

# セルラーゼの中性子構造解析で明らかにするタンパク質における互変異の重要性

五十嵐圭日子

東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

VTT フィンランド技術研究センター Tietotie 2, Espoo FI-02044, Finland

立岡美夏子

海洋開発研究機構 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15

■要旨

電子による回折を観測する X 線構造解析とは異なり、中性子構造解析では原子核由来の回折を用いることから水素原子の可視化が可能となる。酵素の反応機構を考える上では、アミノ酸のプロトン化状態や水分子の配向などは極めて重要な情報である。著者らは二つのセルロース加水分解酵素（セルラーゼ）の中性子構造解析から、通常の溶液状態では安定に存在し得ないイミド酸型アスパラギン残基の活性への関与や、タンパク質骨格での互変異の連鎖に伴うプロトン移動が、加水分解反応において重要な役割を担っている可能性を示す。

## 1. はじめに

「ペプチドの二重結合性」という言葉は、様々な生化学の教科書に載っており、タンパク質構造学に携わる多くの方は、一度は耳にしたことがある言葉だと思う。Fig. 1 に示すように、ペプチド結合の炭素原子と窒素原子間の平均結合距離は約1.32 Å であるが、単結合 (C-N) の結合距離が約1.47 Å で二重結合 (C=N) が約1.25 Å であることを考えると、 $1.47 \times 0.3 + 1.25 \times 0.7 \approx 1.32$ 、すなわちペプチド結合が固定されているならタンパク質の中では7割のペプチド結合が二重結合であるということになるが、現実的には40%程度が Fig. 1 右側の様な構造をしていると考えられている。このペプチドの二重結合性をもう少し詳細に見ていくと、カルボニルの酸素が水酸基になり窒素が水素を一つ手放す、もしくは水酸基が O<sup>-</sup> となり N は水素を持ったままで + チャージを持つという「互変異 (tautomerization)」が起きていることが分かる。この互変異はあたかも炭素-窒素間が自然に二重結合を形成するように描かれているが、もともと電荷を持たない炭素につな

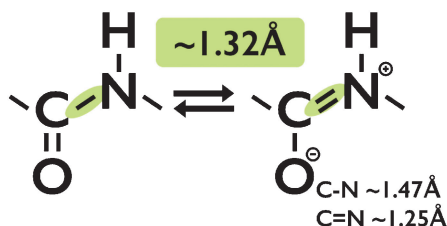


Fig. 1 (Color online) Amido-imidic acid tautomerization in peptide bonds.

がった酸素原子とペプチドの窒素原子が、それぞれ - (マイナス) と + (プラス) に分極することになるので、ここだけを見ると安定性が高いとは言えない。現に同じような構造を持つアスパラギン側鎖の水溶液中での挙動では、そのほとんどがアミド型、すなわち炭素-窒素間は単結合であり、炭素側はカルボニル、窒素側はアミドであることが大部分であると言える<sup>1)</sup>。そのように考えると、どのような機構でこの二重結合性が生じるのかということになるが、これにはタンパク質特有の環境が影響すると長年考えられている。1970年代に議論された「溶媒浸透モデル」や1980年代に議論された「呼吸モデル」どちらにおいても、Fig. 2 のように他のペプチドとのインタラクションによって「互変異の連鎖 (multiple tautomerization)」が起り、ペプチド結合間でプロトン (または水素原子) が移

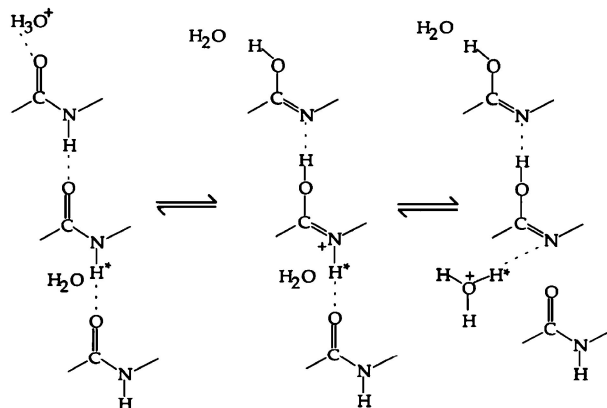


Fig. 2 The relayed imidic acid exchange mechanism of the amide protons (multiple tautomerization)<sup>2)</sup>.

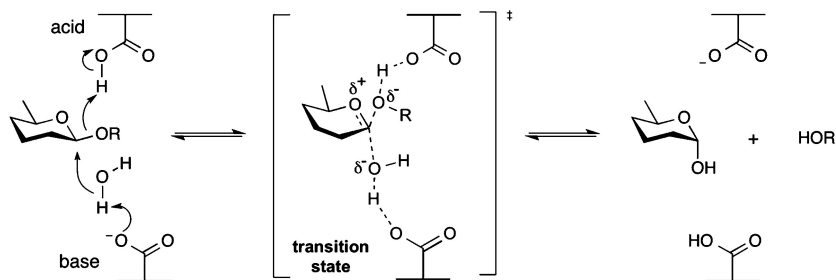
動するメカニズムが提唱されている<sup>2)</sup>。Fig. 2では初発がヒドロニウムイオン ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) であるが、もちろんこの状態はプロトン ( $\text{H}^+$ ) でも起こることである。これらのディスカッションの多くはタンパク質の外側から中へのプロトン移動という現象を説明するために行われてきたが、これはタンパク質内部であってもプロトンリッチなところを起点に起こる現象であることは言うまでもない。

