理学部, 生物学科, 助手, 理学博士 (12月取得見込み), 生物化学

**松原 央 (Hiroshi MATSUBARA), 大阪大学, 理学部, 生物学科, 教授, 理学博士, 生物化学

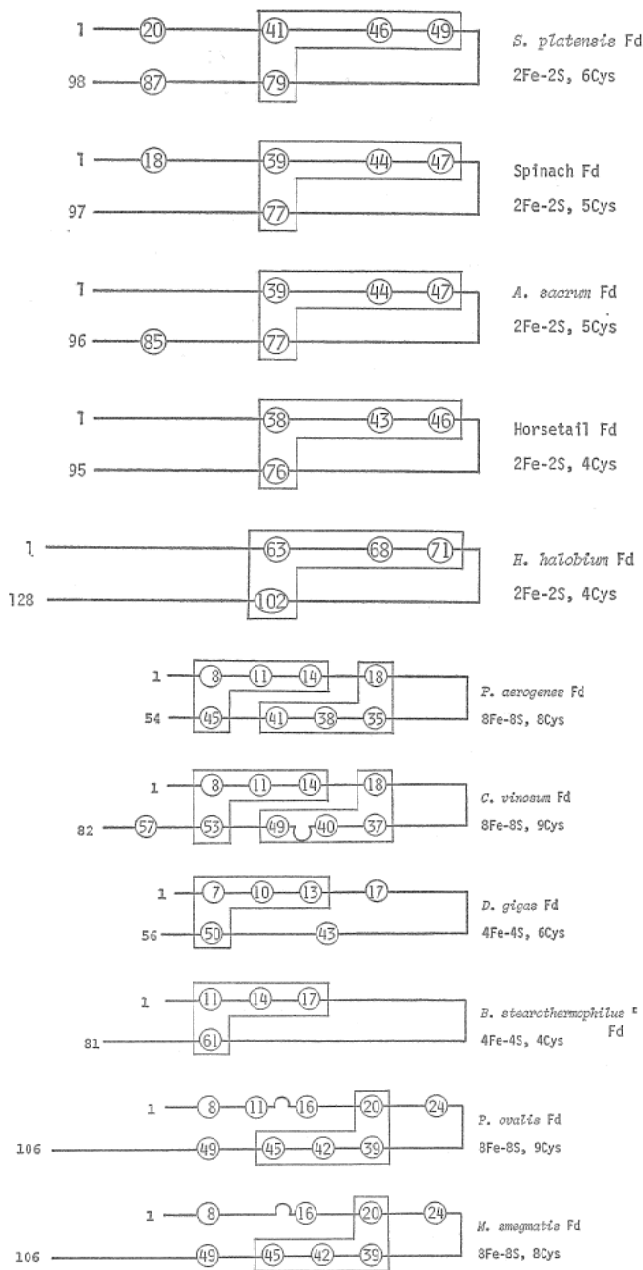


図2 各種フェレドキシンのシステインの分布。各フェレドキシン (Fd) の骨格構造を太い実線で、システイン残基の位置を丸で囲んだ数字で示している。細線で囲んだ一群のシステインが、各々の活性中心構成に関与していると考えられる。右側にフェレドキシンの由来した生物種、および、鉄、イオウ、システインの含量を示す。

心の構成に必要で有り、各々のフェレドキシンには、必要数、あるいはそれ以上のシステイン残基が含まれている。1973年 Adman らにより決定された、嫌気性細菌、*Peptococcus aerogenes* のフェレドキシン (8Fe-8S) の立体構造によると、システイン 8, 11, 14, 45 が、

2個の 4Fe-4S 型の活性中心のうち一方を、システイン 18, 35, 38, 41 が他方を構成していることが判明した。立体構造が決定されない限り、Fe に配位するシステインの位置を正確に決めることは難しいが、一般に、相同な蛋白質間では、一次構造や立体構造上で、相対応する残基が判別できることが知られており、4Fe-4S 型の活性中心を持つ各種フェレドキシンの一次構造と、*P. aerogenes* フェレドキシンのそれとを比較することにより、鉄へ配位しているシステインの位置が推定できる。図2に、各種フェレドキシンのシステインの分布の骨格構造を示した。フェレドキシンにより、総残基数が異なるが、相同性を考慮してアミノ酸の欠失、挿入、付加を設けている。

