

Photoactive Yellow Protein の中性子結晶構造解析
Neutron Crystallographic study of Photoactive Yellow Protein

片岡 幹雄¹⁾、山口 繁生¹⁾、上久保 裕生¹⁾、栗原 和男²⁾、新村信雄³⁾、黒木 良太²⁾

Mikio KATAOKA, Shigeo YAMAGUCHI, Hironari KAMIKUBO, Kazuo KURIHARA, Nobuo Niimura, Ryota KUROKI

¹⁾奈良先端科学技術大学院大学 ²⁾原子力機構 ³⁾茨城大学

Photoactive Yellow Protein(PYP)の結晶を用いて中性子結晶構造解析を行い、水素原子位置を含んだ結晶構造を構築する。

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

1. 目的 タンパク質の構造形成、及び機能発現には、水素結合が深く関わっている。これまで、水素結合の有無に関してはドナーとアクセプター間の距離を指標として、その存在が検証されてきたが、その結合強度に関しては検証することができなかった。しかし、水素原子の位置が同定されれば、その結合を定量的に検証できるようになる。特に、低障壁水素結合や、弱い水素結合と呼ばれている特殊な水素結合に関しては、水素原子の位置を決定しなければその存在すら証明できない。そこで本研究では、光応答タンパク質 PYP をモデルタンパク質として、中性子結晶構造解析により水素原子位置を含んだ PYP の立体構造を構築し、この構造をもとに PYP 中の水素原子を介した相互作用の役割について検証する。

2. 方法 中性子回折実験は、BIX-4 を用いて行った。構造解析は、分子置換法によって行ったが、初期構造及び精密化には同一結晶化条件で作製した結晶の X 線結晶構造を用いた。すなわち、水素原子以外の原子の位置は、X 線結晶構造を採用し、中性子回折実験のデータを水素原子の精密化にのみ用いた。この方法により結晶構造の精度を上げることに成功した。

3. 研究成果 $2.89 \times 0.85 \times 0.79 \text{ mm}^3$ の大きさの結晶を用い分解能 1.5 \AA までの回折データを記録することができた。Completeness は 89.6、回折データの R_{merge} は 10.9 であり、分解能 1.5 \AA の構造解析が可能なデータである。このデータを用いて、構造解析を行った。その結果、PYP 中の全ての水素原子を含む中性子結晶構造を明らかにすることができ、タンパク質中の解離性側鎖のプロトン化状態や、crystal packing に関与している水素結合等、 1 \AA を超える高分解能 X 線結晶構造解析でも得られなかった水素原子に関する情報をもたらした。特に発色団結合領域においては、低障壁水素結合が観測された。

4. 結論・考察 本研究により、生理条件下で存在するタンパク質内の低障壁水素結合が観測された。低障壁水素結合は酵素反応系の遷移状態において形成され、“この形成が酵素反応を促進する役割を担っている”という仮説が 1994 年に提唱された[1, 2]。その後活発な議論がなされてきたが、反証も数多く報告され[3, 4]その役割の詳細は未だ明らかになっていない。本測定で、定常状態の発色団結合領域において、低障壁水素結合が形成されていることが明らかになった。これは生理条件下のタンパク質内における低障壁水素結合形成の初の観測例となる。これにより、タンパク質がその機能発現系において、低障壁水素結合という特殊な水素原子を介した相互作用を用いていることが明らかになった。

5. 引用(参照)文献等

1. Cleland, W. W., and Kreevoy, M. M. Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. *Science* **264**: 1887-1890, (1994).
2. Frey, P. A. et al. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* **264**: 1927-1930, (1994).
3. Elissa L. A. A Low-Barrier Hydrogen Bond in the Catalytic Triad of Serine Proteases? Theory Versus Experiment *Science* **278**, 1128-1132, (1997).
4. Poi, M. J. et al. A Low-barrier Hydrogen Bond Between Histidine of Secreted Phospholipase A2 and a Transition State Analog Inhibitor. *J. Mol. Biol.* **329**, 997-1009 (2003).