結晶構造解析によるイエロープロテインの 光反応モデルとその問題点

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 清水伸隆, 今元 泰, 片岡幹雄

The reaction mechanism of photoactive yellow protein (PYP) has been proposed based on the high-resolution x-ray crystal structure models of the photocycle intermediates. After the analysis, infrared and UV/Visible spectroscopic studies have been carried out on the intermediates in wild-type and mutated PYP. However, the data from the spectroscopic studies are not consistent with the proposed structural models and the reaction mechanism. Here, we describe the conflicts between the crystallographic and spectroscopic studies and discuss the reaction mechanism of PYP in solution.

X-ray crystallography / spectroscopy / photocycle / protein structure / photoreceptor

1. はじめに

生体内情報は、受容体タンパク質をはじめとするさまざまな生体分子が相互作用することによって伝達される。したがって、情報伝達のメカニズムを理解するためには、個々の分子が、どのようにして情報伝達のON/OFFを切り替えているのかを解明しなければならない。たとえば、受容体タンパク質の場合、ターゲット分子と相互作用できない刺激前と、相互作用が可能になった刺激後のグローバルな構造変化を明らかにしなければならない。

さまざまな受容体タンパク質のなかでも、最も広く研究されているのは光受容タンパク質であろう。光受容タンパク質は、光刺激で反応をトリガーできるため、反応の開始が容易で実験上便利である。また、光受容タンパク質は可視光吸収のために補欠分子である発色団をもっている。光吸収に伴う発色団の構造変化は、タンパク質部分との相互作用を変化させるため、吸収スペクトルが変化する。したがって、受容体タンパク質の構造変化を、可視分光という比較的簡単な手法によって追跡することができる。以上のような利点から、外部刺激にともなう受容体タンパク質の高次構造変化や反応メカニズムの解析のためには、光受容タンパク質は最も好適な研究対象である。特に、本稿で取り上げる photoactive yellow protein (PYP) は、比較的低分子の水溶性タンパク質であることから結晶化が容易である。このため結晶構造解析を行うことによって、高次構造に基づいた研究が展開できると期待され、実際そのように研究は進んできた。しかし、PYPの研究は、本来ならば構造を解く上で傍証となるべき赤外・紫外・可視などの分光学的データの蓄積を待たずに結晶構造解析が先行した特異な例である。そのため、後から分光学的データが得られるようになると、反応中間体の結晶構造モデルにさまざまな問題点があることが明らかになってきた。ここではPYPのこれまでの内外の結晶学的・分光学的研究を総括し、現在の問題点を検証してみたい。

toactive yellow protein (PYP) は、比較的低分子の水溶性タンパク質であることから結晶化が容易である。このため結晶構造解析を行うことによって、高次構造に基づいた研究が展開できると期待され、実際そのように研究は進んできた。しかし、PYPの研究は、本来ならば構造を解く上で傍証となるべき赤外・紫外・可視などの分光学的データの蓄積を待たずに結晶構造解析が先行した特異な例である。そのため、後から分光学的データが得られるようになると、反応中間体の結晶構造モデルにさまざまな問題点があることが明らかになってきた。ここではPYPのこれまでの内外の結晶学的・分光学的研究を総括し、現在の問題点を検証してみたい。

2. PYPについて

PYPは、紅色光合成細菌 *Ectothiorhodospira halophila* の産生する水溶性の光受容タンパク質で、菌体の負の走光性のための光受容体である¹⁾。アミノ酸残基は125個あり、それらは6本鎖の逆平行βシート、発色団結合ループ、3つのαヘリックスにより構成される中核部と、2つのαヘリックスとループ領域よりなるN末端部とで構成されるα/β構造に折りたたまれる(図1)。発色団は69番目のシステインにチオエステル結合した4-ヒドロキシケイ皮酸(*p*-クマル酸)である(図2)。発色

The Progress and Problem of X-ray Crystallography of Photocycle Intermediate of Photoactive Yellow Protein

Nobutaka SHIMIZU, Yasushi IMAMOTO and Mikio KATAOKA

Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

図1 PYPの立体構造のリボン図(左)と模式図(右)
PYPは6本鎖βシートと5つのαヘリックスからなるα/βタンパク質である。左図に示した発色団の近傍のアミノ酸(Y42, E46, T50, R52, C69)を、右図では白抜きで示した。

図2 暗状態PYPの発色団
発色団である4-ヒドロキシケイ皮酸は、C69とチオエステル結合している。発色団のフェノール酸素はY42, E46と水素結合を形成し、脱プロトン化している。Y42を介してT50とも相互作用している。発色団の近傍にはR52があり、発色団の負電荷を安定化していると考えられている。

