

総説

蛋白質における光駆動プロトン移動と水素結合

石北 央^{1,2}, 齊藤圭亮^{1,2} 所属名 1. 大阪大学大学院理学研究科, 2. JST さきがけ

Abstract:

In a protein environment, proton transfer events can be initiated by configurational changes of pigments (e.g., *trans-cis* isomerization) or changes in the redox states of cofactors upon photoactivation. These changes lead to alteration of pK_a of hydrogen-bond (H-bond) donor and acceptor moieties. In particular, when the pK_a values of the two moieties match, a “symmetric H-bond” can be formed. Formation of an unusually short, symmetric H-bond appears to be essential for proton transfer events via H-bonds, and has been observed in photoreceptor proteins.

Key words:

hydrogen bond, proton-coupled electron transfer, rhodopsin, photoreceptor, photosystem II

1. 水素結合とプロトン移動の関わり

バクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin, BR) は光受容部位としてレチナル (retinal) をもち光駆動プロトンポンプとして機能する (図1)¹⁾. レチナルは, Lys216と Schiff 塩基 (Schiff base) を介して蛋白質と結合している. 初期状態では all-*trans* 型であり, 光を吸収すると, 13-*cis* 型へと異性化する. この動きが, 周辺環境に伝播してアミノ酸残基間の相互作用に変化をもたらす (後述, 5 章), 蛋白質内プロトン移動経路の各部位の pK_a 値を変化させ, プロトン移動を誘起する. 一方, アナベナ・センサリーロドプシン (*Anabaena* sensory rhodopsin, ASR) は, 光センサー²⁾として機能すると言われている. ASR も, BRと同じロドプシン蛋白質ファミリーに属する. 実際, BR (PDB ID: 1C3W³⁾) と ASR (1XIO⁴⁾) の結晶構造には相同性が見られる. 例えば, Schiff 塩基 (BR では Lys216, ASR では Lys210) 近傍には, W402 と呼ばれる水分子が BR, ASR ともに水素結合距離に保存されている (図1). さらに, W402 と水素結合できる位置に, BRでは Asp85, ASRでは Asp75 が保存されている. なお, この Asp は (Schiff 塩基に対する) 対イオン (counter ion) と呼ばれている.

両者にはこのような相同性があるにもかかわらず, ASRでは, (BRで見られるような) 対イオンへのプロトン移動反応は起こらない. この差は, W402…Asp間の水素結合の強さの差に起因すると指摘されている

²⁾ ここでは, 私たちの研究成果から蛋白質中のプロトン移動と水素結合の関係について述べてみたい.

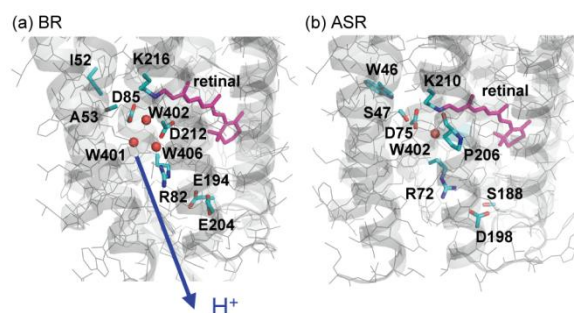


図 1

(a) BR と (b) ASR のレチナル周辺蛋白質環境 .

2. 水素結合ドナー・アクセプターの pK_a

二つの酸素原子間に形成される水素結合 O-H…O を例として説明する. 水素結合には, 水素結合ドナー (H-bond donor) とアクセプター (acceptor) の両者が必要である. ここで, ドナーとはプロトンがより強く結びついている側, つまり (結合距離が短い) O-H側, アクセプターとは (距離が長い) H…O側である. しかし, 結合距離にはいろいろな要素が含まれるため, pK_a が高い部位 (=プロトン・アフィニティーが高い部位) が水素結合ドナー, 低い部位が水素結合アクセプターと理解するのがよい. (pK_a をプロトン・アフィニティーと言い換えてもよい.) 例えばアルコール-OH ($pK_a \sim 16$) とカルボン酸 $-COO^-$ (~ 4)間に生じる水素

