



立体構造からみた植物型 フェレドキシン

勝 部 幸 輝*

フェレドキシンは非ヘム鉄と、その鉄と同数のラピル硫黄と呼ばれる無機硫黄とから構成された活性中心をもつ鉄-硫黄タンパク質で、生物学的に重要な多くの酸化還元反応に関与している。フェレドキシンは、活性中心であるクラスタの組成によって、 $[8\text{Fe}-8\text{S}]$ 、 $[7\text{Fe}-7\text{S}]$ 、 $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ 及び $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ に分類され、クラスタには図1に示すような形があることがX線結晶解析の結果明らかにされている。

$[8\text{Fe}-8\text{S}]$ フェレドキシンは、60個程度のアミノ酸からなるポリペプチドと2個の $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ クラスタをもち、多くの非光合成細菌中に存在することから細菌型とも呼ばれている。フェレドキシンという名称は *Clostridium Pasteurianum* から分離された褐色の非ヘム鉄タンパク質について最初につけられたものである¹⁾。この型のフェレドキシンのX線結晶解析は Adman らによって1973年 *Peptococcus aerogenes* のものについて行われた²⁾。

$[7\text{Fe}-7\text{S}]$ フェレドキシンは、1981年 Ghosh らによる *Azotobacter vinelandii* のフェレドキシン(107アミノ酸残基)のX線結晶解析によって、 $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ と $[3\text{Fe}-3\text{S}]$ クラスタをそれぞれ1個ずつ有することが明らかになった³⁾。しかし、最近 $[3\text{Fe}-3\text{S}]$ クラスタの *in vivo* での存在が盛んに論争されている。

$[4\text{Fe}-4\text{S}]$ フェレドキシンは $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ クラスタを分子中に1個有し、*Bacillus thermoproteolyticus*、*Bacillus stearothermophilus* などからのフェレドキシンがこれに属する⁴⁾⁵⁾。一般にフェレドキシンは酸化還元電位が $-400\sim-280\text{mv}$ と極めて低いが、紅色硫黄

細菌あるいは紅色無硫黄細菌などから酸化還元電位が $+350\text{mv}$ と極めて高い $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ クラスタ1個もつ高電位鉄タンパク質(HiPIP)が分離されている。1974年 Carter らは *Chromatium Vinosum* の HiPIP (85アミノ酸残基)のX線結晶解析を行った⁶⁾。低電位のものについては、現在筆者らが解析中である⁷⁾。

$[2\text{Fe}-2\text{S}]$ フェレドキシンは、93~99アミノ酸からなるポリペプチドと1個の $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ クラスタからなり、藍藻から高等植物にいたる広い範囲で植物界に分布し、植物型フェレドキシンとも呼ばれている。またこの型のもは好塩菌にも存在し、植物型よりもN末端側に約20残基C末端側に約5残基多いアミノ酸を有することが知られている⁸⁾⁹⁾。

このように、フェレドキシンは生物界に広く存在し、活性中心の特異な構造、またその多彩な機能のために多くの研究分野で興味もたれている。筆者らは、最近藍藻の一種である *Spirulina platensis*¹⁰⁾及び *Aphanothece sacrum*¹¹⁾からのフェレドキシンのX線結晶解析を行い、 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ フェレドキシンの立体構造と機能発現の関係及び分子進化に関する知見を得たので、タンパク質の構造研究の一例としてその結果を次に紹介する。

藍藻の $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ フェレドキシンの立体構造

Spirulina platensis 及び *Aphanothece sacrum* のフェレドキシンの主鎖の折れたたみ構造を図2に示す。両者の立体構造は、一次構造が30%異なるにもかかわらずよく一致しており、その基本構造は β -barrelで活性中心部位は β -barrelから離れた所にある。この主鎖の構造を模式的に表わしたものが図3で、主鎖を12個の連続したポリペプチドに分けそれぞれをA~Lとした。 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ クラスタはルー

*勝部幸輝 (Yukiteru KATSUBE) 大阪大学蛋白質研究所, 教授, 理学博士, X線結晶学

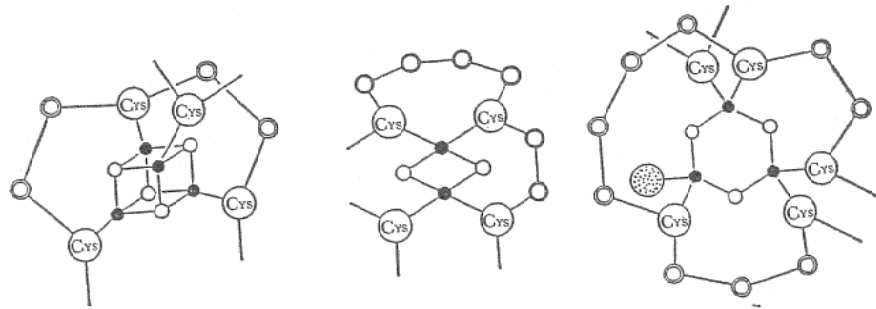


図1 クラスターの構造

左から [4Fe-4S], [2Fe-2S], [3Fe-3S] のクラスターを表わす. 黒丸は鉄原子, 白丸はラピル硫黄, 二重丸はアミノ酸残基, Cys はシステインのγ-硫黄を表わす