団のフェノール酸素は、Y42, E46と水素結合して脱プロトン化しているため、負の電荷をもっている。可視部の吸収極大波長が446 nmにあるため、PYPはその名のとおり明るい黄色を呈している。PYPが光を吸収すると、発色団はトランス型からシス型へ異性化し、PYP_B, PYP_Hという2つの産物が生成する(図3)。その後、それ

図3 PYPの光反応スキーム
室温での時定数と低温での安定温度を図に示した。中間体のよび方はまだ統一されていないので、筆者らのものに従った。PYP_BはI0, PYP_LはI1あるいはpR, PYP_MはI2あるいはpBともよばれる。

ぞれがPYP_Lに変化し、PYP_Mを経て、もとのPYPに戻る。これらの中間体はそれぞれ固有の吸収スペクトルをもっているため、可視分光で区別することができる。光反応サイクルに要する時間は、条件によって大きく異なるが、生理的条件では数100ミリ秒である。

PYPは分子量14000の水溶性タンパク質であることから、発見後すぐに結晶化が行われた。発見の翌年の1986年には結晶のX線回折パターンが発表され、1989

年には一応構造が解かれたのであるが、その構造モデルは2つの5本鎖 β シートをもった β クラム構造で、126個のアミノ酸残基と、発色団として全トランス型レチナールを含むものであった。この構造は2.4 Å分解能での解析結果であったが、まったくの誤りであった。現在広く認められている1.4 Å分解能で解かれた構造は、同じグループにより、1995年に訂正されたものである²⁾ (PDB ID : 2PHY)。その後、結晶構造解析の対象は光反応中間体へと移っていき、光励起前後の差フーリエマップから、さまざまな中間体の構造モデルが提唱されることとなる。

3. PYPの光反応中間体の構造

まず、結晶構造解析によって提唱された中間体の発色団まわりの構造を見てみたい(図4上) これまでの報告はいずれも、中間体自体を結晶化したものではなく、作成した暗状態のPYPの結晶に光を照射して光反応させることにより、結晶中で中間体を生成させて解析を行ったものである。いくら強い光を照射しても光定常状態が生成するため、結晶中のすべてのPYPを中間体に変換させることはできない。そのため、光照射下の電子密度から暗状態の電子密度を引いた、 $|F|_{\text{light}} - |F|_{\text{dark}}$ 差フーリエマップに基づいて構造変化部位を同定し、光

反応メカニズムの議論が行われている。

3.1 PYP_M (PDB ID : 2PYP)

PYPの反応中間体で最初に構造が提唱されたのは、光励起後ミリ秒領域で生成し、活性中間体であると考えられているPYP_M(原著ではI2)である³⁾。PYPの単結晶を-12 °で496.5 nmの定常光レーザーで励起し、ミリ秒領域の時分割ラウエ法が行われた。時分割ラウエ法の詳細は省略するが、1.9 Å分解能で得られた $|F|_{\text{photostationary}} - |F|_{\text{dark}}$ の差フーリエマップにより、構造変化を解析している。この構造を暗状態のものと比較すると、発色団のチオエステル結合部分はそのまま、フェノール部分が大きく回転することでシス型に異性化している(図4上) 推定されたPYP_Mの構造モデルでは、暗状態でみられたフェノール酸素とE46, Y42との水素結合ネットワークは完全に壊れ、R52と新たな水素結合を形成している。R52は溶媒に露出し、タンパク質表面の電荷分布は変化しているが、それ以外のタンパク質の全体構造の変化は観測されていない(後述)。

3.2 PYP_{BL} (PDB ID : 3PYP)

次に提唱されたのは、-180 ~ -90 °の温度領域で安定なPYP_{BL}である⁴⁾。PYPの結晶に、-124 °で460 nmの光(バンド幅20 nm)を1時間照射して光反応させている。PYP_Mの構造モデルと同様に、 $|F|_{\text{photostationary}} - |F|_{\text{dark}}$

図4 上: X線結晶構造解析によって得られたPYPと光反応中間体, PYP_{BL}, PYP_{IL}, PYP_Mの発色団構造

図には示していないが, T50はY42を介して発色団と相互作用している(図2)。

下: Y42F, E46Q, T50V, R52Q変異体の吸収スペクトルと野生型(WT)のものとの比較

PYP_BとPYP_Lは暗状態との差スペクトル, 暗状態(PYP)とPYP_Mは吸収スペクトルの比較である。

発色団と水素結合している残基に変異を導入すると吸収スペクトルが変化し、そうでないものは変化しないはずだが....

