

応用講座 蛋白質結晶構造解析

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 柴田直樹

以前は専門家以外では最初の一步を踏み込むことが難しかった生体高分子のX線結晶構造解析も構造ゲノム科学の推進もあってここ数年で様相が大きく変わってきた。現在では問題が無ければほとんどルーチンのように構造を得ることも可能となりつつあるが、一方でブラックボックス化という問題は避けられない。本講義ではタンパク質のX線結晶構造解析についてその分野の初心者を対象として想定し、放射光を用いて行うX線結晶構造解析を中心として、構造解析を進めていく上で必要な知識やルーチン作業の中で初心者が見落としがちな注意すべき点について解説する。

単結晶によるX線回折原理

波長 λ の入射X線が結晶のある反射面に対して θ の反射角で反射され、回折点として検出器上に投影されたとする。 s_0 は入射X線の波長 λ の逆数 $1/\lambda$ の長さを持つとする。散乱X線も λ の波長を持つから s の長さは s_0 と同じく $1/\lambda$ である。入射X線を表すベクトル s_0 と反射X線(反射面で反射された)のベクトル s を考える(図1)。

s は反射面に垂直で、 s と s_0 の差ベクトルであり、 s と s_0 は長さ $1/\lambda$ で定義されているから s の終点はCを中心とする半径 $1/\lambda$ の球面上を動く。この球をEwald 球と呼ぶ。

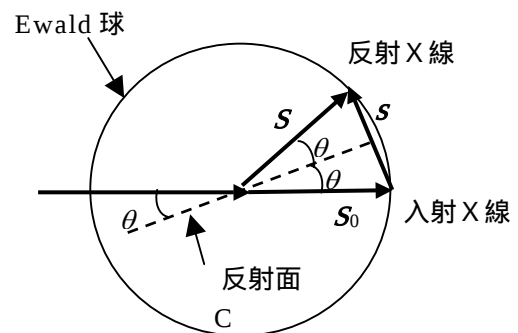


図1

回折現象は数学的にはフーリエ変換操作に相当するが、結晶が存在する空間を実空間と呼ぶのに対し、フーリエ変換されたものは逆空間と呼ばれている。結晶から散乱される合成波はラウエ関数

$$K(\mathbf{s}) = F(\mathbf{s}) \times \sum \exp(2\pi i \mathbf{a} \cdot \mathbf{s}) \times \sum \exp(2\pi i \mathbf{u} \mathbf{b} \cdot \mathbf{s}) \times \sum \exp(2\pi i \mathbf{v} \mathbf{c} \cdot \mathbf{s})$$

から導かれるラウエ条件 $\mathbf{a} \cdot \mathbf{s} = h$, $\mathbf{b} \cdot \mathbf{s} = k$, $\mathbf{c} \cdot \mathbf{s} = l$ (h, k, l は整数) を満たすとき、すべての単位胞から散乱されるX線の位相が揃う。そのような条件を満たす結晶の配向を視覚的にわかりやすく考案さ

れたものが逆格子である（図2）。これを3つのベクトル a^* b^* c^* で表すと格子点は三次元のベクトル $H = ha^* + kb^* + lc^*$ で定義できる。 H が図1の s となる条件を満たす、つまり H の先端が Ewald 球面上に乗る場合に回折が起こることになる（図3）。

