核磁気共鳴によるフラビンモノヌクレオチドと 銅クロロフィルの相互作用

(1985 年 3 月 16 日 受理)

円 満 字 公 衛

銅クロロフィル (Cu-chln) とフラビンモノヌクレオチド (FMN) との複合体の分子構造を ^1H -, ^{13}C -, ^{31}P -NMR 法により推定した。FMN における内部運動の有無を推定する手段として FMN 単体の ^{13}C -緩和時間を測定した。リボース炭素のみかけの回転相関時間はイソアロキサジン環の炭素に帰着するそれよりもわずかに短く、リボース鎖はいくぶん内部運動している。メチル基は 4×10^{-11} s の相関時間で内部回転している。 ^1H -縦緩和時間のデータから、Cu-chln と FMN の複合体の回転相関時間はすべてのプロトンについて同一の値をもつので、この値を ^{13}C -NMR のデータの解析に用いた。

Cu-chln-FMN 複合体の FMN 炭素の縦緩和時間を測定した。観測した ^{13}C - T_1 を仮定した構造から推定した T_1 と比較して複合体の構造を決定するコンピューターシミュレーションを行なった。この方法において、Cu-chln のクロリン環と FMN のイソアロキサジン環の間の角を 0° から 90° まで変えたところすべての角が可能であった。しかし分光データはクロリン環がイソアロキサジン環と平行であることを示唆した。その結果、環-環距離は $4.0 \text{ \AA}$ であると推定された。 ^1H -NMR の横緩和時間を使って電子スピンの Cu-chln の Cu^{2+} から FMN プロトンに流入していることを確認した。このことは電荷移動錯体が Cu-chln と FMN の間に形成されていることを示唆する。

1 緒 言

クロロフィルと電子受容体の相互作用の研究は光合成の初期過程の研究に対して一つの大きな指標を与えるものである¹⁾。Tsu と Wang はクロロフィル a とフラビンモノヌクレオチド (以下 FMN と略記する) と相互間の作用を光吸収スペクトルと ESR を用いて研究した²⁾。彼らは光によって誘導されるクロロフィル a から FMN に向けての電子の移行を発見した。さらに著者はクロロフィル a と FMN の複合体の構造を推定する方法として、銅クロロフィル (以下 Cu-chln と略記する) と FMN の複合体の構造を研究した³⁾。Cu-chln は Cu^{2+} の常磁性効果により FMN のプロトンとリンの縦緩和時間 (T_1) に影響をおよぼしていた。しかしながら、FMN の NMR 観測可能なプロトンは C(6)~C(9) を含む環にのみ局在しているので、 ^1H -NMR のみの研究から複合体の構造を議論するのは困難であった³⁾。

この研究は FMN の ^{13}C -NMR の T_1 におよぼす Cu-chln の効果について述べたものである。炭素は FMN の分子全体に分布しているので ^{13}C - T_1 から得られる情報量が ^1H -の場合より多く、 ^1H -NMR のような問題は生じない。Cu-chln の Cu^{2+}

と FMN の炭素との間のみかけの距離を複合体の ^{13}C - T_1 から求め、複合体の構造を計算機シミュレーションにより推定した。また複合体の ^1H -縦および横緩和時間のデータを解析して複合体の回転相関時間を決定した。さらに Cu-chln から FMN プロトンへの電子のしみだしを見いだしたので報告する。

2 実 験

2.1 材 料

Cu-chln と Mg-chln は既報の方法で得た。特製の FMN は半井化学から入手し、精製せずに用いた。

2.2 NMR 測定

^1H - および ^1H - をデカップルした ^{13}C -NMR スペクトルはパルス Fourier 変換装置 (PFT-100) および EC-100 スペクトルコンピューターを装着した日本電子製 PS-100 高分解能 NMR 測定装置によって、おのおの 100 MHz および 25.15 MHz で測定した。 T_1 は $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ パルス法によって測定した。