の差フーリエマップ（分解能0.85 Å）より構造変化を推定しているが、このモデルでは、チオエステルのC=Oの回転により、発色団は光異性化している（図4上）そのため、暗状態で見られたチオエステルの酸素原子とC69の主鎖の窒素原子との水素結合は切断されている。一方、発色団の水素結合ネットワークをはじめとする発色団結合ポケットにほとんど変化はなく、発色団のフェノール酸素とY42, E46の位置関係はそのままである。また、タンパク質の構造も変化していない。この構造からPYP_Mに変化するためには、発色団はシス型のまま全体がチオエステルの根元で半回転し、芳香環部はR52を向き、チオエステルの酸素原子とC69の主鎖との水素結合が復活するという、大きな動きをしなければならない。タンパク質内部という限られたスペースのなかで、このような大きな動きは難しいように思われる。

3.3 PYP_L (PDB ID : 2PYR)

ナノ秒～マイクロ秒で生成するPYP_L（原著ではpR）の構造は、時間分解能1ナノ秒での時分割ラウエ法により解析された⁵⁾。光反応のトリガーには495 nmのパルスレーザを使用し、測定温度は15 °Cである。同様に、1.9 Å分解能の $|F|_{\text{light}} - |F|_{\text{dark}}$ 差フーリエマップによる解析を行っている。この解析によれば、発色団のフェノール部分が、その重心位置を変えないように面内で回転してシス型に異性化している（図4上）その結果、水酸基の方向のみが変わっており、E46との水素結合は切断されている。この構造は非常にねじれていて不安定なため、PYP_Mへの変化の過程で、発色団はさらにR52側に傾き、安定構造へと向かうと考えられている。PYP_Mの前駆体としてはこのモデルは妥当であるように思えるが、PYP_{BL}とは大きく違っており、PYP_{BL}からの産物であるとは考えにくい。

以上の3つの結晶構造解析は、差フーリエマップによって座標が変化した原子を特定し、光反応中間体の構造を視覚的に表現したため、非常に画期的であった。実際、PYPで研究すべきことはもはやなくなったと考える研究者も多かったようである。しかしその後、フーリエ変換赤外分光（FT-IR）や変異体を用いた低温可視分光など、いわば古典的な手法によるデータが蓄積されてくると、多くの疑問が浮かび上がってきた⁶⁾。

4. 赤外分光法・可視分光法による構造変化の解析

最近、低温FT-IR⁷⁾、あるいは溶液試料を用いた時間分解FT-IR⁸⁾⁹⁾によるPYPの反応機構の詳しい解析が発表された。まず、発色団と水素結合しているE46のC=O伸縮モードをPYP_Lで解析したところ、PYP_LではむしろE46の水素結合は強くなっていた。発色団のほかに

E46の水素結合パートナーは見当たらないため、PYP_Lでも発色団とE46との水素結合は維持されており、切れることはないと考えられた。この結論はPYP_Lの構造解析と矛盾している。また、タンパク質骨格の情報が得られるアミドI領域の変化から、中心部のβシート部分の構造変化は、PYP_Lでは生じていないが、PYP_LからPYP_Mへの変化過程で生じることが示唆された。このステップでE46から発色団へプロトンが移動する（発色団はプロトン化され、E46が脱プロトン化される）ので¹⁰⁾、E46から発色団へのプロトン移動が原因となっており、タンパク質全体におよぶような構造変化が生じると考えられた。

一方、低温FT-IRでは、PYP、PYP_B、PYP_H、PYP_LおよびPYP_Mそれぞれに特徴的な振動モードが観測された⁷⁾。重水素ラベルした発色団をもつPYPを用いてこれらのバンドを同定したところ、いずれもビニル結合部分に由来することが明らかとなったので、これらの構造の違いは、ビニル結合部分にあると考えられた。一方、E46のC=O伸縮モードの波数は、PYP_B、PYP_H、PYP_Lで同じであることから、水素結合強度が同じ、すなわち発色団のフェノール部分の変化は小さいことがわかった。つまり、PYPの光反応サイクルは、フェノール部分の向きが変化していくのではなく、エステル部分の回転によりビニル結合部分のねじれが緩和していくことで進行すると考えられた。

