

タンパク質における弱い相互作用の構造と機能

1. シダ植物プラストシアニン

高妻 孝光¹⁾

要 旨

本稿は、興味深い構造と機能を示すシダ植物由来の光合成系電子伝達タンパク質であるプラストシアニンの研究との出会い、そしてその構造と反応の特徴から古生代、中世代における地球環境等について考察を試みたい。

シダ植物由来のプラストシアニンとの出会い

植物の光合成系電子伝達タンパク質として機能するプラストシアニンは、1960年に東京大学の加藤らによって酸化還元活性を有する銅タンパク質として、クロレラから発見され、翌年1961年に、葉緑体(クロロプラスト)から得られる鮮やかな青色(シアンは、ギリシャ語源で青色を意味する)のタンパク質であることからプラストシアニンと名付けられた[1, 2]。奇しくも1961年は、著者である高妻が産まれた年でもあり、プラストシアニンをはじめとして銅タンパク質の研究を行うようになったことには少なからず遠からぬ縁を感じている。さて、植物は光化学系IIにおいて水の酸化によって電子を取り出し、酸素分子を発生する。この水の酸化によって得られた電子は、シトクローム b_6/f 複合体へと伝達され、プラストシアニンがシトクローム b_6/f 複合体から受け取り、Photosystem Iへと運搬する。Photosystem Iでは、光の力を使って、二酸化炭素を固定する還元力が生まれる。プラストシアニンもアズリンも酸化還元(電子移動)という機能を有するが、その活性中心には、 Cu^{2+} が結合しており、 $Cu^{2+} \rightleftharpoons Cu^{1+}$ という酸化還元のサイクルによって電子をシャトルする。プラストシアニンとは、とても美しい印象的な青色を呈することから、バクテリア由来のアズリン(ラテン語源で青色を意味する)と共に、ブルー銅タンパク質ともよばれている。

1978年オーストラリア・シドニー大学のFreemanらは、ポプラから単離精製し、結晶化したプラストシアニンについて最初のX線結晶構造解析を行った[3]。クロレラからのプラストシアニンの発見が1961年であり、その構造の解明には多くの年月を要しているが、

様々なプラストシアニンの単離精製が行われたものの、長い年月、構造解析を行う上で十分なX線回折データを与える結晶を得ることができなかったためと、後にFreeman先生からうかがったことがある。Freeman先生は、この世界で初めてとなるプラストシアニンの構造をイギリスの学会で発表されたそうであるが、そのモデルは、シドニー大学から電報で送られてきた座標をもとにホテルの部屋で計算されて、OHP(今は見ることも無くなったが)に書いて紹介したところ、米国のWrightが感動して、プロジェクターを後ろに思い切り引いたため、会場の天井いっぱいにプラストシアニンの構造が映し出され、とても感動的だったと話して下さったことがある。さて、Freemanらによる詳細な構造学的研究から、還元型(Cu^{1+})のプラストシアニンにおいて、pHを変えると、酸性条件下では、4つの配位アミノ酸(ヒスチジンが2つ、システインが1つ、メチオニンが1つ)のうち溶媒側に露出しているヒスチジン残基のイミダゾール基が銅イオンから解離することを報告した。当時、プラストシアニンのようなブルー銅タンパク質の電子移動の効率の高さは、タンパク質によって、 Cu^{2+} 状態の構造(通常、水溶液中で Cu^{2+} の錯体は正方平面型をとる)が四面体型に強制され、 Cu^{1+} に還元されても構造(Cu^{1+} の錯体は正四面体型構造をとる)の変化を小さくすることによりエネルギーロスを少なくしていると考えられていたため、プラストシアニンで見出された構造変化は学会で大きな議論をおこした(Freeman先生談)。その後、Freemanらは、X線結晶構造解析でpH滴定実験をするということを行い、構造のpH依存性について調べ、 Cu^{1+} の還元型プラストシアニンは、酸性条件下で、明らかに溶媒側に露出しているヒスチジン残基のイミダゾール基が銅イオンから解離していることを示し、世界が驚愕した[4]。また、無機化合物の化学反応機構の大家であるイギリス・ニューカッスルアポンタイン大学のSykes(後に高妻はSykes先生のところに博士研究員で研究に参加した)ら

