

業績紹介：イエロープロテインにおいて低障壁水素結合の存在を証明

片岡幹雄（奈良先端物質・公募研究代表者（現班友））

論文題目："Low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein"

著者：Shigeo Yamaguchi, Hironari Kamikubo, Kazuo Kurihara, Ryota Kuroki, Nobuo Niimura, Nobutaka Shimizu, Yoichi Yamazaki and Mikio Kataoka

雑誌巻号：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 440-444 (2009).

1990年代初頭より、低障壁水素結合(LBHB)が酵素活性の発現に寄与しているという主張がなされてきた。一方で、LBHB 形成の直接的証拠がないため、その主張に対する疑義も投げかけられている。LBHB の存在を証明するためには、水素原子の位置を同定し、ドナー原子、アクセプター原子の両者とも共有結合をしていないことを示す必要がある。イエロープロテイン(PYP)には、発色団の周囲に二つの短距離水素結合があり、LBHB の存在が議論されている。

本研究では、PYP の高分解能中性子結晶構造解析により、PYP の水素原子の位置を同定し、発色団周りの水素結合ネットワークや二つの短距離水素結合の実体を明らかにすることを目的にした。中性子回折実験のために調整した巨大結晶[1]は、室温でX線および中性子線に対しそれぞれ 1.25 Å、1.5 Åまで回折像を与えた。1.25 Å分解能のX線構造解析により、C、N、O、S の各原子を精密化し、それに基づき中性子構造解析によりH (D) を精密化するという中性子/X線併用解析法を開発し、1.5 Å分解能中性子構造を得た。

全 942 個の水素原子のうち 819 個の水素原子の位置を決定することに成功した。発色団と E46 の間の短距離水素結合においては、水素原子と E46 のカルボキシル酸素との距離は 1.21 Å、水素原子と発色団のフェノール酸素との距離は 1.37 Åであり、LBHB を形成していることが明らかとなった。一方、発色団と Y42 の間の短距離水素結合では、水素原子は Y42 のフェノール酸素に共有結合しており (距離 0.96 Å)、短距離イオン性水素結合と同定された。LBHB がタンパク質のしかも基底状態に存在することが証明されたのは、世界で初めてのことである。また、対イオンと考えられていた R52 は電荷を持っていないことも明らかにした。

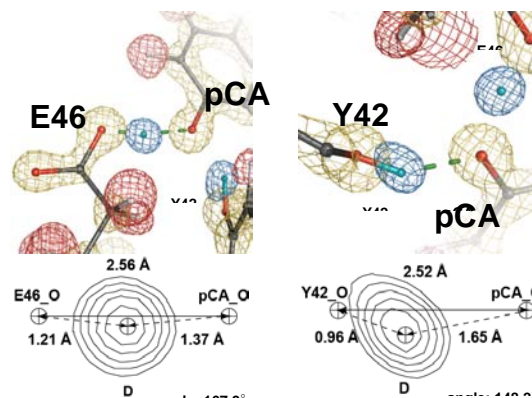


図 1. PYP の二つの短距離水素結合と水素 (重水素) 原子の位置。赤は水素原子、青は重水素原子を表す。

これまでの、発色団が脱プロトン化しているのに対し E46 がプロトン化しており、R52 の正電荷が発色団の負電荷を安定化していると信じられていた。しかし、

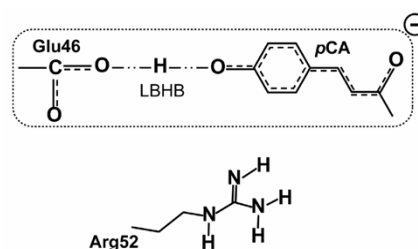


図 2. 提唱された電荷の安定化機構。

今回の結果は、これまで信じられていた機構は誤りであることを明瞭に示した。LBHB の強い結合エネルギーが静電エネルギーの不利を補い、LBHB 形成により π 電子系が発色団から E46 まで広がることで電荷密度を薄めているというタンパク質内部での疎水的環境下での孤立した負電荷の安定化機構が提唱された (図 2)。また、励起状態では発色団の電荷はアリル基側に局在する。これにより、プロトン親和性が変化し、E46 がプロトン化することで、通常の水素結合に緩和すると考えられる。つまり、発色団からタンパク質部分に情報が伝わることになり、これまでに知られていなかった情報伝達機構が提唱されたものである。

引用文献

[1] S. Yamaguchi *et al.*, and M. Kataoka, *Photochem. Photobiol.* **83**, 336-338 (2007)

