

解説

不安定なタンパク質を見る

大阪大学・大学院理学研究科

福山恵一*

1. はじめに

タンパク質の機能や性質を理解する上で、その立体構造情報は極めて重要で、必須ともいえる。このことは光合成分野に限らず、生物科学の広い分野に共通していることであろう。立体構造をみることにX線結晶解析が果たしている役割が非常に大きいことに異論はないであろう。

ところで、タンパク質を代表とする生体巨大分子や複合体の立体構造は静止していない。「機能する」ということは、他の分子と相互作用し、構造変化をしていることに他ならない。X線結晶解析がなされると確かに「ある状態の構造」がみえるが、タンパク質分子がどのように構造変化し、これが機能とどう結びつくかを理解したいという欲求がさらに生ずるのも自然な流れである。このようなことにX線結晶解析法でどこまで迫れるのか、どのようなことをクリアすれば達成できるかをここで述べてみたい。

2. X線結晶解析で何がみえているのか？

X線結晶解析は、調製した結晶にX線を照射し、そこから散乱（回折）されるX線を記録し、この回折データから原子位置などの構造情報を得る方法である。この方法は、構造決定しようとしている分子が結晶状態であることを前提として、理論が組み立てられている。結晶とは、同一の立体構造をとった分子が周期的に配列したものである。X線結晶解析で直接みえるものは「空間的および時間的平均」の電子密度である。結晶中の分子配列に乱れが無く、実験中に構造変化しなければ、この方法は分子を構成する各原子の位置を極めて正確に（誤差が0.01 Å以下の精度で）決定できる。タンパク質のような巨大分子でも、最も見えにくいとされる水素原子をもみることができ。しかし反面、局所的にせよコンフォメーション

が多様であったり、経時的に構造変化すると、該当領域の電子密度はぼやけ、ひどくなると電子密度が全くみえなくなる。

一般に、タンパク質分子は溶液中でも結晶中でも構造がゆらいでおり、さらに基質等の小分子や他のタンパク質やDNAと相互作用すると、大きな構造変化が起こるのが普通である。それではX線結晶解析という方法で、どのようにしてタンパク質の構造をみればいいのか、動きを捉えられるのか、またこの方法から得られた結果をどう評価したらいいかについて概説する。

3. 例1：化学的に不安定な分子をみる^{1,2)}

この種の分子の構造をX線結晶解析でみる場合、結晶を構成する分子を立体的に均一にし、回折実験中不変に保つことが必要である。つまり、変化しやすい分子を「どの状態に揃えるか」がポイントになる。ここでは、不安定な鉄硫黄（FeS）クラスターを保持したIscUタンパク質を例にあげ、どのようにして立体構造をみることができたか、そしてこの構造から得られた知見の科学的評価を述べる。

FeSクラスター形成やFeSタンパク質の成熟化にはタンパク質群が関与しており、その一つがISCマシナリーである（図1A）³⁾。IscUはISCマシナリーの必須の成分であり、他の成分タンパク質と協調的に働き、FeSタンパク質をアポ型からホロ型へと成熟化させる。FeSクラスターには[2Fe-2S]や[4Fe-4S]等があるが、ISCマシナリーはどのタイプのクラスターにも対応するという特徴がある。これまでの分子遺伝学や生化学的解析から、IscU中でFeSクラスターが一時的に形成され、これがアポ型FeSタンパク質に渡されるとされている。このような機能から容易に想像がつくように、IscUは様々な状態をとり、構造（状態）変化