Photo-driven proton transfers via hydrogen bonds in proteins

Hiroshi Ishikita^{1,2} and Keisuke Saito^{1,2}

¹Career-Path Promotion Unit for Young Life Scientists, Kyoto University

²JST, PRESTO

結合 $\text{-OH}\cdots\text{OOC-}$ では、(pK_a より) ドナーはアルコール側、アクセプターはカルボキシル基側である。

以上の話は水素結合のポテンシャルをみるとわかりやすい。プロトンは pK_a が高い側を好むので、ドナー側ならエネルギーは低くてすむ。従って、通常の水素結合 (standard H-bond) のポテンシャルでは、(アクセプターに比べて pK_a が高い) ドナー側に深い谷が存在し、左右非対称の形となる。つまり、通常の水素結合ではアクセプター側にプロトン移動するには大きなエネルギーが要ることがわかる (図 2 左)。

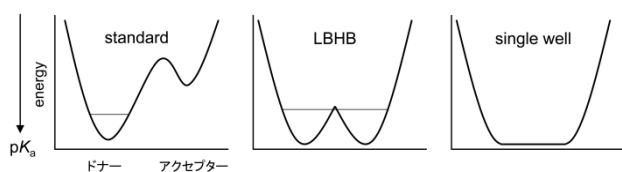


図 2

典型的な水素結合ポテンシャル；(左) standard H-bond (通常の水素結合)、(中) low-barrier H-bond (LBHB, 低障壁水素結合)、(右) single-well H-bond. 縦軸: energy が下がる向きは部位の pK_a が上がる向きに対応する。LBHB, single well ではドナーとアクセプターの明確な差はもはやない。

さて、もしドナーとアクセプターの pK_a 値がほぼ一致すると水素結合はどうなるだろうか? 当然ポテンシャルは左右対称の形となり、一般的に low-barrier H-bond (LBHB, 低障壁水素結合, 図 2 中), あるいは single-well H-bond (図 2 右) と呼ばれる水素結合となる (両者を対称性水素結合と呼ぶ)。両者の区別は必ずしも絶対的ではないが、対称性水素結合の条件「 pK_a 一致」どの研究者も認める事項である^{5,6)}。なお誤解されやすいが、single-well H-bond でも、通常は H がドナー・アクセプター O の中点に位置するわけではない。真ん中に存在するならばプロトン移動中の過渡的で不安定な状態である。(1 分子にカルボキシル基 2 個を持つ) マレイン酸の分子内 single-well 水素結合ですら、H は結合の真ん中には存在せず (実際のポテンシャルは完全に水平ではない)、O 原子に近い部位により分布しやすい⁷⁾。

3. 蛋白質中における水素結合の解析手法

それでは蛋白質中の水素結合の様子を調べるにはどうすればよいだろうか? 例えば、FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) 分光法や核磁気共鳴分光法 (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) を利用すると、蛋白質中の水素結合の強度を調べること

ができる。特に水分子がドナーとして関与する水素結合では、重水置換の場合、O-D 伸縮振動の大きさによって水素結合の状態を知ることができる。水分子間の理想的な水素結合における O-O 結合距離は 2.8 Å 付近を中心に分布し、O-D 伸縮振動数は 2500 cm^{-1} 程度となる⁸⁾。強い水素結合では、ドナー O-D の D がより強くアクセプターの O に引かれるため、O-D...O の O-O は短くなり、逆に O-D は伸びる。強い水素結合におけるこの O-D の伸びは、¹H-NMR で大きな化学シフト値となって観測される⁹⁾。また FTIR では、O-D 伸縮振動数の低下 (例 2200 cm^{-1}) となって現れる⁸⁾。

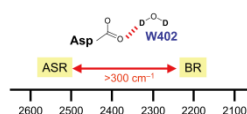


図 3

BR/ASR における W402 の O-D 伸縮振動数の差。

4. 水素結合ポテンシャルは多くを語る

さて、重水置換後 (BR, ASR に保存されている) 水素結合 W402...Asp85 (BR) と W402...Asp75 (ASR) の様子を FTIR 分光法で解析した結果によると、違いがみられた。ASR の W402 の O-D 伸縮振動数は 2500 cm^{-1} 以上であったのに対し²⁾、BR では 2200 cm^{-1} 程度¹⁰⁾ であった。つまり、BR の W402...Asp 水素結合は、ASR のものに比べ明らかに (300 cm^{-1} ほど) 強い。

