

“ヘム核酸” とヘムタンパク質の構造と機能に関する比較研究

○三田肇・大山貴子・山本泰彦（筑波大院数物）

mita@staff.chem.tsukuba.ac.jp

[序論] タンパク質の多くは、金属イオン、補欠分子族、糖質などをポリペプチド鎖に取り込むことにより、さまざまな機能を発現している。しかし、生体中において補欠分子族と複合体を形成し機能を発現している核酸はまだ報告されていない。そこで、私どもは、塩基配列や溶液条件を選択することにより、二重鎖、四重鎖、ヘアピンなどのさまざまな立体構造で存在する核酸に、生物界に遍在しているヘム（鉄-ポルフィリン IX 錯体 (Fig. 1)) を組み込んだ“ヘム核酸”と言える分子の創製を目指している¹⁻⁵。本研究では、四重鎖 DNA を構成する G-カルテット (Fig. 2) とヘムの π -平面の大きさがほぼ同じであることを利用して、ヒトテロメアのモチーフ配列である d(TTAGGG)が

形成する四重鎖 DNA ((d(TTAGGG))₄) とヘムが π - π スタッキングにより安定で特異的な複合体を形成することを明らかにし、その構造と機能を典型的なヘムタンパク質の一つであるミオグロビン (Mb) のそれらと比較した。

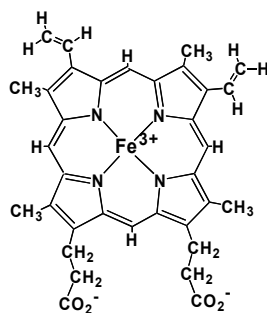


Fig. 1 Structure of heme

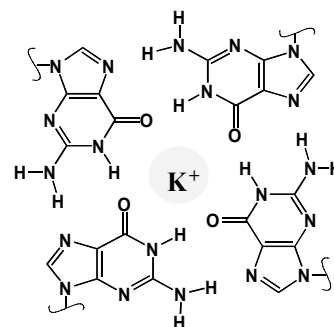


Fig. 2 Structure of G-quartet

[結果と考察]

ヘム核酸の構造 ヘムに (d(TTAGGG))₄ を添加した実験の吸収スペクトルで、ポルフィリン環の π - π^* 遷移による Soret 帯が濃色効果、深色効果、および等吸収点を示し、両者の間で特異的な複合体が形成することが明らかとなった (Fig. 3)。Scatchard 解析の結果、ヘムと (d(TTAGGG))₄ は結合定数 $K_b = 2.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ で 1:1 ヘム核酸を形成することが示された。また、ヘム核酸の吸収スペクトル、ヘム側鎖プロトン由来の NMR シグナルは、Mb のものと著しく類似していた。これらの分光学的性質は、ヘムの電子構造やヘム鉄の配位構造を鋭敏に反映することから、ヘム核酸と Mb におけるヘムの環境は類似していることが推測された。Mb のヘム鉄はヒスチジン側鎖のイミダゾールと外部配位子 H₂O を軸配位子としてもつ六配位高

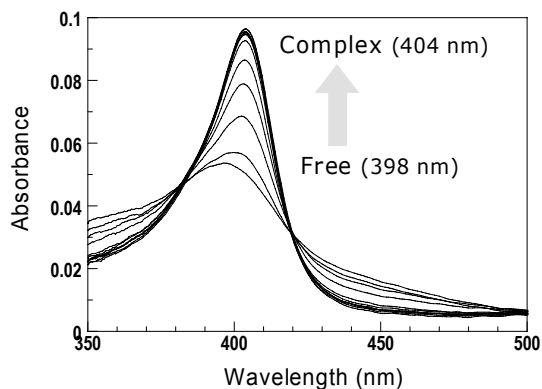


Fig. 3 Vis absorption spectra, 350-500 nm, of the heme-DNA complex in the presence of various concentrations of quadruplex DNA.

