

# 応用講座 1 タンパク質結晶解析

姫路工業大学大学院理学研究科

樋口芳樹

タンパク質等生体高分子の X 線結晶解析の手順はおよそ以下のような流れになる。それらは、(1) 結晶解析すべき試料の抽出・精製・結晶化、(2) X 線回折データの収集とデータ処理、(3) 結晶構造解析（位相の決定）、(4) モデルビルディングと構造精密化である。それぞれの手順においてタンパク質結晶学における独特の手法・技術が多く開発されており、研究者は自分の試料の構造解析に最も適した手法を選ぶことになる。上記手順のうち、(1) の結晶化、(2) の全般、(3) のモデルビルディングについては本学校の実習で計画されている。本講義では、(1) と (3) において実習での説明と重ならない部分でタンパク質結晶学で最も典型的な手法をいくつか挙げて紹介する。

## 1. 生体高分子の結晶化

タンパク質の結晶構造解析を成功に導くために最も重要でしかも最初の大きな難関となるのが結晶化である。近年、タンパク質のいろいろな性質（親水性・疎水性・不溶性・酸素安定性など）に適した試薬や道具類・方法が数多く開発されてきている。試薬については、いわゆるスクリーニングキットと呼ばれるものが Hampton Research 社、Emerald Biostructure 社、Jena Bio Science 社、Molecular Dimensions 社など多くの企業で製造・販売されている。それらはこれまでにタンパク質の結晶化に使われた沈殿剤・緩衝液・添加剤などについての結晶化データベースを検索し、濃度や pHなどを適当な範囲で変化させて企業独自に調製したものである。最近の種類も多くなり、またこれらの試薬の管理・保存が簡単なため、結晶化を狙う者はまずこれらのキットを使うのが一般的となっている。キットを使い、微結晶あるいはスフェライトと呼ばれる球晶状の沈殿物が得られた段階で試薬を自分で調製して結晶化条件をさらに精密化していけばよい。また、X 線回折実験において輝度の高い放射光 X 線を使うことが一般的となった昨今では、結晶化条件のスクリーニング時に最初から不凍液の添加された条件（クライオ条件）でスクリーニングを行っておくのが後々便利であろう。新しい結

晶化の道具類や多くの条件を自動的に検索するためのロボットも開発され、タンパク質試料の量が十分であれば結晶化に成功する確率は以前と比べて格段に高くなった。

タンパク質分子の結晶化理論の研究も行われているが、まだまだ試行錯誤による経験的な手法に頼っているのが現状である。しかし、分子の凝集状態の均一性と結晶化の成功の確率にある程度の相関があることが示され、20年ほど昔と比べるとかなり系統的な実験ができるようになってきた。凝集状態から巻き戻し法により調製したタンパク質試料が一定の3次元構造を維持しているかどうかは昔から円偏光二色性を測定することで調べられていた。最近ではNMR法もよく利用されている。また、動的光散乱法により試料がその溶液状態において分子量的に均一であるかを調べる方法も広く利用されている。

結晶化の手法には(1)蒸気拡散法、(2)透析法、(3)バッチ法、(4)界面拡散法、(5)温度勾配法などがある。この中でも最もよく使われているのが蒸気拡散法である(図-1)。蒸気拡散法には1-10・1のタンパク質を含んだ溶液の液滴をその100倍程度の容量の沈殿剤外液に対して平衡化させる。タンパク質溶液の液滴をカバーガラスに吊り下げる形にする方法をハンギングドロップ法(図-1a)と言い、窪んだところに静置させる方法をシッティングドロップ法(図-1b)という。どちらの場合においてもタンパク質溶液と外液をある割合で混ぜた液滴を密閉系で外液に対して蒸気平衡させる。一般的には水分子が系の中で拡散平衡するので、タンパク質の濃度、沈殿剤の濃度の両方が変化する。結晶化をセットアップした後に微結晶などをシーディングする場合(図2参照)にはシッティングドロップ法が便利であろう。

最近、スペースシャトルに結晶化実験装置を乗せて宇宙で結晶化実験が行われるようになった。無重力の状態では重力による因子が除かれて、結晶性が良くなる(つまり結晶の回折分解能が上がる)という説がある。また、地上では結晶化できなかった試料が結晶化するのではないかという期待もある。