発色団の構造情報を得るには、吸収スペクトル測定が最も直接的であり、実際、中間体の可視分光も行われている。PYPの発色団はY42, E46, T50と水素結合ネットワークを形成している（T50はY42を介して間接的に発色団と相互作用している）。これらの相互作用が、発色団の共役二重結合系に影響をおよぼすため、上記の3つの残基に部位特異的な変異を導入すると吸収スペクトルが変化する¹¹⁾（図4下）。一方で、R52は発色団と水素結合を形成しないので、これに変異を加えても吸収スペクトルは変化しない。このように、発色団周辺の水素結合の状態を、吸収スペクトルの変化で推測することが可能である。そこで、変異体を用いた吸収スペクトル測定を中間体についても行い、中間体でのタンパク質/発色団相互作用を解析した¹²⁾。

光照射によってPYP_{BL}を単独で蓄積することは困難なので、この実験ではその前駆体であるPYP_Bのスペクトルを測定している。野生型と変異体のPYP_BおよびPYP_Lのスペクトルを測定し、野生型と比較したところ、E46Q, T50V, R52Q変異体での吸収極大の波長シフトの程度が、いずれも暗状態で観測されたものと同じであった（E46Q > T50V > R52Q = 野生型）。そのため、

発色団のフェノール酸素の水素結合ネットワークは、PYP_Lまでは保存されていると考えられた。この結果は、PYP_{BL}の結晶構造モデルと矛盾しないが、フェノールの向きが変わるとするPYP_Lの結晶構造モデルとは相反している。一方、PYP_Mでは、E46Qのみ長波長シフトしていた(E46Q > Y42F = T50V = R52Q = 野生型)そのため、PYP_Mの生成時には発色団とE46との相互作用は保たれるがY42との相互作用が弱くなること、また、R52Qの効果がないことから、R52との新たな水素結合の形成もないと考えられた。この結果は、PYP_Mでは発色団の水素結合パートナーがE46からR52に変化するという結晶構造モデルとは矛盾するものとなった。

以上、分光学的データからPYPの光反応機構を推測すると、以下ようになる。まず、暗状態の発色団は、脱プロトン化したトランス型であるが、光吸収でチオエステルのC=O部分が回転し、シス型に異性化する。このとき、フェノール周りの環境は変化せず、水素結合ネットワークは保たれたままである。その後、ビニル結合のねじれの緩和によってPYP_Lが生成する。そして、E46から発色団にプロトンが移動すると、E46と発色団の水素結合は保たれたままY42との水素結合が切れ、大きな構造変化が起こると考えられる。結局、結晶構造解析で提唱された3つの構造のうち、PYP_{BL}の構造は分光学的実験結果で説明できるが、PYP_LとPYP_Mの構造はそれとは矛盾するという結果になった。

5. 溶液中での高次構造変化

さらに、PYPの構造を生理活性との関連で考えると、見逃すことができないのは、PYP_Mの結晶構造解析ではタンパク質の高次構造変化が観測されていないことである。上記の赤外分光によるアミドモードの研究のほかにも、多くの研究からPYP_Mで大きく構造変化が起こっていることが示唆されている。

PYP_Mは、酸性条件下で安定化される。この性質を利用して、PYPを酸性(pH 5.75)光定常下においた状態でPYP_Mを蓄積し、多次元NMRによる構造解析が試みられた¹³⁾。PYP_Mの収束構造は得られなかったものの、¹H-¹⁵N HSQCスペクトルから、β2~β5以外のすべての部分に大規模な影響がおよんでおり、PYP_Mが非常に緩んだ構造になっていることが示された。さらに、暗状態で内部に埋め込まれていた疎水性残基の一部が溶媒露出していることも示唆された。また、我々がX線小角散乱実験で溶液中のPYP分子の形状を検討したところ、PYP_Mの生成にともなって、慣性半径が1 Å程度増加することが示された。このときの散乱パターンの変化は、βシート部分の構造変化だけでは説明しきれず、N末端

部分を含めた大きな構造変化の結果であると考えている(発表予定)一方で、PYPとPYP_Mの結晶構造からX線散乱曲線をシミュレートしたところ、両者の慣性半径の違いは0.1 Å以下であり、X線小角散乱実験の検出限界以下であることがわかった。以上の結果は、結晶中での光反応は、水溶液中での本来のものとは明らかに異なり、生理的条件下ではPYP_Mでタンパク質全体の構造変化が生じることを強く示唆するものである。

