

実習 タンパク質の結晶構造解析

独立行政法人 理化学研究所 播磨研究所 引間孝明

1. はじめに

ヒトゲノム解読プロジェクトがひとまず終了し、その他の生物種についてもその全ゲノム配列の解読プロジェクトが精力的に進行している現在、学会や産業界などではその次のプロジェクトへの期待が高まっている。それは得られた膨大なゲノム配列から、「何がわかるのか」・「何ができるのか」について考えるものというもので「ポストゲノムプロジェクト」と一般に呼ばれている。いくつもの提唱されているポストゲノムプロジェクトの中でも、特に「構造ゲノミクス」と呼ばれるプロジェクトが、その生物学的な重要性や産業応用への期待などから非常に重要視されている。

これらのプロジェクトの基となる概念では、ゲノム全配列を生物という複雑な装置の仕様書や図面として捉え、ゲノムから生体内で合成されるタンパク質は、実際に装置を構成し様々な機構を実現する部品であると考えられる。タンパク質の機能はその立体的な形に大きく依存することがこれまでの研究から明らかにされている。そこで「構造ゲノミクス」プロジェクトでは、部品であるタンパク質の立体的な形を様々な生命現象やその化学反応に沿って網羅的・体系的に調べていくことで、生命というものをより深く具体的に知ろうとするものである。

卑近な例え話をするなら、自動車の図面から実際に部品を製造し、1つ1つの形を調べて「この部品とあの部品はこんな風に組み合わさるのか」などと考えながらエンジンやトランスミッションを組み立てていき、自動車というものを理解していく、というような感じになるだろうか。

「構造ゲノミクス」ではタンパク質の立体構造を知ることが重要であるが、これはゲノム配列から直接に知ることはできない。タンパク質は20種類あるアミノ酸という小さな分子がひものように一列につながってできており、このひもが複雑に絡まりあった球状の構造をしている。ゲノム配列にはこのアミノ酸の並び順序しか書かれておらず、またアミノ酸どうしが並び順では遠く離れているのかわからず、実際の立体構造上では近接した位置にあり、共同してそのタンパク質の機能に関与している例も多い。そのためアミノ酸の並び順だけから、タンパク質の立体構造や機能を正確に予測することは今のところ不可能である。

タンパク質の形を知るには、円偏光二色性や核磁気共鳴を利用するものなどいくつかの手法がある。そのなかでも回折現象を利用するX線結晶構造解析と呼ばれる手法が、その精度や適用範囲の広さなどから、現在のところ最も有力な方法である。「構造ゲノミクス」では生体反応に関与する非常に数多くのタンパク質の立体構造を調べる必要がある。そのため、X線結晶構造解析はその精度の高さのみならず、解析に要する時間が他の手法に比べて比較的短い、という点からも必要不可欠なものとして位置付けられている。

本実習では、タンパク質のX線結晶構造解析でおこなわれる一連の作業のうち、()結晶化、()回折強度データ収集、()電子密度分布図の解釈、をおこなう。また近年多くの構造解析で取り入れられるようになった「多波長異常分散法」で行う実験の一部として、()X線吸収測定と()多波長異常分散法による位相決定についても概略であるが実習する。

