タンパク質の動きやすい部分を見る

X線結晶構造解析を中心に

加藤博章*
小田順一

近年、タンパク質の動きがその機能発現に必須であることがわかってきた。そうすると、固定した状態を相手にするX線結晶解析は、機能解析に向かない方法のようであるが、決してそうではない。むしろタンパク質研究におけるX線結晶解析の重要性はますます高くなっている。この一見矛盾すること、すなわちX線結晶構造解析でタンパク質分子の動きを見るための方法について、最近の研究例を交えて解説する。

酵素の触媒作用、アロステリックな調節制御、抗体の分子認識などあらゆる場面で、タンパク質の動きは、機能と密接にかかわっている。現在では、FT-IR、NMR、蛍光分光といった、溶液状態での構造変化を追跡することができる方法が発達したおかげで、このような動きの速さや大きさに対する理解も進んできている。しかし一方で、動きと機能の関係を構造的な面から詳細に理解するためには、やはりX線結晶解析で直接「見る」ことへの取り組みが強く求められている。

言うまでもなく、結晶という止まった状態を相手にするため、X線結晶解析で得られるのはある一定時間の平均構造、すなわち硬い分子模型的なイメージの三次元構造であり、その構造は動きとは無縁のように思われる。しかし、実は、X線結晶解析の結果にはゆらぎ (fluctuation) や振動 (vibration) という言葉で分類される細かい動き (幅 $0.01 \sim 1 \text{ \AA}$) に関する情報が含まれているのである。この情報の物理的な意味については優れた総説もある⁽¹⁾。

では、ペプチド鎖の位置が数 $\text{\AA}$ 以上も動くような場合についてはどうか。本稿では、タンパク質の機能に応じて、すなわちリガンドの結合などに誘発されて大きく動く場合に焦点をあてて、動く部分の構造あるいはその動きを見るための優れた方法と具体的な酵素タンパク質についての研究例、そしてタンパク質が動きやすい構造をもつ利

点について解説する。

タンパク質の動きやすい部分を見るための方法

タンパク質の結晶化には、試料の純度が問題となる。ただし、この場合の純度とは、アミノ酸配列の違うものが含まれているかどうかではない。いかに、立体構造が同じものだけを分別するかである。したがって、動きやすい部分を見る場合でも、結晶解析であるかぎり、対象とする結晶格子中に単一の立体構造の分子種だけが整列するような工夫が必要となる。これは、溶液中の多様な立体構造をなるべく1つに固定化することにほかならない。そこで、考えられる手法は、リガンドの添加などによって、立体構造をある単一の状態に固定し、その状態を精密に解析することである。さらに、別のリガンドで違う立体構造に固定すれば、それらの立体構造を比較して、動きを見ることが可能である。たとえば、酵素に基質が結合した状態と結合していない状態を比較したり、基質が結合した状態と、生成物が結合した状態を比較することもできる。

次に、固定化の手段として、遷移状態アナログと親和性標識の利用法について概要を説明するとともに、それぞれの研究例としてアデニル酸キナーゼ、グルタチオン合成酵素について紹介する。

遷移状態アナログの利用による立体構造の固定化

遷移状態アナログ

目的とするタンパク質が酵素であれば、反応の遷移状態アナログを用いて、立体構造の固定化を

Visualization of Mobile Regions in Proteins by X-Ray Crystallography

* Hiroaki KATO, Jun'ichi ODA, 京都大学化学研究所

図 1 ■ 酵素反応と非酵素反応の自由エネルギー変化の比較

行なう方法が優れている。それは、遷移状態アナログが極端に小さい解離定数をもつため、溶液中の平衡を結合状態に移行させやすいからである。活性中心付近に存在する柔らかい（動きやすい）ループ構造の固定化では、そのループが酵素反応の遷移状態の安定化に必須であることが多いことから、特に威力を発揮している。