2022年1月31日受付 2022年2月21日受理

1) 茨城大学理工学研究科

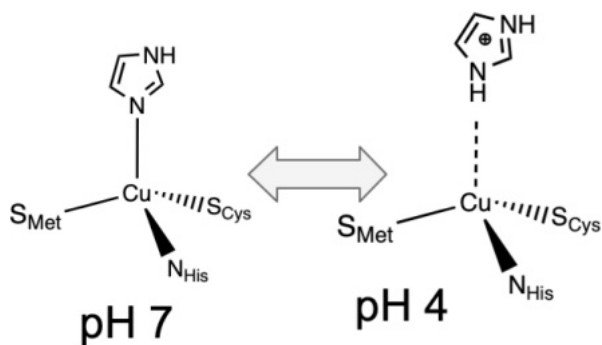


Figure 1. ポプラプラストシアニンの構造解析から、酸性にすると水側に露出したヒスチジンイミダゾールが、Cu(I)から解離して電子伝達活性を失う[4, 5]

は、プラストシアニンの電子移動反応が酸性条件下で抑制されることから、チラコイド膜における電子伝達がpHによって制御されるという考えを提唱したが、この仮説は残念ながら証明されていない[5]。

筆者である高妻がまだ大阪大学教養部化学教室の助手をしていた1993年、イギリスのSykes先生から、東邦大学の吉崎先生とコンタクトをとって、緑藻類のアナオサ由来のプラストシアニンについて問い合わせをしてほしいと連絡があった。Sykes先生とは1992年に分子科学研究所で開催された研究会で会っており、Sykes先生の研究室に行くことが決まっていた。このアナオサからのプラストシアニンの抽出・単離精製は、想像を絶するほど体力勝負であり、茨城大学に移ってから本格化した。学生達が大いに活躍してくれた(アナオサのプラストシアニンはスペースシャトルに載せて微小重力環境での結晶化実験も行った)。

さて、東邦大学の吉崎はプラストシアニンのアミノ



Figure 2. 東邦大学吉崎先生、茨城大学学生と長野県八千穂村でのオシダの採集(2005年9月)

酸配列からの分子進化系統樹を作製し、植物の分子進化についての研究を行っていたが、シダ植物であるオシダから得られたプラストシアニンのアミノ酸配列が他の高等植物由来のプラストシアニンとは極めて異なることを見出し、シダ植物は現在の高等植物の直接の祖先ではないことに気づいていた。高妻は、この吉崎らによって見出されていたシダ植物プラストシアニンの構造、分光学的性質、電子移動反応を調べてみたいと考え、吉崎との共同研究が開始された。シダ植物であるオシダは、長野県の八千穂村で採集し、10kgの葉(シダ植物では中央にあるのがいわゆる高等植物の茎に相当し、鋸歯状に出ている部分が葉であるので、採集したオシダは総量でおそらく50kgはあったと思われる)から、約半年ほどかけて、ようやく100mg精製できた。前述のアナオサプラストシアニンの精製よりもよりハードであったが、学生達がよく頑張り精製することに成功した。精製されたオシダ由来のプラストシアニンの電子吸収スペクトルを測定したところ、高等植物のプラストシアニンでは594nmにブルー銅タンパク質特有のシステインチオラートからCu²⁺への電荷移動に由来する吸収極大を示すのに対し、オシダから得られたプラストシアニンは590nmと高等植物型プラストシアニンよりも短波長側に吸収極大を有し、共鳴ラマンスペクトルも高等植物由来のものとは異なるタイプのブルー銅活性中心であることを示唆していた。更に、酸化還元電位も387mVと高等植物由来のプラストシアニンよりは約20mVほど高い酸化還元電位を有することが明らかとなった。タンパク質における電子移動反応のプロープとしてフェリシアン錯体やトリス