* 連絡先 E-mail: fukuyama@bio.sci.osaka-u.ac.jp

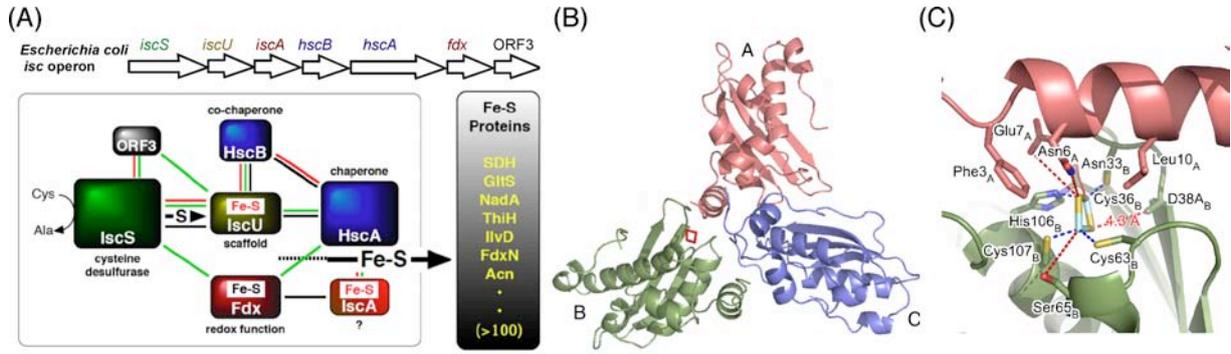


図1. ISCマシナリーとその成分タンパク質IscUの構造

(A) 大腸菌ではiscSUahscBAfdxはオペロンをなし、対応するタンパク質が協調的に働くことによってFeSタンパク質がホロ型になる。IscUはscaffoldタンパク質である。成分間に引いた線は様々な方法で検出された相互作用を示す。(B) [2Fe-2S]クラスターを結合したIscU (D38A変異体) の非対称な三量体構造。同一のポリペプチドでありながら互いに異なるコンフォメーションをとり、一つのサブユニットのみがFeSクラスターを結合している。(C) [2Fe-2S]クラスター近傍の構造。緑がBサブユニット、赤がAサブユニットを示す。Cys36とHis106が一方の鉄原子に、Cys63とCys107が他方の鉄原子に結合している。BとCは文献2より転載。

しやすいが故に「機能的」であるといえる。我々はFeSクラスターを保持した状態のIscU (FeS-IscU) の構造をみるのがIscUの分子機構解明の第一歩であると位置づけ、この構造を捉えることに焦点をあてた。それまでの経験から大腸菌FeS-IscUはきわめて不安定であったので、以下のように順次取り組んだ。

- 1) 幾つかの生物種について、安定なFeS-IscUをスクリーニングし、*Aquifex aeolicus* 由来のIscUを選択した。
- 2) このIscUを大腸菌で発現させるとFeSクラスター特有の色を持つタンパク質が生成した。嫌気的条件下で操作すると、このFeSタンパク質が精製できたが、かなりの割合でFeSが分解しているようであった。
- 3) さらに安定化させるため、*Azotobacter vinelandii* のIscUに倣って、*A. aeolicus* のIscUにD38Aという変異を導入した。この結果、このFeS-IscUはより安定になり、嫌気チャンバー内で操作することにより精製と結晶化に成功した。この結晶は、大気中ですばやく急速凍結すれば、その後は通常の結晶と同様に扱っても長期間安定であった。

本X線結晶解析から、予期していなかった構造が現れた。それまではIscUの二量体の中央でFeSが形成されると考えられていたが、FeS-IscUは非対称な三量体を形成し、一つのサブユニットの表面にFeSが結合し、残る二つのサブユニットはFeSを持たずに、別のサブユニットが持つFeSを覆っていた(図1B)。すなわち、一つはFeS形成の場を提供し、残る二つは異なるコンフォメーションをとってFeSの保護や転移に

寄与しているように見え、同じポリペプチドでありながらそれぞれのサブユニットは異なる役割を果たしていると考えられた。詳細は省略するが、IscUの生化学的解析と合わせて、IscUはオリゴマー状態を変えてFeSを形成・転移させているという、新しい分子機構を提唱した。