遷移状態とは、化学反応が進行する際に乗り越えなければならない最もエネルギーの高い状態である。したがって、化学反応の速度は反応前、すなわち基底状態と遷移状態のエネルギーの高さによって決まる。酵素反応と非酵素的な 2 分子反応とを比較すると、酵素反応が効率的な反応の加速を行なうのは、酵素の活性中心が遷移状態の構造と相補的な構造になっているために強力な遷移状態の安定化が期待できるからであるといわれている^(2,3)。つまり、酵素は基質とまず結合しなければならないが、その後の反応過程を通じて最も強い相互作用が遷移状態との間で生じるということである。このことを図 1 に示す。 ΔG_s は、酵素反応において、酵素と基質がミカエリス複合体 (ES) を作ったときの自由エネルギー変化を表わし、 $\Delta G_e^\ddagger$ は、ES から遷移状態 $ES^\ddagger$ への活性化自由エネルギーを表わす。また、 $\Delta G_n^\ddagger$ は、同様に非酵素的な反応の場合の活性化自由エネルギーである。そして、 ΔG_T は、酵素反応と非酵素反応の遷移状態の自由エネルギー変化、すなわち遷移状態において変化した状態の基質と、酵素が複合

体を作ったときに下がる自由エネルギーの量を表わす。このことから、酵素反応と非酵素反応の速度の比をとれば、酵素による遷移状態の安定化の強さを求めることができる。そのことを反応速度式で示す。

K_s と K_T はそれぞれ、基底状態と遷移状態における基質分子と酵素との解離定数を示す。また、 $K_e^\ddagger$ と $K_n^\ddagger$ はそれぞれ酵素反応と非酵素反応における基底状態と遷移状態との平衡定数を示す。すると、酵素反応の速度定数 k_e と非酵素反応の速度定数 k_n の間に以下の関係が成り立つ。

$$\frac{k_e}{k_n} \equiv \frac{K_e^\ddagger}{K_n^\ddagger} \equiv \frac{K_s}{K_T} \quad (2)$$

ここで、 K_s は K_m とほぼ等しく、 k_e は k_{cat} と等しいことから、

$$K_T = K_m \cdot \frac{k_n}{k_{cat}} \quad (3)$$

と表わすことができる。したがって、たとえば、酵素反応と非酵素反応の速度比が 1 万だとすると、酵素は、基底状態よりも遷移状態と 1 万倍強く結合することがわかる。この遷移状態をまねてデザインしたのが遷移状態アナログと呼ばれる阻害剤である。上記の式からわかるように、この種の阻害剤は通常の競争阻害剤に比べて格段に高い阻害活性を示す。これまでに、多種多様な酵素の遷移状態アナログの設計が試みられ、実際に結晶解析で用いられたケースもかなりの数にのぼる。なお 1990 年までの研究例については詳しい総説があるので参照されたい⁽⁴⁾。

アデニル酸キナーゼの例

アデニル酸キナーゼ (EC 2.7.4.3) は ATP と AMP から 2 分子の ADP を生成する反応を触媒する。結晶構造に関しては、酵素単独の構造 (2.1 Å 分解能; プタのサイトゾルの酵素)、AMP との複合体 (1.85 Å 分解能; ウシ心臓ミトコンドリアの酵素)、遷移状態アナログである

図 2 ■ アデニル酸キナーゼの立体構造模式図

Aは AMP:酵素複合体, Bは AP5A:酵素複合体を示す. Aの の部分は結合した AMP 分子を表す. Bでは, 結合した AP5A 分子のうち, AMP に相当する部分を で, その他の部分を で表示した. 図中上方にある INSERT ドメインが AP5A の結合に伴って大きく動くのがわかる. その他も含め, 動きの大きい部分は で示した.

P^1, P^5 -bis(adenosine-5'-)penta-phosphate (AP 5 A)⁽⁵⁾ との複合体 (1.9 Å 分解能; *Escherichia coli* の酵素) について, いずれも Schulz のグループによって解析されている⁽⁶⁻⁹⁾.

このうち, 酵素単独の場合と AMP 複合体とはほとんど同じ構造であるため, AMP 複合体の構造と AP5A 複合体の構造を示す (図 2-A, B). 両者の大きな違いは, INSERT ドメインと呼ばれる 4 本の β 鎖から構成される 1 枚のシート構造にある. 図中リガンド分子の上方にあるこの 30 残基ほどの小ドメインは, AP5A が結合すると,

図 3 ■ アデニル酸キナーゼの推定遷移状態構造 (A) と AP5A 分子構造 (B) の比較

Bには相互作用している酵素の残基も表示した.

