

■ 中性子で見たタンパク質

生体物質中性子回折研究グループ ■ 峯崎 善章・新村 信雄 ■

Protein Structure determined by Neutron Diffraction

Yoshiaki MINEZAKI and Nobuo NIIMURA

Research Group for Neutron Crystallography in Biology

The structure of hen egg-white lysozyme including all hydrogen atoms and all bound water molecules was determined by neutron Laue method equipped with neutron imaging plates. In this report distinctive nature of hydrogen atoms and bound water molecules in the lysozyme molecule was discussed.

1. はじめに

近年、構造生物学が大きなトレンドに成っている。Nature や Science には毎号のように新規タンパク質の立体構造が紙面を賑わし、生命現象の担い手である生体高分子の立体構造を決定することで、神秘のベールに包まれていた生命の営みがすべて明らかにされる日も遠い将来ではないと思わせる勢いである。ところが立体構造解析の主役である X線結晶学や NMR 解析では水素の情報を得ることは甚だ難しく、水素については類推で話をするのが常である。X線、NMR で未知の生体高分子の立体構造が決定される最初の印象が余りにも強く、それだけで生体高分子の構造のすべてがわかったかのような錯覚に陥ってしまうが、忘れてはならないのは、タンパク質の半分は水素から成り、タンパク質が機能するためには周りの水が必要不可欠であることである。したがって中性子による水素を含めた構造決定の研究は、X線、NMR により決定された構造を完成させ、生命現象の本質を理解するためになくてはならないものである¹⁾。

しかし中性子を用いたタンパク質結晶構造解析は、中性子のビームの強度が弱いこともあり、今までほとんど行われてこなかった。従来のガス封入式検出器を

用いた中性子実験では JRR-3M クラスの中性子源を用いても数ヵ月から半年ほど必要とする。この弱点を補うのが、新しい検出器である中性子イメージングプレート²⁾と新しいデータ収集法である中性子ラウエ法³⁾の組み合わせである。

今回、これらの方法を用いてニワトリ卵白リゾチームの中性子結晶構造解析を行い、水素960原子と水和水157分子を決定することに成功した⁴⁾。

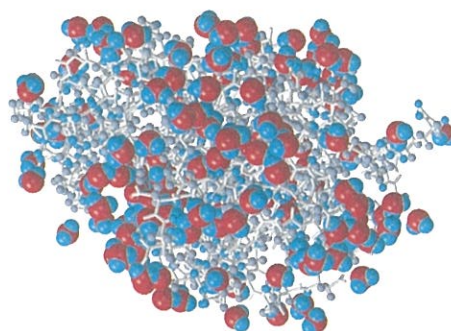


図1 中性子で決定されたニワトリ卵白リゾチームの全構造。軽水素は薄紫色、重水素は青色、水和水の酸素は赤色、その他の原子は灰色で表わしている。水素960原子と水和水157分子の位置を同定することが出来た。

2. 中性子で水素を見る

中性子によって決定されたニワトリ卵白リゾチームの（水素を含めた）全原子の構造を図1に示す。（軽）水素は薄紫色、重水素は青色、水和水の酸素は赤色、その他の原子は灰色で表わしている。タンパク質は多くの凹凸を持った複雑な形をしているが、その周りを包むように水分子が付いているのがわかる。

まず、酵素活性部位はどのようになっているのだろうか。リゾチームは溶菌作用を示す酵素で、pH=5.0で最大活性を示し、35番目のグルタミン酸残基（Glu35）と52番目のアスパラギン酸残基（Asp52）の位置で糖鎖を加水分解する。この時、Glu35がプロトネイトした状態で、Asp52は解離状態（つまり-COO⁻になっている）であることがわかっている。今回用いた単結晶はpH=7.0で結晶化させたため酵素活性を示さない構造をとっている。決定されたGlu35とAsp52の構造を図2 a, bに示す。赤で囲った部分に示すように、Glu35, Asp52共に解離状態を示し、Glu35が解離することで酵素活性が不活性になったことが説明できた。

次にタンパク質内部の水素について話を進める。決定されたすべての水素の位置を改めて見直すと、X線の結果だけでは構造化学的に予測できない水素の位置がたくさんあるのに気がつく。一番重要なのがプロトネイト部位であり、前述の活性部位の水素もその一例である。ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、リジン、アルギニン各残基、N末端、C末端がこれに

相当し、リゾチーム全129残基のうち30残基存在する。

X線では水素が見えないためと、酸素、炭素、窒素の散乱強度がほぼ同じであるために表裏の区別が付かない部位がある。一例として15番目のヒスチジンを図3に示す。pH=7.0ではND1 (δ 1位の窒素), NE2 (ϵ 2位の窒素) ともにはっきりとプロトンが付いているのが見える。中性子では水素がはっきり見えるために時計回りに、CG (γ 位の炭素)-CD2 (δ 2位の炭素)-NE2-CE1 (ϵ 1位の炭素)-ND1-CGとなっているのがわかるが、X線の場合水素が見えないために時計回りか反時計回りか区別がつかない（表裏の区別がつかない）。この表裏の区別がつかない部位に当たるのが、ヒスチジン、グルタミン、アスパラギン各残基で17残基ある。