差スペクトルは Cu-chln と FMN の混合溶液の入ったセルおよび緩衝液の入ったセルを試料側に、Cu-chln 溶液の入ったセルおよび FMN 溶液の入ったセルを参照側において島津 MPS-5000 自記分光光度計で測定した。

3 結果と考察

3.1 水溶液中での FMN の運動状態

水溶液中での FMN の運動状態を調べるため、 30°C で $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ FMN 重水溶液 (pH 7.5) の ^{13}C -NMR の T_1 を測定し

京都大学理学部化学教室, 606 京都市左京区北白川追分町

** 現在 三菱電機株式会社材料研究所, 661 尼崎市塚本町

1) 加藤 栄, 化学の領域, 36, 61(1982).

2) S. Tsu, J. H. Wang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 79(1969).

3) K. Enmanji, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52, 1275(1979).

Table 1 Carbon relaxation rates of flavine mononucleotide at 30°C

Carbon No.	$T_1 \cdot 10^{-1}$ (s ⁻¹)	$(NT_1)^{-1}$ (s ⁻¹)	τ_C^{eff} (ns)	R_{Int} (ns) ⁻¹
C(2)	1.0			
C(4)	0.9			
C(6)	17.2	17.2	0.75	
C(7,8)	0.9			
C(9)	17.6	17.6	0.77	
C(9a)	1.0			
C(5a)	1.2			
C(10a)	1.4			
C(4a)	0.9			
C(1')	37.7	18.9	0.73	
C(2')	18.8	18.8	0.70	
C(3')	16.6	16.6	0.73	
C(4')	16.5	16.5	0.70	
C(5')	23.5	12.0	0.45	
C(7a)	3.1	1.0	0.05	25
C(8a)	3.4	1.1	0.05	25

a) T_1 is the longitudinal relaxation time in the absence of copper chlorophyllin. Flavine mononucleotide; 1 mol/l.

b) N denotes the number of protons attached to carbon.

た。各炭素の T_1 を表1に示す。このとき、プロトンの結合している炭素は直接結合しているプロトンとの双極子-双極子相互作用によって緩和し、極度尖鋭化の条件下 ($\tau_C < 8.1 \times 10^{-9}$ s) では $1/T_1$ は式(1)で表わすことができる⁴⁾。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{\hbar^2 \gamma_H^2 \gamma_C^2}{(r_{C-H})^6} \tau_C^{\text{eff}} \quad (1)$$

ここで τ_C^{eff} は有効相関時間である。各炭素の τ_C^{eff} を求めて結果を表1に示した。 r_{C-H} はリボフラビンの X 線解析からの値を使った⁵⁾。表1から、イソアロキサジン環の炭素 (C(6) と C(9)) はほぼ同じ τ_C^{eff} (7.5×10^{-10} s と 7.7×10^{-10} s) をもっているのに対して、メチル基の炭素 (C(7a) と C(8a)) の τ_C^{eff} は1ケタも小さい。これはメチル基の内部回転の影響であると思われるので、Woessner の理論で解析を試みた⁶⁾。

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3 \gamma_H^2 \gamma_C^2 \hbar^2}{(r_{C-H})^6} \left[\frac{A}{6R} + \frac{B+C}{6R+R_{\text{Int}}} \right] \quad (2)$$

ここで、 R は分子全体の回転運動の拡散定数で、式(1)から $R = 1/6 \tau_C^{\text{eff}}$ (C(6), C(9)) の関係から C(6), C(9) の T_1 の値を用いて計算して得られる。 R_{Int} は同様に、3 部位跳躍を仮定したときのメチル基の内部運動の拡散定数である。また、 A , B , C は幾何学的因子で式(3), (4), (5)で与えられる⁷⁾。

$$A = -\frac{1}{4} (3 \cos^2 \Delta - 1)^2 \quad (3)$$

$$B = -\frac{3}{4} \sin^2 2 \Delta \quad (4)$$

$$C = \frac{3}{4} \sin^4 \Delta \quad (5)$$

ここで、 Δ は核と核ではるベクトルと回転軸との間の角である。

式(2)と表1からえられた結果を表1に併記した。FMN メチル基の R_{Int} の値は 1-メチルナフタレンのメチル基の R_{Int} (4.0×10^{11} s⁻¹) とくらべて1ケタ小さい⁸⁾。さらにリボースの炭素の τ_C^{eff} はリボース鎖の回転の自由度にしたがって順に小さくなっているが、C(1') から C(4') まではイソアロキサジンの炭素 (C(9), C(6)) の τ_C^{eff} とほとんどかわらず、リボース鎖中にいくぶんかの内部運動が存在することを示唆している。

