

X線構造生物学の近未来展望

Prospects for X-ray Structural Biology in the Near Future

X線構造生物学研究会

X-ray Structural Biology Research Group

神谷信夫, 大阪市立大学

Nobuo Kamiya, Osaka City University

タンパク質結晶構造解析の歩み

現在の放射光利用において構造生物学が占める範囲は、その質・量ともに非常に大きなものとなっている。1950年代の中頃、DNA二重らせん構造モデルが提唱され、その後急激に勃興・発展した分子生物学は、それまで神秘のヴェールにつつまれていた生物学を物質科学へと進化させた。これにより、「構造と機能」をスローガンに掲げ、膨大な数の巨大で複雑な生体分子の構造が明らかとなり、それらの相互作用として生命現象を論ずる研究姿勢が確立された。この姿勢は、現在、極めて広い範囲に拡大を続ける生命科学の多くに共通するものである。DNA二重らせん構造モデルの構築も含めて、生体巨大分子の三次元構造を決定する手段として、X線回折法が極めて重要な役割を果たしてきたことは言うまでもない。これをタンパク質に適用した最初の例は、マッコウクジラの筋肉中に大量に存在するミオグロビンであった。筋肉は酸素を消費して発生する化学エネルギーにより生体を動かしており、ミオグロビンは分子状酸素を蓄積し、必要に応じて筋肉中に放出する。タンパク質結晶構造解析はその後、表面を覆う糖鎖を切断して細菌を死滅させる環境を整えるリゾチームや、血糖値を制御するホルモンとして働くインスリンなど、様々な生命現象において中心的役割をになうタンパク質に適用された。この黎明期には、試料を標的の生体そのものから抽出・精製したことが多い。その多大な労力のためにタンパク質の結晶構造解析例はゆっくり増大するにとどまり、生体巨大分子の三次元構造に基づいて生命現象を論ずる「X線構造生物学」が広く認知されるのは、ようやく1980年代の終わりになってからで、ミオグロビンの結晶解析の成功から二十年以上の歳月を必要とした。黎明期の状況を劇的に変えたものは、標的遺伝子をウイルスや大腸菌、昆虫細胞などの宿主に埋め込んで目的タンパク質を大量に発現させる遺伝子工学の発展と、1990年代初頭から始まったヒューマンゲノム計画であった。大腸菌のゲノム解読は既に開始されていたが、生命科学が究極の目標とするヒトについても、その遺伝情報の全容を解明しようというのである。遺伝子工学とゲノム解析の結果を組み合わせれば、研究者は、容易に目的とするタンパク質を大量に入手することができる。試料が大量に供給されれば、その結晶化に要する労力は軽減される。また試料の精製度を極限まで高め、従来は結晶化不可能と考えられていた膜タンパク質、多数のサブユニットが互いに会合してひとつの粒子を形成し、一連の機能を実現するDNAポリメラーゼやリボソームなどの超分子複合体もX線結晶構造解析の対象となり、構造生物学の範囲は著しく拡大された。

一方、構造生物学の現在の隆盛は、X線源としての放射光施設の存在を抜きにしては語ることができない。放射光利用のタンパク質結晶構造解析は、我が国では、1980年代につくばのフォトンファクトリーで始まり、その後ほぼ十年を経て構造生物学に必要な不可欠なツールとして認知されるに至った。SPring-8はまさにこの時期に建設され、その高輝度特性により、分子量数万程度の通常のタンパク質については、幸運であればほんの数時間で最終的な三次元構造が得られるようになり、また分子量が数百万にも及び、従来は解析不可能と考えられた超分子複合体についても解析が可能になった。最近の五年間には、蓄積されたゲノム情報に基づいて、膨大なタンパク質群の三次元構造を網羅的に決定する構造プロテオミクスが国家プロジェクトとして展開され、多数のタンパク質の構造情報が蓄積された。また構造プロテオミクスは、放射光を利用する研究者の数を飛躍的に増大させ、構造生物学は既に成熟期に入ったような印象を与えるかもしれない。しなしながら、この地球に生息する生物種は極めて多様であり、またそれぞれの生命を維持するために機能するタンパク質は膨大な数にのぼるため、構造生物学の研究領域は今後も拡大の一途をたどり、それぞれの時代の要求に即して、分子生物学や放射光科学に新たな革新を迫り続けるものと予想される。

