



# 電子キャリアー蛋白質の機能特性の改変

長谷俊治\*, 明石哲行, 松村智裕

## Modification of Functional Characteristics of an Electron Carrier Protein

**Key Words** : Electron Transfer, Redox Potential, Ferredoxin,  
Protein-protein Interaction

### 1. はじめに

細胞内で行われる電子伝達反応は、呼吸、光合成等の物質代謝の基礎過程であり、多くの場合、蛋白質に取り込まれている金属イオンや補欠分子族が酸化還元を中心として働いている。これらの電子伝達は、特定の蛋白質間で選択的に、しかも比較的長い距離を早い速度で起こり、高い特異性と効率を持つ生体反応である。これは、蛋白質のポリペプチド鎖バックボーンが酸化還元中心を電子の授受に適した状態に保ち、さらにパートナーとなる蛋白質が相互に認識できるような構造を作り出しているからであると考えられる。

我々の研究グループは光合成電子伝達成分の一つであるフェレドキシン (Fd) に着目し、蛋白質工学的な手法で電子伝達特性を規定しているポリペプチド鎖の構造要因を明らかにしようとしている。本稿では、電子伝達能が明確に変化した改変分子の機能特性を通して、蛋白質を介した電子伝達反応の特徴の一端を紹介する。

### 2. Fd分子の構造とその改変

Fdは非ヘム鉄と無機硫黄からなる金属クラ



\*Toshiharu HASE  
1950年7月20日生  
昭和51年大阪大学大学院理学研究  
科生理学専攻修士課程修了  
現在、大阪大学蛋白質研究所、酵  
素反応学部門、教授、理学博士、  
生物化学  
TEL 06-879-8611

スターを持つ電子キャリアー蛋白質の総称である<sup>1)</sup>。植物型Fdは植物細胞の葉緑体に存在し、[2Fe-2S]クラスターを備えている。主要な機能は光化学系Iより電子を受け取り、それをFd-NADP<sup>+</sup>還元酵素に供与して、NADP<sup>+</sup>の光還元反応を行うことである。このFdは分子量1万余りの可溶性蛋白質であり、多くの生物由来の分子種の一次構造や立体構造が明らかになっており、豊富な構造上の知見が蓄積している。図1にポリペプチド主鎖の折り畳み構造を示した<sup>2)</sup>。[2Fe-2S]クラスターは分子上部の38番目付近から48番目までのループ領域と分子下部のβパレル構造との間に存在する。

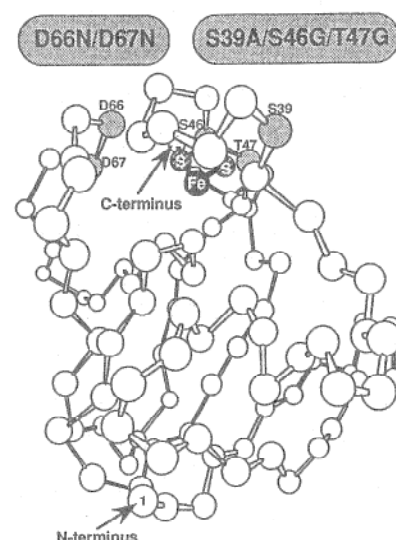


図1 植物型Fdの立体構造とトウモロコシFdの部位特異変異体  
変異体の詳細は本文参照

我々は、トウモロコシよりクローニングした Fd 遺伝子が大腸菌で発現させて、植物由来のものと同じ分子を得ることに成功し<sup>3)</sup>、この発現系を用いて各種の Fd 改変体を作製している。

図 1 に示す 2 種類の改変体は、66 番目と 67 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した分子 (66N/67N) と、39 番目のセリンをアラニンに 46 番目のセリンと 47 番目のスレオニンと共にグリシンに置換した分子 (39A/46G/47G) である。これらの分子は、これまで作製した 20 種余りの改変体の中で、電子伝達能の基本的な制御要因である酸化還元電位と、電子伝達のパートナーである Fd-NADP<sup>+</sup> 還元酵素との複合体形成能が元の野生型の分子を著しく異なる特性を持つ<sup>4)</sup>。