(a) ハンギングドロップ蒸気拡散法



(b) シッティングドロップ蒸気拡散法





-  タンパク質溶液液滴 (水分子 + 沈殿剤分子 + タンパク質分子)
-  沈殿剤分子
-  水分子
-  タンパク質結晶

図-1 蒸気拡散法によるタンパク質分子の結晶化

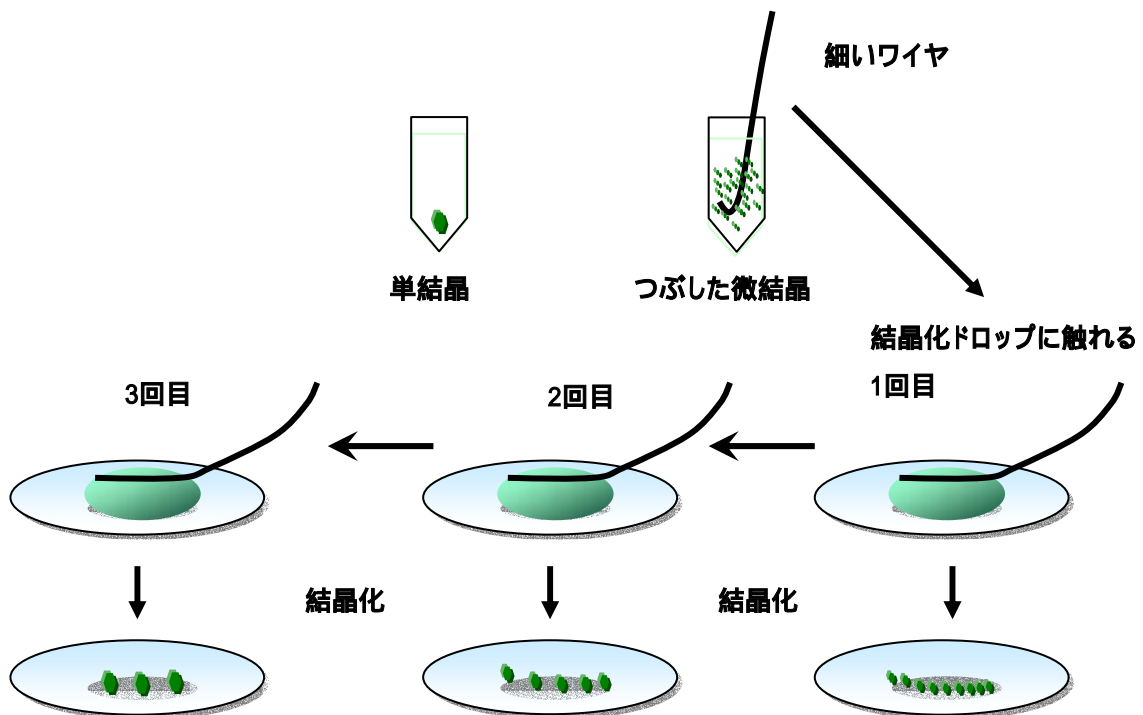


図-2 シーディング法によるタンパク質分子の結晶化

## 2. 結晶構造解析

タンパク質の結晶構造解析の場合も有機低分子結晶と同様，構造因子 ( $F(hkl)$ ) の失われた位相を求めることが課題である．これまでに開発されている手法のうちいくつかを紹介する．

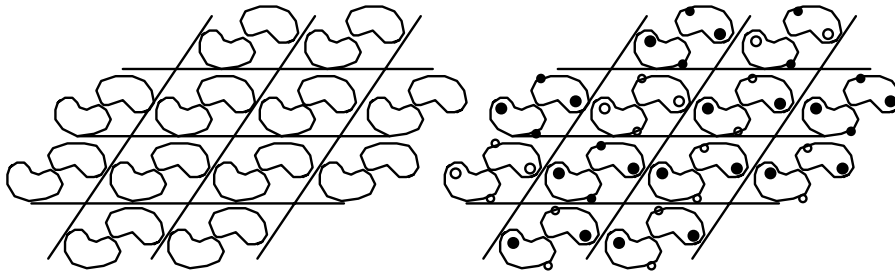
### 2-1. 分子置換法 (MR 法)

