

## 生命科学とタンパク質 X 線結晶構造解析

神谷 信夫

理研・播磨研究所\*

## Life Science and X-ray Protein Crystallography

Nobuo KAMIYA

RIKEN Harima Institute, The Institute of Physical and Chemical Research

X-ray crystallography using synchrotron radiation is an excellent tool to elucidate three-dimensional structures of proteins. The structural information is indispensable to understand biological functions and interactions of proteins in a living organisms. In order to propagate a scientific field of structural biology, the Bio-Crystallography beamline (BL41XU) of SPring-8 is under operation for routine structure analyses of proteins. The 21st century will be an era of life science based on the three-dimensional structures of proteins.

## 1. 生命科学とタンパク質

あと1年と9ヶ月にせまった21世紀は生命科学の時代と言われている。ある日突然に世の中が一変する訳ではないにしても、いったい生命科学の時代とはどういうものなのであろうか。古来から神秘的なベールに包まれて、神聖にして犯すべからざるものと考えられてきた生命が科学の対象とされ、その知識に基づいて新しい時代が構築されるというのである。まだ記憶に新しいこととして、少し前にはイギリスでクローン羊が誕生して世界中の話題をさらった。クローンとは遺伝的にまったく同一な固体(または細胞)のことである。クローン羊の生産はそのままクローン人間が跋扈する世界を我々に想像させて強い衝撃を与える。しかしながらこのような問題は倫理の範疇にあり本稿の意図するものではない。本稿ではタンパク質の原子レベルにおける立体構造を基礎にしてあらゆる生命現象が語られる時代について論じたい。

現在の生命科学の隆盛は、20世紀の半ばにワトソンとクリックによって提唱されたDNAの2重らせんモデルの成功に端を発している。このモデルは、生物を特徴付ける上でもっとも重要であり、複雑でそれゆえに神秘的に見える遺伝という現象を、物質すなわち分子の概念を用いて説明することができた。なぜ細胞は自分と同じものを次々とつくり出して増殖することができるのか。その答えはDNA

を構成する2本の鎖状分子(便宜的にA, Bとして区別する)、すなわち核酸の上にならぶ塩基の相補性にあった。核酸塩基には4種類しかなく、その2個づつが互いに特異的な結合を形成してお互いを認識する。細胞の増殖に際してDNAの2重らせんがほどければ、AとBの塩基配列が独立に認識され、Aを鋳型にして新しいB'(Bと同じもの)が合成でき、Bを鋳型にしてA'(Aと同じもの)が合成されることにより(A, B')と(A', B)の新しい2本の2重らせんができてあがる。

DNAは良く知られているように遺伝情報を記録するビデオテープのようなものである。ワトソンとクリックのモデルの提唱を境にして分子生物学が急速に発展し、ウイルスや大腸菌から人間まで、様々な生物の遺伝情報、すなわち核酸塩基の配列が次々と決定された。連続する3個づつの核酸塩基の組みは1つのアミノ酸に対応している。タンパク質はこの遺伝情報に基づいて対応するアミノ酸が鎖状に重合したものである。タンパク質こそがあらゆる生命現象を実際に進める化学反応の担い手であり、特定の生命固体の遺伝形質を決定している。こうして遺伝子とは、タンパク質の1次構造情報を記録しているDNA上の特定の領域であるという概念が形成された。

分子生物学の発展の歴史の初期においては、ある生物種の1つの遺伝子についてその塩基配列を決定することが

\* 理化学研究所・播磨研究所 〒679-5143 兵庫県佐用郡三日月町三原323-3  
TEL 0791-58-2839 FAX 0791-58-2834 e-mail nkamiya@sp8sun.spring8.or.jp

重要な課題であった。しかしながら DNA はどの生物種から得られるものでも同じ化学的性質を持つため、塩基配列の決定法は瞬く間に世界中の研究者が日常的に利用するものとなった。現在では大腸菌の全塩基配列が既に決定されている。また複数の生物種の遺伝情報をまるごと解明しようとするゲノム計画が複数開始されており、21世紀初頭にはヒトの遺伝情報の全容が解明されるであろう。