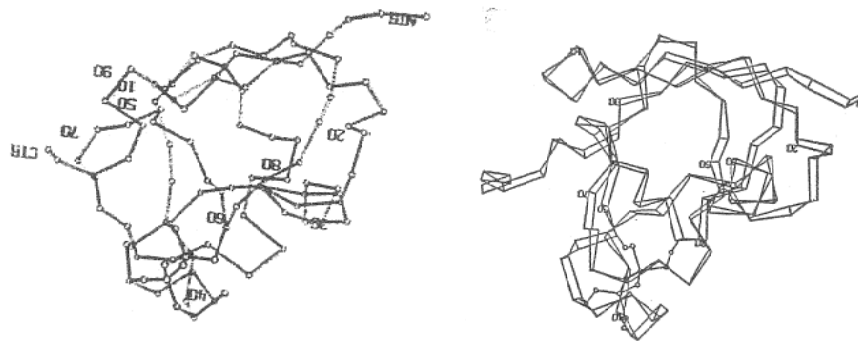


図2 *Spirulina platensis* (左) と *Aphanothece sacrum* (右) のフェレドキシン

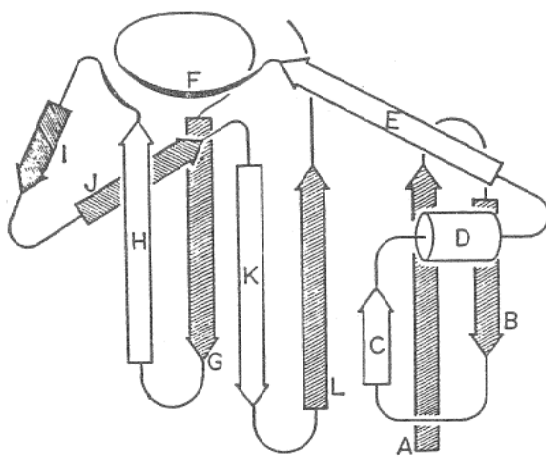


図3 植物型フェレドキシンの主鎖の構造

A : 1-11残基, B : 12-21, C : 22-24,
D : 25-32, E : 33-40, F : 41-49,
G : 50-56, H : 57-66, I : 67-73,
J : 71-81, K : 82-88, L : 89-101

プF中に存在する.

一次構造と立体構造

二つのアミノ酸 Q, R の性質の差をそれぞれのアミノ酸の原子組成G, 分極率P, 分子容

Vを用いて, Grantham は

$$d(QR) = [a(C_Q - C_R)^2 + \beta(P_Q - P_R)^2 + \gamma(V_Q - V_R)^2]$$

によって表わした¹²⁾. 筆者らは二つのタンパク質SとTの一次構造の差を

$$D_{ST} = \frac{\sum_i w_i d(S_i T_i)}{\sum_i w_i}$$

によって与えた. ここで $d(S_i T_i)$ はSとTの i 番目のアミノ酸の性質の差であり, W_i は i 番目に対応するアミノ酸が二つのタンパク質に存在するときは1, 何れかにおいて欠損しているときは0とする. 多くのタンパク質についてD値を検討し, D値は一次構造のみならず, 主鎖の折れたたまり方の類似性の指標にも用いることができることを示した¹³⁾. 立体構造の類似性もなく進化論的な関連もないタンパク質間ではD値は77~105であるのに対し, 藍藻フェレドキシンと他の植物型フェレドキシン26種との間のD値は2~9である. このことは今回検討した全ての植物型フェレドキシンの立体構造が藍藻のそれと同じであることを示唆している.

