

## 恩師のノーベル化学賞受賞に寄せて<sup>‡</sup>

大阪大学 大学院理学研究科 生物科学専攻  
石北 央\*

2013年のノーベル化学賞受賞者の一人Arieh Warshel教授（南カリフォルニア大学）は、蛋白質の理論化学研究分野の発展、特に計算化学手法の開発に多大な貢献をした。一方で、数多くの理論化学研究者を差し置いて彼がノーベル賞を受賞した理由は、計算化学の枠にとどまらない、蛋白質科学における重要な基本概念をいくつも明らかにしてきたことであろう。例えば、誰もが本来「知っている」はずの水素結合の概念を基本から見直すことで、多くの研究者の「低障壁水素結合」への誤った理解に警鐘を鳴らした。群れをなさず、権威に媚びず、そして子供のように好奇心旺盛。それがArieh Warshelであり、科学者とは本来そうあるべきである。

### 1. はじめに

2013年のノーベル化学賞は、蛋白質の理論計算化学分野の発展に大きく貢献した3名に贈られた。光合成とは関係ないだろうと思うかもしれないが、そのうちの一人、Arieh Warshel教授（University of Southern California : USC、南カリフォルニア大学）は、私の恩師である。さぞかし多くの日本人がWarshelのラボで研究していたのではと思うかも知れないが、南カリフォルニア大学の彼のラボにポスドク研究員として研究していた日本人は、現状では私が最初で最後であるのは摩訶不思議である。もっとも、いったんノーベル賞を受賞すると、人は手のひらを返したようにぞろぞろ行くのかもしれない。そういう意味では、ポスドク時の私には、表層的なことにとらわれずに人を見る目があったのかも知れない、と思うことにしておきたい。ここではWarshelと関連ある研究について取り上げてみる。

### 2. 蛋白質中における水素結合の解析手法

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<sup>-1</sup>程度となる<sup>1)</sup>。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、<sup>1</sup>H-NMRで大きな化学シフト値となって観測される<sup>2)</sup>。またFTIRでは、O-D伸縮振動数の低下（例 2200 cm<sup>-1</sup>）となって現れる<sup>1)</sup>。

### 3. 水素結合とドナー・アクセプターのpK<sub>a</sub>

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<sub>a</sub>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<sub>a</sub>をプロトン・アフィニティーと言い換えてもよいが、溶媒和を含んでいるのでpK<sub>a</sub>と呼ぶほうが適切。）例えばアルコール-OH（pK<sub>a</sub>~16）とカルボン酸-COO<sup>-</sup>（~4）間に生じる水素結合-OH...OOC<sup>-</sup>では、（pK<sub>a</sub>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。

<sup>‡</sup> 解説特集「30年後の光合成研究」

\* 連絡先 E-mail: hiro@bio.sci.osaka-u.ac.jp

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1左)。

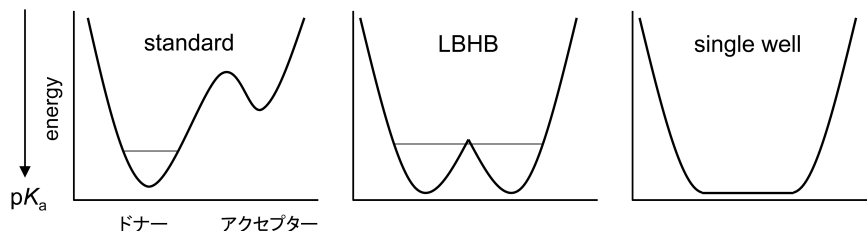


図1 典型的な水素結合ポテンシャル

(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。

#### 4. 低障壁水素結合とは？

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1中)、あるいはsingle-well H-bond (図1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」はどの研究者も認める事項である<sup>3,4)</sup>。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 midpoint 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 H-bond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<sup>5)</sup>。

「LBHB」の概念や定義はしばしば曖昧であった<sup>4,6)</sup>。酵素活性部位でのLBHBの存在を論じたCleland<sup>7)</sup>やFrey<sup>3)</sup>の論文がScience誌に発表された後は、蛋白質内の短い水素結合に対し慎重な検証もなく安易にLBHBと結論づける風潮も見られた。ここでは、蛋白質におけるLBHBの特徴を改めて整理してみたい。

蛋白質内におけるLBHBの特徴に関しては、結晶構造解析、プロトン核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-NMR)、理論化学等を中心とした研究手法の立場からそれぞれの主張がなされてきた。