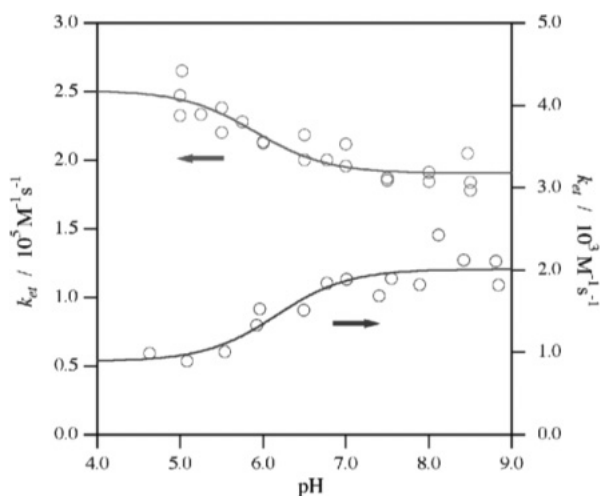


Figure 3. プラストシアニンの電子伝達活性: 左の軸は[Co(phen)₃]³⁺錯体との電子移動反応であり、右の軸は[Fe(CN)₆]³⁻錯体との電子移動反応を示す。いずれの場合も電子伝達活性は酸性領域でも保持されている。

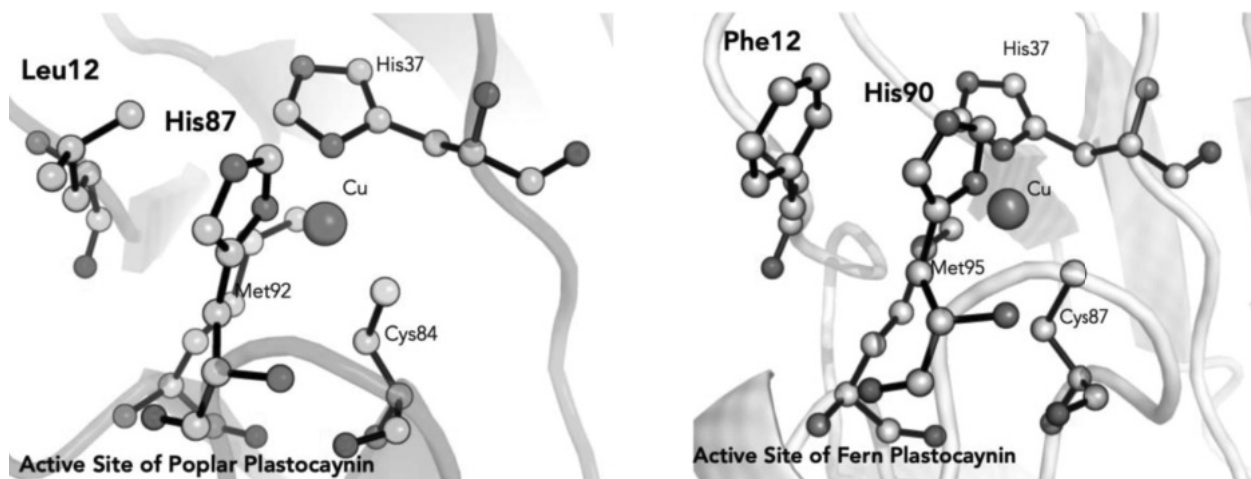


Figure 4. プラストシアニンの活性中心構造: 左が高等植物タイプ (ポプラ) のプラストシアニンであり, 右にオシダ由来のプラストシアニンを示した。Phe12のベンゼン環とHis90のイミダゾール環の間には π - π の相互作用が働いていて, His90の銅イオンへの結合を強くしている。

フェナントロリンコバルト(III)錯体が有効であることをSykesらは報告していたが、高妻はイギリスから帰国後、その手法を用いて、オシダ由来のプラストシアニンの電子伝達活性のpH依存性を調べたところ、従来、知られていた高等植物のプラストシアニンとは全く異なる挙動をとることを見出した。先に述べたように高等植物型のプラストシアニンでは、酸性になると電子伝達活性が顕著に阻害される。 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 錯体を酸化剤とした場合、オシダのプラストシアニンは酸性になっても電子伝達活性は低くはなるものの活性を保持した。酸化剤に $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 錯体を用いた場合は、むしろ活性が高くなるという結果を得た(Figure 3) [6]。

