タンパク質の高次構造と機能

ホスホフルクトキナーゼのX線結晶解析

白木原 康雄

Yasuo Shirakihara, 東京大学理学部

1. はじめに

タンパク質は極めて種類が多く、またそれぞれが生体のなかで特有の機能を果たしている。例えば、血液のなかで酸素分子を運搬する赤い色をしたヘモグロビン、(筋)肉のなかでやはり赤い色をして酸素を貯蔵するミオグロビンといった私たちの日常生活でもよく目にするタンパク質から、体のなかで起こっている膨大な数の化学反応をつかさどっている非常に多種類の酵素タンパク、生体の器官のあいだでの情報伝達を行なうホルモンなどをかんがえていただければこのことは明らかであろう。

ところで、個々のタンパク質の機能を理解するためにはその立体構造の理解が不可欠である。タンパク質はアミノ酸が連なったポリペプチドであり、このポリペプチド鎖は3次的に折れ曲がって複雑な立体構造(表題の高次構造のこと)をとっているが、この正常な立体構造を(アミノ酸のつながりをかえずに)こわしてしまうとタンパク質の機能は失われてしまうからである。立体構造を解くための強力な手段がここで述べるX線結晶解析である。

筆者は最近英国ケンブリッジMRC分子生物学研究所でPhil Evansとともに大腸菌のホスホフルクトキナーゼ(以後PFKと略す)のX線結晶解析¹⁾をする機会を得たので、この仕事の解説をとおして、立体構造の解析の道筋と、このタンパク質の構造と機能の関係を述べてみたい。

2. アロステリック酵素としてのPFK

ここでは、酵素PFKの特徴について述べる。これ

により、多数のタンパク質のなかからこの酵素を選んだ理由が理解されるはずである。

PFKはいわゆるアロステリック酵素²⁾と分類され、自身が環境の変化に応じてその酵素活性を調節することができる。これは調節機能をもたない残りの大部分の酵素(非アロステリック酵素)と際だった対照をなす。またわたしたちが材料に用いた大腸菌のPFK(分子量14万、4個の同一のサブユニットからなる、図1)は多数のアロステリック酵素のなかでも最も小さいため、この酵素は酵素調節におけるアロステリック機構の構造的詳細を調べるのに格好の材料である。

基礎的なことを述べると、PFKは解糖系に属する酵素であり、フルクトース6リン酸にATPからのリン酸基を付加しフルクトース1,6-二リン酸にするステップを触媒する。解糖系とは酸素のない状態でグルコースを分解してATPを生産するための反応系であるが、多くの生物でこの系の調節はPFKの酵素活性の調節で行なわれている。したがって、PFK分子が細胞のエネルギーレベルに関連したエフェクターによるアロステリック調節機能を備えていることは非常に理にかなったことである。例えば大腸菌を含めた細菌のPFKの場合、ADP(ATP欠乏時に濃度が増大する)などのヌクレオシド二リン酸が酵素を活性化し、ホスホエノールピルビン酸(PEP、解糖系最後の段の基質)が抑制する。

一般に、アロステリックタンパク質は、

- (1) 基質と活性化剤に対して親和性の高い、R状態とよばれる活性化型の構造
 - (2) 基質に対して親和性が低く、阻害剤に対して親和性の高い、T状態とよばれる非活性化型の構造
- の二つを可逆的にとることができるので、環境の変化(基質、アロステリックエフェクターの濃度の変化)

白木原康雄 東京大学理学部物理学教室(113 文京区本郷7-3-1) 助手・理博
昭和54年東大大学院修了。58年まで細菌べん毛の電顕3次元再構成を行なう。59~60年英国MRC分子生物学研究所でX線結晶解析を行ない、帰国、現在に至る。〈趣味〉音楽鑑賞。

Structure and Function of Proteins: The X-ray structure of phosphofructokinase and its function

図 1 PFK 四量体

を感知するとすみやかに2つの状態の分布を変化させ機能調節を行なっているといわれている²⁾。

さて、上記のように特徴をもつ細菌の PFK に着目した Phil Evans は、1980 年前後に、好熱菌 (*Bacillus Stearothermophilus*) の PFK の活性型 (R 型) の構造を 2.4 Å 分解能で、また非活性型 (T 型) の構造解析を 7 Å 分解能で行なった。この後 Phil Evans は好熱菌から大腸菌の PFK に研究の対象をかえることになる。遺伝子工学による *in vitro* mutagenesis を併用した研究には大腸菌のほうが有利であったためである。この大腸菌の PFK のプロジェクトのなかで筆者は、分子置換法を用いて、R 状態の結晶解析を行なったわけである。