α ヘリックスとの連結部を支点として回転し、AP5A 分子をすっぽりと覆ってしまう。ところが、AMP 複合体ではこのドメインは完全に開いた形をしている。したがって、実際の酵素反応では、AMP の次に ATP が結合してはじめて INSERT ドメインにより活性中心が覆われるのであろう。

図 3-A にアデニル酸キナーゼの遷移状態の予想構造をあげる。この反応は、典型的なリン酸基転移反応で、転移されるリン酸の中心リン原子が 5 配位をとった遷移状態を経由すると考えられている⁽¹⁰⁾。AP5A では、リン酸基の数が 1 つ多いわけであるが、遷移状態では転移するリン酸とその両脇の酸素原子との距離が幾分長いため、ちょうど AP5A の右から 2 番目と 3 番目のリン酸から上方に伸びる酸素原子の位置が遷移状態の立体構造とよく似ているのであろう (図 3-B)。阻害定数 K_i は約 3 nM (ウサギ筋肉の酵素) で、AMP に対する K_m (0.6 mM) の実に 10 万倍強力である⁽⁹⁾。また、図 3-B では、AP5A と相互作用している距離にある酵素の残基も表示した。INSERT ドメインに含まれるのは、Arg 123, Arg 156, Asp 158, Asp 159 の 4 残基である⁽⁹⁾。変異型酵素を用いた実験からも、この 2 つのアルギニン残基が活性発現に欠かせないことが判明しており、遷移状態の安定化に寄与していると考えられている^(11~13)。

INSERT ドメインの動きは、これまで例を見ないほど極端で、90 度回転し、重心が 7 Å 移動する。では、この動きは基質が結合してはじめて起こるのだろうか、あるいは常時、閉じたり開いたりしているのだろうか。実は、AP5A 複合体以外の結晶構造において、この領域が開いた状態で固定化されたのは、結晶化の際に INSERT ドメインどうしが互いに噛み合っていたからである。それでも、INSERT ドメインに相当する領域は、結晶構造中での動きやすさの指標となる温度因子が高い値を示しており、INSERT ドメインは本来動きやすいことが示唆される⁽⁹⁾。したがって、AP5A 複合体以外の結晶構造で、INSERT ドメインどうしが相互作用していないよ

うな状態で結晶化していたら、この領域は X 線解析しても見えなかったかもしれない。もっとも、リガンドなしの状態で酵素が結晶化したのは、この相互作用によって INSERT ドメインの固定ができたからであろう。

親和性標識の利用による立体構造の固定化

親和性標識試薬

もう一つ、リガンドと酵素の結合において、平衡を完全に結合型に片寄らせる手段として有効なのは、リガンドと酵素を共有結合で不可逆的に結合させてしまうことである。そこで、酵素の活性中心に対する親和性をもちながら活性中心近傍の特定残基を化学修飾する親和性標識試薬の利用が図られている。

親和性標識試薬とは、酵素の活性部位など、タンパク質の機能発現上必須な部位に存在する特定のアミノ酸残基に対してのみ、共有結合的な標識をつけるために用いられる化学修飾試薬のことである。このものは、そのような部位との親和性を示すように、相手が酵素であれば、基質類似の構造を分子内にもっている。修飾が特異的に行なわれているかどうかは、不活性化反応の速度論的な解析で、酵素 (E) と試薬 (I) とが、単純な 2 分子反応ではなく、ミカエリス複合体類似の EI 複合体を経由していることが示されるかどうかで判断される。通常、親和性標識試薬の利点は、修飾後の標識ペプチドを限定加水分解により単離して、修飾残基を同定し、三次元構造が不明でも、アミノ酸配列の情報から活性中心の領域を特定できる点にある。しかし、用いた親和性標識試薬と反応する官能基が活性中心にあるとは限らないため、修飾を受けた残基が必ずしも活性に必須ないいわゆる触媒残基ではないこともある。ともかく、三次元構造がすでに判明している場合には、利用範囲が限られてしまう。ところが、修飾された酵素は完璧に 1 対 1 の複合体を形成しているため、その状態で結晶化すれば、結晶化の過程でリガンドが酵素から遊離することはなくなり、リガンド結合状態での立体構造の固定化には利用価値が高い。