(NMRケミカルシフト( $\delta H$ )と水素結合長) 「強い水素

結合」においては、H原子はアクセプター側のO原子に引かれる傾向にあるため、電子の遮蔽効果が少なく、NMRでは低磁場側にシフトし大きな $\delta H$ 値を示す。Jeffrey<sup>8)</sup>やFrey<sup>9)</sup>によると、水素結合は $\delta H$ 値やO-O結合長のサイズにより以下のように分類できる。①ionic (single-well) H bond ( $\delta H = 20-22$  ppm, O-O結合長 = 2.4-2.5 Å)、②LBHB ( $\delta H = 17-19$  ppm, O-O結合長 = 2.5-2.6 Å)、③weak H bond ( $\delta H = 10-12$  ppm, O-O結合長 > 2.6 Å)。O-O結合長は、ionic H bondが最も短く、LBHBはそこまでは短くない (図1)。

( $pK_a$ 値) Warshelよれば、結合長だけによるLBHBの判断は適切でなく、水素結合のポテンシャルエネルギー曲線が左右対称であることが必要である<sup>4)</sup> (図1)。ポテンシャルエネルギー曲線は、蛋白質環境内でのドナー・アクセプターの $pK_a$ 値を知ることができれば、ある程度予測がつく。通常の水素結合 (= asymmetric double well potential) では、ドナー側の $pK_a$ 値が、アクセプター側の $pK_a$ 値より高い (= H原子がドナー側に引きつけられている)。なお、 $pK_a$ の大・小関係は、ポテンシャルエネルギーの低・高に対応する (図1)。一方、ionic (single-well) H bondやLBHB形成においては、ドナー側とアクセプター側の $pK_a$ 値がほぼ一致することが必須である。この条件は、Cleland<sup>7)</sup>やFrey<sup>3)</sup>の論文にも明記されており、多くの研究者が同意する特徴である。

(共有結合性) 通常の水素結合は $H^{\delta+}$ と $O^{\delta-}$ のような分極をもつ結合である。一方、LBHBでは、H原子が二つのO原子間を行き来できるため、電荷がドナーからアクセプター領域において非局在化して共有結合性をもつ<sup>3,7)</sup>。しかし、「LBHBの共有結合性」に関しては、これを唱え始めたClelandらの主張<sup>7)</sup>を慎重に検証

する必要がある。Clelandによると、蛋白質内部は「無極性溶媒」のようなものであるため、電荷が非局在化したLBHBは容易に形成され得る、とのことである。しかし、「疎水的環境＝無極性溶媒」は正しい理解ではない。

蛋白質内部には、蛋白質構成原子のvan der Waals半径（体積）により、水分子は入り込みにくい。その結果、蛋白質内部では、水分子によるsolvation energyが得られにくい。これこそが「蛋白質内部の疎水性」である。一方、蛋白質内部には無極性溶媒とは異なり、多くのdipoleが存在する。極性アミノ酸側鎖だけでなく、主鎖カルボニル基 $C^{δ+}=O^{δ-}$ は強く分極しており、蛋白質内での電荷の安定に大きく貢献する<sup>10,11</sup>。さらに、蛋白質中での静電相互作用は、バルク水中のように遮蔽されず、強い。このような場では、分極している通常の水素結合なら安定化効果を得られるが、電荷が非局在化しているLBHBでは小さい。

## 5. プロトン移動が起こる際の水素結合の様子

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<sup>3,4</sup>)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<sup>12</sup>)。  $pK_a$ の一致でカップリングは最大となるため<sup>13</sup>)、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。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<sup>12,13</sup>)。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 $H_3O^+$ の脱プロトン化とアクセプター $H_2O$ のプロトン化）、対称性水素結合 ( $H_2O \cdots H-OH_2^+$ ) が生じプロトン移動経路になりやすい。

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。例えばバクテリオロドプシンではシッフ塩基からプロトン移動が開始することが知られているが、そのトリガーは、レチナルのtrans-cis光異性化に由来する $pK_a$ 変化である<sup>14</sup>)。

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<sup>15</sup>)。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<sup>16</sup>)。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のは都合がよい。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<sup>5</sup>)。多くの場合、対称性水素結合は励起や電子移動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、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待ち受けている。

## 6. “The LBHB proposal revisited”

LBHBは i) 「短い水素結合」である。また、水素の移動においてバリアが小さいため、水素はドナー・アクセプター間に ii) 「非局在化」する。「短い結合ほど強い」「（本来分極しているはずの水素結合が）非局在化することは共有結合性を持つことを意味している」という都合のいい解釈を著名な人たちが権威ある雑誌上で言い出すと、多くの研究者たちは簡単に引きずられてしまうのは、今も昔も同じである。周囲の顔をうかがわずにものごとの「中身」を自ら判断して、堂々と意見を述べることができる研究者はいったいどれほどいるだろうか。

そこに、堂々と自分の意見を述べたのがWarshelである<sup>4,17</sup>)。Warshelは蛋白質の計算化学の手法開発にも多大な貢献をしたが、（他の同業者ではなく）彼がノーベル賞を受賞した理由は、それだけにとどまらず、計算化学の枠を超越した蛋白質科学における重要ないくつかの基本概念を、たとえ他の著名な研究者らが自分と逆の意見であろうが、他人の顔をうか