3. X 線結晶解析の原理と分子置換法

ここで X 線結晶解析について手短かにふれ、分子置換法についても述べる。X 線結晶解析の基本的な道具立ては、X 線ビームと結晶と記録のためのフィルム (または検出器) である。結晶に照射された X 線は結晶のなかで規則的にならんだ分子 (単位格子の密度分布を $\rho(x, y, z)$ とする) によって特定の方向 (h, k, l で指定される) に回折され、後方フィルム上に回折波の強度 ($I = |F|^2$, $|F|$: 振幅) が記録される。この $|F|$ と ρ とはフーリエ変換によって関係づけられる。

$$|F_{h,k,l}| e^{i\alpha_{h,k,l}} = \int dx dy dz$$

$$P(x, y, z) e^{2\pi i (bx + ky + lz)} \quad (1)$$

ここで $\alpha_{h,k,l}$ は回折波を記述するための位相項である。数学的にはこれの逆変換が存在して

$$\rho(x, y, z) =$$

$$\frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F_{h,k,l}| e^{i\alpha_{h,k,l}} e^{-2\pi i (hx + ky + lz)} \quad (2)$$

X 線結晶解析は (2) 式を使って ρ を求め、その密度分布に重ね合わせたポリペプチド鎖のモデルを最終解とする。(2) 式の右辺の $|F|$ は直接観測される量であるが、位相 α は直接の測定にかけられないので何とか工夫して求めなければならない (位相問題)。

位相問題を解く一般的な解法は、巨大分子であるタンパク質の場合、重原子同型置換法 (重原子のついた結晶からの回折強度を測定し、ついてない結晶からの回折

強度と比較して位相を求めるやり方) である。しかし、類似の分子の 3 次元構造情報が利用できる場合には、この重原子置換法なしに構造を解くことができる。これは分子置換法とよばれ、この解析でも用いられた。分子置換法のアイデアは、本当の分子を構造既知の類似分子で代用し (初期モデルの設定)、初期モデルの結晶内での向き、位置を決める、そうすれば (1) 式により近似的な初期位相が得られるというところにある。そのあと、重原子同型置換法の場合と全く同様に位相の精密化を行なえばよい。

4. 解析の実際

4-1. PFK の結晶化と回折データの収集

大腸菌 PFK はそれまで結晶になっていなかったの、遺伝子工学を用いてつくった大腸菌 PFK を over-produce する菌を用いて高度に精製した標品を使い、さまざまな結晶条件をためした。得られた 10 を越える結晶型のうち、F6 P=0.2 mM, ADP=10 mM を存在させた 50% MPD (2-methyl-2,4-pentanediol) から成長した板状結晶 (0.6 mm × 0.8 mm × 0.2 mm) のみが解析に値することがわかった。この結晶型は、格子が斜方格子 ($a=112.3 \text{ Å}$, $b=85.4 \text{ Å}$, $c=77.1 \text{ Å}$)、空間群は $P2_12_12$ (格子内の決まった位置に 2 つの 2 回らせん軸と 1 つの 2 回軸がある) であり、

α ヘリックスは円筒で β スtrandは矢印で示す。結晶内に存在する各リガンドの位置も示している。点をうった部分は P 接触に寄与する部位を示す。

図 2 p 軸からみたときの手前 2 つのサブユニットの模式図

結晶の 2 回軸と分子内の 2 回軸 (図 1) のうちの 1 つが一致している。

2.4 Å 分解能の回折データ収集 (回折強度 I の測定) は回転カメラを用いて行なった。

4-2. 分子置換法による位相の決定

回折強度の情報を用いて、初期モデルの結晶格子内での位置を決めることができる。密度分布の自己相関関数のフーリエ変換である強度はそれ自身分子内の原子の位置情報をもっているからである。

このために、まず好熱菌の R 状態の PFK のモデルの原子座標を借用し大腸菌の PFK の初期モデルをつくる。結晶内での分子の位置の指定は、4-1. に述べたことから非常に簡単になる。すなわち、(1) 残る 2 つの 2 回軸のうちの 1 つの軸の方位と (2) 分子の 3 つの 2 回軸の交点 (分子の中心) の結晶の 2 回軸にそっての位置の 2 つが指定できればよいことになる。詳しいことは割愛するが、最初のパラメーターは回転関数の計算により、あとのものは Translational R-factor Search の計算により求めることができた¹⁾。