スピン状態であることから、ヘム核酸におけるヘム鉄も軸配位子として核酸塩基と外部配位子 H_2O をもつと考えられる。さらに、ヘム核酸水溶液の pH を上昇させると、Mb と同様に外部配位子が OH に置換した六配位低スピン状態を示す吸収スペクトルと NMR スペクトルが観測され、この酸塩基平衡の $\text{p}K_a = 8.6$ も Mb での値に類似していた。これらの結果から、ヘムは G-カルテットの形成により生じる四重鎖 DNA に特異的に結合して複合体を形成し、ヘム核酸中のヘムはヘムタンパク質中のヘムと類似した電子構造をもつことが明らかとなった。

ヘム核酸の機能 ヘム核酸にイミダゾール (Im) を添加して測定した吸収スペクトルにおいて、Im 濃度の増大に伴い Soret 帯の吸収極大は 409 nm へと長波長シフトした。また、Hill 解析から $K_b = 19 \text{ M}^{-1}$ 、Hill 係数 $n = 1.19$ が得られた。このことから、ヘム核酸のヘム鉄には Im 1 分子が配位した複合体が形成されることが明らかとなった。また、NMR 測定の結果、このヘム核酸-Im 複合体のヘム鉄は低スピン状態を示すことが明らかとなった。

ヘム核酸の酸化還元電位 (E^0) を、作用電極に 4-メルカプトピリジンで修飾した金電極を用いた Square Pulse Voltammetry 法で測定した結果、 $E^0 = -91 \pm 10 \text{ mV (vs. SHE)}$ が得られた (Fig. 4)。また、ヘム核酸に Im を大過剰添加した時は $E^0 = -145 \pm 10 \text{ mV (vs. SHE)}$ であった。これらの値は、Mb と、ウマのシトクロム *c* よりヘム結合部位である 11 アミノ酸残基を切り出したヘム錯体誘導体 MP-11 で報告されている E^0 値の中間であった。一般に、ヘムタンパク質の E^0 は、軸配位子の種類とヘム鉄への溶媒分子のアセスビリティに依存すると言われていることから、ヘム核酸では Mb に比べると溶媒分子がヘム鉄に近づきやすい構造になっていることが推測された。

[まとめ] ヘムは G-カルテットの形成により生じる四重鎖 DNA に特異的に結合して複合体 (Fig. 5) を形成することが明らかとなった。また、ヘム核酸のヘムは Mb 中のヘムと類似した電子構造で存在し、外部配位子の結合性や酸化還元電位などに関しても Mb と類似していることが明らかとなった。

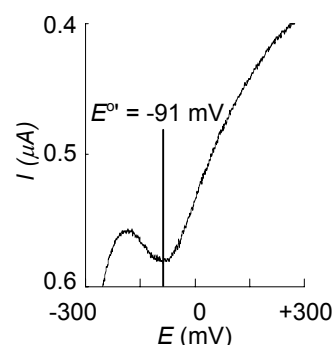


Fig. 4 Square pulse voltammogram of the heme-DNA complex at 25 °C.

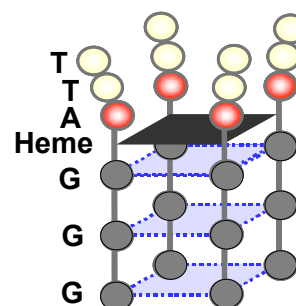


Fig. 5 Schematic drawing of the heme-DNA complex.

References

- 1) T. Mikuma, T. Ohyama, N. Terui, Y. Yamamoto, and H. Hori, *Chem. Commun.*, 1708-1709 (2003).
- 2) Y. Kato, T. Ohyama, H. Mita, and Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9980-9981 (2005).
- 3) T. Ohyama, H. Mita, and Y. Yamamoto, *Biophys. Chem.*, **113**, 53-59 (2005)
- 4) T. Ohyama, Y. Kato, H. Mita, and Y. Yamamoto, *Chem. Lett.*, **35**, 126-127 (2006)
- 5) H. Mita, T. Ohyama, Y. Tanaka, and Y. Yamamoto, *Biochemistry*, **45**, 6765-6772 (2006).