それでは生命科学は21世紀初頭で終わりを告げるのであろうか。そうではない。これまで多くの生物学者が特定の生命現象を理解しようとして、対象とする遺伝子、すなわちタンパク質の1次構造を決定しても、それは依然として暗号のような情報の羅列にすぎなかったのである。タンパク質は鎖状に重合したアミノ酸から、多くの場合自発的に、球状にからみあった3次元的な立体構造を形成する。タンパク質はこの立体構造の場において特異的な生命反応を進行させるものであり、我々はその立体構造を解明して初めて生命の本質にせまることができる。

タンパク質を構成するアミノ酸の数は数百から時には数千にも及ぶ。その自発的な立体構造の形成過程をシミュレートして1次構造から立体構造を正確に予測できるなら、生命科学の発展は20世紀中に終結していたかもしれない。しかしながら現実には、タンパク質の立体構造形成過程は非常に多数のパラメータからなり、タンパク質の立体構造の形成過程をシミュレートするためには、ほとんど無限と考えてよいパラメータの組み合わせのすべてを検討しなければならない。このような予測はコンピュータ科学の発達した現在においてもほとんど不可能である。各タンパク質に特異的な立体構造を実験的に解明して生命現象を論じようとする構造生物学が発展しつつある所以である。

## 2. 放射光を利用したタンパク質結晶構造解析

構造生物学では原子レベルの分解能における立体構造情報を必要とする(本特集の野中孝昌氏の稿を参照されたい)。それは生命現象の本質にかかわる化学反応が、主に水素、炭素、窒素、酸素から構成させるアミノ酸の関与により進行するためである。もちろんタンパク質全体の構造変化が生命現象に直接係わるような場合には、より分解能の低い構造情報が大きな意義を持つことは明らかである(本特集の藤沢哲郎氏の稿を参照されたい)。しかしながらこの場合でもタンパク質全体の構造変化の前には必ず原子レベルでの化学変化が先行しており、その直接観測が必要となる(本特集の岡俊彦氏の稿を参照)。

巨大なタンパク質の立体構造を原子レベルの分解能で決定できる手法としては、X線結晶構造解析、核磁気共鳴、電子顕微鏡を考えることができる。これらの手法は互いに相補的なものであるが、その適用範囲の広さと構造解析結果の信頼性においてX線結晶構造解析の右に出るものはいない。タンパク質のX線結晶構造解析法は、近年の放射光科学の進展により飛躍的な発展を遂げているもののひ

とつである。特にSPring-8を初めとする第3世代放射光施設に導入されたアンジュレータは、解析可能なタンパク質の範囲を拡大し、より迅速な構造解析を可能にした。平成9年の10月からSPring-8で共同利用運転を開始したタンパク質結晶構造解析アンジュレータビームライン(BL41XU, 図1参照)は、X線を利用してタンパク質の立体構造をよりルーチン的に迅速に決定すること、特に分子量の大きいタンパク質や小さな結晶試料など、X線回折能の低いものに解析対象を拡大することを目的に建設されたものである<sup>1-3)</sup>。

タンパク質結晶構造解析を行うにあたりまず解決しなければならない問題は、言うまでもなくタンパク質試料の結晶化である。タンパク質の結晶化は、タンパク質分子表面の電荷の分布や結晶内部でのパッキングに作用する金属原子、沈澱剤の種類や温度など、数え上げたらきりのないほど多数のパラメータに依存しているため、これまで結晶化に成功したほとんどは、研究者による多数の試行錯誤の結果である。それゆえにタンパク質の結晶化条件の体系化は困難なものと考えられてきたが、最近になって、従来の代表的な結晶化例をまとめる努力が行われ、新規タンパク質を結晶化しようとする際にまず試してみるべき結晶化条件が示された<sup>4)</sup>。またその結晶化条件を簡単に実現できる試薬が市販されるに至り、初めてタンパク質の結晶化に挑戦しようとする生物学者の感じる壁を低くすることに貢献している。