3.2 Cu-chln-FMN 複合体のプロトンおよびリンの縦および横緩和時間の解析

図1に Cu-chln-FMN 複合体の ¹H- および ³¹P- の fT_{1p} , fT_{2p} の温度変化を既報⁹⁾で求めた ³¹P- に対する値とともに示す。ここで T_{ip} ($i=1, 2$) は真の緩和時間 T_{iM} と式(6)によって関係づけられる⁹⁾。

$$\frac{2}{\Delta T_{ip}} = \frac{1}{T_i^*} - \frac{1}{T_i^0} = \frac{f}{T_{iM} + \tau_M} \quad (i=1, 2) \quad (6)$$

Fig. 1 Temperature dependency of fT_{1p} and fT_{2p} for the copper chlorophyllin-flavine mononucleotide complex in ¹H-, ³¹P-NMR

The values of fT_{1p} were determined previously⁹⁾
 —●—: C(9) H, —×—: C(6) H, —○—: C(8) CH₃, —■—: C(7) CH₃, —△—: P

4) N. Bloembergen, E. M. Purcell, R. M. Pound, *Phys. Rev.*, **73**, 677(1948).

5) N. Tanaka, T. Ashida, Y. Sasada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **42**, 1546(1969).

6) H. Beierbeck, R. Martino, J. K. Saunders, *Can. J. Chem.*, **58**, 102(1980).

7) D. E. Woessner, *J. Chem. Phys.*, **36**, 1(1962).

8) A. Ericsson, J. Kowalewski, *Chem. Phys.*, **60**, 387 (1981).

9) T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.*, **37**, 307 (1962).

T_{1e}^* は Cu-chln が存在しているときの T_{1e} , T_{1e}^0 は Cu-chln が存在していないときの T_{1e} , f は Cu-chln と FMN のモル比, τ_M は複合体の存在寿命である。図 1 から 17°C までは C(9)H, C(6)H, C(8)CH₃, C(7)CH₃ とほぼ同一の fT_{2p} の値をとり、温度に対する挙動から、この領域では T_{2p} は τ_M に支配されていることがわかる。このとき直線の傾きから複合体の解離速度に対する活性化エンタルピーが 42 kJ/mol と計算された。23.5°C における結合定数 (330 l/mol) と $k_{-1} = \tau_M^{-1}$ (0.63×10^4 s⁻¹) とから、 k_{+1} が 2.1×10^8 s⁻¹・l・mol⁻¹ と計算された。温度が上昇すると、C(9)H の fT_{2p} は 55°C まで τ_M と同じ勾配で減少し、C(6)H, C(8)CH₃, C(7)CH₃, P の fT_{2p} はそれよりもはるかにゆるい勾配で減少した。この結果から、C(9)H の T_{2p} は 55°C までは τ_M で支配され、C(6)H, C(8)CH₃, C(7)CH₃, P では T_{2M} で支配されると考えられる。 T_{1M} , T_{2M} はおもに電子スピンの二極子相互作用によると思われるので、等方的な回転の仮定の下ではつぎの Solomon の式が成り立つ¹⁰⁾。