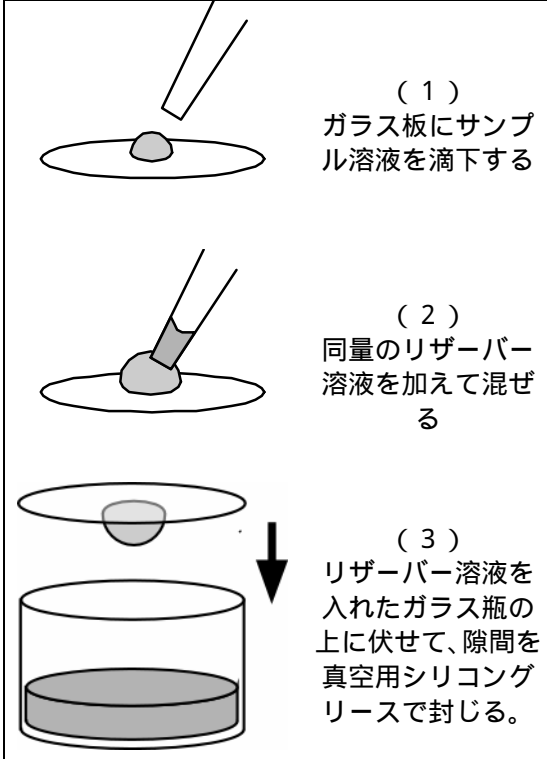
2. リゾチームの結晶化実験

X線結晶構造解析では、物質が三次元方向に規則正しく並んだ「結晶」に波(X線)が当たって起こる回折という現象を利用する。そこで立体構造を知りたいタンパク質をなんらかの方法で結晶にする必要がある。

この実習ではリゾチームを用いて、簡単な結晶化の実験をおこなう。

リゾチームは動物の分泌液(鼻水など)や卵白などに含まれ、細菌細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカン分解する機能を持つ。また細菌の感染を防御する機能があるため風邪薬にも含まれている。卵白リゾチームはアミノ酸が129個つながったタンパク質で、分子量14307とタンパク質としては比較的小さな部類に入る。

以下のようなレシピでハンギングドロップ法により、2~3時間で結晶を得ることができる。

サンプル溶液	ハンギングドロップ法
卵白リゾチーム 100 mg / ml 酢酸ナトリウム 50 mM (pH 4.5)	 <p>(1) ガラス板にサンプル溶液を滴下する</p> <p>(2) 同量のリザーバー溶液を加えて混ぜる</p> <p>(3) リザーバー溶液を入れたガラス瓶の上に伏せて、隙間を真空用シリコングリースで封じる。</p>
リザーバー溶液 塩化ナトリウム 1.0 M 酢酸ナトリウム 50 mM (pH 4.5)	

一般にタンパク質の結晶化は、こんなに簡単に短時間でできるものではない。食塩のような無機化合物やナフタリンなどの低分子量有機化合物では、飽和溶液の温度を下げるなどしてその溶解度を下げてやれば、比較的簡単に結晶化することができる。しかしタンパク質のような巨大な分子では、分子表面積が広く溶媒和している水分子の数が多いので、このような方法では結晶化に必要なだけ溶解度を下げることができない。そのため、沈殿剤と呼ばれる試薬を加えて溶媒和している水分子をタンパク質表面から奪ってやることで溶解度を下げて結晶化をおこなっている。

またタンパク質はその複雑さゆえに一般的に不安定で、水溶液中のpHやイオン強度を整えたり、安定化に必要な化合物と共存させることが必要である。これらの要素も結晶化に影響を与える因子となるため、通常の場合非常に数多く（数十～数百パターン）の組み合わせの中から結晶が得られる条件を探さなければならない。

最近では、統計的に厳選された100パターン程度の組み合わせをまとめた試薬キットがいくつかのメーカーから市販されるようになってきたので、初期的な条件検索にはそれらが用いられることが多くなっている。

3. 多波長異常分散法とX線吸収端測定

X線結晶構造解析では、回折波の「強度」と「位相」という2つの情報から、結晶を構成する分子の構造を決定することができる。この必要となる2つの情報のうち、強度情報はX線回折実験をおこなうことで求めることができるが、位相情報を実験的に直接求めることはできない。この失われた位相情報を復元することを「位相問題」と呼び、同形置換法などいくつかの手法が考案されている。

「多波長異常分散法」は位相問題を解決する非常に強力な手法で、X線回折実験に放射光を利用するようになって多用されるようになった。原子には、ある決まった波長のX線を特に良く吸収するという性質があり、この波長のことを「吸収端波長」という。この吸収端の近傍の波長でX線回折をおこなうと、「異常分散」と呼ばれる現象により、他の波長での場合とは回折強度や位相が異なる。「多波長異常分散法」では吸収端を含むいくつかの波長でX線回折をおこない、それらの回折強度を比較することで位相情報を復元する。