蛋白質全原子存在下において着目部位を量子化学的に取り扱える QM/MM (quantum mechanics/ molecular mechanics) 法を用いると、蛋白質結晶構造座標を利用して O-D 伸縮振動数を計算することができる。その結果、W402...Asp における O-D 伸縮振動数は、BR の場合 2078 (PDB: 1C3W) ~ 2120 cm^{-1} (2NTU), ASR の場合 2376 cm^{-1} (1XIO) と計算された¹¹⁾。(計算値が実験値より小さく出ているのは計算での熱揺らぎの無視に起因するが、FTIR で得られた BR と ASR の差 300 cm^{-1} の原因を明らかにするための目的には十分な質である。)

BR と ASR の振動数の差が蛋白質中のどの要因に起因するのか調べるには、例えば、候補となる部位特異的変異体を作り、変異体構造毎に振動数を計算するのも一手である。しかし、水分子が水素結合に含まれる際は、変異体構造では必ずしも水分子の存在自体が保存されているとも限らず、その場合、結果の解釈は難しくなる。私たちはこの問題を、より簡単な「 BR ・ ASR の野生型の水素結合ポテンシャルを解析し比較」する単純作業に置き換えた¹¹⁾。実際、BR と ASR の W402...Asp 水素結合ポテンシャルを比較してみると

様々な情報がわかりやすく見えてくる (図 4).

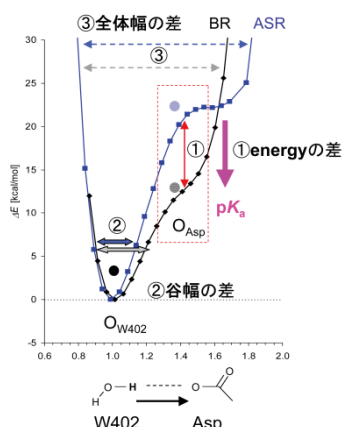


図 4 水分子 W402 と対イオン Asp 間水素結合ポテンシャル. BR (◆): W402…Asp85, ASR (■): W402…Asp75. 比較のため W402 でのエネルギーをそろえてある .

①アクセプター近傍のエネルギー差は Asp85 (BR) と Asp75 (ASR) の pK_a 差に対応 . プロトンが Asp 近傍に来た場合, そのエネルギーは BR < ASR であった (図 4). エネルギーが下がる向きは pK_a が大きくなる向きに対応しているので, Asp85 (BR) の pK_a は Asp75 (ASR) に比べて高いことになる . つまり, W402 から Asp へのプロトン移動は, BR のほうが ASR に比べてエネルギー的に楽であり, 起こりやすい .

② pK_a 差は, 谷幅の差を生じる (図 4). アクセプターの pK_a が高ければドナー O-D の D はよりアクセプター側に引きつけられるため, 谷幅は広がる (アクセプターに向かう障壁が低くなる) . つまり O-D の伸びは, W402 の O-D 伸縮振動数の低下に対応する (わかりにくければ, 振動数の次元 cm^{-1} は距離の次元 cm の逆数でとることを考えてみるとよい) .

③ポテンシャル全体幅の差は O-O 距離差に対応する . 谷幅が広がるほど, ドナー側の O-D は伸びているが, それは同時に, アクセプターが強く D を引きつけていることの裏返しでもある . そうなると O-O 距離 (全体幅) は短くなる . つまり, アクセプター Asp の pK_a が大きいほど O-O 距離は短い . 実際, W402…Asp の O-O 距離は, BR^{3,11)} < ASR^{4,11)} となっている .

以上, アクセプター側の pK_a が高くドナー側の pK_a に近づくほど, O-O 水素結合距離は短くなり, プロトン移動は起こりやすくなる様子がうかがえる .