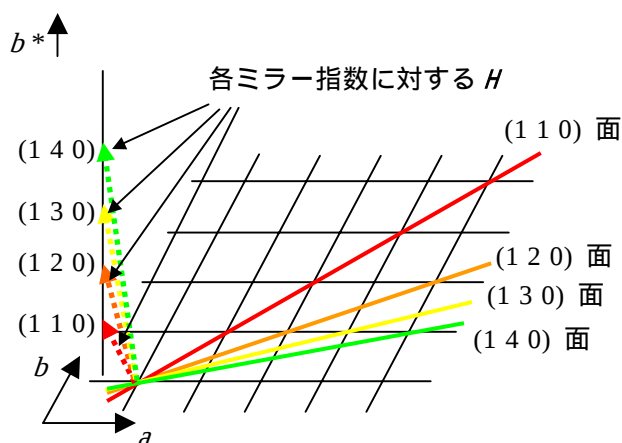


図2 実格子と逆格子の関係。
括弧内の3つの整数はミラー指数を表す。
 a^* と c^* 方向の場合は省略している。

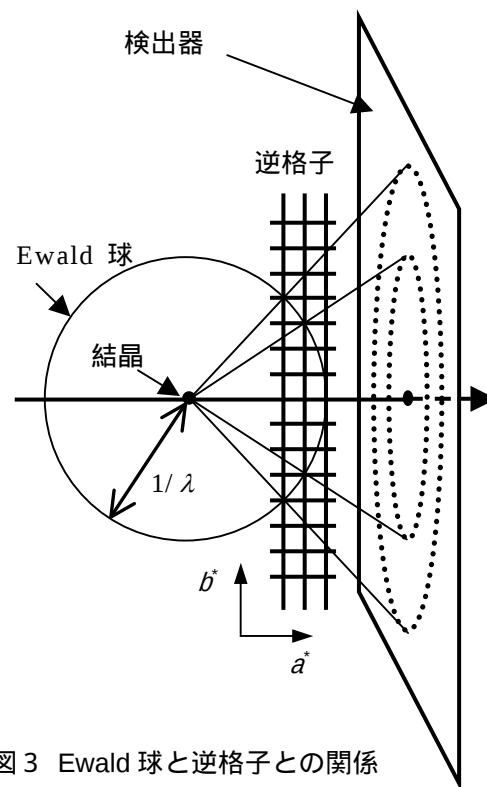


図3 Ewald 球と逆格子との関係

データ測定

図3のように結晶が静止した状態でラウエ条件を満たす逆格子点のごく一部にすぎない、構造解析を行うためには逆空間における非対称単位中にある全反射の回折強度を測定する必要がある。一般的には単色化されたX線を用い、結晶を微小角（0.1～1.0°程度）回転（振動）させる。必要な反射強度を得るのに十分な角度を達成できるまで繰り返し微小角の回転を続けていく。もし90°分のデータを収集しようとする場合に1フレーム当たり1.0°の振動角で測定したとすると、少なくとも90枚のフレームが必要となる。各フレームに写った回折点の積分強度を専用のプログラムによって測定する。結晶は特に加工を施さない場合には球状ではないためその向きによって結晶中をX線が通過する体積が変化するし、結晶によるX線の吸収効果が異なる。また、放射光では通常の運転モードの場合、入射X線の強度が徐々に下がっていく。それらを補正するためのスケールングが必要となる。

構造解析法

結晶から回折される X 線は現在では主に CCD 検出器やイメージングプレート検出器によって検出されるが、どのような検出器を用いても位相を直接測定することは現在のところ不可能である。得られるのは検出器上でのシグナル強度とその位置情報である。位置情報からは回折点がどのようなミラー指数を持っているかわかり、シグナル強度からそれらの振幅がわかるが、位相情報は失われる。構造解析はこの失われた位相を求めることにありと言ってもいい。以下位相を求める方法を紹介する。

1. 重原子同型置換法

タンパク質の構造解析では最も歴史が古い。後で述べる異常分散法や分子置換法が用いられるようになった現在でもその重要性に変わりはない。特殊な場合を除いて、実験室系の X 線発生装置を用いて類似の構造が無いタンパク質の構造解析を行う場合には重原子同型置換法しか選択肢はない。

重原子同型置換法は分子の特定の位置に十分な電子数をもつ重原子イオン（水銀化合物などの分子の場合もある）を結合させ、付加した重原子の位置、つまり重原子に由来する位相をもとにタンパク質結晶に由来する位相を決定する方法である。図 4 にその原理を示す。あるミラー指数を持つ 1 つの回折波について考える。何らかの方法で決定された重原子の位置情報から重原子によって回折された X 線が図 4 a のような位相と振幅を持っていることがわかったとする。タンパク質結晶（ネイティブ結晶）の回折強度データから同じミラー指数を持つ X 線の振幅がわかるから、それを元に図 4 b のようにその位相を変化させる。正しい位相のところで重原子誘導体の回折強度データから得られた振幅と一致するはずである（図 4 c）。図 4 b とは反対の方向に位相をずらしても同様に重原子誘導体からの振幅と一致する位相が存在する。従って、1 種類の重原子誘導体からは 2 つの位相の可能性があることになる。しかし、分子中の別の部位に重原子が結合した重原子誘導体を併用すれば 1 カ所に限定できる。これを重原子多重同型置換法（MIR）という。1 種類の重原子誘導体の場合は単一同型置換法（SIR）という。図 5 はタンパク質の X 線結晶構造解析の教科書等に必ず掲載されているハーカー図である。これは図 4 をベクトル図に置き換えた物で、2 つの円が交差するところが解となる。ハーカー図を理解できればこちらの方が 2 つの位相の可能性があることがよりわかりやすい。