アミノ酸を構成する炭素や酸素などの軽い原子では異常分散効果が小さいので、タンパク質中に天然に含まれる鉄や亜鉛を異常分散原子として利用する。また、金属原子を含まないタンパク質の場合、水銀や白金などを人為的にタンパク質結晶に導入して異常分散原子として利用することが行われる。

吸収端の波長は原子種に固有のものであるが、正確な波長は異常分散原子の周囲の環境に依存する。そこで異常分散効果を最大限に生かすため、X線回折実験に先立って吸収端波長を求めるための「X線吸収スペクトル測定」がおこなわれることが多い。

この実習では、異常分散原子として亜鉛を含むサーモリシンの結晶のX線吸収スペクトルの測定をおこなう。サーモリシンはアミノ酸数316個・分子量約37500のタンパク質で、活性部位に亜鉛を持つ金属プロテアーゼ(タンパク質分解酵素)の一種である。

タンパク質結晶のX線吸収スペクトル測定は、以下のような流れでおこなわれる。

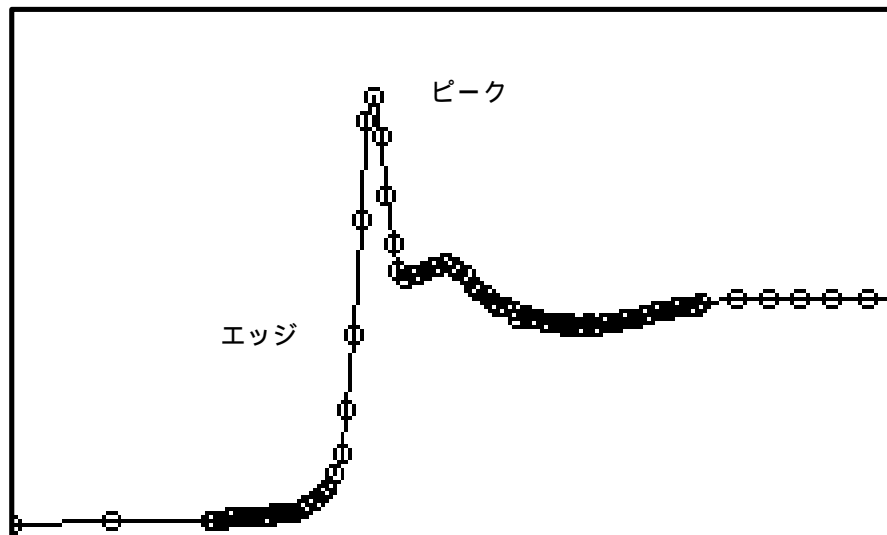
ゴニオメータへの結晶の設置

X線強度検出器の設置

波長を変えながら蛍光強度測定

スペクトルの解釈

タンパク質結晶中に含まれる異常分散原子の濃度はとても薄く、X線の吸収量も小さい。そのためスペクトルを精度良く求めるには、X線吸収量を直接測定するのではなく、X線吸収によって発生する蛍光の量を測定する方法が用いられている。