タンパク質結晶構造解析を成功に導く上で克服しなければならないもうひとつの問題は、結晶構造解析には必ずついてまわる、いわゆる「位相決定」である。タンパク質の立体構造を実験的に決定するためには、結晶内部の電子密度分布を求める必要がある。これはタンパク質結晶からの回折線特性(振幅と位相)をすべて決定すればフーリエ変換として計算される<sup>5)</sup>。しかしながらX線の位相を実験的に求めることは容易ではなく、特に分子量の大きいタンパク質の結晶構造解析では従来から独特の方法が開発され利用されてきた。重原子多重同型置換(MIR)法では、元となるタンパク質の結晶とともに、それに重原子を付加した誘導体を複数必要とする。この重原子誘導体は元の結晶と同型、すなわち誘導体結晶におけるタンパク質のパッキングや立体構造は重原子が付加されていること以外にはまったく同等でなければならない。本来タンパク質は多種類の重原子試薬と化学反応しやすい性質を持っており、その重原子化そのものは容易であるが、この同型性を満足するものは容易には得られない。そのためMIR法に基づくタンパク質結晶構造解析では、多数の重原子化試薬を利用して試行錯誤的な重原子誘導体の探索が必要となる。BL41XUでは、ビームラインの優れた特性を利用してひとつの結晶試料に対する測定を迅速化し、一方測定とほぼ平行して重原子誘導体の同型性を検定できるシステムの構築を目指している。