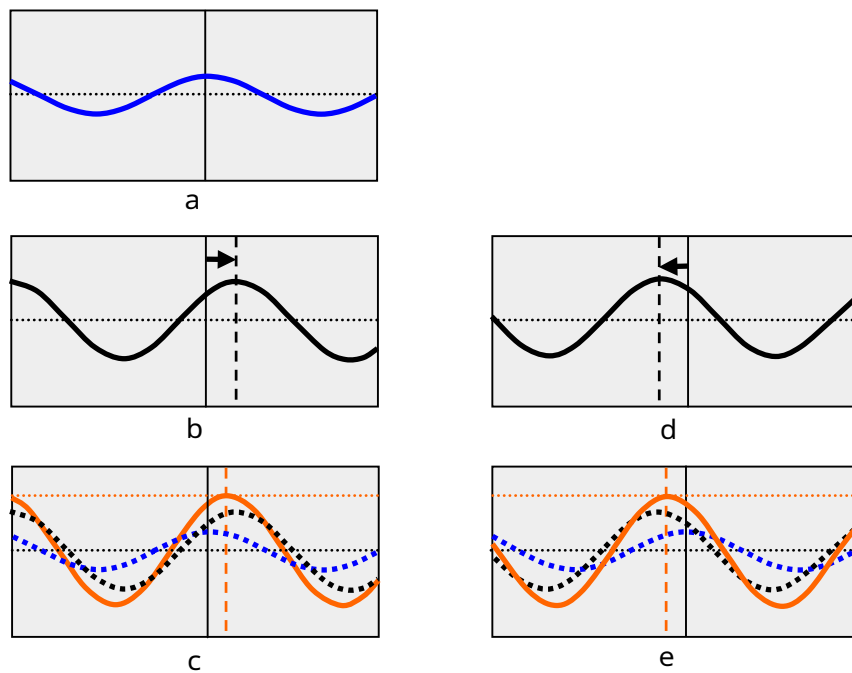


図4 重原子同型置換法の原理

- a 重原子のみの結晶（実在しない）.
- b ネイティブ結晶．a に比べて右方向に位相をシフトさせている．
- c 重原子誘導体．青と黒の波の重ね合わせが重原子誘導体の波（橙）に一致する．
- d ネイティブ結晶（左方向にシフトする場合）.
- e 重原子誘導体（左方向にシフトする場合）.