## 2. 触媒残基が失われたセルラーゼの発見

著者らのグループが中性子構造解析に興味を持ち始めたのは、あるセルラーゼ（セルロースを加水分解する酵素）の活性中心に関して調べる必要性があったのがはじまりであった。きのこの一種である *Phanerochaete chrysosporium* という担子菌は、木材を非常に効率良く分解することが知られている。著者らは特に木材の主成分であるセルロースを分解する酵素のキャラクタライズを25年以上やってきているのだが、その過程で今世紀に入って本菌の全ゲノム配列情報が明らかとなり、これまでに調べられていなかった様々なセルラーゼの存在が明らかになってきた。そんな

ある時、セルラーゼ研究者のコミュニティの中で話題になったのが糖加水分解酵素（glycoside hydrolase, GH）ファミリー45に属するエンドグルカナーゼ（endo-glucanase, EG, 注：セルロース鎖をランダムに切断する酵素）に関してであった。このファミリーには、洗剤や飼料への利用が行われている有名な産業用セルラーゼが何種もあるが、一般的にカビから単離されたものが使われている。その他にも貝類や線虫など「自然界の掃除屋」として働いている生き物には広く分布しているのだが、なぜ地球上で最も強力な分解者であるキノコにはこの酵素がないのかという会話が発端だった。日常的に分解者としてのキノコの力を崇拝している私たちにとって、これだけ多くの生き物が利用している分解酵素がないということは、地球上で最強の分解者として侮辱を受けたように感じられた。そこで生物として近縁であるカビ由来の酵素の全長アミノ酸配列を使って本菌の全ゲノム配列情報に対して相同性検索プログラム（Blast）をかけてみるものの、確かに似たような配列は見当たらない。しかしながら、活性残基の一つ付近のアミノ酸配列だけを用いて網羅的に検索をかけてみると、非常に低い相同性ではあるがヒットする部分を含む遺伝子領域が

Inverting mechanism for a  $\beta$ -glycosidase:



Retaining mechanism for a  $\beta$ -glycosidase:

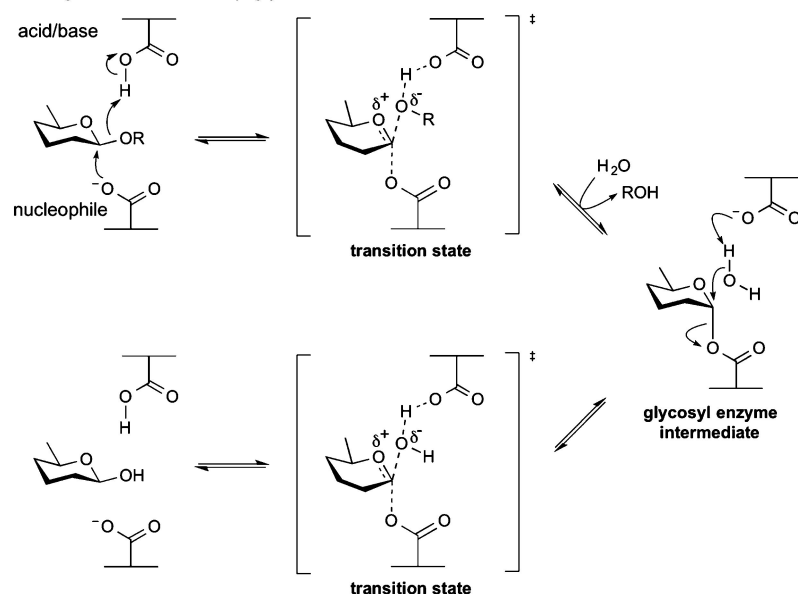


Fig. 3 Inverting (top) and retaining (bottom) mechanisms of glycoside hydrolase<sup>4)</sup>.

見つけた。その遺伝子をクローニングし、発現させてみると、組換えタンパク質には明らかなセルラーゼ活性があったことから、キノコにも本酵素があるということが証明できて、汚名返上につながったのであった<sup>3)</sup>。

しかしながら、ここで新たに問題となったのが「なぜ全長アミノ酸配列では Blast 検索に引っかからなかったのか」ということであった。配列をよく調べてみると、セルラーゼのような GH に必須と考えられている二つの酸性残基の一つが失われているのが原因であった。Fig. 3<sup>4)</sup>に示すように、セルラーゼでは一般的に加水分解後のアノマー炭素における水酸基の向きが  $\beta$  型であるものを「立体保持型 (retaining)」と呼び、 $\alpha$  型のものを「立体反転型 (inverting)」と呼ぶ。これは、セルロースはそもそもグルコースが  $\beta$ -1,4 結合した構造をしているため、その構造が保たれるように加水分解が起こることを「保持」と言い、裏返ることを「反転」としているからである。このどちらの反応メカニズムにおいても「二つの酸性残基」が触媒に関与することは教科書にも広く書かれているところであるが、そのうちの一個が無いというのが、私達が疑問を持ったところであった。「活性中心が無いのに活性がある」ということは新しい反応機構の存在を考えるには十分な理由であった。