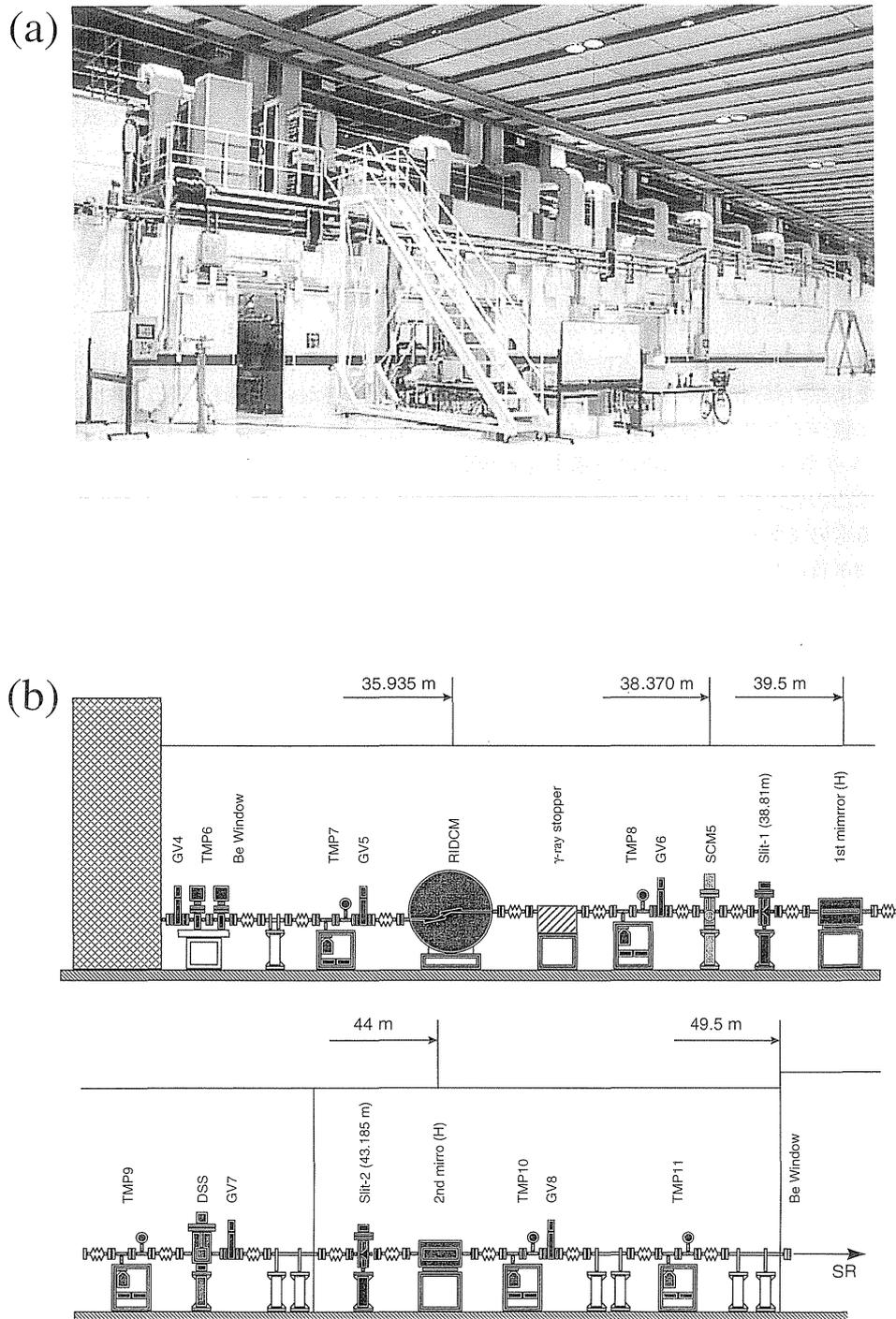


Figure 1. (a) Bio-Crystallography beamline and (b) its schematic drawing. RIDCM; rotated inclined double crystal monochromator, GV; gate valve, TMP; turbo molecular pump, SCM; screen monitor, DSS; downstream shutter. The distances are from the light source point.

タンパク質結晶構造解析に対して放射光がもたらした福音のひとつは、X線エネルギーの可変性（チューナビリティ）である。上述した重原子誘導体に含まれる重原子は、そのX線吸収端の前後で顕著な異常分散効果を示す。放射光を利用すれば、各重原子に対して最も大きな異常分散効果（OAS）を示すX線エネルギーを自由に選択でき

る。これを位相決定に積極的に利用すれば、必要とされる重原子誘導体の数を減らすことができる。これはタンパク質結晶構造解析のルーチン化に非常に有効である。なお異常分散効果は原子量の大きい重原子に限ったものではない。タンパク質結晶構造解析では、タンパク質に人工的にセレンを導入して、その異常分散効果のみを利用した多波

長異常分散 (MAD) 法による構造解析の自動化が急速に広がっている。MAD 法に関しては本特集の中川教史氏の稿を参照していただきたい。

さて MIR と OAS を組み合わせてタンパク質結晶構造解析をルーチン化するためには、まずビームラインの光学素子を自動調整して任意のエネルギー選択性を確保しなければならない。この作業には、本来の分光素子としての役割とともに、アンジュレータ光源の発する熱負荷を除去するという重大な役割を担う SPring-8 の標準モノクロメータを十分に使いこなす必要があった<sup>6)</sup>。この困難な問題も最近になってようやく解決への目処がたち、現在では目的とする任意の X 線エネルギーを簡便に選択可能となっている<sup>7)</sup>。

一方 MIR-OAS ルーチン解析の実現には、アンジュレータの優れた特性に見合う実験ステーション内の回折計、付属する装置、データ処理系のハードとソフトウェアの開発などがあわせて必要である。図 2 に、BL41XU の実験ステーションに設置された回折計を示した。ここでは主な X 線検出器として富士フィルム社の開発したイメージングプレート (IP)<sup>8)</sup>を採用している。IP はタンパク質結晶構造解析においては特に重要となる広い有感面積、6 桁にも及ぶダイナミックレンジをもち、MIR-OAS 法で利用される広いエネルギー範囲にわたる X 線に対して高い感度を示すなど、非常に優れた検出器として働いている。し