この方法は標的としている (解析しようとしている) タンパク質分子の立体構造全部，あるいは一部が，既に構造解析されている分子とよく似ていると期待される場合に有効である．立体構造がよく似ているかどうかは，アミノ酸配列の相同性や，それらの分子の機能がよく似ているなどのことから判断されるであろう．この手法は結晶化に成功し X 線回折データの収集に成功すればすぐに試すことができる．手続きの流れは簡単である．まず，回折実験で得られた構造因子 ( $|F_{obs}|$ ) を元に計算したパターン関数をモデル分子から計算したそれと比較してモデル分子が標的分子の結晶格子中でどのような配向にあるかを定める (回転関数法)．この時，パターン関数中の分子内ベクトル集合のみを使わないと分子の配向を正確に捕らえることが難しい．従って，モデル分子のパターン関数を計算する時の架空の格子定数の大きさや，比較するベクトルの大きさや分解能などに注意する必要がある．次に配向の決まったモデル分子が結晶格子中のどの位置にあるかを決めてから (並進関数法・R 値法) モデル分子をもとに構造因子 ( $F_{calc}$ ) を計算する．この構造因子の位相が初期位相となる．初期位相と実験で得られた構造因子の絶対値から電子密度を計算すれば，標的分子本来の電子密度に現れてくるはずである．最終的には標的分子のモデルが矛盾なく構築でき，R 値や R-free 値が良い値を示せば分子置換法による解析はほぼ成功したと考える．分子置換法はモデル分子による初期位相に引きずられて誤った解析をしてしまうことも十分考えられるので，特に R-free 値の経緯には注意しておく必要がある．

### 2-2. 重原子同形置換法 (IR 法)

重原子同形置換法は，まだ構造解析されていない新規のタンパク質の構造を解析するときの王道である．この方法はタンパク質結晶 (ネイティブ結晶) 中に水銀や白金などの重原子化合物を浸透させ，分子の位置や配向，結晶の格子定数などに変化を与えず，結晶中の全ての分子のある特定の位置に重原子化合物を結合 (付加) させることにより，その部分だけの電子密度に変化を与えること

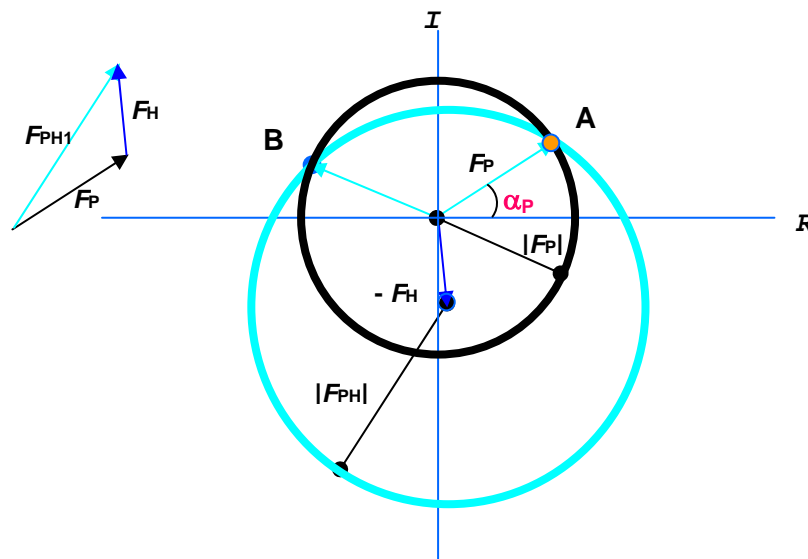
を言う(図3参照).実際には重原子の付加・結合により結晶はある程度は乱されるのが一般的である.



**図3 重原子同形置換法** (a): ネイティブ結晶 (b): (a)の結晶格子内のタンパク質分子の表面に重原子を結合(付加)させた重原子誘導体結晶 は重原子の結合部位に重原子が結合していることを示す, は結合しなかった部分. この例では, 大きな (あるいは )の部位は 18/24 の占有率(occupancy)を持つので, 主結合部位(major site)と呼ばれる. 一方, 小さな (あるいは )は 10/24 の占有率しかないので, 副結合部位(minor site)と呼ばれる.