図1CにFeSクラスター近傍の構造を示したように、FeSには3つのCys残基と一つのHis残基が配位している。これらの残基に加えて、Asp38(ここではD38A変異体なのでAla38となっている)をはじめFeSクラスターを結合しうるアミノ酸残基が近くに点在する(図1C中赤破線)。IscUの機能から、FeSがIscUに結合する様式は幾つかあり、形成された(されつつある)FeSクラスターはIscUの中で順次移動して、最終的にターゲットとなるアポ型FeSタンパク質に渡るのであろう。D38Aは形成されたFeSクラスターが固定される変異体で、このため安定になったと解釈できる。事実、この変異によりIscUの機能が損なわれる。本解析では、機能しているIscUの一つのスナップを捉えたと考えている。

IscUに限らず、タンパク質が働く様を動画としてみたいのであれば、各状態の構造を捉え、これらを繋ぐ必要がある。映画の場合と同じである。

4. 例2-1：酵素反応の中間体を捉える⁴⁾

図2Aに示すように、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)は2段階で、基質中の γ -グルタミル基を加水分解・転移する反応を触媒する⁵⁾。一般に、2

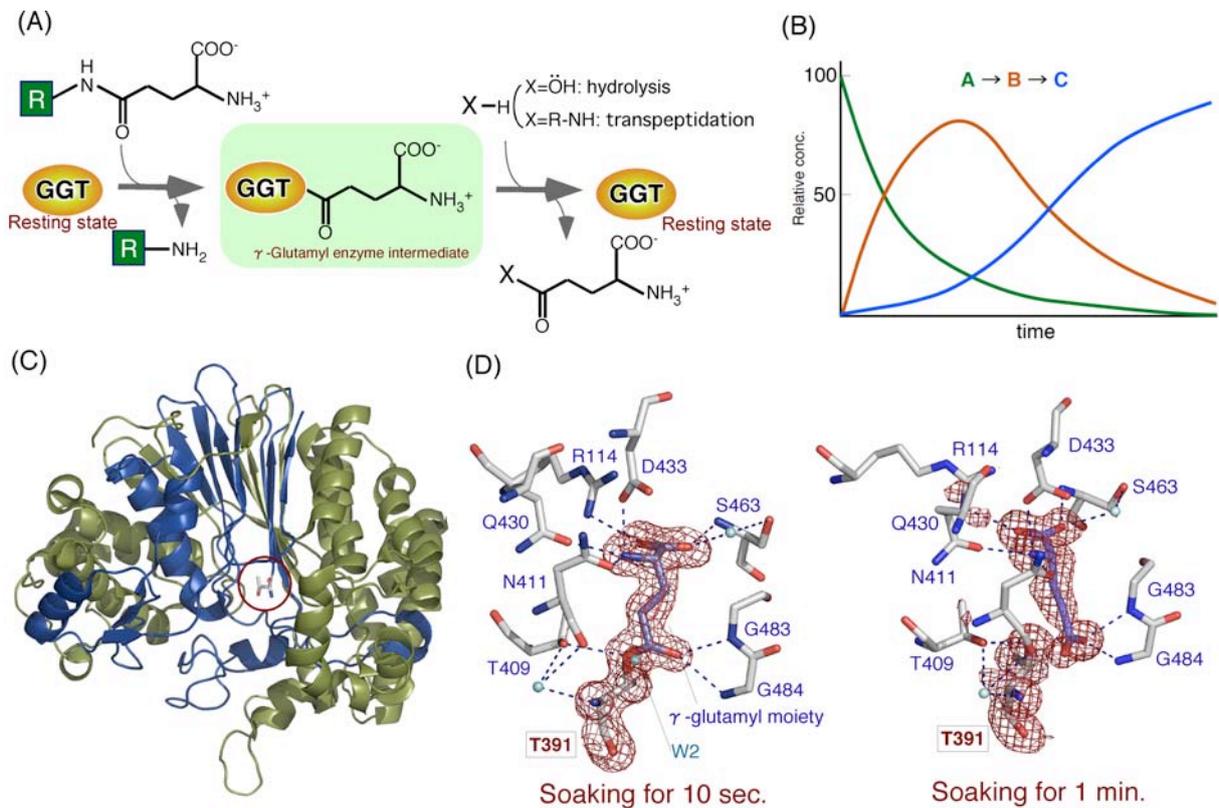


図2. GGTの反応と構造

(A) GGTの2段階反応。一段階目の反応後に、GGTの活性残基(Thr)と基質に由来する γ -グルタミル基が結合した γ -グルタミル酵素中間体が生成する。(B) 2段階反応における3状態の構成比率の経時変化。(C) 大腸菌GGTの立体構造。中央(赤丸)に活性残基Thr391がある。緑:L-サブユニット、青:S-サブユニット。(D) GGT結晶を基質溶液に一定時間ソーキングした後の電子密度。

段階反応の場合、反応前、中間体、反応後にある状態の構成比の経時的変化は図2Bのようになる。X線結晶解析では、時間的・空間的平均の電子密度がみえるのであるから、回折測定に供する結晶中の分子種(の大多数)をいずれかの状態に揃えれば、それがみえることになる。

よく知られているように、タンパク質結晶はかなりの割合で水を含んでおり、タンパク質分子間には小分子やイオンが浸透できる水路がはり巡らされているようなものである。酵素結晶を低分子基質の溶液に浸せば、もし反応部位が水路に面していれば結晶中で反応が起こり、これによって結晶を壊すような構造変化がなければ、X線結晶解析できる。