かしながら IP ではその動作原理に依存して、回折像の記録と読み出しを空間的に異なる場所で行う、読み出し用の点状に集光したレーザー光を機械的にスキャンするなどのために、回折像の読み出しに要する時間が長いという欠点がある。BL41XU では、新規のレーザースキャン方式の開発によりその読み取りの短縮をはかる R & D を進めているが、この問題に対する抜本的な解決にはより高速な読み取りが可能な CCD 検出器の導入が不可欠である。

### 3. 構造生物学と放射光

タンパク質はその分子量が時には200万にも及ぶ巨大なものであり、その結晶から得られる信号 (回折点) は極めて多数であると同時に極めて微弱である。またタンパク質の結晶は10ミクロンから100ミクロン程度という小さなものしか得られない場合が多い。SPring-8 のアンジュレータ光源はその超高輝度特性により、直径が100ミクロン程度の領域に平行性の高い大強度の X 線ビームを集中させることができる。タンパク質の結晶にアンジュレータ光を照射すれば、10万点を越える回折点を一度に記録することができる<sup>9)</sup> (図 3)。これは極めて多数で微弱な回折点を測定しなければならないタンパク質結晶構造解析において、アンジュレータ光がもっとも優れた光源であることを証明している。またアンジュレータ光の超高輝度特性は、従来の装置では観測できなかった領域まで測定限界を広げる、すなわちタンパク質結晶構造解析の分解能の改善を可

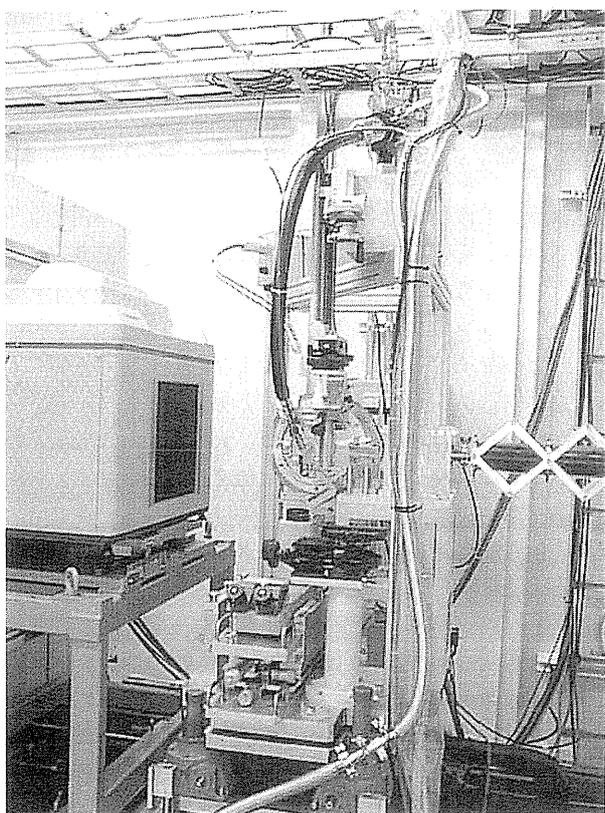


Figure 2. MIR-OAS diffractometer.