私たちが本酵素の中性子構造解析に取り組もうと思ったもう一つの大きな理由は、本酵素の「結晶のできやすさ」であった。実は本組換え酵素に活性があった段階で「キノコの汚名返上」を達成していた著者らは、すでに論文が受理されて満足をしていたのだが、その酵素を冷蔵庫で保管している間に結晶ができていた。このようにしてできた結晶はヘテロなものが多く、構造解析には耐えないという噂も聞いたのだが、X 線をあててみるとサブオングストロームレベルの回折点が観測された。そこで本酵素の構造を X 線結晶構造解析で解き、これまでに構造が解かれた他の GH ファミリー 45 に属する酵素と比較してみると、他の酵素では塩基性残基として働くと考えられているアスパラギン酸に位置するアミノ酸がアスパラギンになっていた。本来この残基はプロトンを受け取る役割をしないといけないために、マイナスにチャージしたカルボン酸 (COO<sup>-</sup>) が必要なのであるが、アスパラギンではその役目ができない。しかしながら、実際にセルラーゼ活性は検出されており、それを説明するためには違う反応機構を考えないといけなかったのである。

### 3. 中性子構造解析の利点と技術的課題

これまで、セルラーゼを含む GH の反応機構解析は、X 線結晶構造をベースに行われてきた。しかしながら電子によって回折が起こる X 線では、このような酵素の第 2 基質である「水」は (水素がほとんど見えないため) 酸素原子としてしか評価ができないだけでなく、加水分解反応に

重要な役目を果たす H<sup>+</sup> は、電子を持たないために可視化できない。一方で中性子構造解析では回折は原子核で起こるため水は酸素原子だけの「球」ではなくきちんと「おにぎり型」に見えるだけでなく、プロトンの局在までも可視化することができる。そのように考えると X 線結晶構造解析と相補的に使われることが当たり前のように感じられるが、そう簡単にはいかない理由が中性子のビーム強度の弱さに起因する巨大結晶の必要性である。昨今では一辺が 0.1 mm を割るような (0.001 mm<sup>3</sup> 以下の) 小さな結晶でも、シンクロトロン放射光を用いて X 線回折データを取得することが一般的なのに対して、中性子構造解析では 1 mm<sup>3</sup> 程度の結晶、すなわち 1000 倍ものサイズが必要ということになる。形を見ることが目的であれば X 線結晶構造解析で十分であり、それは Protein Data Bank (PDB) に登録されている X 線結晶構造解析結果が 13 万件にも達しているのに対して、中性子 (を含む) 構造解析結果が 100 件程度しか無い事からも明らかである。一方で酵素の反応性を調べるような目的では、水分子の向きや、プロトンの局在が分からない状態は暗闇で捜し物をしている様な状態であると言える。本酵素の「結晶のできやすさ」と「特殊な反応機構」が中性子構造解析を推し進める原動力となった。

### 4. セルラーゼ PcCel45A の中性子構造解析

上述のように、冷蔵庫でできた結晶を用いることで、*P. chrysosporium* 由来 GH ファミリー 45 セルラーゼ (PcCel45A) の X 線構造解析には成功していたが、中性子構造解析のためには安定な結晶生成条件の検討が必要であった。最終的には 3-メチル-1,5-ペンタンジオールという特殊な MPD (注: 通常 MPD は 2-メチル-2,4-ペンタンジオールのことを言う) を使うことで安定な結晶生成条件を確立し、さらにタンパク質濃度と沈澱剤濃度をそれぞれ X 軸と Y 軸にとった相図の作成により、6 mm<sup>3</sup> もの巨大な結晶作成に成功した<sup>5,6)</sup>。本実験に関しては、本酵素の「結晶のできやすさ」を考慮して JAXA との共同研究で行っていた微小重力下でのタンパク質結晶化実験を忘れてはならない。当時はまだ宇宙実験で生成した結晶を中性子構造解析に用いるというスキームが完成していなかったため、宇宙実験を行うために条件検討をし、その条件を用いて地上で巨大結晶を作るというプロセスであった。その条件検討の中では非常に高品質な結晶もでき、リガンド結合状態の PcCel45A を X 線結晶構造解析した結果は、PDB に登録されている中で「酵素の X 線結晶構造解析における最高解像度」であるとして、ギネス世界記録™ に認定されたことも特筆すべきであろう。大型結晶を得るために最も必要なことは結晶の質であり、そのために必要なことはタンパク質の精製度と結晶生成条件の詳細な解析であり、最終的にはそれだけの実験に耐えられるだけの目的タ



ンパク質の生産量ということになる。どれか一つでも条件が欠ければ、巨大結晶作製→中性子構造解析は不可能であった。そのような高品質大型結晶を用いても、データ取得には約2週間もの連続したビームタイムが必要であったが、そもそもタンパク質の中性子構造解析に取り組んでいる研究者は少なく、私たちのサンプルに対するデータ取得の時間を割り当ててもらえた。加えて、2013年には iBIX（茨城県生命物質構造解析装置）の拡張工事が終わり、高感度に均一なデータ取得ができる検出器が従来の倍以上（30台）に増え、さらに線源の出力強度が高い状態でデータを取得できたため、中性子構造としては解像度が高いデータセットが取得できたのであった。