当時は、まだX線結晶構造解析の技術や装置等を有しておらず、この新しく単離したシダ植物由来のプラストシアニンの構造解析は、X線結晶構造解析の専門家である大阪大学の井上・甲斐らとの共同研究によって行われた。X線結晶構造解析の結果、オシダ由来のプラストシアニンは高等植物とは異なる分子構造(Figure 4)および活性中心構造を有することが明らかとなり、高等植物や緑藻では保存されている活性中心近傍のロイシン残基がフェニルアラニン残基へと置換されていることが明らかとなった[6, 7]。このフェニルアラニンへの置換によって、フェニルアラニン側鎖のベンゼン環と Cu^{2+} に配位しているヒスチジンイミダゾールとの間に π - π 相互作用が生じており、銅イオンとヒスチジンイミダゾール間の結合が安定化され、酸性になっても電子伝達活性が保持されるものと結論づけた。シダ植物以外のプラストシアニンは酸性条件下でヒスチジンが銅イオンから解離するが、オシダ由来のプラストシアニンのヒスチジンは酸性条件下でも解離しないことがX線結晶構造解析からも示された。

この新しいシダ植物プラストシアニンの研究について、国際学会で発表したところ、なんとシドニー大学のFreeman先生から、詳細をもっと教えてほしいとの電子メールを受け取った。シドニー大学への訪問をおうかがいしたところ御快諾いただいて、このオシダ由来のプラストシアニンの話だけをするためだけにシドニーに1泊3日の強行軍で、渡豪した。この時が、Freeman先生に初めてお会いしたときであった。その年末には論文を書き上げ、Fax!で先生に送ると、Faxでアドバイスをいただいた。その時のFaxには、サイエンスにはいっさい手をつけていないと書き添えてあった。この論文、なにしろ世界で初めてシダ植物のタンパク質の性質や構造を明らかにしたものであると自負していたのと、Freeman先生もいい仕事だということだったので、Nature誌に投稿したが、惨敗であった。がっかりはしたが、気を取り直してJournal of Biological Chemistry誌(アメリカ生化学・分子生物学会の伝統的雑誌)に論文を送り、1998年の12月22日に原稿を受け取ったという通知が届いた。なにしろ、この時代は電子投稿ではなく、リアルに郵送していた。年末もおし迫る12月29日の夜、研究室で年内最後の仕事をしていたところ、Faxが突如としてカタカタと音をたて始めた。音が鳴り止むと同時にFaxをみると、なんと、Journal of Biological Chemistry誌からの返信で、投稿した論文は、「無修正でアクセプト」と書いてあり、驚くと同時にすごく嬉しかったが、年末の研究室は私一人であった。後日、Freeman先生に伝えると、Natureがダメなときは、Scienceに出すんだと言われ、元気を取り戻した。この御縁で、多くの国際的に活躍している研究者たちを紹介して下さり、いつも私の研究を気にかけてくださっていた。米国のヴェンチュラで開

催されていたGordon ConferenceのMetals in Biologyでは、Copperランチを共にさせていただいて、サイエンスと食事を大いに楽しんだ。さて、この論文が掲載されると、結構反響があり、スペイン、オランダ、米国、英国の研究者との共同研究に発展し、国際学会でも度々招待講演をさせて頂いた。研究というものは、他の研究者と全く独立して、よく似たところに行き着くことがある。なので、新しいことを見つけたときは、世界のどこかで、少なくともあと2人は同時に同じことを見つけているというように思うことにしている。さて、オシダのプラストシアニンの論文を読んだスウェーデン・ストックホルム大学のHansson博士は、高等植物プラストシアニで保存されているロイシン(シダ植物ではフェニルアラニン)を遺伝子工学的にグルタミン酸やリシン変えて静電的環境の導入がプラストシアニンの構造や物性に与える研究をおこなっておられた。変異を導入するアミノ酸に12番目のロイシンを選択されたことは大きな意味をもっていた。Hansson博士は、単純に電荷を導入したということだけでは説明できないという報告をされていた[8]。うかつにもこの論文を見落としていて、Hansson博士には申し訳ないことをしたが、ストックホルム大学に招いてくださり、講演をする機会をいただいた。その後、この効果についても、どのようなことが起こりつつあるかが、ごく最近わかってきているが、このことについては、続報でお伝えしたい。