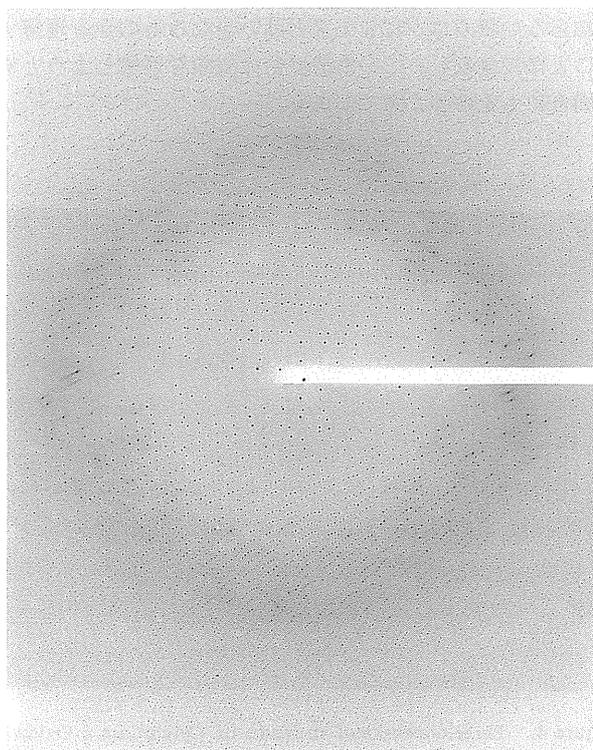


Figure 3. Large angle oscillation diffraction pattern of tetragonal lysozyme crystal.

能にした。

タンパク質は巨大な分子でありながら、そこで進行する生命反応は、例えば pH 試験紙の色が変わるのと同様にあくまで化学反応であり、蛋白質の機能を解明するためにはそれを構成するそれぞれの原子を識別できる高分解能の構造解析が要求されることはすでに述べたとおりである。チトクローム酸化酵素 (図4) は合計13種類の蛋白質が寄り集まってひとつの機能単位を形成し、細胞呼吸で中心的な役割を果たしている。細胞呼吸とは細胞が外界から酸素を取り込んで生命活動に必要なエネルギーを生み出すもので、チトクローム酸化酵素は細胞膜上で水素イオンをくみ上げる生体ポンプとして働いている。すなわちこの酵素の機能を解明するためには、原子の中でももっとも小さい水素原子が反応の進行に伴って細胞の内外を移動する様子を明らかにしなければならない。大阪大学蛋白質研究所の月原富武教授ら、姫路工業大学理学部の吉川信也教授らのグループは共同で、SPring-8 を利用して本酵素の超高分解能構造解析を進めており、その本性が明らかにされる日は近い。

SPring-8 では現在、多数のタンパク質をターゲットにした結晶構造解析が複数のビームラインで進められており、今後も着実に成果が報告されるであろう。しかしながら SPring-8 が出現した現状ではもはや、個別のタンパク質の立体構造が解明されることに満足していることはできない。生命現象をコンピュータに例えるならタンパク質はその部品である IC チップに過ぎないのであり、その部品がどのように組み合わせられ、どのように制御されているかを知らない限りコンピュータとはいかなるものかを理解することはできない。この事情は生命現象を理解しようとする場合にもそのままあてはまる。

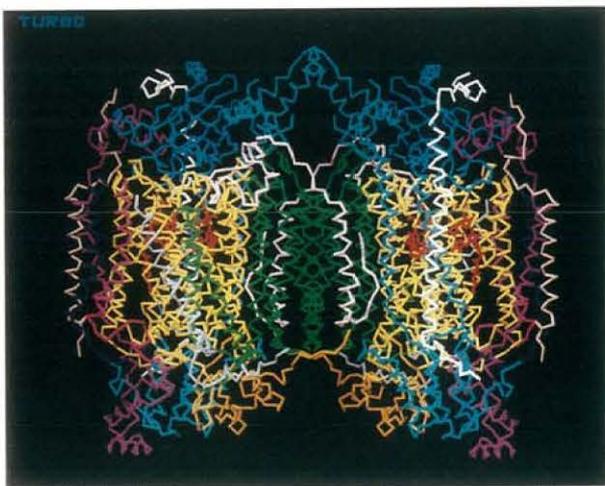


Figure 4. Three-dimensional structure of Cytochrome c Oxidase. (kindly gifted from Professors Tomitake Tsukihara of Osaka University and Shin-ya Yoshikawa of Himeji Institute of Technology.)