しかしながら、はじめて中性子散乱密度マップを見たときは（高解像度 X 線構造を見慣れ始めていたせい）非常にノイズが多く、さらに使用した特殊な MPD のせいで重水への置換率もそれほど高くできなかったために、データ取得当初は本当に新しい情報が含まれているのか不安であった。その後解析を進めていって分かったことは、まず水がきちんと水の形（H-O-H）に見えていることであった。上述のように X 線結晶構造解析では水は酸素原子のみの球しか見えておらず、そのためどの方向に対しても言わば「作作的に」水素結合を作ることにはできた。しかしながら中性子構造解析ではそのようなことは不可能であった。例えば、中性子構造解析できちんと「おにぎり型」の水が見えている時は、その水素から離れる方向と酸素の非共有電子対に向かう方向にしか水素結合が起これないために、適当な線を引くわけにはいかない。一方で、水素が見えていないと言うことは、水分子自体が回転していることが考えられ、そのような水分子に対して水素結合というものを考えて良いのかということにもなる。さらに、どちらか片方だけの水素が見えている状態では、水分子における水素が片方だけ固定されている様な状態や水酸化物イオンなどを考えなければならない。つまり、これまで X 線結晶構造解析で（言い方は悪いが）「適当に」または「作作的に」行ってきた議論は、中性子構造解析では通用しないということなのである。また、付加的な要素としては X 線結晶構造解析との温度の違いもあった。現在、iBIX では主に常温（25℃）でデータ取得を行っているため、それに合わせて X 線の結晶構造解析も常温で行っている。そうすると液体窒素温度下で解いた構造と最も大きく異なるのは水の挙動なのである。著者らが構造解析を行った *PcCel45A* の場合は、100 K で取得したデータには一分子辺り 273 個の水分子が観察できたが、それを常温でデータ取得をすると 140 個まで減っていた。さらにクライオ条件で活性中心付近に当てはまっていた緩衝液の Tris 分子が、常温では見えない。この Tris 分子が活性中心付近に結合していたので、活性を阻害するのではないかと考えて阻害実験をしたが、1 mol/L まで濃度を上げてても活性は阻害されなかった。これらの現象を統合して考えると、液体

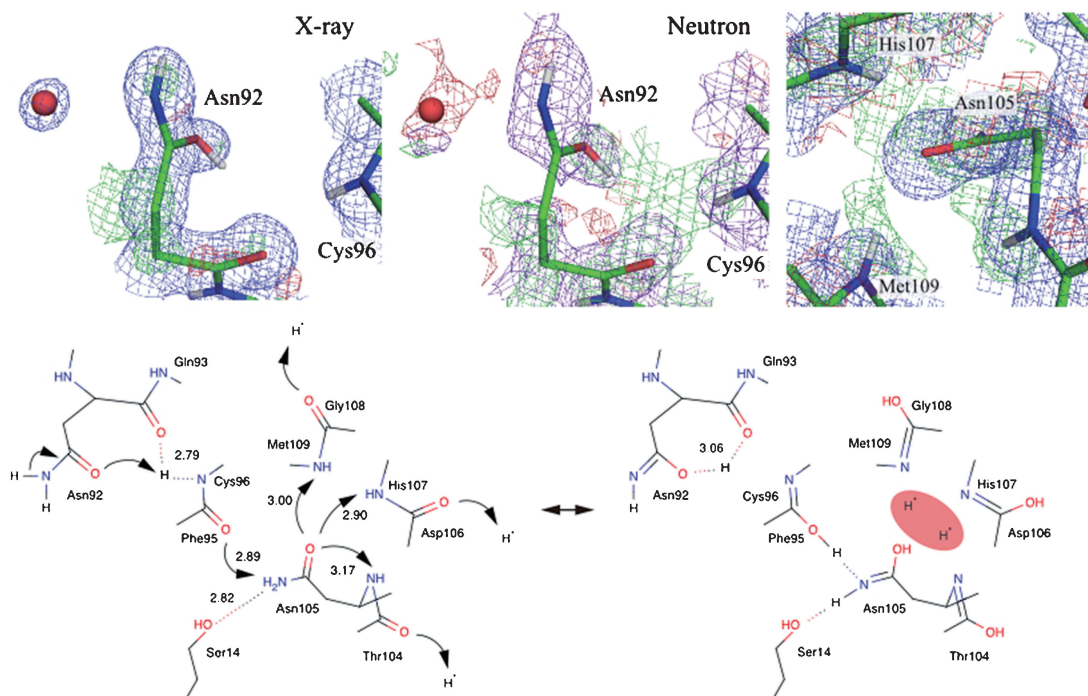
窒素条件では水分子や緩衝液の成分など濃度が高くフリーな分子は「凍り付いている」状態のものもあり、そのような凍り付いた水分子に関して「反応点との距離が  $\sim 0.1$  Å なので反応に関わっている水分子である…」というようなディスカッションはできないということになる。そう考えると、タンパク質の X 線結晶構造解析が始められた頃は常温で構造解析をしていたのに、いつ頃からか液体窒素で冷やすのは当たり前のことになっていて、さらに私たちの世代では「結晶は凍らせて当たり前」という状態になってしまっていたことに気付くのである。水の動きが止まればもちろん結晶構造の解像度は上がる。また、結晶の温度を下げないと X 線によって「焼けて」しまうので、小さい結晶では（場所を変えて X 線を当てることが出来ない）常温での回折データ取得ができない。このような「凍り付いた分子の情報」しか得られていない昨今の X 線結晶構造解析の現状は、より小さい結晶でより高解像度のデータ取得を目指してきた代償であったと言えべきであろう。