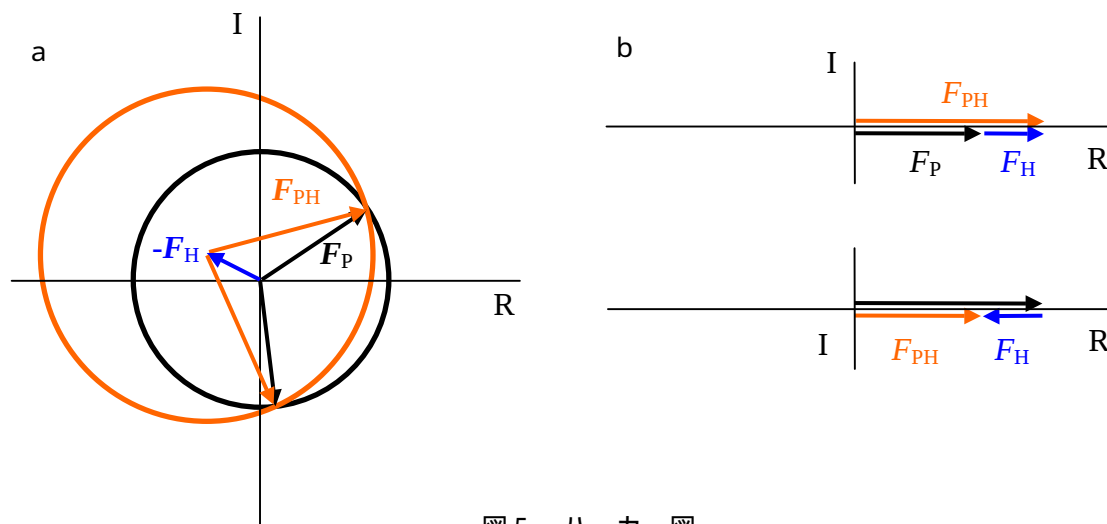


図5 ハーカー図

- a 非セントリック反射の場合．
- b セントリック反射の場合．

F_P , F_H , F_{PH} はそれぞれネイティブ結晶，重原子，重原子誘導体結晶の構造因子を示す．

2．異常分散法

特定の元素の異常分散効果を利用して位相を決定する方法である。異常分散効果が十分に得られる波長領域が元素の種類によって決まっているので任意の波長を取り出せる放射光が必要となる。実験室系のX線発生装置では条件が整わない限り難しい。

異常分散は電子が原子核に束縛されている場合に起こる。異常分散効果がある場合、原子散乱因子 f_{anom} は次のようになる。

$$f_{anom} = f_0 + \Delta f' + i \Delta f''$$

$\Delta f'$ と $\Delta f''$ はそれぞれ実数軸方向と虚数軸方向での変化量で、図6はこれをベクトル図にしたものである。異常分散効果による原子散乱因子の変化を利用して同型置換法と同様の取り扱いから位相を決定することが出来る。3種類以上の波長でデータを測定し位相を求める方法

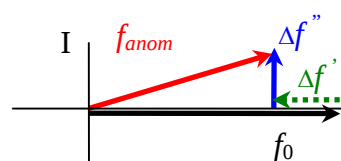


図6 異常散乱因子

は多波長異常分散法 (MAD) と呼ばれており、放射光ビームラインを利用できる機会が増えた現在では最も良く用いられる位相決定法の一つである。この方法はセレンメチオニンを導入したタンパク質を調製し、そのセレン原子の異常分散効果から位相を決定する場合に最も良く用いられている。単一の波長だけで測定したデータを使って位相を求める場合は一波長異常分散法 (SAD) となり、SIR 法と同様に位相を一義的に決定することは出来ないが、SAD 法で求めた位相から計算した電子密度を元にしても溶媒平滑化や分子平均化などの処理を行うと電子密度が改良されるため、構造が得られることが多い。

3．分子置換法

すでに構造が明らかとなっている類似分子が存在する場合に限り構造解析が可能な方法である。ネイティブ結晶のデータで計算できるパターンソン関数を用いてモデル分子の回転パラメーターの検索を行い、その後、パターンソン関数またはその他の指標をもとに並進パラメーターの検索を行う。このようにネイティブ結晶のデータがあれば構造解析できるので迅速な構造決定が可能となる。

構造解析を行う上での注意点

1. 共通の注意点

構造解析をしようとする結晶の空間群がどのような性質を持つか良く理解する必要がある。これを理解しないまま進めていくと途中で失敗してもそれに気づかないことがある。タンパク質結晶の場合はミラーや対称心をもつ空間群には遭遇しない。しかし、大抵の場合、回転軸またはらせん軸を持つ空間群のはずである。それらが結晶の一軸方向にのみ存在するか、複数の軸方向に存在するかによって原点の取り方に違いが生ずる。前者の場合はその軸方向については原点を自由に設定できる。後者では特定の位置に限定される。限定されれば原子の絶対位置が決定されるため、同型置換法や異常分散法で非対称単位中に重原子が複数個存在する場合、それらの相対的な位置関係に注意しなくても重原子位置を決定することが出来る。また、分子置換法で非対称単位中に複数の等価な分子、またはサブユニットが存在しても重原子の場合と同様に、それらの絶対配置を決定できる。原点が任意の場合、任意な方向には（回転軸またはらせん軸が一軸方向しか無い場合にはその軸の方向）原子の絶対位置は決まらない。非対称単位中に1個の重原子（重原子同型置換法の場合）または1個の分子またはサブユニット（分子置換法の場合）しか無い場合には特に注意しなくても良いが、複数個存在する場合にはそれらの相対的な配置に注意する必要がある。例えば分子置換法の並進パラメーターを決定する場合、1番目の分子の位置を決定した後、2番目の分子の位置を決定するときに、1番目の分子の位置情報（つまり1番目の分子の位相情報）を考慮しないで計算すると、2番目の分子の位置も原点が任意とのものとして計算してしまう。1番目の分子の位置が決まると1番目の分子に由来する位相が決まるため、2番目の分子からの位相が限定されるのである。これは図4で示した通り、重原子誘導体の重原子の位置が決定される、つまり重原子からの位相が固定されればタンパク質分子からの位相が限定されることと同じである。また空間群 $P1$ は対称要素を持たないため原点の取り方は完全に自由である。従って、分子置換法で構造解析を行う場合に非対称単位中（ $P1$ では格子全体と一致）に1分子しかない場合には回転パラメーターだけを決定すればよい。しかし、複数個の分子がある場合には2番目の分子の並進パラメーターを決定するときには上述の注意が必要となる。