グルタチオン合成酵素の例

グルタチオン合成酵素は、ATP を利用して γ -グルタミルシステインとグリシンからグルタチオンを合成するリガーゼである。これまでに、*Escherichia coli* 由来の酵素の結晶構造が $2.0 \text{ \AA}$ の分解能で解析されており⁽¹⁴⁾、それによると、活性中心近傍に大ループ (Ile 226~Gly 241) と小ループ (Gly 164~Gly 167) の2つの柔軟なループ構造が存在し、結晶解析では、そのいずれも明瞭な電子密度を示さない。大ループについては、タンパク質工学的な実験によって活性に必須であることが判明している^(15,16)。そして、グルタチオン合成酵素の場合も、アデニル酸キナーゼと同様、基質の結合の後に大ループが閉まり、中間体や遷移状態などの反応性分子種を溶媒の水から守って安定化していることが示唆されている。しかし、これら2つのループの構造は、いくつかの基質複合体の結晶を作ってはみたものの、固定できてはいない。これは、グルタチオン合成酵素の反応が、3つの基質が結合してはじめて開始する反応機構であるため、1つあるい

図 5 ■ AP4PL とグルタチオン合成酵素の複合体の立体構造の模式図

▨の部分には AP4PL 分子を、□の部分には2つの柔軟なループ構造を示す。ループのうち、上が大ループ (Ile 226~Gly 241)、下が小ループ (Gly 164~Gly 167) である。

図 4 ■ AP4PL 分子の構造

は2つの基質を結合させただけでは、ループと基質の相互作用が不完全であるためであろうと思われる。

事実、得られた複合体結晶中に含まれる基質分子の割合は1対1にはなっていなかった。ところが、ATP の構造を分子中に含むアデノシンテトラホスホビリドキサル (AP4PL, 図 4) が親和性標識試薬として機能することが判明した⁽¹⁷⁾。そこで、酵素上のリジン残基 (Lys 18) との反応で生じる Schiff 塩基を還元固定化して、AP4PL を共有結合させた複合体が調製された。その複合体を結晶化して解析したところ、ループを2つとも固定化することに成功したことがわかった (図 5)⁽¹⁸⁾。もともと AP4PL は、ATP の結合の際、リン酸基と相互作用すると思われるリジン残基を修飾することを意図して設計された化合物である⁽¹⁹⁾。ところが、本酵素の場合はむしろ、 γ -グルタミルシステイン結合部位近傍の Lys 18 が修飾され、この酵素の広い活性中心に相補的に結合した。そして、そのことが強い結合を実現している。一方、AP4PL に関しては、これが酵素と結合した状態で立体構造が明らかになった最初の例であり、分子内の ATP 部分構造は、酵素の ATP 結合部位に結合していることが確認された。

タンパク質が動きやすい部分をもつ利点

動きやすい部分をもつことの利点は何であろうか。酵素活性という点から考えてみると、少なくとも次の3つのことが考えられる⁽²⁰⁾。第一は、溶媒の水を活性中心の周りから排除するためである。これは、活性中心を疎水的な環境にして静電相互作用を高めるとともに、反応中に生じるアシル中間体などの活性型分子種が不用意に加水

分解されることを防ぐ。第二は、基質結合、生成物放出過程の加速のためである。酵素が極限まで進化する、その酵素反応の律速段階は、化学反応の遷移状態ではなく、基質の結合や生成物の放出といった物理的な過程となる。したがって、さらに反応を加速するために、立体構造変化によって基質の取り込みや生成物の放出を効率化することは理にかなっている。そして第三は、複数の遷移状態に対する協奏的な相補性の会得のためである。これは、複数の基質をもつ場合に特に重要であるが、反応過程に複数の遷移状態や反応中間体に関与する場合、それぞれに迅速かつ協奏的に相補的な反応場を提供するためには、部分的な構造変化によって形を変えることが有利であるからである。グルタチオン合成酵素の大ループが柔らかいのはこのためであろう。