## 5. *PcCel45A* における互変異の連鎖と反応機構

中性子構造解析には、その他にも様々な難点があったが、一番大変だったのは決められた解析手法がないことであった。現在では Phenix という構造解析統合ソフトを用いれば X 線と中性子の共解析が可能である。しかしながら私たちが *PcCel45A* の解析をしながら気づいたことは「リファインメント（構造精密化）」の罠であった。X 線結晶構造解析では、電子密度にモデルを当てはめて C, N, O の位置をリファインメントし、R 因子を下げることは正しいモデルを得るために重要になる。一方で、上述のように互変異を起こして窒素と酸素の間を行き交う水素に関してはどう考えれば良いのだろうか？ X 線/中性子共解析では、X 線結晶構造解析で得られた C, N, O の位置をそのまま中性子散乱密度に重ねると、各原子間に雲のように見える中性子散乱密度 ( $F_o - F_c$ ) が水素の分布を示していることになる。このようなデータの片方（例えば窒素）に水素を付けてリファインメントをすれば NH としてモデルが計算されて水素の分布が消え、反対に酸素に付ければ OH としてリファインメントが行われて同様にその分布が消えるという現実であった。しかもペプチド結合は全てのソフトウェアで単結合 (O=C-NH) として精密化が進み、このプロセスの中で「互変異」の情報が失われるという現実であった。もちろん C-N 原子間距離がそもそも 1.32 Å に設定してあれば、X 線構造における位置情報としては正しいが、「水素を置く」という作業をした瞬間に「水素の動き」は全て消される訳である。すなわち、リファインメントという作業は動くものには通用しないという現実を突きつけられてはじめて、今まで私たちがいかに静的 (static) に構造情報を読んでいたかを知ったわけである。

このような状況の中で、なるべく生データに忠実に、つまり X 線から得られた C, N, O の情報を中性子回折データに取り込み、リファインメントをしない状態で  $F_0-F_c$  マップを詳細に読み解いていくと、プロトンや水素に関する様々な情報が得られることが分かった。その中で最も重要な情報の一つが、活性中心だと考えられている92番目のアスパラギン残基に関してであった。通常のアミド型 ( $O=C-NH_2$ ) の側鎖がうまく密度マップに当てはまらないのに対して、イミド酸型 ( $HO-C-NH$ ) の方が、明らかに中性子散乱密度をうまく説明できるのである。最初に述べたようにアスパラギンの側鎖は、ペプチド結合と同じ構造を持っており、カルボニルとアミドの間に二重結合を作ることによって互変異が起こることは可能である。しかしながら、溶液中ではその確率は非常に低く、過去の議論ではこの可能性は否定されていた。一方で私たちが得た結果は明らかにイミド酸の安定化が起こっていることを示しているため、その機構を明らかにするために互変異の連鎖を辿ることにした。すると92番アスパラギン側鎖は、同じ (92番) アスパラギンの主鎖のペプチド結合を介して96番システインにおける主鎖の N と水素結合をしており、その窒素と二重結合を形成する95番フェニルアラニンの主鎖の炭素に結合している酸素が、105番アスパラギン側鎖の窒素と水素結合を形成していた (Fig. 4)。105番アスパラギン側鎖の酸素原子は、中性子散乱密度が濃く出ているのに

X 線では全く見えない穴 (ドーナツホール) になっているところ、すなわちプロトンが局在していると考えられる「プロトン溜まり (proton pool)」に接している状態であることが分かった。つまり、互変異の連鎖は二つのアスパラギン (92番と105番) 間でペプチド結合を仲介役として起こっており、プロトン溜まりから押し出したり、戻したりできるようにデザインされていることが分かったのである。このような水素結合の場合は Fig. 4 に示したように、プロトンは窒素原子と酸素原子の間に広く分布している様子が観察される。原子間距離 ( $\sim 2.8 \text{ \AA}$ ) から考えても「低障壁水素結合 (low-barrier hydrogen bond)」よりはむしろ「対称性水素結合 (symmetric hydrogen bond)」であろうと考えているが、そもそもこの原子間にいくつのプロトンがあるかも分からず、しかも分布をしているということは分子毎に違うことは明らかであることから、それ以上の情報は得られていない。さらに、その先を辿っていくと、105番アスパラギン→14番セリン→112番ヒスチジン→16番スレオニン→114番アスパラギン酸というように、いずれも側鎖の水素結合によってつながっていることが分かった。後半の水素結合の場合はどの組合せにおいても手前のアミノ酸側に水素の局在が見えたことから、一般的な水素結合であると考えられたが、特筆すべきは最後の114番アスパラギン酸は、加水分解に必要なもう一つの酸性アミノ酸であることである。すなわち、上述の水素結合ネッ