ここでは大腸菌由来GGT結晶を、基質であるグルタチオンの溶液に様々な時間浸し、それぞれの結晶を急速凍結して反応を停止させた。それぞれの結晶について回折データを収集し、構造解析したところ、約10秒間グルタチオン溶液に浸した場合に、活性残基Thr391のO γ 原子に γ -グルタミル基がエステル結合でつ

ながっている電子密度がみえた(図2C,D)。すなわち、 γ -グルタミル-酵素中間体を捉えたといえ、どのように γ -グルタミル基がGGTに認識されているかが明らかになった。なお、本解析より前に、ヒトGGTで機能が損なわれる変異体が幾つか報告されていたが、ここで指摘されていたアミノ酸残基は α 位のアミノ基とカルボキシル基を認識している残基であった。本構造解析で特筆すべきは、この中間体のカルボニル炭素を攻撃するに適した位置に水分子(図2D左中のW2)がみえていることである。また、カルボニル酸素は2つのGly残基のNHと水素結合し、この後この中間体が加水分解される際にとる四面体形遷移状態を安定化するオキシアニオンホールの位置にある。より長くグルタチオン溶液に浸したGGT結晶では、Thr391O γ と γ -グルタミル基との間の結合は切れていた(図2D右)。ここでは γ -グルタミル基のC α -C β とC β -C γ 結合のねじれ角が変化しており、加水分解後はこのように生成物が構造変化・遊離し、酵素は休止状態に戻るであろう。

このような一連の解析から、GGTでは一段階目の反応が早く、2段階目の反応が遅い（結晶中で遅くなった）といえ、これ故に中間体が捉えられた。ここでとった方法では、GGTとグルタチオンとのES-complexの構造を捉えることは無理であった。なお、中間体の電子密度がみえたが、結晶中で何%がこの状態にあるか、結晶の表面と中心部での構成比率について定量的なことは何ともいえない。この結晶の場合、予想以上に早く基質が結晶中に浸透し、これが幸いして中間体が捉えられたという印象は強い。

5. 例2-2：より不安定な酵素反応の途中の状態を捉える⁶⁾

ここではヘムオキシゲナーゼ（HO）を用いて、より不安定な状態を捉えた方法を紹介する。HOはヘム代謝で主要な役割を担っている酵素で、O₂と還元力を利用して、ヘムのα位を特異的に開裂させる反応を触媒する。この反応は3段階からなり、各段階でO₂を一分子用い、最終的にビリベルジン、CO、Fe²⁺を生じる（図3A）⁷⁾。ヘムはHOにとって基質であると共に、補酵素でもある。注目すべきは2段階目で生じるCOである。よく知られているように、COはO₂よりはるかに強くヘムやその誘導体に結合する性質を持っている。発生したCOが存在する中で、3段階目