2．同型置換法と異常分散法について

同型置換法では複数種類の重原子誘導体のデータ収集をするか、単一でも異常分散データを測定しなければ、原理的に構造解析法のセクションで述べた位相の曖昧さを克服できない。異常分散法でも同様に3種類以上での波長を用いる必要がある。しかし、重原子誘導体が1種類しか得られない場合もあるし、MAD法ではX線による結晶の劣化によって3波長分のデータ測定を完了する前に測定をあきらめなければならない場合もある。そのような場合はSIR法あるいはSAD法による構造解析を行うのも一つの方法である。最近では構造解析の方法論とプログラムが大きく改善されており、SIR法またはSAD法で決定した位相からスタートしても、位相改良プログラムによって分子モデルを構築することが出来る電子密度マップが得られることが多い。また、複数の結晶を使ってSAD法によるデータセットを可能な限り多く集め、それぞれのデータセット毎に位相計算と位相改良して得られた複数の電子密度マップを平均化することによって電子密度の改良を行う方法もある。筆者が最近構造解析したタンパク質はいずれもSAD法で決定した位相からスタートしている。SAD法ではMAD法ほど厳密に波長を選定しなくても問題が生じにくいので、XAFSを測定する時間を十分に取れない場合でも一般的な吸収端よりも高エネルギー側（短波長側）の波長を選定して測定したデータから位相を計算できるというメリットがある。ただし、セレンのような吸収端での立ち上がりの急な元素の場合にはXAFSの測定が必要である。

同型置換法と異常分散法で用いられるプログラムとそれらの特徴

SHARP/autoSHARP (<http://www.globalphasing.com/sharp/>)

Web を使ったインターフェイスで使いやすいし、位相計算後に別のプログラムを使って結果を評価するためのインターフェイスも使いやすくかつ充実している。Web を使っているので一見ブラックボックス的だが、デフォルト設定がきちんと画面に現れるし、レイアウトが工夫されているので各パラメーターの意味をつかみやすい。しかし外部アプリケーションが多数必要なため、他のプログラムに比べてインストール時にトラブルが起きやすく、使用時にもエラーが発生する頻度が高い。自動的に位相を決定できるモードもある。

SOLVE (<http://www.solve.lanl.gov/>)

重原子位置の決定も含めてほとんど自動的に位相を決定できる。テキストベースのインターフェイスだが、ホームページの例を参考にデフォルト値を利用すればほとんど修正を加えなくても動作する。

CNS (<http://cns.csb.yale.edu/v1.1/>)

テキストベースのインターフェイスで、コマンドファイルがやや複雑。インストールは比較的簡単。外部アプリケーションはほとんど必要ない。

MLPHARE (CCP4 Program Suite) (<http://www.ccp4.ac.uk/main.html>)

テキストベースのインターフェイスだが、コマンド数が少ないため使い方は難しくない。上の3つのプログラムに比べると古く、最近ではあまり用いられていないようである。

RAVE (<http://alpha2.bmc.uu.se/usf/>)

位相計算を行うプログラムではないが、位相計算と位相改良後、電子密度の平均化によってその改良を行うためのパッケージである。非対称単位中複数の分子または等価なサブユニットがある場合に、それらの電子密度の平均化や、複数の結晶（空間群と格子定数が異なっても良い）からのデータあるいは複数の SAD データから得られた電子密度間で平均化することが出来る。