6. 終わりに

X線結晶構造解析を用いたPYPの光反応メカニズムの研究は、1995年に暗状態の構造解析が報告された後、わずか3年ほどの間に非常に急速なピッチで進められた。その間には時分割ラウエ法といったタンパク質の結晶解析では非常に新しい解析法も導入され、実験手法に長足の進歩をもたらしたことは無視できない。しかしながら現在、これらで得られた構造は旗色が悪いようである。結晶構造解析に誤りがあったとして、その原因には、結晶中での光反応性が水溶液中と違うこと、構造解析に先立って十分な状況証拠が揃っていないこと、精度が不足している差電子密度マップに基づいて強引に構造モデルを構築したこと、などが考えられる。PYP研究の一連の流れのなかでは、インパクトを求めるあまり、視覚化された構造が絶対という考え方が優先されてきた。その結果、PYPの光反応過程を正確に理解する上で、非常に大きな混乱を引き起こしている。X線結晶構造解析は孤高の解析法ではなく、ほかの技法と組み合わせなければ正確な情報を導き出すことができないこともある、という好例であろう。分光測定は結晶構造解析が成功するまでの時間稼ぎではないのである。

確かに、高分解能の構造解析にX線結晶構造解析が最も有効な手法であることに異議のある方はいないであろう。ただ、求めた原子の座標の精度と、結晶構造解析という分解能とに、必ずしも相関がないということに留意するべきである(最近発表されたラウエ法の論文では、構造を解かず、差電子密度の変化が発色団から周辺に伝播していく様子を示すにとどまっている¹⁴⁾)。論文を読む側も、結晶構造解析で示された「絵」を鵜呑みにするのではなく、ほかのデータと同じように、十分にその妥当性を検討することが求められるであろう。

文 献

- 1) 今元 泰, 徳永史生(1997)蛋白質 核酸 酵素 42, 129-135.
- 2) Borgstahl, G. E. O., Williams, D. R. and Getzoff, E. D.

- (1995) *Biochemistry* **34**, 6278-6287.
- 3) Genick, U. K., Borgstahl, G. E., Ng, K., Ren, Z., Pradervand, C., Burke, P. M., Šrajcar, V., Teng, T. Y., Schildkamp, W., McRee, D. E., Moffat, K. and Getzoff, E. D. (1997) *Science* **275**, 1471-1475.
- 4) Genick, U. K., Soltis, S. M., Kuhn, P., Canestrelli, I. L. and Getzoff, E. D. (1998) *Nature* **392**, 206-209.
- 5) Perman, B., Šrajcar, V., Ren, Z., Teng, T., Pradervand, C., Ursby, T., Bourgeois, D., Schotte, F., Wulff, M., Kort, R., Hellingwerf, K. and Moffat, K. (1998) *Science* **279**, 1946-1950.
- 6) Heberle, J. and Gensch, T. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 195-197.
- 7) Imamoto, Y., Shirahige, Y., Tokunaga, F., Kinoshita, T., Yoshihara, K. and Kataoka, M. (2001) *Biochemistry* **40**, 8997-9004.
- 8) Brudler, R., Rammelsberg, R., Woo, T. T. and Getzoff, E. D. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 265-270.
- 9) Xie, A., Kelemen, L., Hendriks, J., White, B. J., Hellingwerf, K. J. and Hoff, W. D. (2001) *Biochemistry* **40**, 1510-1517.
- 10) Imamoto, Y., Mihara, K., Hisatomi, O., Kataoka, M., Tokunaga, F., Bojkova, N. and Yoshihara, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12905-12908.
- 11) Imamoto, Y., Koshimizu, H., Mihara, K., Hisatomi, O., Mizukami, T., Tsujimoto, K., Kataoka, M. and Tokunaga, F. (2001) *Biochemistry* **40**, 6047-6052.
- 12) Imamoto, Y., Mihara, K., Tokunaga, F. and Kataoka, M. (2001) *Biochemistry* **40**, 14336-14343.
- 13) Rubinstenn, G., Vuister, G. W., Mulder, F. A., Düx, P. E., Boelens, R., Hellingwerf, K. J. and Kaptein, R. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 568-570.
- 14) Ren, Z., Perman, B., Šrajcar, V., Teng, T. Y., Pradervand, C., Bourgeois, D., Schotte, F., Ursby, T., Kort, R., Wulff, M. and Moffat, K. (2001) *Biochemistry* **40**, 13788-13801.

清水伸隆

清水伸隆 (しみず のぶたか)

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 博士後期課程

連絡先: 〒630-0101 奈良県生駒市高山町8916-5

E-mail: si-nobut@ms.aist-nara.ac.jp

今元 泰 (いまもと やすし)

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 助教授

連絡先: 同上

E-mail: imamoto@ms.aist-nara.ac.jp

片岡幹雄 (かたおか みきお)

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 教授

連絡先: 同上

E-mail: kataoka@ms.aist-nara.ac.jp

<http://mswebs.aist-nara.ac.jp/LABs/kataoka/mainpage.htm>