### 3. Fd の酸化還元電位

野生型 Fd の酸化還元電位は  $-345\text{mV}$ 、66N/67N、39A/46G/47G の電位はそれぞれ  $-338\text{mV}$ 、 $-162\text{mV}$  であった。39A/46G/47G の電位が約  $180\text{mV}$  も上昇した原因は、46 番目と 47 番目に側鎖のないグリシンが導入されたために、ポリペプチド鎖の局所的なフレキシビリティが増し、これらの残基の近傍に位置する [2Fe-2S] クラスタと溶媒との触媒度合いが増加したことによるものと判断している。この考え方の根拠となる実験事実は、1) 46 番目と 47 番目にグリシン以外の幾種類かの残基を導入しても、このような大きな電位の変化が起こらないこと、2) 鉄イオンのキレーターを溶液に加えると、39A/46G/47G の [2Fe-2S] クラスタの鉄イオンは容易にそれと新たな化合物を形成すること、3) この Fd の還元型分子は、野生型分子に比べ酵素分子による自動酸化性が 5 倍以上も強いこと、などである。Fd が低い酸化還元電位をもつ要因として、ペプチド主鎖のアミドやアミノ酸側鎖の水酸基と鉄イオンに配位している S 原子との間 NH-S、OH-S の水素結合の重要性が論じられているが<sup>5)</sup>、我々の観察は、アミノ酸側鎖の微妙な構造の違いよりも、むしろ極性溶媒への露出度も電位の規定要因として重要なものであることを示唆するものであろう。

### 4. Fd-NADP<sup>+</sup> 還元酵素との相互認識

Fd から電子を受け取り酸化還元反応する酵素はいくつかあるが、これらは Fd と電子伝達複合体を形成する。この蛋白質間の主な結合力は静電的相互作用に由来する。我々は、酸性残基の側鎖のいずれかがこの複合体形成に関与していると考え、[2Fe-2S] クラスタ近傍に加え、他の領域の分子表面のアスパラギン酸やグ

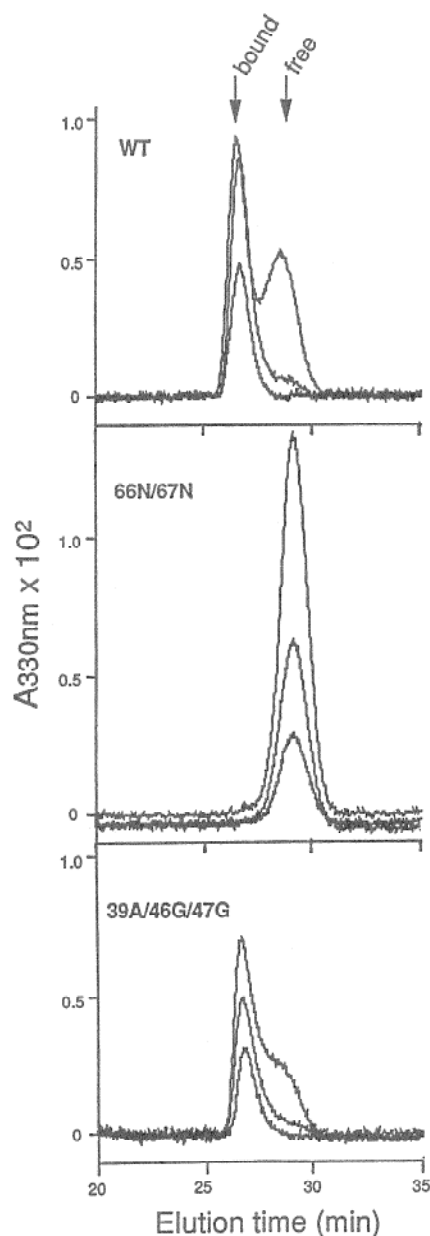


図 2 Fd 改変体と Fd-NADP<sup>+</sup> 還元酵素との複合体形成  
あらかじめ酵素 ( $3\mu\text{M}$ ) と Fd ( $0.75, 1.5, 3\mu\text{M}$ ) を混合し、 $50\text{mM}$  トリス塩酸緩衝液 ( $\text{pH}7.5$ ) で平衡化した Superdex 75PC3.2/30 のカラムクロマトグラフィーを行った。酵素に結合した Fd と結合していないフリーの Fd が分離される。