表1 各ペプチド領域の平均D値

領域	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
植物型	24	43	34	9	13	9	24	16	12	12	12	31
好塩菌型	93	79	57	20	21	18	46	57	25	54	61	85

藍藻と好塩菌型間のD値は50~57で、両者の立体構造の類似性もかなり高いものと予想される。D値を図3の各ペプチド領域ごとに求め、植物型及び好塩菌型の平均値を第1表に示す。この表は、好塩菌のものはC~K領域で藍藻と同じ構造をとっているが、A, B, L領域では少し異なる構造をとっていることを示唆している。

機能発現と立体構造

植物型 フェレドキシンは、フェレドキシン-NADP還元酵素 (FNR) と複合体を形成することによって光合成系における電子伝達体として機能するが¹⁴⁾、好塩菌のものはFNRとの複合体を形成しない¹⁵⁾。一般に、他分子と特異的に結合する部位は構造の不変性が高い。第1表からわかるように、複合体ができない好塩菌で低い不変性を示し、複合体をつくる植物型では高い不変性でしかも互に隣接した領域としてはH, J, Kがある。このうちJ領域は分子内部に埋もれているためFNRと接触することができない。したがって、FNRと接触する部位は活性中心を含むFから互に隣接したH, K領域であると予想することができる¹¹⁾。MasakiらはAとLの領域にあるε-アミノ基をアセチル化してもFNRとの反応性に変化がないことを明らかにしている¹⁶⁾。また、Hasumiらは複合体が形成されると、フェレドキシンとFNRとの両方で5個のチロシン残基が溶媒に接触できなくなると報告している¹⁷⁾。ここで用いたホウレン草のフェレドキシンには先に予想したFNRとの接触部位中あるいはその近くに3個のチロシン残基が存在し、これらのOH基は全て溶媒分子と接触している。これらのことは前述の推察を支持している。

好塩菌も含めて28種の[2Fe-2S]フェレドキシンのうち、26種のもは42番目の残基がアルギニンであるのに対し、植物型の2種では

グルタミンとなっている。また、ほとんどの種の25番目の残基がチロシンであるのに対し、42番目がグルタミンに変異している2種のものだけがアルギニンとなっている。前述のように主鎖構造は全ての植物型フェレドキシンについて高い類似性を保っているとして、25番目をアルギニンとした場合の立体構造を予測したところ、グアニジル基の立体的位置はもとの42番目のアルギニンの場合とほぼ同じであることを知った。このグアニジル基の立体位置の不変性はこの基が機能発現に対し重要な役割を果していることを示唆している。Matsubaraらは化学修飾法によってこのアルギニン残基の重要性を示している¹⁸⁾。

酸化還元電位と立体構造

全ての[2Fe-2S]フェレドキシンは極めて低い酸化還元電位(-420mV)を示す。この理由について多くの研究がなされているが未だ完全な説明がなされていない^{19)~20)}。クラスターの鉄原子から分子表面までの距離と露出面積²¹⁾との関係から鉄原子の分子内への埋れ方を検討した結果を図4に示す²²⁾。この結果からみれば、鉄原子が分子内部に埋れている程度酸化還元電位は高くなるという規則性がある。

分子進化と立体構造

タンパク質の分子進化の基本過程はポリペプチド鎖中の個々のアミノ酸残基の変異であり、更に大きな変異は一連の残基の挿入・欠損である。したがって、遠く離れた相同タンパク質間ではそれらの一次構造が全く異なってしまう、