**(a) 単一同形置換法 (SIR)**

ネイティブ結晶の構造因子を  $F_p$ , 重原子を付加させた重原子誘導体結晶の構造因子を  $F_{PH}$ ,  $F_{PH}$ のうち重原子の寄与する部分を  $F_H$ とすれば, これらの関係は  $F_{PH} = F_p + F_H$  となる. このうち, 実験で得られるのは,  $F_{PH}$ と  $F_p$ の大きさ, すなわち  $|F_{PH}|$ と  $|F_p|$  だけである. しかし, このふたつの構造因子の絶対値の差の2乗をフーリエ変換することにより, 付加した重原子の位置を決めることができる.



**図-4 単一同形置換法による  $F_p$ の位相 ( $\alpha_p$ )を求める時の原理** A(正しい解)とBで示されるように2通りの解が得られる. 従って, 単一同形置換法では一義的には解を決めることができない.

そして結晶格子中の重原子の位置がわかれば  $F_H$  を計算することができる. 単一同形置換法による  $F_p$ の

位相 ( $\alpha_P$ ) の求め方を図-4に示す。実験で得られた  $|F_{PH}|$  と  $|F_P|$  からこれを半径とする円をそれぞれ ( $-F_H$  と原点) を中心として描けばその交点から位相の解が求まるが、単一同形置換法では一義的には決まらない。

$F_{PH}$ ,  $F_P$  および  $F_H$  の関係は複素平面上で図5のように示される。Centric反射の場合は一般的に位相が「0」「 $\pi$ 」なので図-5(b)か(c)であれば、単純に  $|F_{PH}|$  と  $|F_P|$  の差をとれば、それは  $F_H$  の絶対値を示すので重原子のみの寄与からなるパターン関数が計算できる。それを解けば重原子の位置が求まり、位相を含めた  $F_H$  が計算できる。図-5(c)の場合にはこれは適用できないが、このようなことはほとんど起こらない。

Noncentric反射 (図-5(a)) の場合には  $\Delta F = |F_{PH}| - |F_P| = 1/2 |F_H|^2 + 1/2 |F_H|^2 \cos 2(\alpha_H - \alpha_{PH})$  となる。第2項は小さな値をとるのでこれを二乗した場合の係数は実質  $|F_H|^2$  のパターン関数に1/2を乗じたもの (ピークの値が1/2になったもの) である。これを解けば重原子の位置が求まる。

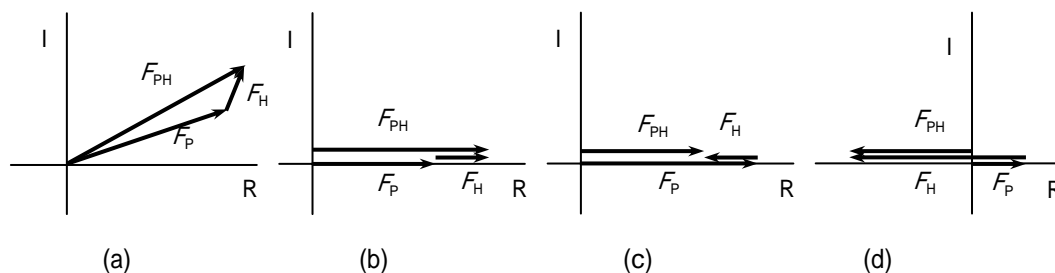


図-5  $F_{PH} = F_P + F_H$  の関係 (a) Noncentric 反射, (b), (c), (d) Centric 反射

### (b) 多重同形置換法 (MIR)

ふたつ目の重原子誘導体結晶が得られれば単一同形置換法で一義的に解が決まらないという問題は解決される。最初の重原子誘導体結晶の構造因子を  $|F_{PH1}|$ 、ふたつ目のそれを  $|F_{PH2}|$ 、とすれば図-4と同様の作図をすれば正しい解はふたつの円の交点として求まる (図-6)。実際にはいろいろな実験測定誤差により円は一箇所では交わらないことが多い。従って、いくつかの重原子誘導体から得られた解を統計処理することにより位相の確率分布を求める。位相の存在確率から次式により求めた位相 (位相角の重心) は最良位相角 ( $\alpha_{best}$ ) と呼ばれる。

$$m = m \cdot \exp i \alpha_{\text{best}} = \int \exp i \alpha P(\alpha) d\alpha / \int P(\alpha) d\alpha$$