**Fig. 4** (Color online) Proton relay stabilizing the imidic acid state of Asn92<sup>6)</sup>. The X-ray and neutron H/D omit maps around the proposed proton pool regions are shown (top). In the X-ray map, hydrogen atoms are invisible in either  $2F_0-F_c$  map (blue) or  $F_0-F_c$  map (red and green). In the neutron map, the single deuterium atom (ND1) of Asn92 is visible in  $2F_0-F_c$  map (purple) and continuous  $F_0-F_c$  positive maps (green) are observed around the peptide chain. Proposed mechanism of formation of the imidic acid form of Asn92 is illustrated (bottom).

トワークは、セルロースの加水分解に重要な二つのアミノ酸の間に形成されており、片側から突けば反対側に受け渡されるような「かちかち玉（英語では Newton's cradle）」のような機構で、プロトンの授受ができるようにデザインされていることが分かったのである<sup>6)</sup>。

## 6. 立体反転型セルラーゼ *PcCel6A* の反応機構解明に向けて

求核分子が水である立体反転型酵素では、*PcCel45A*に限らず、三次元構造上のアミノ酸配置のみからではその反応機構を決められないことは珍しくない。本研究室で次に中性子構造解析を目指したセルラーゼ *PcCel6A* は、多数の X 線結晶構造が解かれているにも関わらず触媒残基や反応機構の議論に決着がついていない立体反転型の GH ファミリー 6 に属する酵素である。本酵素の面白さもまた、セルラーゼとしては非常に優秀な酵素であるにも関わらず、水の活性化とプロトン受容に関わる一般塩基触媒にあたるアミノ酸が見当たらないという点である。

GH ファミリー 6 は、カビやキノコ、バクテリアなどの微生物が広く保有するセルラーゼのファミリーであり、結晶性セルロースを分解する際に主力となるセロビオヒドロラーゼ (cellobiohydrolase, CBH, 注: セルロース鎖を末端からセロビオース単位に分解する酵素) を含むことから、世界中で盛んに研究が進められてきた。1990年にはカビ由来の CBH の X 線結晶構造がセルラーゼとして最初に明らかになっており、反応機構の検討の歴史も長い。これまでで最もインパクトの高い仕事として、水分子を介したプロトン伝達 (Grotthuss 機構) の考え方を取り入れた反応機構の提案が Koivula らによってなされた<sup>7)</sup>。触媒中心に水分子が配列することにより、求核水から水分子ひとつ離れたアスパラギン酸がプロトンを受け取ることを提案しており、この発表以降、X 線結晶構造で頻りに 2 つの水の存在が確認されたり、分子動力学計算による評価が行われたりなど、多くのグループが Koivula らの提案をサポートしている<sup>8,9)</sup>。しかしながら、水分子の配向に関わるアミノ酸は CBH のみに存在するループ領域にあることから、同じファミリーに属するバクテリア由来の EG では、依然としてアルギニンと対になっている全く別のアスパラギン酸が一般塩基触媒であると主張されている<sup>10)</sup>。したがって、GH ファミリー 6 の触媒残基と反応機構については現在に至るまで決着がついておらず、X 線結晶構造が決定されて四半世紀後になお中性子構造解析による詳細な検討が必要であるのは、このような水分子に関わる謎が多いことが理由である。

## 7. セルラーゼ *PcCel6A* の中性子構造解析

*PcCel6A* についても初期の結晶化条件からの検討を続

けることによって高品質な結晶の作製が可能となり、X 線回折測定 (100 K) では分解能 0.8 Å 程度のデータを取得するまでに至った。軽水条件下で仕込んだ結晶で中性子回折測定が可能な結晶が得られたため、重水置換を行った後、中性子回折測定でも分解能 2 Å を超えるデータを取得することができた。得られたデータについては現在解析中であるが、興味深い点が多くすでいくつか見出されたので紹介したい。まず、*PcCel45A* で特徴的であったイミド酸型のアスパラギンが *PcCel6A* のアポ体 (基質無し) の構造にも存在することがわかった。基質結合部位付近に存在する 300 番アスパラギンは窒素原子に重水素原子由来の中性子散乱密度が一方しか観測されず、また、酸素原子がペプチド主鎖のアミドと水素を共有する形を取ることでイミド酸が安定化されやすい構造をとっていた (Fig. 5)。さらにそのペプチド主鎖をたどっていくと、きれいに配向した水が塩基性アミノ酸の 347 番アルギニンへとつながっている (Fig. 5, root-A)。ここで、*PcCel6A* の反応機構を考える上で特筆すべきは、この 347 番アルギニンは 394 番アスパラギン酸と対になっている点である。394 番アスパラギン酸は一般酸触媒と向かい合う基質結合部位に位置し、バクテリア由来の EG では一般塩基触媒であると主張されている残基である。しかしながら、基質認識への関与やアルギニンとの安定な塩橋の形成によって触媒反応には直接関わらないという反論に対して、一般塩基触媒として反応に関与する機構はこれまで全く説明できていなかった。一方で、今回の中性子構造解析の結果からは、347 番アルギニンからイミド酸型の 300 番アスパラギンまでの領域が、通常よりプロトンが一つ足りない状態で存在し得ることを示している。むしろ、394 番アスパラギン酸は 347 番アルギニンと対になることでプロトンを受容し伝搬させ得るのではないかと示唆された。さらにこの 347 番アルギニンに着目してペプチド結合に沿った別方向の水素結合を注意深く見ていくと、また特徴的な中性子マップを持つ領域が現れることが分かった。299 番アラニンへの水素結合から最終的に溶媒と接する 298 番バリンのアミドは、重水と接しているにも関わらず、軽水素のまま観測されるほど重水置換が遅いアミドであった (Fig. 5, root-B) ことから、ペプチドのネットワークの寄与によってより強固な N-H

