

Photoactive Yellow Protein 水素結合組み換え変異体の中性子結晶構造解析

Neutron crystallography of Photoactive Yellow Protein E46Q mutant

片岡 幹雄¹⁾ 山口 繁生¹⁾ 上久保 裕生¹⁾ 栗原 和男²⁾ 黒木 良太²⁾

Mikio KATAOKA Shigeo YAMAGUCHI Hironari KAMIKUBO Kazuo KURIHARA Ryota KUROKI

¹⁾奈良先端科学技術大学院大学 ²⁾原子力機構

Photoactive Yellow Protein(PYP)中の低障壁水素結合形成部位に対して変異を加えた変異体の中性子結晶構造解析を行い、低障壁水素結合への摂動が、PYP分子内水素結合ネットワークに及ぼす影響を調べる

キーワード：低障壁水素結合，タンパク質，中性子結晶構造解析，
Photoactive Yellow Protein，水素結合

1. 目的

昨年度の野生型PYPを用いた中性子結晶構造解析(2007A-A08)により、PYPにおいて低障壁水素結合が形成されていることが明らかとなった。これまでに、低障壁水素結合は幾つかの酵素において触媒反応へ寄与しているという仮説が提唱されてきた。しかし、蛋白質内部での形成が実証された例は無く、その仮説は疑問視されてきた。我々は、野生型PYP中で低障壁水素結合が形成されていることを実証し、この結合のPYP機能発現機構への関与を示した(Yamaguchi S. *et al.* 2009)。本研究では低障壁水素結合形成部位に変異を加えたE46Q変異体PYPの中性子結晶構造解析により、低障壁水素結合への摂動が分子内水素結合ネットワークに及ぼす影響を調べる。また、この変異体はPYPの光反応サイクルの初期において生成されるPYP₁中間体をミミックしていると考えられており、その構造を明らかにすることで光反応初期に生じる水素結合ネットワークの変化が明らかになると期待される。

2. 方法

野生型の結晶化の際に用いたマイクロシーディング法と蒸気拡散法を併用した結晶化方法を用いた(Yamaguchi S. *et al.* 2007)。その結果、大きさ $1.21 \times 0.68 \times 4.12 \text{mm}^3$ の結晶が得られた。この結晶を用いてJRR-3/BIX-4において中性子回折実験を行った。1枚あたりの照射時間4時間で測定を行い、計221枚の回折パターンを得た。

3. 研究成果

得られたデータセットは分解能 1.5 \AA で処理することができた。処理後の統計値はCompleteness: 93.5%, Redundancy: 2.2, $1/\sigma: 7.8$, $R_{\text{merge}}: 9.5\%$ であった。このデータに加え、解析には同じ結晶化条件で調製した結晶から得られた分解能 1.44 \AA の室温X線回折データを併用し、中性子/X線併用結晶構造解析を行っている。未だ、最終構造を決定するには至っていないが、分解能 1.5 \AA での水素原子(重水素原子)位置を含んだ構造構築を行っている。すでに得られている構造では、蛋白質表面の揺らぎの激しい領域に存在する水素原子を除き、ほぼ全ての水素原子を観測することができている。

4. 結論・考察

現段階の構造では、変異を加えた箇所以外の構造は野生型と酷似していることが観測できている。しかし、変異を加えた部分では、発色団の骨格構造を含めて水素結合環境が大きく変化している。今後はさらに詳細な解析を行い、より精密な水素原子位置を決定していく予定である。

5. 引用(参照)文献等

Yamaguchi, S. *et al.* Low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **106**, 440-444, (2009)

Yamaguchi, S. *et al.* Preparation of large crystals of photoactive yellow protein for neutron diffraction and high resolution crystal structure analysis. *Photochem. and Photobiol.*, **83**, 336-338, (2007)