$m$ は位相の確からしさを表す量で位相の確率分布の広がりが狭いほど1に近い値を取り Figure of merit と呼ばれる。これは最良位相角で電子密度を計算する時の各反射の重みになる。

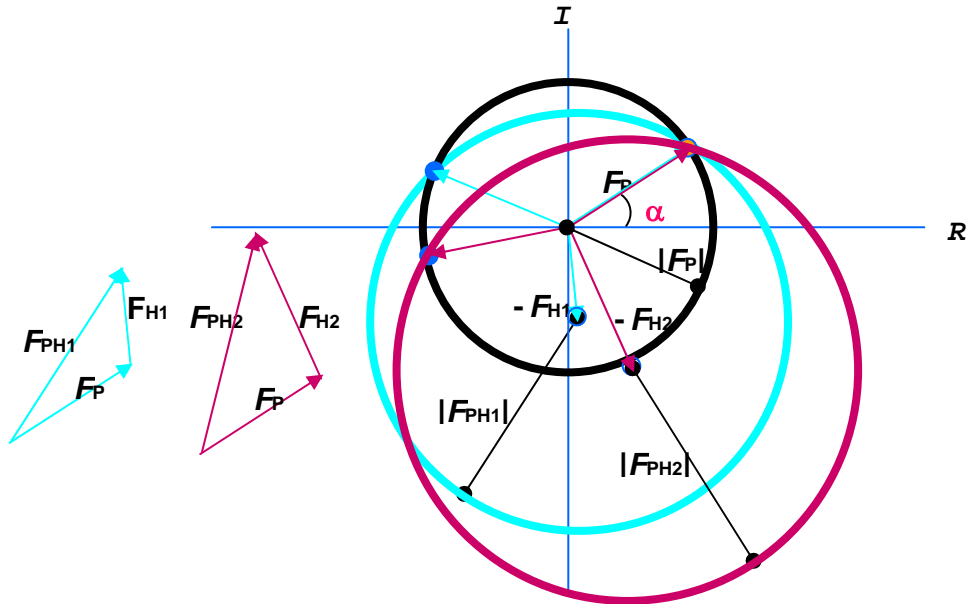


図-6 二重同形置換法による位相の算出の原理 図-5と同様の方法で作図することにより理想的には位相を一義的に決めることができる。

### 2-3. 異常分散法

タンパク質の分子中に大きな異常分散を示す原子が含まれている時、原子散乱因子は( $f = f^0 + f' + if''$ )で示すように複素数になる。 $f^0$ は異常分散に関わらない項で照射するX線の波長には依存しない。一方、 $f'$ と $f''$ は波長に依存する項で、 $f'$ は異常分散の実数部、 $f''$ は虚数部である。異常分散が顕著になる場合にはフリーデルの法則は破れ、 $|F(hkl)|$  (以下、 $|F^+|$ ) と  $|F(-h-k-l)|$  (以下、 $|F^-|$ ) はもはや等しくない。異常分散法ではこのフリーデル対の回折強度の差を利用して位相を算出する。

#### (a) 一波長異常分散法 (SAD)

タンパク質結晶の構造因子 ( $F_p$ ) は、異常分散の小さな原子の成分 ( $F_N$ ) と大きな原子の成分 ( $F_A$ ) を用いて、 $F_p = F_N + F_A$  と表現される。 $F_p^+ = F_N^+ + F_A^+$  のフリーデル対は  $F_p^- = F_N^- + F_A^-$  と表現できる。また、 $F_p$  の共役複素数  $F_p^*$  は、 $F_p^* = F_N^* + F_A^*$  である。異常分散が無視できる成分は、

$F_N^+$ と $F_N^{*}$ であるので、 $F_P^+ F_P^{*} = F_A^+ F_A^{*}$ となる。 $\Delta = F_A^+ F_A^{*}$ とおけば、 $F_P^+ F_P^{*} = \Delta$ となる。この関係式から、単一同形置換法で述べた方法を用いて  $F_P^+$  の位相を求めることができる(図-7)。しかし、この場合にも位相は一義的には決まらない。異なる X 線の波長で測定したもう 1 セットの回折データがあれば MIR 法と同様の関係式を使って位相を一義的に求めることができる。