シダ植物プラストシアニンの電子伝達活性保持は π - π 相互作用に起因するということは何ぞわかったのか

結論からすると、オシダプラストシアニンで見つけられた π - π 相互作用は、奇しくも金沢大学の山内らによって低分子モデル化合物により予言されていたものである[10]。その化学的予測に従って、オシダ由来のプラストシアニンの構造と機能との相関を説明することができたが、このような相互作用が天然でのタンパク質中ではじめて見出された例でもあった。さて、この奇しくもということなのだが、高妻は、1984年～1989年、山内先生の研究室で大学院生として研究させて頂いていた。その際、山内先生、小谷先生に、 $[\text{Cu}(\text{hista})(\text{Phe})]\text{ClO}_4$ 錯体(hista=ヒスタミン、Phe=フェニルアラニン)のX線結晶構造解析をさせていただくという機会を得て、ヒスタミンのイミダゾール環とフェニルアラニンのベンゼン環との間の π - π 相互作用について構造的な検討を行った(Figure 5)[9]。まさか、そのモデル錯体で見出した構造を自分自身でシダ植物プラストシアニンに見出すとは思ってもいなかった。しかし、この低分子モデル錯体の知見があったからこそ、その π - π 相互作用によるシダ植物プラストシアニンの電子伝達活性保持について、正しく解釈できた。このモデル錯体の知見がなかったら、あまり面白くない結論にたどりついていただろうし、その後の発展もなかったと思う。更に、興味あることにオシダ由来のプラストシアニンはプラストシアニン特有のacidic

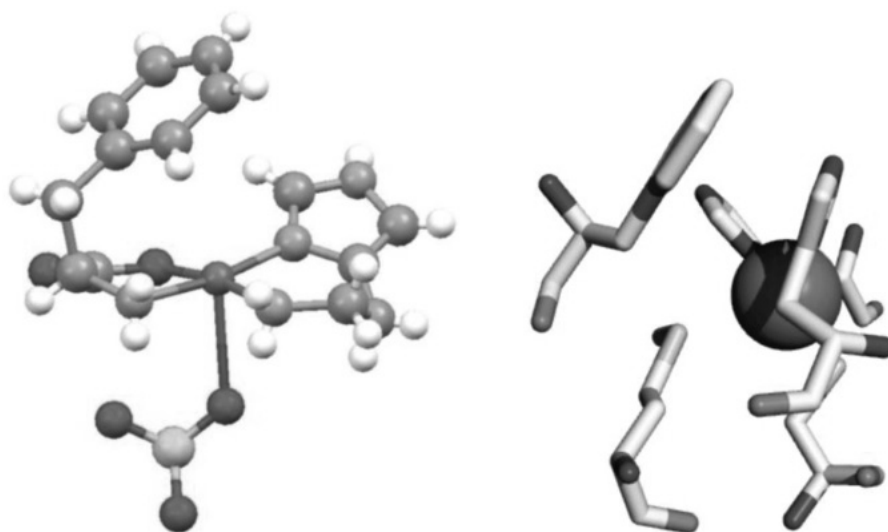


Figure 5. 右図は、オシダプラストシアニンの活性中心構造であり、2つのヒスチジンイミダゾールとメチオニンのスルフィド硫黄、システインのチオラート硫黄が配位し、歪んだ四面体型構造を有する。左図は、 $[\text{Cu}(\text{hista})(\text{Phe})]\text{ClO}_4$ 錯体(hista=ヒスタミン、Phe=フェニルアラニン)の構造であり、同じくフェニルアラニンのベンゼン環とヒスタミン配位子のイミダゾール環の間に π - π 相互作用があり、構造を安定化している。

patchが高等植物とはまったく異なる場所にあることもわかった。また、スペインのセビリア大学のDe la Rosa教授のグループとの共同研究からも、高等植物とは異なる電子伝達反応をしていることがわかった [10]。