セレンを含むタンパク質結晶のX線吸収スペクトル

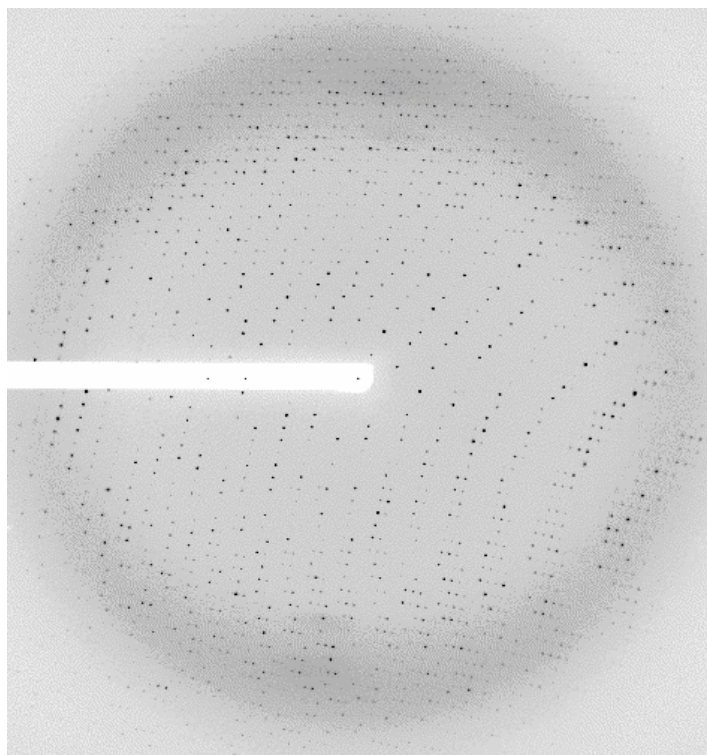
多波長異常分散法の利点は、他の方法と異なり基本的に1種類1個の結晶だけから位相情報を復元できることである。しかし同時に、金属のような異常分散効果の大きな原子を含まないタンパク質では利用することができない、という欠点もある。最近よく用いられるようになった「セレノメチオン化」は、この問題点を克服するものである。これは、()メチオンinというアミノ酸を含み、()

大腸菌に産生させることのできる、タンパク質に適応できる手法である。メチオニンの代わりにセレンという金属原子を含む「セレノメチオニン」を加えた培地で大腸菌を培養すると、目的のタンパク質の合成にセレノメチオニンが使われるので、タンパク質に金属原子が含まれるようになる。

4 . X線回折実験とデータ処理

回折強度を収集するためにX線回折実験をおこなう。結晶のX線回折では、結晶の周りに数学的に定義された仮想的な空間（逆空間）と、その逆空間中に存在するたくさんの格子状の点（逆格子点）というものを想定する。結晶にX線を照射すると、この逆格子点の方向に向かってX線の回折が起こる。すべての逆格子点の方向に同時に回折が起こるわけではなく、入射X線に対してある空間的な関係を満たす逆格子点にのみ回折が起こる。そこで結晶を回転させるなどして、全ての逆格子点が空間的關係を一度は満たすようにして測定をおこなう。

ここでは先ほどのサーモリシンの結晶を用いてX線回折実験をおこない、その回折強度データを収集する。



記録された回折像

昔（ほんの10年ほど）はX線用フィルムを用いてX線回折強度を記録していた。また数年前まではイメージングプレートという再利用可能なフィルム素材が用いられることが多かった。しかし現

在では、ほとんどの放射光施設で高速CCD検出器が用いられている。これは要するに「X線用デジタルカメラ」のようなもので、これまでの記録素材と比べて現像やスキャニングが不必要なため実験時間を大幅に短縮できるという利点がある。ただしダイナミックレンジが2ケタほど低いので、超高精度の測定やきわめて微弱な回折強度を収集する場合などには、いまでもイメージングプレートを用いる。

実際の測定ではコマ撮り撮影のように、結晶にX線を照射しながら1度ほど回転させてその間に起こった回折をCCDに記録し読み出す、という作業を繰り返しおこなう。通常の場合トータルで100~200枚程度、多い場合には300枚以上の回折像を撮影し、それらに記録された回折強度をまとめて1つのデータセットとする。多波長異常分散法では一つの結晶に対してピーク波長、エッジ波長と吸収端波長域から少し離れた波長で測定した3つのデータセットが必要である。

記録された1枚の回折像は、そのままではタダの画像ファイルにしか過ぎない。データセットとするには画像に写っている逆格子点(回折斑点)のX線強度を数値として取り出す必要がある。この作業は「データ処理」と呼ばれ、具体的には()指数付け、()精密化、()積分、()尺度補正というステップからなる。