今後の課題

今後の十年から二十年を見通して、放射光科学の立場からX線構造生物学の近未来を正しく予測することは容易ではないが、筆者の私見によればそのキーワードは、「位相情報の併用」、「X線損傷の低減」、他の手法と組み合わせた「構造生物化学の展開」である。生命は多数の生体巨大分子の機能ネットワークにより維持されており、生命科学の最終的な目標はこのようなネットワークの全容解明である。しかしながら現状は、ひとつひとつの生命現象に関わるタンパク質の三次元構造を網羅的に決定している段階にある。網羅的な解析は、今後もその領域を拡大していくと予想されるが、一方でこれからの研究は、より多数の超分子複合体と、複数の要素が解離会合して機能を発揮している生物システム（あるいは部分的な機能ネットワーク）に及ぶであろう。

超分子複合体に関する研究では既に、電子顕微鏡との組み合わせが模索され、構造解析における位相情報の威力が再確認されている。電子顕微鏡を利用した膜タンパク質の二次元結晶構造解析では、各回折点について検出器に到達する電子数はX線結晶解析のフォトン数に比べて10分の1から100分の1程度にとどまる。このため電子線回折の測定精度はX線結晶解析より劣るにも関わらず、実際には同等の解析分解能に到達している。これは、回折強度測定と同時に多数の二次元画像を撮影し、それらを平均して、精度の高い位相情報を構造解析に併用しているためである。超分子複合体ではその巨大な分子量のために、今後は1000 Å (0.1 μm)にも及ぶ格子定数の結晶を対象とするようになるが、その結晶はミクロンサイズ（1辺の単位胞は10個のオーダー）以上には成長しないかもしれない。X線回折実験は、SPring-8で建設が進められているマイクロフォーカスビームラインで行われることとなるが、得られる回折強度は、これまでと比べて遥かに弱い。ビームラインとしては、この弱い回折強度

をいかにして高い精度で測定するかが重要な課題となる。またミクロンサイズの結晶を氷包埋した試料の電子顕微鏡像から得られる位相情報や、X線自由電子レーザー(XFEL)が提供するスペックル干渉像から引き出される位相情報を、ビームラインで測定された回折強度と組み合わせる新たな手法の開発が望まれる。

X線損傷の低減は、バクテリオロドプシンのプロトンポンプに関する研究、チトクロームオキシダーゼや光化学系 II 複合体の研究などで、既に、緊急に解決されなければならない中心課題の一つとなっている。これまで普通に適用されてきたX線ドーズでは、それぞれの不安定な活性中心はほとんど破壊されているとされており、構造生物学の根底を揺るがしかねない問題である。ここでも、より少ないドーズで、いかにしてこれまでと同等の解析精度を実現するかが検討されなければならない。

「枚举の科学」と呼ばれ、生物学の広範な領域に拡大した構造生物学は、現在も膨大な数の生体巨大分子の三次元構造情報を蓄積し続けている。しかしながら、それらに基づいてこれまでに推論された反応機構や機能は、今後、生命の機能ネットワークを議論する際にそのまま適用されるであろうか。構造プロテオミクスにより蓄積された三次元情報は、それらを初期構造とする計算機シミュレーションや量子化学計算に利用されるが、その計算結果は初期条件に大きく依存し、推定した反応機構の正しさを一義的に証明するものではない。また現在の構造生物学では、研究対象が例えば酵素であれば、基質に類似した構造を持ち実際には化学変化を受けない阻害剤や、反応中心のアミノ酸残基を部位特異的に改変して本来の機能を失った変異体の三次元構造から機能を推論することが多い。このような方法論に従って提案された反応機構は、論理的に考えれば、その正当性を保証されているとは言えない。生命現象は時間とともに変化する過程である。単純な酵素反応においても、提案された反応機構は実際に反応が進行する過程をその場観察して実証されなければならない。極論すれば、最初のみオグロビンから現在まで、構造生物学は生体巨大分子の三次元構造情報を提供してきたのみと見なすこともでき、タンパク質結晶解析法は今後、自らに時間軸を加えて四次元解析法に昇華するか、XFELの一分子計測や溶液条件下の反応速度論解析など、時間軸を含む他の研究手法と組み合わせることによって、今後もその存在意義を維持し続けることができる。顕微分光装置をビームラインのアタッチメントに加える努力が既に行われているが、今後はさらに様々な手法を結晶構造解析と組み合わせることになるであろう。