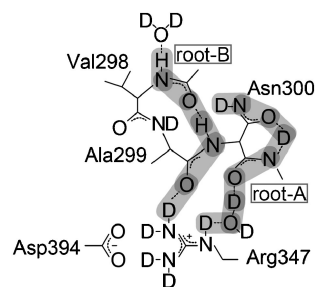


Fig. 5 Proton network observed in the *PcCel6A* catalytic site.



結合が形成されているのではないかと考えられた。このようにペプチド結合や配向した水を経由して394番アスパラギン酸が特異的な領域につながっていたことは予め推測していた結果ではない。中性子構造解析に基づく発見であり、394番アスパラギン酸の一般塩基触媒としての役割を再認識し、これまで検討されてこなかったタンパク質骨格を利用した新しい反応機構を考えるきっかけとなった。

一方で、Koivula らが提案した水分子の配列が関与する機構に関しては、当初中性子構造解析で水の配向を明らかにすることで議論を深められるのではないかと考えていた。しかしながら、常温でのX線結晶構造解析の結果、電子密度が広範囲に分布しているため酸素原子の位置を定めることができず、中性子回折のデータと合わせて配向が決まるような水分子ではないことがわかった。同じ条件の100 KでのX線結晶構造解析では水分子はきれいに配列していたことから、凍結状態での立体構造に基づいた反応機構の議論におけるリスクを再認識する結果となった。水分子の配列によるGrotthuss機構はGHファミリー6の反応機構として広く支持されている機構であったが、常温では水分子の位置が動いていることや、アルギニンとアスパラギン酸の対がプロトンポンプの役割を持つ可能性を示唆する今回の中性子構造解析によって、GHファミリー6の反応機構の再考が必要になってくるのは確実である。

## 8. おわりに

2つの立体反転型セルラーゼ *PcCel45A* と *PcCel6A* の中性子構造解析の結果をもとに、タンパク質内でのイミド酸型のアスパラギン残基の存在やペプチド結合の互変異について紹介した。このように中性子構造解析の結果から、タンパク質内部には一見予測していなかった特異な状態を取る構造が存在することが明るみに出るようになってきた。一般的なpHでは脱プロトン化されないはずのアルギニンやリジンが中性状態として存在し反応に寄与する例<sup>11-13)</sup>や、今回紹介した互変異のように水素原子を互いに共有する構造<sup>14)</sup>なども次々に報告されている。つまり、このようなタンパク質の中でのみ生み出される特殊な局所環境こそが、常温常圧下で様々な化学反応を担える触媒としての本質であり、中性子構造解析の威力はこれを検出できることにある。また、触媒反応におけるペプチド結合の互変異の重要性はほとんど指摘されて来なかったが、タンパク質骨格を介したプロトン移動を考えることで触媒活性を示さないと考えられていたアミノ酸までが反応を仲介できることが今回明らかになった。これまで加水分解酵素の反応機構を考えるにあたっては最終的なプロトンキャリアとなる酸性アミノ酸が触媒残基とされてきたが、タンパク質骨格や水分子も含めた触媒反応を担う領域を議論することが今後重要になるのではないだろうか。

水素原子の解析に耐えうる中性子回折データを得るには

依然として結晶の大型化はボトルネックであるが、著者らの実験の最中にも中性子構造解析は着実に進んでいっている。*PcCel6A* の中性子回折データは0.5 mm<sup>3</sup>程度のサイズの結晶から得られているし、回折斑点強度をより高精度に決定するプロファイルフィッティング法による回折データ処理<sup>15)</sup>も検討することができた。今後はより高精度な水素原子の可視化が可能なD/Hコントラスト法<sup>16)</sup>などをあわせて詳細な解析を行い、反応機構を明らかにしていきたい。

## 謝辞

*PcCel45A* に関する研究<sup>6)</sup>は、現分子科学研究所の中村彰彦助教、現宇宙航空研究開発機構の石田卓也博士、東京大学大学院農学生命科学研究科の鮫島正浩教授らともに行った。また、*PcCel6A* の生産、精製、結晶化から構造解析に至るまでのご指導をいただいた。本研究の中性子構造解析及び結晶化の検討は、茨城大学の新村信雄特命研究員、田中伊知郎教授、日下勝弘教授、山田太郎准教授、矢野直峰助教、(株)コンフォーカルサイエンスの田仲広明博士、高橋幸子氏、(株)丸和栄養食品の伊中浩治博士など多くの方々の協力をいただいた。またJ-PARC MLFのスタッフや高エネルギー加速器研究機構のスタッフの皆様の支援の下でデータ収集を行った。その他本研究にご協力いただいたすべての方々に感謝したい。