ルタミン酸の置換体を作製しつつある。これらの内で、66N/67NがFd-NADP<sup>+</sup>還元酵素との結合力が大きく低下していることが目下判明している。図2に微小のゲルろ過カラムを用いて複合体形成の様子を解析したデータを示す。一定量のFd-NADP<sup>+</sup>還元酵素にFdの量を変化させながら、この酵素に結合したFdを測定する。野生型Fdでは、Fdの量が酵素と当量になるまでは、加えた分子の全てが結合型として、この量を越えるとフリー型としてゲルろ過カラムより溶出される。66N/67Nは結合型としては溶出されず全てフリー型であり、一方、39A/46G/47Gは野生型と同様の性質を持つ。

次に、Fd-NADP<sup>+</sup>還元酵素と電子伝達反応をNADP<sup>+</sup>の光還元活性で測定した結果を図3に示す。2種の改変体は野生型に比べ電子伝達能は大きく減少しており、特に39A/46G/47Gではこの活性はほとんど完全に消失している。

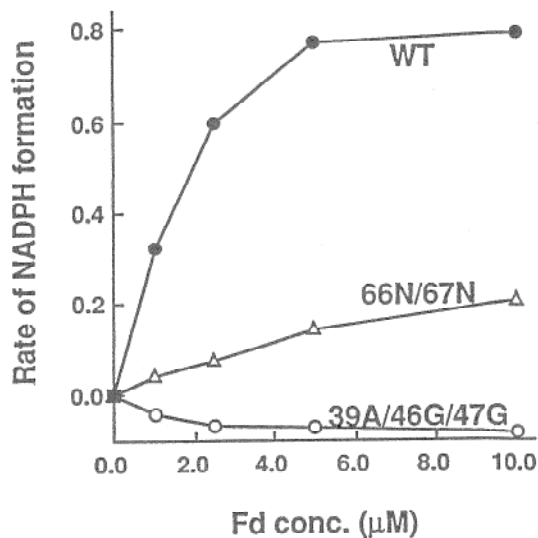


図3 Fd改変体のNADP<sup>+</sup>の光還元活性

## 5. ま と め

表1に改変体の特性をまとめた。これら2種

表1 Fd改変体の酸化還元電位、及びFd-NADP<sup>+</sup>還元酵素との複合体形成と電子伝達反応

分子種	電位(mV)	複合体形成能	電子伝達速度(%)
野生型	-344	有	100
66N/67N	-338	無	30
39A/46G/47G	-162	有	0

の改変分子はいずれも電子キャリアー蛋白質としての機能は大きく低下したものであるが、その原因は互いに異なり、66N/67Nは電子を供与するパートナー蛋白質との複合体形成の欠陥に、39A/46G/47Gは酸化還元電位の上昇にあると結論できる。これは、蛋白質間の電子伝達を制御する2つの要因を独立して解析できる実験系を確立したものであり、今後の進展を期待している。生体の酸化還元代謝系やその他の非生理的な電子伝達系の反応過程制御の研究の一助になれば幸いである。

## 参 考 文 献

- 1) Matsubara, H., Saeki, K., *Adv. Inorg. Chem.*, 38, 223 (1992)
- 2) Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo M., Wada, K., Matsubara, H., *Nature*, 286, (1980)
- 3) Hase, T., Mizutani, S., Mukohata, Y., *Plant Physiol.* 97, 1395 (1991)
- 4) 明石哲行, 松村智裕, 井手口隆司, 長谷俊治, 生化学(第67回日本生化学会大会発表抄録集), 66, 726 (1994)
- 5) Tsukihara, T., Fukuyama, K., Nakamura, M., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo M., Wada, K., Hase, T., Matsubara, H., *J. Biochem.*, 90, 176,3 (1981)