3SB01

結晶構造解析に基づいた化学反応機構研究の概要

○月原 富武（阪大蛋白研）

結晶構造解析に基づいた化学反応機構研究の概要 Crystallographic Research on Reaction Mechanism in a Protein Molecule T. Tsukihara 月原富武 阪大蛋白研 本年度より科学研究費補助金「特定領域研究」によって「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」が発足した。本研究では、いかなる大きさの生体超分子を原子分解能で捉える方法を開発し、得られる超分子の原子レベルの構造に基づいて、超分子の関わる生命の仕組みを解き明かすことを目指す。この研究は巨大な構造の精密な構造を追求することに特徴がある。本シンポジウムでは、その内の「精密な構造」に関わる所を深めるために企画した。蛋白質の立体構造によって高度に制御された化学反応の理解を深め、生命の神秘を探ることを目的にして、結晶学、分光学、量子化学、生化学の立場から討論する。結晶構造に基づいた反応機構の研究は、蛋白質結晶学の創生期から中心的な課題として取り上げられてきた。精密構造解析、時分割精密構造解析によって蛋白質による化学反応制御の仕組みを明らかにする研究も進展してきている。研究対象はより大きな生体超分子に拡がり、溶媒領域から隔離され完全に蛋白質に取り囲まれた場で起こる一連の反応連鎖も対象になっている。こうした研究は、関連する反応はどのようにタイミングをとっているか、蛋白質場におけるアミノ酸残基の性質など、今一度掘り下げて追求すべき課題を提示している。立体構造を基に、蛋白質場で展開される化学の実態を明らかにし、神秘的な蛋白質の理解を深めたい。

T. Tsukihara : Crystallographic Research on Reaction Mechanism in a Protein Molecule

3SB03

蛋白質場でのディールスアルダー反応

○尾瀬 農之^{1,2}（¹北大・院・理、²九大・生体防御研）

化学反応の中には、物質同士が近づくだけで新しい化合物が生じる反応が存在する。そのうちの一つ Diels-Alder 反応は、ジエンおよびジエノフィルが上下から接近し、二重結合の電子軌道の重なりから協奏的にシクロヘキセン環を合成する付加反応である。この反応を大成させたドイツ化学者 O. Diels とその弟子 K. Alder には、1950 年ノーベル化学賞が授与されている。Diels-Alder 反応は容易にシクロヘキセン環を合成することができるので、有機合成化学に対するブレイクスルーをもたらした。この Diels-Alder 反応を触媒する蛋白質として、Diels-Alder 反応抗体触媒が有名である。しかし、天然に存在する酵素で Diels-Alder 反応を触媒する蛋白質、すなわち Diels-Alderase の構造は解明されておらず、そのメカニズムを具体的に論じることは不可能であった

ツユクサの葉より単離された病原菌 *Macrophoma commeliniae* は 2-ピロン及びオキザロ酢酸から安息香酸誘導体マクロフォミン酸への珍しい変換反応を触媒するが、この複雑な変換反応は一つの酵素（マクロフォミン酸合成酵素、MPS）が触媒する。MPS の触媒反応は大別して 3 段階に分けることができ、二段階目の反応である 2 個の炭素炭素結合反応が Diels-Alder 反応である。構造解析の結果、反応途中で生成するビルビン酸がマグネシウムイオンに配位している様子を確認することができた。変異実験及び反応中間体の絶対配置情報から、反応メカニズムを解明することができた。とりわけ、蛋白質が提供する活性部位は、基質との水素結合の形成により Diels-Alder 反応を加速させる戦略をとっていることは重要である。

T. Ose : Diels-Alder Reaction in Proteins

3SB02

原子分解能結晶構造解析による酵素反応機構

○加藤 博章（京大院薬、理研播磨研）

高輝度シンクロトン放射光 X 線と高性能 X 線検出器が利用できるようになり、タンパク質であっても、超高分解能での結晶構造解析が可能になってきた。1.0 Å を越える原子分解能では、結晶中のタンパク質分子や水分子の水素原子の位置をも決定できることから、酵素反応にかかわる触媒残基のプロトン化の状態を明らかにすることも期待できる。一方、中性子線は原子核によって散乱されるため、水素原子の構造決定では、X 線よりも中性子線を用いることが原理的に優れている。そこで、極めて高い分解能を示すタンパク質の結晶を X 線と中性子線を用いて比較解析することにより、タンパク質の精密結晶解析の可能性を検討している。エンドポリガラクトナーゼ (EC 3.2.1.15) は、ペクチンの主鎖であるポリガラクトロン酸を加水分解する酵素である。この反応は 2 つの酸性残基によって触媒される。すなわち、一方はグリコシド結合の酸素にプロトンを供給する一般酸触媒として、もう一方は加水分解を行う水分子からプロトンを引き抜く一般塩基触媒として働くと考えられている。本酵素の 3 次元構造は、0.96 Å (Native) と 1.15 Å 分解能 (生成物複合体) ですでに決定した [Shimizu, T. et al. (2002) Biochemistry 41, 6651-6659]。この結晶からは、SPRING-8 の BL41XU において、0.7 Å を越える分解能での X 線回折データが得られることが判明している。一方、数ミリ立方メートルまで巨大化したこの結晶からは、日本原子力研究所の研究用原子炉 JRR-3 にて 1.5 Å 分解能の中性子線回折データを収集することができている。講演では、明らかになった X 線と中性子線解析の結果から、水素原子の構造を踏まえた酵素反応メカニズムについて議論する。

H. Kato : Enzyme reaction mechanism analyzed by atomic resolution crystallography

3SB04

光解離に伴うヘモグロビン構造変化の直接観測

○足立 伸一¹、城 宜嗣²、朴 三用³、Jeremy R. H. Tame³、柴山 修哉⁴（¹KEK-PF、²理研・播磨研究所、³横浜市大・院総合理学、⁴自治医大・医・生理）

ヘモグロビン (Hb) は血液中に存在し、酸素運搬タンパク質として重要な機能を果たしている。特に Hb の酸素結合における酸素親和性調節の現象はアロステリック効果による協同性のモデルとして、古くから多くの研究者の研究対象となってきた。1960 年代の Max Perutz らによる X 線結晶構造解析研究から、Hb は高酸素親和性型 (relaxed 型または R 型) と低酸素親和性型 (tense 型または T 型) の 2 つの 4 次構造をとることが明らかとなり、酸素結合が「引き金」となって R 型と T 型の間を構造転移する機構が提唱された。それ以降、より精密な結晶構造に基づいた構造機能相関研究が活発に行われてきたが、いまだ Hb の配位子結合調節機構が解明されたとはいえない。それは、通常の X 線結晶構造解析で決まる静的構造だけでは、タンパク質機能を調節している構造変化の仕組みを十分には理解できないからである。我々は、Hb の動的構造変化に迫るために、極低温条件下で結合した配位子 (CO) 分子を光によって解離させるという方法を用い、CO が光解離された直後の中間体の高分解能構造解析を行った。その結果、特に T 型結晶において、構造歪みが蓄積されている部分の特異的な構造緩和が観測され、酸素親和性を低下させている構造要因を同定することができた。さらに α と β サブユニット間で構造変化する部位が異なっていることが明らかとなり、配位子結合調整機構がサブユニット間で質的に異なっていることの直接的な証拠が得られた。

S. Adachi, Y. Shiro, S.-Y. Park, J. R. H. Tame and N. Shibayama : Direct observation of photolysis-induced structural changes in hemoglobin