がわず主張したことにあると私は思う。

この件に関してWarshelが誰にでもわかりやすい形でまとめてあげたことは、次の点につきる。「ドナー・アクセプターの $pK_a$ が一致した水素結合がLBHBであり、それ故、salt-bridgeのように ( $pK_a$ 差が大きいため) 分極がはっきりしている水素結合とは相反した性質を持つ。だから、溶媒和安定効果を得ることができず、極性環境ではエネルギー的に安定ではなく、決して強い結合ではない<sup>4,17)</sup>。」科学としてはごくあたりまえなことをWarshelは述べただけに過ぎないが、大多数が狂信的に権威を支持する中で、当たり前のことを言うことはとても難しいことだと思う。この「当たり前のこと」を多くの人ができないからこそ、実行できる人は偉人であり、ノーベル化学賞を受賞する人とはそういう人なのかも知れない (図2)。

### 謝辞

共に研究を行った斉藤圭亮博士 (大阪大学) に感謝申し上げます。

Received November 10, 2013, Accepted November 26, 2013, Published December 31, 2013

### 参考文献

1. Mikenda, W. (1986) Stretching frequency versus bond distance correlation of O-D(H)...Y (Y = N, O, S, Se, Cl, Br, I) hydrogen bonds in solid hydrates. *J. Mol. Struct.* 147, 1-15.
2. Saito, K. and Ishikita, H. (2012) H atom positions and nuclear magnetic resonance chemical shifts of short H bonds in photoactive yellow protein. *Biochemistry* 51, 1171-1177.
3. Frey, P.A., Whitt, S.A. and Tobin, J.B. (1994) A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* 264, 1927-1930.
4. Schutz, C.N. and Warshel, A. (2004) The low barrier hydrogen bond (LBHB) proposal revisited: the case of the Asp...His pair in serine proteases. *Proteins* 55, 711-723.
5. Perrin, C.L. (2010) Are short, low-barrier hydrogen bonds unusually strong? *Acc. Chem. Res.* 43, 1550-1557.
6. Perrin, C.L. and Nielson, J.B. (1997) "Strong" hydrogen bonds in chemistry and biology. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 48, 511-544.

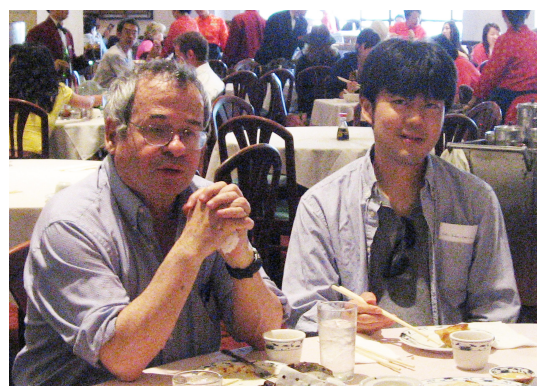


図2 Arieh Warshel教授とそのpostdocであった筆者 (2008年頃、Los Angelesにて)。

7. Cleland, W.W. and Kreevoy, M.M. (1994) Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. *Science* 264, 1887-1890.
8. Jeffrey, G.A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, Oxford, UK.
9. Frey, P. A. (2006) in *Isotope Effects in Chemistry and Biology* (Kohen, A. and Limbach, H.-H., Eds.), pp 975-993, CRC press, Boca Raton, FL, USA.
10. Ishikita, H. Saenger, W., Biesiadka, J., Loll, B. and Knapp, E.-W. (2006) How photosynthetic reaction centers control oxidation power in chlorophyll pairs P680, P700 and P870. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9855-9860.
11. Ishikita, H. (2007) Contributions of protein environment to redox potentials of quinones in flavodoxins from *Clostridium beijerinckii*. *J. Biol. Chem.* 282, 25240-25246.
12. Eigen, M. (1964) Proton transfer, acid-base catalysis, and enzymatic hydrolysis. Part I: Elementary processes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 3, 1-19.
13. Hammes-Schiffer, S. (2001) Theoretical perspectives on proton-coupled electron transfer reactions. *Acc. Chem. Res.* 34, 273-281.
14. Saito, K., Kandori, H. and Ishikita, H. (2012) Factors that differentiate the H-bond strengths of water near the Schiff bases in bacteriorhodopsin and Anabaena sensory rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 287, 34009-34018.
15. Ishikita, H. and Knapp, E.-W. (2005) Control of quinone redox potentials in photosystem II: electron transfer and photoprotection. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14714-14720.
16. Saito, K., Rutherford, A.W. and Ishikita, H. (2013) Mechanism of proton-coupled quinone reduction in Photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 954-959.
17. Warshel, A., Papazyan, A. and Kollman, P.A. (1995) On low-barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis. *Science* 269, 102-106.

Dear Arieh, a laureate of the Nobel Prize in Chemistry 2013

Hiroshi Ishikita\*

Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University