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} S(S+1) \frac{\gamma_I^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left[\frac{3\tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} \right] \quad (7)$$

$$\frac{1}{T_{2M}} = \frac{1}{15} S(S+1) \frac{\gamma_I^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left[4\tau_C + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} \right] + \frac{1}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \tau_C \quad (8)$$

$$\tau_C^{-1} = \tau_r^{-1} + \tau_M^{-1} + T_{1e}^{-1} \quad (9)$$

$$\tau_e^{-1} = \tau_M^{-1} + T_{1e}^{-1} \quad (10)$$

ここで、 S は電子のスピン量子数、 β は電子の Bohr 磁子、 r は電子スピンと核スピン間の距離、 A は超微細分裂定数、 τ_M は複合体の寿命、 T_{1e} は電子緩和時間、 τ_e は電子相関時間である。C(6)H, C(8)CH₃, C(7)CH₃, P の fT_{2p} が 17°C 以上で温度に対し負の勾配をもつ 80°C 付近でも fT_{1p} と fT_{2p} に大きな差があり、 fT_{2p} の温度変化が緩やかで各プロトンによりその値が異なっていることは、 fT_{2p} が (8) 式の第 1 項 (二極子相互作用) ではなく第 2 項 (スカラー相互作用) に支配されており、かつ τ_e が T_{1e} に支配されているからであると考えられる。(7) 式を使って T_{1M} の最小値と各温度における T_{1M} の値の比から、各温度における Cu-chln-FMN 複合体の回転相関時間 τ_C を求めて¹¹⁾、図 2 に示した。図 2 の直線の傾きから、 τ_C の活性化エネルギーを 27.8 kJ/mol と決定した。 τ_C の活性化エネルギーは複合体の回転障壁を示すものであり、FMN 単体の τ_C 活性化エネルギー 23 kJ/mol¹²⁾ とくらべて少し大きくなっており、複合体の方が FMN 二量体より少し回転障壁が大きいことを示す。

3.3 ¹³C- T_{1p} の測定と f の決定

30°C で Cu-chln (<25 mmol・dm⁻³) を FMN (1 mol・dm⁻³, pH 7.5) に添加すると Cu-chln の添加量に比例して FMN のすべての炭素環の緩和速度が増大する (図 3 参照)。複合体形成による τ_C の変化をみつめるために Mg-chln を FMN 溶液に加えた。20 mmol・dm⁻³ Mg-chln を 1 mol・dm⁻³ FMN 溶液に加えても FMN 炭素の緩和速度は増加しなかった。これは、Mg-

Fig. 2 Temperature dependency of τ_C for the copper chlorophyllin-flavine mononucleotide complex

—●—: C(9)H, —×—: C(6)H, —○—: C(8)CH₃, —□—: C(7)CH₃

Fig. 3 Effect of added copper chlorophyllin on the ¹³C- T_{1p}^{-1} of flavine mononucleotide

—△—: C(5a), —●—: C(7, 8), —○—: C(9a),
—▽—: C(4a), —■—: C(10a), —×—: C(9),
—▲—: C(7a), —▼—: C(8a), —□—: C(6),
—×—: C(1'), —■—: C(3'), —△—: C(2'),
—▽—: C(5'), —□—: C(4')

chln ($f=0.02$ 程度) を加えても粘度の増加はないことを示す。測定された ¹³C- T_{1p} に含まれる誤差とフランクシムン比から計算すると、FMN と Mg-chln の複合体形成による τ_C の増加は少なく、その上限は約 2 倍であることがわかった。著者の以前の報告⁹⁾ から 23.5°C では Cu-chln と FMN の結合定数が 330 l/mol⁹⁾ で結合数は 1 であることがわかっている。低温 ESR 測定

10) L. Solomon, *Phys. Rev.*, **99**, 559(1955).

11) A. Yamada, K. Akasaka, H. Hatano, *Biopolymers*, **15**, 1315(1976).