## 参考文献

- 1) C. L. Perrin: *Science* **266**, 1665 (1994).
- 2) M. A. Eriksson, T. Härd and L. Nilsson: *Biophys. J.* **69**, 329 (1995).
- 3) K. Igarashi, T. Ishida, C. Hori and M. Samejima: *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5628 (2008).
- 4) CAZypedia, URL <http://www.cazypedia.org>
- 5) A. Nakamura, T. Ishida, S. Fushinobu, K. Kusaka, I. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, M. Masaki, K. Ohta, S. Kaneko, N. Niimura, K. Igarashi and M. Samajima: *J. Synchrotron Radiat.* **20**, 859 (2013).
- 6) A. Nakamura, T. Ishida, K. Kusaka, T. Yamada, S. Fushinobu, I. Tanaka, S. Kaneko, K. Ohta, H. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, N. Niimura, M. Samejima and K. Igarashi: *Sci. Adv.* **1**, e1500263 (2015).
- 7) A. Koivula, L. Ruohonen, G. Wohlfahrt, T. Reinikainen, T. A. Teeri, K. Piens, M. Claeysens, M. Weber, A. Vasella, D. Becker, M. L. Sinnott, J.-Y. Zou, G. J. Kleywegt, M. Szardenings, J. Ståhlberg and T. A. Jones: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10015 (2002).
- 8) C. M. Payne, B. C. Knott, H. B. Mayes, H. Hansson, M. E. Himmel, M. Sandgren, J. Ståhlberg and G. T. Beckham: *Chem. Rev.* **115**, 1308 (2015).
- 9) H. B. Mayes, B. C. Knott, M. F. Crowley, L. J. Broadbelt, J. Ståhlberg and G. T. Beckham: *Chem. Sci.* **7**, 5955 (2016).
- 10) D. W. Cockburn, C. Vandenende and A. J. Clarke: *Biochemistry* **49**, 2042 (2010).
- 11) T. Hiromoto, F. Meilleur, R. Shimizu, C. Shibasaki, M. Adachi, T. Tamada and R. Kuroki: *Protein Sci.* **26**, 1953 (2017).

- 12) K. Yonezawa, N. Shimizu, K. Kurihara, Y. Yamazaki, H. Kamikubo and M. Kataoka: *Sci. Rep.* **7**, 9361 (2017).
- 13) M. P. Blakeley, F. Ruiz, R. Cachau, I. Hazemann, F. Meilleur, A. Mitschler, S. Ginell, P. Afonine, O. N. Ventura, A. Cousido-Siah, M. Haertlein, A. Joachimiak, D. Myles and A. Podjarny: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 1844 (2008).
- 14) E. Golden, L. Yu, F. Meilleur, M. P. Blakeley, A. P. Duff, A. Karton and A. Vrielink: *Sci. Rep.* **7**, 40517 (2016).
- 15) N. Yano, T. Yamada, T. Hosoya, T. Ohhara, I. Tanaka and K. Kusaka: *Sci. Rep.* **6**, 36628 (2016).
- 16) T. Chatake and S. Fujiwara: *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **72**, 71 (2016).

## 著者紹介



### 五十嵐圭日子

東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

VTT フィンランド技術研究センター 客員教授

E-mail: aquarius@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

専門：生化学，バイオマス生物学

#### 【略歴】

1999年，東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻博士課程修了，博士（農学）。1999年～2002年，日本学術振興会特別研究員（PD），ウプサラ大学博士研究員。2002年～2007年，東京大学大学院農学生命科学研究科助手，2007年～2009年，同助教，2009年より同准教授。2016年よりVTT フィンランド技術研究センター客員教授。2018年より国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）フェロー。



### 立岡美夏子

海洋研究開発機構 日本学術振興会特別研究員（PD）

E-mail: tachiokam@jamstec.go.jp

専門：酵素化学

#### 【略歴】

2018年，東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻博士課程修了，博士（農学）。2015年～2018年，日本学術振興会特別研究員（DC1）。2018年より日本学術振興会特別研究員（PD）。

## Importance of tautomerization in proteins clarified by neutron crystallography of cellulases

**Kiyohiko IGARASHI** The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

VTT Technical Research Centre of Finland, Tietotie 2, Espoo FI-02044, Finland

**Mikako TACHIOKA** Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15, Natsushima-cho, Yokosuka-city, Kanagawa, 237-0061, Japan

**Abstract** Neutron crystallography enables us to visualize hydrogen atoms because neutrons are scattered by nuclei, whereas X-ray is scattered by electrons. Protonation states of amino acids and orientations of water molecules are extremely important to consider the mechanisms of enzymes. We found the importance of imidic acid form of asparagine residue in two cellulase structures although it is believed to be unstable in solutions, and proton transfer mediated by multiple tautomerizations in the protein main chains should be important for hydrolysis to occur in these enzymes.