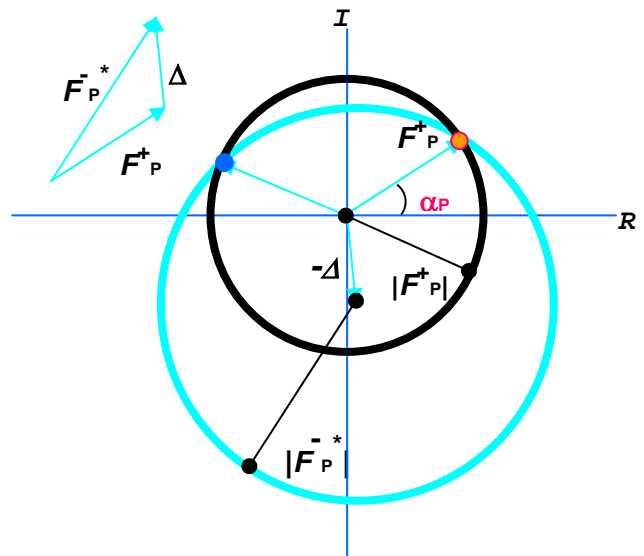


図-7 単一波長異常分散法による位相の求め方の原理

### (b) 多波長異常分散法 (MAD)

Hendrickson らは異常分散の大きな原子を含んだ結晶構造因子の関係式を数式的に展開して、異常分散の関わる成分を単純化して示した。タンパク質中で大きな異常分散を示す原子の原子散乱因子を  $(f = f^0 + f' + if'')$  で示すとその原子の寄与する結晶構造因子は、 $F_A = (f^0 + f' + if'') \sum \exp 2\pi i(h \cdot r_j)$  となる。波長に依存しない項は  $F_A^0 = f^0 \sum \exp 2\pi i(h \cdot r_j)$  であるので上式は  $F_A = F_A^0 + [(f' + if'') / f^0] F_A^0$  となる。 $F_P = F_N + F_A$  の関係式から  $F_P$  を求めると、 $F_P = F_N + F_A^0 + [(f' + if'') / f^0] F_A^0$  である。式中、波長に依存しない最初の 2 項を  $F_T^0 = F_N + F_A^0$  と書き直せば、 $F_P = F_T^0 + [(f' + if'') / f^0] F_A^0$  と表現できる。これは構造因子を波長に依存しない項と依存する項に分けて書き表した式である(ここでは異常分散の大きな原子が 1 種類するときである)。 $|F_P|^2 = F_P \cdot F_P^*$ 、 $F_T^0 = |F_T^0| \exp i \phi_T$  および  $F_A^0 = |F_A^0| \exp i \phi_A$  の関係式を使えば、 $F_P (F_P^+ と F_P^-)$  は、 $|F_P^\pm|^2 = |F_T^0|^2 + [(f'^2 + f''^2) / (f^0)^2] |F_A^0|^2 + (2f' / f^0) |F_T^0| |F_A^0| \cos(\phi_T - \phi_A) \pm (2f'' / f^0) |F_T^0| |F_A^0| \sin(\phi_T - \phi_A)$  と書き直せる。この式の  $[(f'^2 + f''^2) / (f^0)^2]$  と  $(2f' / f^0)$  と  $(2f'' / f^0)$  は、測定に用いた X 線の波長で決まる値を持つ。従って、残りの 4 つの量の  $|F_T^0|^2$  と  $|F_A^0|^2$  と  $|F_T^0| |F_A^0| \cos(\phi_T - \phi_A)$  と  $|F_T^0| |F_A^0| \sin(\phi_T - \phi_A)$  はこれらを未知数として、測定した反射ごとに方程式を立てることにより求めることができる。 $|F_A^0|^2$  が求めれば、これを係数としたパターン関数から異常分散を示す原子の位置が求まる。次にこれから  $\phi_A$  が求めれば  $\phi_T$  も得られ構造が得られる。