でHOはO₂をどのように選択しているのであろう？HO中のヘムにCOが結合しにくい分子機構はいくつかあるが⁸⁾、これに関連して、発生したCOを一時的にトラップする部位がHO中にあるのではないかと、あるとすればどこだろう？

この疑問に答えるため、我々は以下のように結晶解析法で取り組んだ。ここでは酵素反応でCOを発生させる代わりに、HO中のヘムにCOを結合させ（CO-heme-HO）、これにレーザー光を照射してCOを解離させることにした。CO-heme-HO結晶を回折計にマウントし、低温（～35K）で、まず薄暗くして回折データを収集した。次に、この結晶にレーザー光を照射しながら、他は全く同じ条件で回折データを収集した。これら2セットのデータ間の差（ $F_{\text{illuminated}} - F_{\text{dark}}$ ）を係数にした電子密度を図3Bに示す。予想通り、ヘム鉄に結合していたCOの箇所は、レーザー光照射によって電子密度が減少し、ヘムから少し離れた箇所でも電子密度が高くなった。このうちsite-2は疎水性のアミノ酸側鎖に囲まれたキャビティーであった。この結果から、光解離したCO（の一部）はこの部位にトラップされたといえる。電子密度の高さから、この実験条件では約10%のCOがヘム鉄から解離し、その約半分がこの部位にトラップされたと見積もられた。単一の結晶を用いて、レーザー光照射の有無以外