12) 円満字公衛, 未発表データ。

Table 2 T_{1M}^{-1} and Apparent distances between electronic spins and carbons in the copper chlorophyllin-flavine mononucleotide complex

Carbon No.	T_{1M}^{-1} (s ⁻¹)	r^{app} (Å)
C (2)	255	5.4
C (4)	310	5.4
C (6)	450	5.1
C (7, 8)	475	4.7
C (9)	555	4.9
C (9a)	670	4.7
C (5a)	780	4.7
C (10a)	590	4.9
C (4a)	605	4.8
C (1')	270	5.6
C (2')	115	6.5
C (3')	150	6.1
C (4')	85	6.7
C (5')	95	6.6
C (7a)	580	4.9
C (8a)	525	5.0

から Cu-chln-FMN 複合体において, Cu-chln 同士には相互作用はない⁹⁾。それゆえ 1:1 複合体のみを考えればよい。結合定数から, 添加したすべての Cu-chln (<25 mmol·dm⁻³) は FMN (1 mol·dm⁻³) に結合していると判断される。それゆえ, f と T_{1p}^{-1} の積とから T_{1M}^{-1} が求められる。30°C における $\tau_c = 1.6 \times 10^{-9}$ s と T_{1M} の値から r^{app} を求めた (表 2)。pH が ¹H-測定時は 5.8 であったのに対して, FMN の溶解性を増すために, ¹³C-測定時には pH を 7.5 にたもった。pH を変化させたとき, FMN は pH 0.25 で N(1) のプロトンを解離し, pH 10.25 で N(3) のプロトンを解離することが知られている¹³⁾。Cu-chln-FMN の差スペクトルに対する pH の影響を図 4 に示す。図で示したように pH 5.8 と pH 7.5 で差はみられなかった。¹H-NMR により, 70 mmol·dm⁻³ FMN (pH 5.8) の C(6)H の τ_c は 8×10^{-10} s (25°C) であり, ¹³C-NMR よりの 1 mol·

Fig. 4 pH Dependency of the difference spectrum for the copper chlorophyllin-flavine mononucleotide complex

13) E. J. Land, A. J. Swallow, *Biochemistry*, **8**, 2117 (1969).

dm⁻³ FMN (pH 7.5) の C(9), C(6) の τ_c (7.5×10^{-10} s, 30°C) と変らなかった¹²⁾。以上のことから ¹H- と ¹³C-NMR のスペクトルの測定条件下では, 複合体の構造および回転相関時間はほとんど変化がないものと考えられる。

3.4 計算機による複合体の構造決定¹⁴⁾

Cu-chln のクロリン環と FMN のイソアロキサジン環の原子座標を文献 15) と文献 5) のようにとり, Cu-chln の中心を原点にとってイソアロキサジン環の中心座標を (x, y, z), イソアロキサジン環のクロリン環に対する傾きを (θ), 中心座標において面に垂直にたてた軸と x 軸の角度を (ϕ), イソアロキサジン環の中心軸のまわりの回転角を (ψ) として, x, y, z は 1 Å ごと, θ, ϕ, ψ は 30° ごとに变化して Cu-chln の Cu²⁺ イオンおよび N 原子と FMN の各炭素との距離を計算した。ここで不対電子は Cu-chln-FMN 複合体の低温 ESR スペクトルより Roberts と Koski の手法¹⁶⁾を使って計算した結果, Cu²⁺ に 65%, ピロールの N 原子に 8.8% ずつ局在しているとした。つぎに複合体の T_{1M} を式(7)を使って求めた。

$$F = \sqrt{\frac{\sum_i ((T_{1M}^{-1})_{\text{計算値}})_i - (T_{1M}^{-1})_{\text{実験値}})^2}{\sum_i ((T_{1M}^{-1})_{\text{実験値}})_i^2 / (\text{実験値の誤差})^2}} \quad (11)$$

式(11)で定義した F が最小となるように計算を実行した。これらの計算についての明解な解はなく, F の値の比較的小さい値 (0.15 以下) を与える ϕ, ψ では θ の変化につれて, $z, \sqrt{x^2 + y^2}$ が図 5 のように変化することがわかった。 $\theta = 40^\circ \sim 90^\circ$ の構造は立体障害のため可能性がない。さらに Cu-chln-FMN の差スペクトルは尿素添加で変化しないことから, Cu-chln は FMN と水素結合していないと思われる。クロロフィル a から FMN への電子移動が困難であることも考慮すると $\theta = 20^\circ \sim 30^\circ$ の構造は考えにくい。それゆえ, 図 6 には $\theta = 0^\circ$ としたときの構造を代表として示した。このときの Cu-chln-FMN 複合体の中心間距離 (z) は 4.0 Å ($F = 0.12$) であり, ¹H-NMR からの結論とよく一致している。表 2 と図 6 から, リボースの炭素はイソアロキサ