4-3. 構造の精密化 (refinement)

結晶格子内で位置づけられた初期モデルを次の点で精密化する。

- (1) 各原子の位置が強度データをよく説明する。
- (2) 各アミノ酸の原子配置が標準的なジオメトリーに従う。

2.4 Å という中程度の分解能は個々の原子の位置を正確に決めるには不十分であり、(2) の助けをかりる必要がある (Restricted least squares refinement)。また必要におうじて、グラフィックス上でのマニュアル修正を行なう。この 2 つを実行して、モデルの最終的な R 因子 (モデルから計算した $|F|$ と観測値とのずれ) は 23.4% に減少した。

5. PFK の構造

5-1. PFK の構造の特徴

図 1 に示すように PFK では 2 つのドメインからなるサブユニットが、直交する 3 つの 2 回軸で関係づけられる位置に配置されている。活性部位は分子表面に位置し、図 1 の A は F6P 結合部位、B は ATP 結合部位である。アロステリックエフェクター結合部位は C で示されており、別の組のサブユニットの間に位置し、また活性部位からは遠く離れている。サブユニットのドメインは 2 つとも中央にある β シートを外側の α ヘリックスが取り囲む形をとっている (図 2)。

また、各サブユニットは他の 2 つのサブユニットと各々異なった性格のインターフェイス (P ならびに R 接触) を形成しているのも特徴である (5-4.)。

5-2. 活性部位

結合の協同性を示さない ATP の結合部位とそうでない F6P の結合部位はその性質に違いがある。すな

図3 r 軸からみたときの上2つのサブユニット表示のしかたは図2と同様。点の部分は R 接触に寄与する部位を示す。

わち、ATP 部位がドメイン1に局在するのに対し、F6P 部位は2つのドメイン1, 2にまたがっており、さらには R サブユニットにもひろがっている。B 部位の ADP (この結晶型では ATP のかわりに結合している) のリン酸部分は、F6P の 1'OH に近接しており、リン酸基転移に好都合にできている。

5-3. エフェクター部位

エフェクター部位は M と P と間の深いクレフトに存在する。ここでは ADP はリン酸部分をクレフトのより内側にいれて結合している。ADP は両方のサブユニット (M, P) からの多数の残基と相互作用している。

5-4. サブユニットインタフェース

P 接触 (図1) は図2に示すように主として α ヘリックス同士のパッキングである。またエフェクター ADP もこれに関与している。

一方 R 接触 (図1) は図3に示すように、活性部位近傍にみられ、P 接触に比べ規則的2次構造の寄与の少ないのが特徴である。F6P も R 接触に関係していることはすでに述べた。

5-5. アロステリック転移

T 状態の構造が得られていないので、ここでは R

状態の構造の特徴からの推論を述べてみる。

PFK では、すでに述べたようにサブユニット間に結合部位をもつリガンドが結合の協同性を示す。一方、モノーのアロステリックのモデルでは、各々結合部位が異なる基質と活性化剤が同じように R 状態を安定化する。この2つを組み合わせると、R 状態と T 状態の間の変換の際、サブユニットは近似的にコンホメーションを変えずそれらの (またはサブユニットの対同士の) 相対的な位置を変化させていると考えるのが自然であろう。ここで P 接触が硬い接触であり R 接触が比較的柔らかい接触であることを思い出すと、M と P、および Q と R というペア (図1) を考えペアの間の位置関係が変わると考えられる。実際、酵素反応のキネティクスは T 状態と R 状態の間の変換の際、エフェクター部位に比べて活性部位は大きな構造変化をうけることを示唆している。また好熱菌の PFK の R 型の結晶では阻害剤 PEP が結晶をこわすことなく結合できるという知見も上の仮説と矛盾しない。現在 Phil Evans らにより私たちの R 型の構造をモデルとして分子置換法を用いた T 型構造の解析が進行中である。

なお引用文献は最小限にしたので、タンパク質に関する最近の知見については文献4)、X 線結晶解析については5) を参照されたい。

文 献

- 1) Y. Shirakihara, P.R. Evans: Manuscript in preparation.
- 2) J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux: *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965)
- 3) P.R. Evans, G.W. Farrants, P.J. Hudson: *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.*, **293**, 53 (1981)
- 4) T.E. Creighton: *Proteins*, W.H. Freeman and Company (1983)
- 5) T.L. Blundell, L.N. Johnson: *Protein Crystallography*, Academic Press (1976)