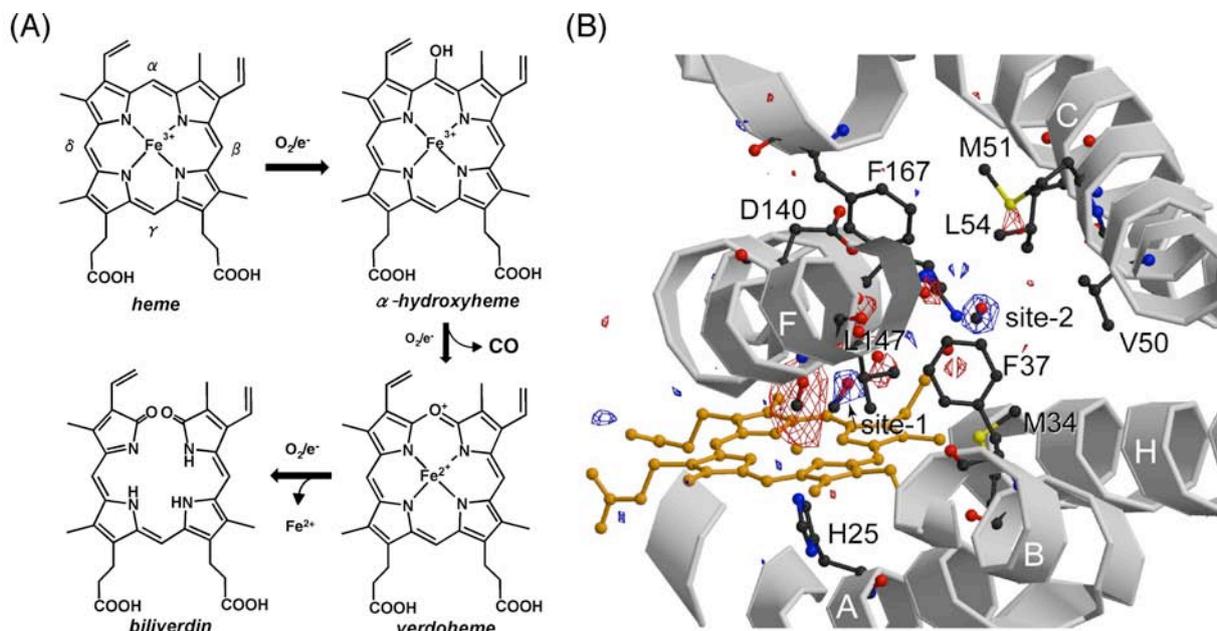


図3. HOが触媒する反応とCOの行方

(A) HOの3段階反応。HOは各段階で一分子のO₂を用い、2段階目でCOが生成する。(B) CO-heme-HO結晶の暗所とレーザー光照射の差の電子密度。レーザー光照射により減少した電子密度を赤で、増加した電子密度を青で示す。Bは生化学 77, 634-638 (2005)より許可を得て転載。

は全く同じ条件で測定した（電子密度のノイズを下げた）ので、このようなわずかな電子密度変化（水素原子の電子密度の高さに相当）を検知できたといえよう。ちなみに、heme-HO結晶にXeガスを充満させ加压した後急速凍結させると、同じ部位にXeに由来する電子密度が明瞭に見える。なお、COの代わりにCNを使った同様の実験では注目している部位に電子密度は見えなかったことから、この部位はイオンをトラップしないといえよう。これらの結果から、酵素反応で生じるCOもこの部位に一時的にトラップされ、これによってCOが幾らかでもヘム鉄に結合することを防いでいると考えている。

6. おわりに

X線結晶解析法が生来もつ制約（結晶でなければならぬ）の中で、不安定な分子の構造をみた例を幾つか紹介した。これらの例からわかるように、このような制約にどう対応するか、すなわち立体的に均一な分子が規則正しく配列した結晶をどう調製するかがキーポイントである。現在のX線解析技術で、結晶中の分子を同期させて同じように構造変化を起こすことができれば、ミリ秒オーダーの反応でも各ステップを捉えることができる。タンパク質分子の種類にかかわらず、適切な試料（結晶）が準備できたかどうか成否を分け、これをクリアーした場合にはこの方法からきわめて重要かつ豊富な情報が得られる。

参考文献

1. Shimomura, Y., Kamikubo, H., Nishi, Y., Masako, T., Kataoka, M., Kobayashi, Y., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2007) Characterization and crystallization of an IscU-type scaffold protein with bound [2Fe-2S] cluster from the hyperthermophile, *Aquifex aeolicus*, *J. Biochem.* 142, 577-586.
2. Shimomura, Y., Wada, K., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2008) The asymmetric trimeric architecture of [2Fe-2S] IscU: Implication for its scaffolding during iron-sulfur cluster biosynthesis, *J. Mol. Biol.* 383, 133-143.
3. Tokumoto, U., Kitamura, S., Fukuyama, K., and Takahashi, Y. (2004). Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: Functional replacement of the *isc* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*, *J. Biochem.* 136, 199-209.
4. Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H., and Fukuyama, K. (2006) Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme involved in glutathione metabolism, and its reaction intermediate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6471-6476.
5. 鈴木秀之, 和田啓, 福山恵一 (2009) γ -グルタミルトランスペプチダーゼの立体構造に基づいた成熟化と酵素反応機構, *蛋白質核酸酵素* 54, 245-251.
6. Sugishima, M., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2004) CO-trapping site in heme oxygenase revealed by photolysis of its CO-bound heme complex: Mechanism of escaping from product inhibition, *J. Mol. Biol.* 341, 7-13.
7. 杉島正一 (2007) ヘムの代謝にかかわる酵素の構造生物学, *日本結晶学会誌* 49, 99-106.
8. Sugishima, M., Sakamoto, H., Noguchi, M., and Fukuyama, K. (2003) Crystal structures of ferrous and CO-, CN-, and NO-bound forms of rat heme oxygenase-1 (HO-1) in complex with heme: Structural implications for discrimination between CO and O₂ in HO-1, *Biochemistry* 42, 9898-9905.