さてタンパク質結晶構造解析に基づく構造生物学は、現在生命科学の広い領域にわたって展開されている。これは生命現象そのものともいえるタンパク質間の相互作用をターゲットにしたものであり、その動向は2つの大きな流れに分類できる。ひとつは最初に述べたゲノム計画ともカップルして、可能な限り多くのタンパク質についてその立体構造を解明しデータベース化することで、タンパク質間の相互作用をコンピュータ上でシミュレートしようとする。この流れでは本年度より、高度高熱菌で働いているタンパク質のすべての立体構造を解明しようとするプロジェクトが理研で開始される。2つめは結晶構造解析の対象を単独のタンパク質から複数のタンパク質の複合体へ移行させ、生命現象の現場を直接解明しようとする。これは上述したチトクローム酸化酵素のように複数のタンパク質がひとつの機能単位を形成している場合に留まらない。タンパク質としては個別に存在するものでも、一連の生命反応が進行する条件においては複合体を形成する 경우가多く、これをまるごと構造解析しようというのである。この流れでは文部省科学研究費特定領域研究「シンクロトロン放射光による生物マシーナリーの構造生物学」が本年度より4年間の予定で開始される。このような2つの流れはどちらも SPring-8 の利用を前提にしており、またどちらも世界的な激しい競争の中にある。

#### 4. 21世紀の生命科学の発展のために

本稿では最初に、生命科学の時代と呼ばれている21世紀のイメージを問いかけた。そのイメージは以上述べてきたように、タンパク質結晶構造解析 (や核磁気共鳴、本稿では触れていない) を手法とした構造生物学を基礎として構築される世界である。あらゆる生命現象を記述するために、原子レベルで立体構造を決定したタンパク質分子が利用される。生命現象は多数のタンパク質の相互作用により説明される。その相互作用は、実際に複合体の結晶構造解析を行った結果である場合もあれば、コンピュータ上のシミュレーションによる場合もある。

このようなイメージは、実は膨大な数のタンパク質について立体構造情報が蓄積されることを前提にしている。それにはタンパク質結晶構造解析が、天秤を使って物質の質量を測定するように日常化し大衆化する必要がある。本稿でも述べてきたように現在の生物学は確実に構造生物学へとその中心を移行させつつあり、タンパク質結晶構造解析を実行しようとする生物学者の数は日増しに増加している。タンパク質結晶構造解析は手法的にもほぼ完成された段階に近づいてきており、その大衆化の素地は十分にある。しかしながらここで我々の前に大きく立ちちはだかる問題があるとすれば、それは放射光施設におけるビームタイムの不足である。言うまでもなく放射光施設は世界的にも数える程度しかない。1つの施設には多数のビームラインを建設できるとは言え、放射光施設はあらゆる物質科学の

ために建設され利用されている。これをいかに分配するかはそれぞれの施設が建設された経緯や、立地条件、科学の進展の程度にもよるなど、高度に政治的な判断によらざるを得ない。それを議論することは本稿の任ではないが、本稿により、21世紀の生命科学においてタンパク質結晶構造解析が占める役割が放射光科学のコミュニティにいつそう理解され、ひいては生命科学の発展に寄与できればと願うものである。

#### 参考文献

- 1) 神谷信夫：生物物理 **35**, 15 (1995).
- 2) 神谷信夫：日本結晶学会誌 **38**, 80 (1996).
- 3) 神谷信夫：放射光 **9**, 427 (1996).
- 4) J. Jancarik and S. H. Kim: *J. Appl. Cryst.* **24**, 409 (1991).
- 5) J. Drenth: "Principles of Protein X-Ray Crystallography", Springer, New York.
- 6) 河野能顕：SPring-8 利用者情報 **4**(2), 58 (1999).
- 7) 河本正秀：SPring-8 利用者情報 **4**(1), 21 (1999).
- 8) J. Miyahara, K. Takahashi, Y. Amemiya, N. Kamiya and Y. Satow: *Nucl. Instrum. & Meth.* **A246**, 527 (1986).
- 9) N. Kamiya, Y. Kawano and M. Kawamoto: *RIKEN Review* **18**, 29 (1999).