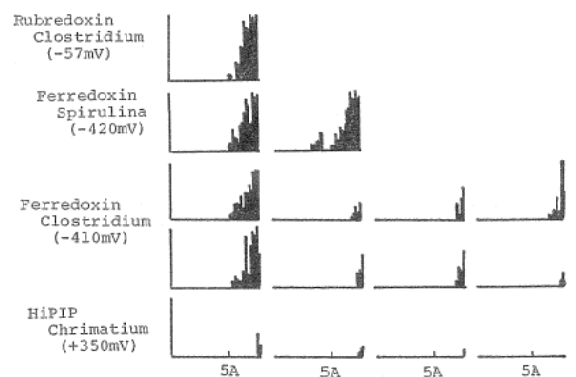


図4 鉄原子から接触表面までの距離(横軸)と露出面積

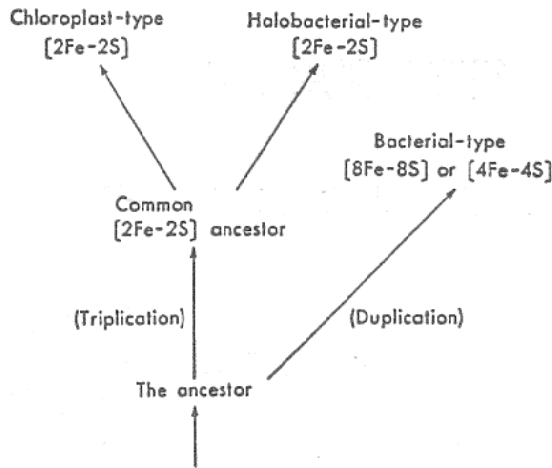


図5 フェレドキシンの系統樹

一次構造の比較から類縁関係を知ることが困難となる場合がある。このような場合でも、立体構造はよく保存されており、立体構造から類縁関係を知ることができる。筆者らが構造解析した二種のフェレドキシンのにおいても、一次構造が前述の如くかなり異なるにもかかわらず、それらの立体構造はよく保存されている¹¹⁾。アミノ酸残基の変異率は、立体構造上の位置に大きく依存し、一般的に分子表面にある残基の変異率は内部のそれに比べて大きい。植物型フェレドキシンのにおいてもこのことが観測された²³⁾。しかし、機能発現に重要な残基は変異しないが、前述のアルギニンの変異にみられるように、機能発現に重要な官能基の立体的位置を変化させないように、2個所で互に補完する形でアミノ酸置換が併発している場合もある。立体構造に基づいて相同タンパク質のより正確な系統樹の作成も可能であり、Matsubaraらが提出した祖先型アミノ酸配列と立体構造に基づいてつくられた系統樹を図5に示す²⁴⁾。

以上筆者らが最近行ったことの一つについて述べたが、加えてタンパク質構造に関する原理的なものを確立し、その成果を応用面に拡張する道をも拓くように努力している。

文 献

1) L. E. Mortenson, R. C. Valentine and J. E. Carnahan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 448 (1962)
 2) E. T. Adman, L. C. Sieker and L. H. Jensen, *J. Biol. Chem.* **248**, 3987 (1973)
 3) D. Ghosh, W. Furey, Jr., S. O' Donnell

and C. D. Stout, *J. Biol. Chem.* **256**, 4185 (1981)
 4) H. Matsubara, A. Singer, R. Sasaki and T. H. Jukes, *Biochem. Biophys. Commun.* **21**, 242 (1965)
 5) T. Hase, N. Ohmiya, H. Matsubara, R. N. Mullinger, K. K. Rao and D. O. Hall, *Biochem. J.* **159**, 55 (1976)
 6) C. W. Carter, Jr., J. Kraut, S. T. Feer, N. Xuong, R. A. Alden and R. G. Bartsch *J. Biol. Chem.* **249**, 4212 (1974)
 7) T. Tsukihara, K. Homma, K. Fukuyama, K. Fukuyama, Y. Katsube, T. Hase, H. Matsubara, N. Tannaka and M. Kakudo, *J. Mol. Biol.* **152**, 821 (1981)
 8) T. Hase, S. Wakabayashi, H. Matsubara, L. Kerscher, D. Oesterhelt, K. K. Rao and D. O. Hall, *FEBS Lett.* **7**, 308 (1977)
 9) T. Hase, S. Wakabayashi, H. Matsubara, M. Mevarech and M. M. Werber, *Biochim. Biophys. Acta* **623**, 136 (1980)
 10) T. Tsukihara, K. Fukuyama, M. Nakamura, Y. Katsube, N. Tanaka, M. Kakudo, K. Wada, T. Hase and H. Matsubara, *J. Biochem.* **90**, 1763 (1981)
 11) T. Tsutsui, T. Tsukihara, K. Fukuyama, Y. Katsube, T. Hase, H. Matsubara, Y. Nishikawa and N. Tanaka, *J. Biochem.* **94**, 299 (1983)
 12) R. Grantham, *Science* **185**, 862 (1974)
 13) T. Tsukihara, M. Kobayashi, M. Nakamura, Y. Katsube, K. Fukuyama, T. Hase, K. Wada and H. Matsubara, *Biosystems* **15**, 243 (1982)
 14) R. Masaki, S. Yoshikawa and H. Matsubara, *Biochim. Biophys. Acta* **700**, 101 (1982)
 15) M. M. Werber, Y. Shahak and M. Avron, *FEBS Lett.* **113**, 111 (1980)
 16) R. Masaki, K. Wada and H. Matsubara, *J. Biochem.* **81**, 1 (1977)
 17) H. Hasumi and S. Nakamura, *J. Biochem.* **84**, 707 (1978)
 18) H. Matsubara, K. Wada and R. Masaki, 'structure and function of chloroplast-type ferredoxins' plenum press, New York (1976)
 19) W. Sweeney and R. S. Maglizzo, *Biopolymers* **19**, 2133 (1980)
 20) R. J. Kassner and W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4351 (1977)
 21) A. Shrake and J. A. Rupley, *J. Mol. Biol.* **79**, 351 (1973)
 22) 月原, 勝部, 長谷, 和田, 松原 第32回タンパク質構造討論会講演要旨集 pp. 25-28 (昭56)
 23) K. Fukuyama, T. Hase, S. Matsumoto, T. Tsukihara, Y. Katsube, N. Tanaka, M. Kakudo, K. Wada and H. Matsubara, *Nature* **286**, 522 (1980)
 24) T. Tsukihara, Y. Katsube, T. Hase, K. Wada and H. Matsubara, 'Molecular Evolution, protein polymorphism and Neutral Theorg' ed. M. Kimura, Springer-Verlag, Berlin, p299 (1982)