古生代・中生代における地球環境とシダ植物

古生代においては、二酸化炭素の濃度が約2000ppmもあったと考えられている。実に現代の二酸化炭素濃度の5倍である。この二酸化炭素濃度は、一旦減少するが、中生代後期には再び約2000ppmに達したと推定されている [11]。このような高い二酸化炭素濃度の環境において、シダ植物はその隆盛を誇っていた。古生代石炭紀では、シダ植物は巨大化し、後に石炭のような化石燃料へと変化していった。その量から考えると、いかに大量の二酸化炭素を固定していたかということは想像に難くない。ここからの話は、全く根拠のないものであるが、シダ植物プラストシアニンの風変わりな性質は、高い二酸化炭素濃度の環境に適応したものであり、それが連綿と受け継がれたのではないだろうか。つまり、大気中の二酸化炭素濃度が高くなると、水に溶ける二酸化炭素濃度が高くなり、重炭酸イオンが増え、水は酸性化する。本稿で取り上げたシダ植物プラストシアニンは、酸性でも電子伝達活性を保持することから、高い二酸化炭素の環境に適応したのではないのかと思いを馳せてしまう。この地球温暖化に向かいつつある現代において、かつて膨大な量の二酸化炭素を固定したシダ植物の仕組みは、温暖化防止への何かのヒントを与えてくれるかもしれない。

謝 辞

本稿で紹介させていただきました研究は多くの方々との共同研究による賜です。銅タンパク質の研究を始める機会をいただきました大阪大学理学研究科の鈴木晋一郎先生、プラストシアニンの研究を始めるきっかけを与えてくださり、たえず有意義な御助言をしてくださいました東邦大学吉崎文則先生、シダ植物プラストシアニンのX線結晶構造解析を行っていただいた大阪大学の甲斐 泰先生・井上 豪先生、共鳴ラマンスペクトルを測定するために機器のご便宜をはかっていただき、多くのアドバイスをいただきました分子科学

研究所の北川禎三先生・長友重紀先生(現筑波大学)にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

有意義な御助言を賜りましたシドニー大学(オーストラリア)のFreeman先生、共同研究者であるライデン大学(オランダ)のUbbink博士、ヒューストン大学(米国)のCzernuszczewicz先生、セビリア大学(スペイン)のDe la Rosa先生に感謝いたします。また、膨大な実験データを得るために尽力してくれた学生諸氏に感謝いたします。

そして、生命現象を化学構造から出発して考察することの重要性を御教示いただきました名古屋大学名誉教授の山内 脩先生に感謝いたします。

References.

1. S. Katoh, *Nature*, **186**, 533-534 (1960).
2. S. Katoh and A. Takamiya, *Nature*, **189**, 665-666 (1961).
3. P. M. Colman, H. C. Freeman, J. M. Guss, M. Murata, V. A. Norris, J. A. Ramshaw, M. P. Venkatappa, *Nature*, **272**, 319-324 (1978).
4. J. M. Guss, P. R. Harrowell, M. Murata, V. A. Norris, H. C. Freeman, *J. Mol. Biol.*, **192**, 361-387 (1986).
5. M. G. Segal, A. G. Sykes, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 4585 (1978).
6. T. Kohzuma, T. Inoue, F. Yoshizaki, Y. Sasakawa, K. Onodera, S. Nagatomo, T. Kitagawa, S. Uzawa, Y. Isobe, Y. Sugimura, M. Gotowda, Y. Kai, *J. Biol. Chem.*, **274**, 11817-11823 (1999).
7. T. Inoue, M. Gotowda, H. Sugawara, T. Kohzuma, F. Yoshizaki, Y. Sugimura, Y. Kai, *Biochemistry*, **38**, 13853-13861 (1999).
8. K. Sigfridsson, S. Young, O. Hansson, *Biochemistry*, **35**, 1249-1257 (1996).
9. O. Yamauchi, A. Odani, T. Kohzuma, H. Masuda, K. Toriumi, K. Saito, *Inorg. Chem.*, **28**, 4066-4068 (1989).
10. J. A. Navarro, C. E. Lowe, R. Amons, T. Kohzuma, G. W. Canters, M. A. De la Rosa, M. Ubbink, M. Hervás, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3449-3456 (2004).
11. K. Moriya, *Fossils* (in Japanese), **102**, 31-42 (2017).