Fig. 5 Possible configurations between Cu-chln (larger rectangles) and FMN (smaller rectangle, viewed from one end of the long axis) as a function of the interplanar angle θ

- 14) Y. Nosaka, K. Akasaka, H. Hatano, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 706(1978).
 15) C. J. Brown, *J. Chem. Soc. A*, **1968**, 2488.
 16) E. M. Roberts, W. S. Koski, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3006(1969).

Fig.6 Time most probable structure of the Cu-chln-FMN complex

ジン環の炭素よりも電子スピンのから離れており、複合体形成による相互作用は C(1') から C(4') までは炭素番号が増すにしたがって弱くなっている。またメチル基の存在する疎水部のほうがカルボニル基の存在する親水部よりも強く相互作用している。すなわち、Cu-chln とイソアロキサジン環との相互作用の性質は

親水的というよりも疎水的である。

図1のリンの fT_{1p} の最小値と $\tau_c = 3.98 \times 10^{-9}$ s を使って計算するとリンと電子スピンの間は $8.0 \text{ \AA}$ 離れていることがわかる。FMN の結晶構造から考察すると Cu-chln のカルボキシル基は Cu^{2+} から $7 \text{ \AA}$ 離れており、このカルボキシル基とリン酸基のOが $2 \text{ \AA}$ 離れて水へ結合しているとすると、 Cu^{2+} とP間は $8 \text{ \AA}$ 程度になり、つじつまがあう。

これらのことから、Cu-chln と FMN の複合体は 1,7-ナフタレンジオールとフラビンの複合体¹⁷⁾と同様にクロリン環とイソアロキサジン環が重なりあって電荷移動しやすい形になっているものと考えられる。また、電子スピンの FMN のプロトンにしみだしていることは Cu-chln-FMN 複合体が電荷移動錯体であることを直接示唆するものである。

17) C. A. Langhoff, C. J. Fritchie, Jr., *Chem. Comm.*, 1970, 702.

Interaction between Flavine Mononucleotide and Copper Chlorophyllin Studied by Nuclear Magnetic Resonance

Koe ENMANJI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University; Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto-shi 606 Japan

**** Present Address:** *The Materials Engineering Laboratory of Mitsubishi Electric Corp.; Tsukaguchi-Honmachi, Amagasaki-shi 661 Japan*

The molecular structure of the complex between copper chlorophyllin (Cu-chln) and flavine mononucleotide (FMN) was investigated by ^1H -, ^{13}C -, and ^{31}P -relaxation times for FMN alone were measured first in order to examine the rigidity and internal motion of FMN. The apparent rotational correlation times of ribose carbons are slightly shorter than those of the carbons on the isoalloxazine ring; this suggests the existence of some degree of internal motion in the ribose chain. The methyl groups showed internal rotation with a correlation time of 4×10^{-11} s.

The ^{13}C - T_1 's for FMN in the Cu-chln-FMN complex were measured at 30°C . Computer simulation was applied to determine the probable structure of the complex. The rotational correlation time necessary in this simulation was estimated from ^1H - T_1 data. The angle between the Cu-chln chlorin ring and the FMN isoalloxazine ring was varied from 0° to 90° and each angle gave a reasonable fit of the calculated T_1 's with those determined experimentally. For a parallel configuration of the two rings, suggested by optical data, the ring-ring distance was determined from the ^{13}C - T_1 data to be $4.0 \text{ \AA}$. The transverse relaxation times measured by ^1H -NMR indicate a partial flow of electron spin from the Cu^{2+} of Cu-chln to the protons of FMN; this suggests that a charge-transfer complex is formed between Cu-chln and FMN.