ここでは実際に()指数付けと()積分をおこなってみる。

「指数付け」とは、回折像に移っている点がどの逆格子点なのかを決定する作業である。昔は、点の並び具合や規則性から人間が判断して手作業でおこなっていたが、最近ではアルゴリズムの発展と計算機スピードの向上から、この作業はほぼ完全に自動化されている。プログラムに回折像の画像ファイルを与えると、自動的に点の並び具合や規則性を判断して、どの逆格子点が回折像のどこに写っているはずであるかを示すボックスが画像ファイルにインポーズされる。

「積分」ではこのボックス内の画素の濃さを全て足し合わせて、その逆格子点の回折強度とする作業がおこなわれる。このとき逆格子点が写っていない領域の画素の濃さから、バックグラウンドノイズの大きさを見積もり、回折強度に補正をかけることもおこなわれている。

このデータ処理では、一連の作業を1つのソフトウェア上で連続しておこなう統合型データ処理ソフトが使われる。このようなソフトとして有名なものに「DENZO/HKL2000」や「DPS/Mosflm」などがある。

5 . 電子密度分布図の解釈

ここまででタンパク質のX線結晶構造解析におけるビームラインでの作業はお終いである。この後

に続く「位相決定」「逆フーリエ計算」「電子密度分布図の解釈」「構造モデルの構築」といった作業は、ユーザーがデータを持ち帰り、自身の研究室でおこなうのが普通である。

実習ではあらかじめ多波長異常分散法にて測定されたサーモリシンを使って、簡単に「位相決定」と「電子密度分布図の解釈」をおこなってみる。

上述したX線回折で得られる回折強度と位相から、タンパク質（を構成するアミノ酸）を構成する原子の立体的な位置座標が直接求められるわけではない。回折強度と位相から逆フーリエ計算で求められるのは、結晶中での電子の存在密度をあらわした、「電子密度分布図」と呼ばれる立体的な等高線地図のようなものである。電子密度の高いところにアミノ酸を一つ一つ置いてつなげていくことによりタンパク質の立体構造のモデルを構築していく。

電子密度分布図を表示するグラフィックソフトウェアや、アミノ酸の電子密度へのハマリ具合について、様子をつかんでいただきたい。



電子密度分布図と構造モデル構築の様子

タンパク質の電子密度分布図を詳細に見ていくと、周りのアミノ酸とはつながらない電子の塊が見つかることがある。大抵の場合、それらは結晶中に存在するタンパク質に結合した水分子であるが、水とは考えられない大きさのものが見つかる場合がある。例えば、タンパク質分解酵素の一つであるトリプシンでは、結晶化時に加えた機能阻害剤であるベンズアミジンに由来する電子密度が観察される。ベンズアミジンはタンパク質を分解する部位に挟まりこむことで、トリプシンの機能を阻害する。

このように機能を阻害する化合物との複合体を構造解析することで、機能阻害の作用機構を議論したり、より強い阻害活性を持つ化合物を設計するのに役立てられたりする。

6 . 最後に

このテキストがタンパク質X線結晶構造解析という未経験者にはわかりにくい手法の理解の一助となり、あわよくばこれを機に構造ゲノミクスに代表される「構造生物学」という学問分野に興味を持っていただけるならば幸いである。

この分野の入門的参考書としては、

- ・ 日本学術振興会回折構造生物第 169 委員会(編) : タンパク質の結晶化 - 回折構造生物学のために、京都大学学術出版会(2005)
- ・ 佐藤衛 : タンパク質のX線解析、共立出版(1998)
- ・ J.ドレント(著)、竹中章郎、勝部幸輝、笹田義夫(訳) : タンパク質のX線結晶解析法、シュプリンガー・フェアラーク東京(1998)
- ・ C.Branden、J.Tooze(著)、勝部幸輝、竹中章郎、福山恵一、松原央(訳) : タンパク質の構造入門 第2版、ニュートンプレス(2000)

などがある。

(財)高輝度光科学研究センター
長谷川和也、河本正秀