光合成細菌の一種である紅色イオウ細菌、*Chromatium vinosum* フェレドキシンは、82残基のアミノ酸より成り、含まれる9残基のシステインの内、57番目のものを除外した残り8残基は、*P. aerogenes* フェレドキシンのシステイン分布と良く一致する。硫酸還元細菌 *Desulfovibrio gigas* フェレドキシンや好気性細菌 *Bacillus stearothermophilus* フェレドキシン (共に 4Fe-4S) の構造は、各々6残基と4残基のシステインを含み、特に後者は、鉄配位に必要な最少数しか含まず、これらの残基は全て鉄への配位に関与していることになる。両フェレドキシンのシステイン分布は、*P. aerogenes* フェレドキシンの一方の活性中心に関与するシステインのそれと対応している。以上の4種のフェレドキシンの酸化還元電位は、共に-400 mV 付近にあるが、最近、分子内の2個の活性中心の電位が、一方は約+300mV、他方が-400mV と非常に異なるフェレドキシンの一群が、ある種の細菌類に見いだされた。この特異な性質から推察して、構造上の特徴が期待され、われわれはこれに属する好気性細菌、*Pseudomonas ovalis* フェレドキシンと *Mycobacterium smegmatis* フェレドキシンの構造決定を試み、これらのフェレドキシンのシステイン分布が、他のものとは異なることを示した。*M. smegmatis* フェレドキシンは8残基のシステインを含み、これらは全て鉄への配位に

関与すると考えられ、システイン24が、他のフェレドキシンに認められない特異な残基であると推定された。P. ovalis フェレドキシンも同様の残基が配位に関与すると考えられ、従ってこれらのフェレドキシンのシステイン20, 39, 42, 45は、P. aerogenes フェレドキシンのシステイン18, 35, 38, 41に対応し、11番目のものを除外した。システイン8, 16, 24, 49がユニークな分布をとっていると思われる。

2Fe-2S フェレドキシンの立体構造は、最近、らん藻の一種 *Spirulina platensis* から取り出されたものについて、鳥取大、工学部の勝部幸輝教授と、阪大、蛋白研の角戸正夫教授とわれわれの研究グループの共同研究で決定され（図3）、初めて活性中心の配位構造が明らかになった。それによると、6残基のシステインのうち、システイン41と46が一方の鉄原子に、システイン49と79が他方に配位していた（図4）。4残基これらは、他のシステイン含量の異なる2Fe-2S フェレドキシンでも保存され、

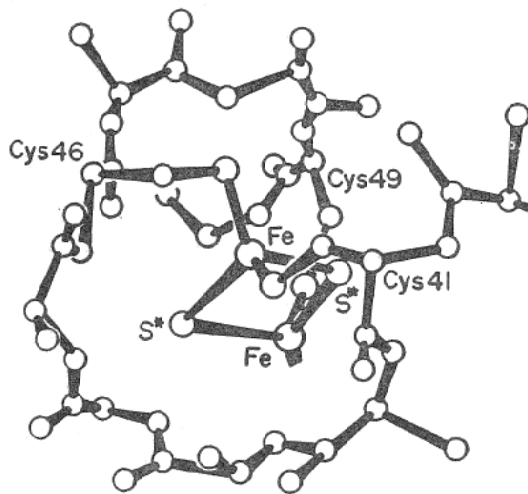


図3. *S. platensis* フェレドキシンの立体構造模式図。

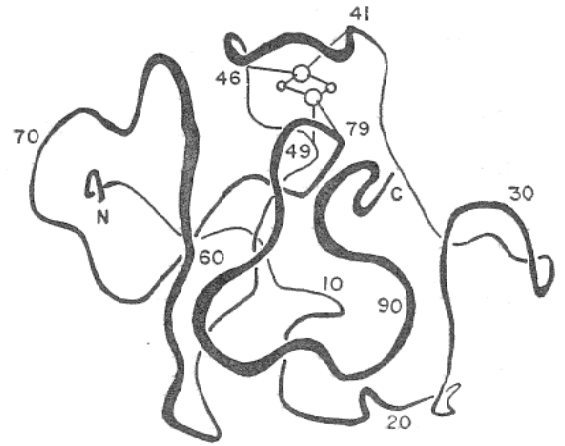


図4. 図3の活性中心拡大図。

一次構造比較より推定された必須のシステインの位置と一致していた。2Fe-2S フェレドキシンは、一般に植物に認められるが、超好塩細菌 *Halobacterium halobium* にも、その存在が知られていた。このフェレドキシンの一次構造を決定してみると、植物由来のものに比べ、約30残基長いけれども、良い相同性が認められ、特に4残基のシステインは、先に示した位置に存在し、植物フェレドキシンと同様の2Fe-2S型活性中心の構造が保存されていることを示している。

以上、システインの分布はよく保存され、4Fe-4S型活性中心を持つフェレドキシンでは、-Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-の構造と、これとは離れた位置に存在する-Cys-, 2Fe-2S型活性中心を持つものでは、-Cys-X-X-X-X-Cys-X-X-Cys-と-Cys-が必須の構造であると結論できる。M. smegmatis フェレドキシンやP. ovalis フェレドキシンの配位構造は、単なる一次構造比較からだけでは結論が出せず、今後の立体構造等の研究の裏づけが待たれる。