5 . プロトン移動が起こる際の水素結合の様子

このような議論から, アクセプター側の pK_a が上昇し,

ドナー側の pK_a とほぼ同じになった際, 水素結合は最短となることが理解できる . それは両部位のカップリングが最大となるからであり, 水素結合内でのプロトン移動が最も容易となる^{12,13)}. このように, 対称性水素結合はプロトン移動と関係が深い . 例えば, 蛋白質中の水分子クラスターでは, プロトンが外部から来ると, ドナーもアクセプターも水分子なので pK_a の一致が容易に行え (= ドナー-H₃O⁺ の脱プロトン化とアクセプター-H₂O のプロトン化), 対称性水素結合 (H₂O …H-OH₂⁺) が生じプロトン移動経路になりやすい .

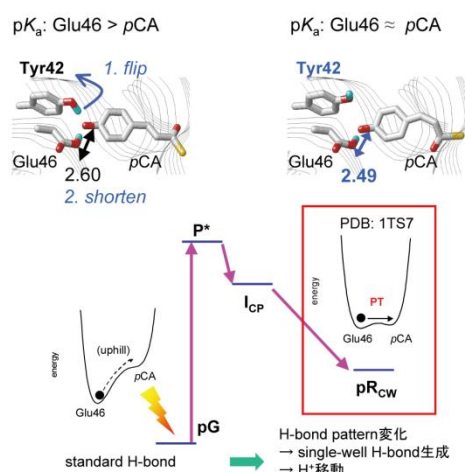


図 5 PYP における Glu46 · pCA 間のプロトン移動 . (左) 初期状態 . (右) 励起後, pCA 光異性化により Tyr42 の水素結合が消失し Glu46 · pCA は対称性水素結合となる .

一方で, 水素結合内 (pK_a : ドナー > アクセプター) のプロトンがアクセプター側へ移動するためには, pK_a を変えるのに十分な構造変化, 酸化状態変化等が必要である . 例えば BR の場合は, レチナールの *trans-cis* 光異性化がプロトン移動のきっかけとなる . 光受容体 photoactive yellow protein (PYP) においても *p*-coumaric acid (pCA) の *trans-cis* 光異性化反応が水素結合 Glu46…pCA 内プロトン移動のきっかけとなる . 初期状態では, pCA のフェノール O は (Glu46 の他に) Tyr42 からの水素結合も受けているため pK_a は低く, Glu46…pCA 水素結合内でプロトンは Glu46 側にあり, standard H-bond (O-O: ~ 2.6 Å) を生じている¹⁴⁾ (図 5 左). pCA の光異性化に伴い Tyr42 からの水素結合が外れると (図 5 右), pCA の pK_a は上昇して Glu46 の pK_a に近づく . その結果, 対称性水素結合 (~ 2.5 Å, pR 状態¹⁵⁾) が生じ, Glu46 から pCA へのプロトン移動が容易となる¹⁶⁾. そして, この先の pB 状態に至る過程で Glu46 · pCA 間水素結合は崩壊する . (なお, pB 状態の結晶構造¹⁵⁾ は溶液中の状態と異なると言わ

れている。一方, pR 状態に対応する結晶構造¹⁵⁾は分光測定結果の特徴をよく表している¹⁶⁾。)

ドナーとアクセプターの pK_a 一致は対称性水素結合の条件^{5,6)}であるが, 同時にプロトン移動が最も起こりやすい条件でもある¹²⁾。 pK_a の一致でカップリングは最大となるため¹³⁾, 対称性水素結合は2つの分子種が取り得る最短の水素結合である。PYP 初期状態で既に LBHB が存在, 光励起後には通常の水素結合となる¹⁷⁾との解釈もあるが, それでは初期状態のほうがプロトン移動中の過渡的な状態よりも不安定となってしまうし, pR 状態で更に短い水素結合が生成できる (= ここで初めて pK_a が一致) 事実とも矛盾する。対称性水素結合ではカップリングは稼げるが salt-bridge 性とは相反するため安定とは限らず, また pR 状態は

Tyr42 · pCA 間水素結合を切断 = 犠牲にして作られており, 系全体ではエネルギーは高く不安定である。

酸素発生を行う光合成蛋白質 Photosystem II (PSII) のキノン分子 Q_B は, 反応中心部位にあるクロロフィル分子の光励起によって開始される2回の電子移動と, それに伴って起こる2回のプロトン移動により $Q_B^{\bullet-}$, Q_BH^{\bullet} 状態を経て最終的に Q_BH_2 となる。ここでのプロトン移動のきっかけは, 電子移動による Q_B の還元 (負電荷) による Q_B カルボニル基の pK_a 変化である¹⁸⁾。PYP の場合と同様, プロトン移動が起こる際は, 水素結合ドナーのアミノ酸と Q_B 間に非常に短い対称性水素結合が生じる¹⁹⁾。