構造化学的に水素を含む結合に回転の自由度があるため、水素の位置を推定できない場所として、-OH、-CH₃、-NH₂部位がある。-OH部位を有しているのは、セリン、スレオニン、チロシン各残基で20残基ある。-CH₃部位を有しているのはアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、スレオニン残基で41残基、-NH₂部位は、リジン残基、N末端にあり、7残基ある。図4に53番目のチロシン残基を示す。-OH基が向かって左後方向を向いていて、根元の酸素と隣の残基が水を介して水素結合でつながっている。もし水を介さずに水素結合させようとすると距離が離れすぎているため届かない。

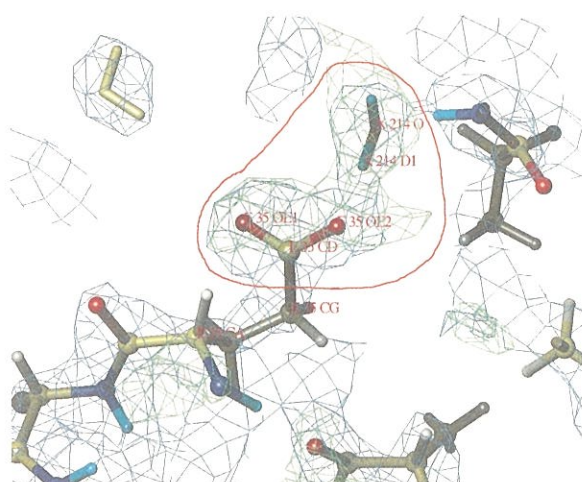
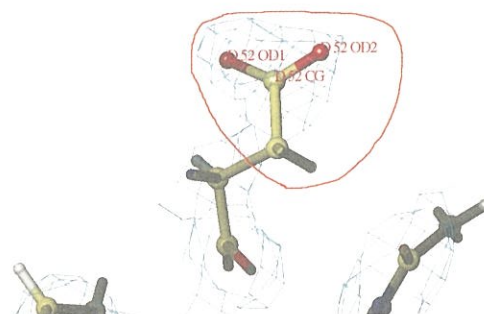


図2 (a) 中性子で見た35番目のグルタミン酸残基。赤で囲った部分に示すが、カルボキシル基は解離しており（つまり-COO⁻）、水分子が1つ結合しているのが確認された。



(b) 52番目のアスパラギン酸残基。赤で囲った部分に示すが、カルボキシル基は解離しておりながらも結合していない（-COO⁻である）。

3. 中性子で水和水を見る

今回、様々な水和水が見つかった。図5に62番目のトリプトファン残基のインドール環の上に乗っている水分子を示す。6員環の中央ではなく π 結合の上に乗っているのがわかる。この位置での水分子の安定性については興味があるところである。タンパク内部ではこの他に周囲の4ヶ所と水素結合している水分子や疎水基のポケットに囲まれた水分子、2本のバックボーンの間にはさまれている水分子などが見つかった。

タンパク質表面では、親水基に強く結合している水分子(図6)、タンパク質と直接結合せずに水分子同士でクラスターを形成している水分子などが見つかった(図7)。図6に65番目のアスパラギン残基と1番目のリジン残基の間に結合した水分子を示す。アスパラギン残基は親水基であるため水分子と強く結合しており、水分子の向きを反映しておむすび型で見えているのがわかる。図7にクラスター状に結合している水分子を示す。水分子はタンパク質に直接結合するだけではなく、水分子同士もクラスターを作り安定化している。

4. 最後に

重箱の隅を突つく様な細かいところにまで話が及んでしまったが、これは中性子で得られる情報がそれだけ細かい情報を持っているためである。X線、NMRを用いて次々と新しい構造が解かれている一方、それだけで解けない本質的な問題が残っているのも事実である。例えば、生物が遺伝情報として持っているのはシーケンスと呼ぶアミノ酸の並びだけであり、そこからどのように3次元構造を形成しタンパク質として機能するのだろうか(立体構造の構築原理)という問題や、タンパク質は必要なとき必要な分だけ合成され、機能し、不要になると分解されるが、そのためには固すぎても柔らかすぎても機能せず、タンパク質がどれだけ安定でどのように動いているのだろうか(熱安定性、ダイナミクス)という問題の最終的な答えはいまだに得られていない。今回解かれた、たった一つの構造からすべてのタンパク質を論ずることは出来ないが、今後、中性子実験で解かれる構造が増えるにつれ、水素を含めたタンパク質3次元立体構造情報が、これらの問題解決に大いに役立つと考えている。