*

本稿で述べてきたことは、結晶中の止まった状態を見て動きの軌跡を追うことであった。これは、まるで明治時代のころ数時間も姿勢を強制されながら撮った写真を見て動きを想像しているようなものかもしれない。今、最先端では、結晶中で起こる酵素反応などに伴う一連の構造変化過程を連続的に撮影すること、すなわち時間分割X線結晶解析の装置と実験法確立への取り組みが行なわれている⁽²¹⁾。これが実現すれば、野球選手がボールを打つ瞬間を高速シャッターで撮影するごとく反応中間体を捉えたり、まるでアニメーションのように酵素反応の進む様子を目で追えるようになるかもしれない。もうすぐ、時間軸を加えたタンパク質の“四次元構造”⁽²²⁾が議論されるようになることであろう。タンパク質研究にとってX線結晶解析はまだまだ多くの可能性を秘めている。

文献

参考文献

- 1) D. E. McRee : "Practical Protein Crystallography", Academic Press, 1993.
- 2) C. R. Cantor & P. R. Schimmel : "Biophysical Chemistry—Part II", Freeman, 1980.
- 3) A. Ducruix & R. Giegé : "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins", Oxford University Press, 1992.

- 4) 勝部幸輝, 松原 央, 松原謙一 (監修) : "タンパク質の構造入門" (原著 C. Branden & J. Tooze : "Introduction to Protein Structure", Garland, 1991), 教育社, 1992.
- 5) A. Fersht : "Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed.", Freeman, 1985.

引用文献

- 1) G. A. Petsko & D. Ringe : *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 13, 331 (1984).
- 2) L. Pauling : *Chem. Eng. News*, 24, 1375 (1946).
- 3) J. L. Kurz : *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 987 (1963).
- 4) E. Lolis & G. A. Petsko : *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 597 (1990).
- 5) G. E. Lienhard & I. I. Secemski : *J. Biol. Chem.*, 248, 1121 (1973).
- 6) D. Dreusicke, P. A. Karplus & G. E. Schulz : *J. Mol. Biol.*, 199, 359 (1988).
- 7) K. Diederichs & G. E. Schulz : *J. Mol. Biol.*, 217, 541 (1991).
- 8) C. W. Müller & G. E. Schulz : *J. Mol. Biol.*, 224, 159 (1992).
- 9) M. Gerstein, G. Schulz & C. Chothia : *J. Mol. Biol.*, 229, 494 (1993).
- 10) J. R. Knowles : *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 877 (1980).
- 11) H. J. Kim, S. Nishizawa, Y. Tokutomi, H. Takenaka, M. Hamada, S. A. Kuby & S. Uesugi : *Biochemistry*, 29, 1107 (1990).
- 12) M.-D. Tsai & H. Yan : *Biochemistry*, 30, 6806 (1991).
- 13) H. Yan, Z. Shi & M.-D. Tsai : *Biochemistry*, 29, 6385 (1990).
- 14) H. Yamaguchi, H. Kato, Y. Hata, T. Nishioka, A. Kimura, J. Oda & Y. Katsube : *J. Mol. Biol.*, 229, 1083 (1993).
- 15) T. Tanaka, H. Kato, T. Nishioka & J. Oda : *Biochemistry*, 31, 2259 (1992).
- 16) T. Tanaka, H. Yamaguchi, H. Kato, T. Nishioka, Y. Katsube & J. Oda : *Biochemistry*, 32, 12398 (1993).
- 17) T. Hibi, H. Kato, T. Nishioka, J. Oda, H. Yamaguchi, Y. Katsube, K. Tanizawa & T. Fukui : *Biochemistry*, 32, 1548 (1993).
- 18) 日弁隆雄 : 京都大学 (農) 博士論文 (1993).
- 19) 谷沢克行, 多賀谷光男, 福井俊郎 : 化学と生物, 31, 797 (1993).
- 20) D. Herschlag : *Bioorg. Chem.*, 16, 62 (1988).
- 21) 加藤博章, 小田順一 : 化学, 49, 72 (1994).
- 22) J. Hajdu & I. Andersson : *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 467 (1993).