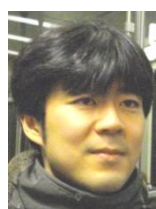
いずれの例も, 水素結合内でプロトン移動が起こる過渡的な状況で, 短い対称性水素結合が生じる。ドナー・アクセプター間で pK_a が等しい対称性水素結合ではドナー・アクセプターの性格の差を薄めることになるので, (通常起こりにくい)ドナーからプロトンを放出しやすくするには都合がよい。逆に, (本来の pK_a が大きく異なる部位同士の場合は特に)対称性水素結合を初期・定常状態等で維持し続けることはエネルギー的には得策ではない⁷⁾。多くの場合, 対称性水素結合は励起 (例 PYP) や電子移動 (例 PSII) のエネルギーを用いることで初めて過渡的に作り出せる。それが証拠に, 対称性水素結合の出現・プロトン移動後には, PYP では水素結合崩壊と蛋白質構造変化, PSII でも水素結合崩壊と Q_BH_2 の蛋白質結合サイトからの遊離といった構造変化に絡んだ大きなイベントが共通に待ち受けている。

謝 辞

FTIR 及び水素結合に関する議論において神取秀樹教授 (名古屋工業大学) に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kandori, H. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1460, 177-91.
- 2) Furutani, Y., et al. (2005) *Biochemistry* 44, 12287-96.
- 3) Luecke, H., et al. (1999) *J Mol Biol* 291, 899-911.
- 4) Vogeley, L., et al. (2004) *Science* 306, 1390-3.
- 5) Frey, P. A., et al. (1994) *Science* 264, 1927-30.
- 6) Schutz, C. N.; Warshel, A. (2004) *Proteins* 55, 711-723.
- 7) Perrin, C. L. (2010) *Acc Chem Res* 43, 1550-1557.
- 8) Mikenda, W. (1986) *J Mol Struct* 147, 1-15.
- 9) Saito, K.; Ishikita, H. (2012) *Biochemistry* 51, 1171-7.
- 10) Shibata, M.; Kandori, H. (2005) *Biochemistry* 44, 7406-13.
- 11) Saito, K., et al. (2012) *J Biol Chem* 287, 34009-18.
- 12) Eigen, M. (1964) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 3, 1-19.
- 13) Hammes-Schiffer, S. (2001) *Acc Chem Res* 34, 273-81.
- 14) Saito, K.; Ishikita, H. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 167-172.
- 15) Ihee, H., et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7145-50.
- 16) Saito, K.; Ishikita, H. (2013) *Biochim Biophys Acta* 1827, 387-394.
- 17) Yamaguchi, S., et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 440-444.
- 18) Ishikita, H.; Knapp, E.-W. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14714-14720.
- 19) Saito, K., et al. (2013) *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 954-959.



石北 央 (いしきた ひろし)

大阪大学大学院理学研究科 教授

略歴 東京大学工学部化学生命工学科卒, 同院修了 (修士), Free University of Berlin にて Ph.D. 取得. Penn State と USC にて postdoc 及び JSPS 海外特別研究員, 東京大学助教, 京都大学キャリアパス形成ユニット特定助教 (~2013.3), 講師 (~13.6) を経て現職.

研究内容 蛋白質における H^+ ・電子移動

連絡先 〒 560-0043 豊中市待兼山 1-1

E-mail hiro @ bio.sci.osaka-u.ac.jp

研究室の HP URL

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-paper-temp.php?id=87>

斉藤圭亮 (さいとう けいすけ)

現在の役職 JST さきがけ研究者, 大阪大学大学院理学研究科 招へい研究員

略歴 筑波大学大学院数理物質科学研究科修了, 博士 (工学). 大阪市立大学博士研究員, 京都大学キャリアパス形成ユニット特定研究員を経て現職.

研究内容 蛋白質 H^+ ・電子・励起移動

E-mail ksaito @ bio.sci.osaka-u.ac.jp