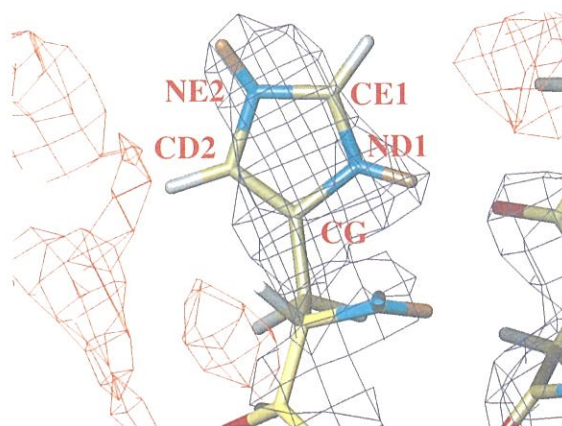


図3 15番目のヒスチジン残基。青色がプラス、赤色がマイナスを表す。試料結晶を重水中で作製したため、窒素に結合している水素は重水素に置換されている。重水素はプラス、軽水素はマイナスの中性子散乱長を有するため、窒素と炭素がはっきり区別できる。これより中性子を用いるとイミダゾール環の配置が時計回りに、CG-CD2-NE2-CE1-ND1-CGとなっているのがわかるが、X線の場合水素が見えないために時計回りが反時計回りか区別がつかない(表裏の区別がつかない)。

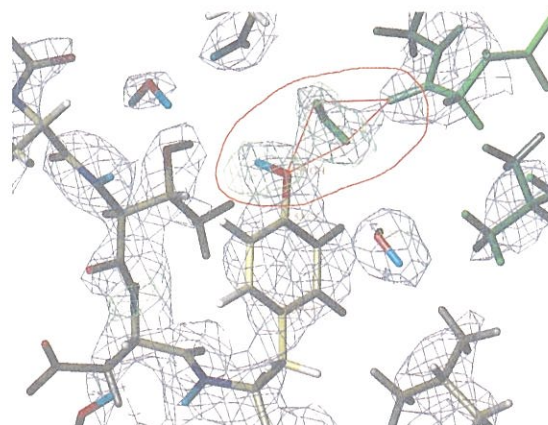


図4 53番目のチロシン残基。-OH基が左後を向っており、-OH基の酸素が水和水を介して隣のアミノ酸残基と水素結合をしている。-OH基を右後方向へ向けて水和水を介さずに直接隣のアミノ酸残基と水素結合するには距離が離れすぎている。

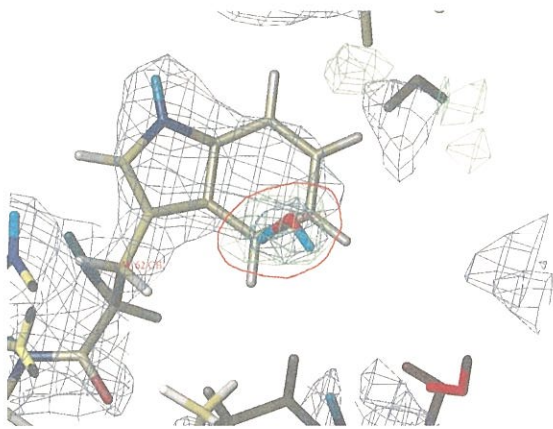


図5 62番目のトリプトファン残基のインドール環の上に乗っている水分子。6員環の中央ではなく π 結合の上に乗っていることがわかった。

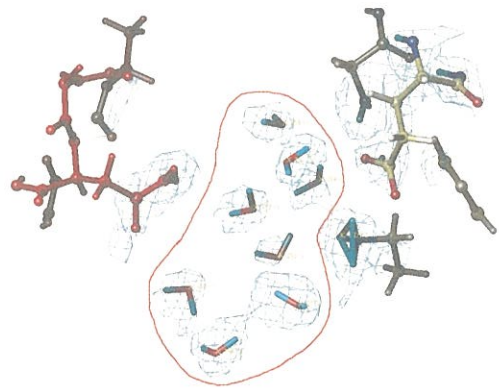


図7 クラスタ状に結合している水分子。水分子は直接タンパク質に結合し安定している以外に水分子同士がクラスタを作り安定化している。



図6 65番目のアスパラギン残基と1番目のリジン残基の間に結合した水分子。アスパラギン残基は親水基であるため強く結合しており、水分子の向きを反映しておむすび型で見えている。

参考文献

- 1) 新村信雄：基礎科学ノート，2(1)(1995)2.
- 2) C. Wilkinson & M. S. Lehmann：Nucl. Instrm. & Methods, A310(1991)411-415.
- 3) N. Niimura, et. al.：Nucl. Instrm. & Methods, A349(1994)521-525.
- 4) N. Niimura, Y. Minezaki, et. al：Nature Structural Biology, in preparation.