



蛋白質の粉末 X 線結晶解析の現状

三浦圭子 勲高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1

植木龍夫 勲高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1

要旨

粉末 X 線回折データからの構造解析については、無機化合物を始めとして有機化合物についても実績が増えてきているが、蛋白質結晶についても放射光を使った適用例が一部報告されてきている。SPring-8 の特徴的な大型ギニエカメラの利用結果も含めた蛋白質粉末 X 線回折に関する世界的動向について紹介する。高分解能粉末 X 線回折データを用いることで、構造既知の酵素とその阻害剤複合体の構造解析の可能性を伝えたい。

1. 序

蛋白質結晶のような結晶格子が大きく、かつ X 線回折強度が弱い粉末 X 線データから構造解析が出来るなどと想像していなかった方々へ、当方の実験データも含めた最近の研究動向をまとめて報告してみれば、興味を持つ方が増えるかと思ひ、以下の内容を用意してみた。

無機材料をはじめとする粉末 X 線構造解析の結果を多数発表されているようになってきた近年、Rietveld 法を中心にその解析ソフトウェアの進展は大きな寄与を果たしているものと思われる。その手法に加えて、特に医薬品を中心とする有機分子の *ab-initio* 結晶構造解析が可能になってきている。有機分子までについては、その詳細については、別途資料を参照してもらうことを期待したい。対象分子が大きいものでも可能になってきた延長線上に位置づけられるように、蛋白質を用いた構造解析についても、主として大型放射光施設を利用することで可能になってきている。

2. 世界的動向

最初に、蛋白質粉末 X 線回折データより結晶構造の精密化まで行なった報告例として挙げられるのは、1999年の *J. Applied Crystallography* に報告された Von Dreele による metmyoglobin の構造解析となる¹⁾。それ以降同じグループが、 T_3R_3 Zn-Insulin complex の粉末結晶構造解析を報告している²⁾。

例えば、Hen Egg lysozyme を用いて回折角度 2θ 25度までの 1 次元の回折強度を用いて構造精密化が出来ることを示したことは、従来の蛋白質結晶構造解析のために、単結晶を用意して、振動写真法で結晶を回転させながら連続測定する必要があるとして時間をかけていた実験者の観点からすると、画期的なことではないかと思えた。

データ測定はいずれも、第 2 世代放射光実験施設の National Synchrotron Light Source (NSLS), Brookhaven National Laboratory の粉末回折実験専用ビームライン (X3B1) で行なっている。測定器は Ge(111) の crystal

analyzer-detector system を用いて、 $\Delta 2\theta 0.002$ degree, 1 sec/step としても、測定総時間は 11 時間以上となっていた³⁾。

このとき用いた lysozyme の結晶学的パラメーターは、空間群 tetragonal $P4_32_12$, $a=b=78.89$ Å, $c=38.25$ Å で、無機化合物を対象としていたような粉末 X 線結晶構造解析の研究者にとっては、無機物に比べると 2 桁近く大きな結晶格子を持つ蛋白質結晶についても、構造解析の可能性がある興味深い結果となっていたと思われる。

しかしながら、測定条件が室温であったこともあり、放射光使用の蛋白質結晶解析の観点からすると、この長時間測定中の X 線損傷についての懸念が大きく、強度分布の不均一性につながっているものと推定している。

ともかく、以上の解析結果については、蛋白質結晶構造のデータベースである PDB (Protein Data Bank) に登録・公開されているので、指数付けされたプロファイルと合わせて各自見ることが出来る。直接参照願いたい。現在、合計 12 データ (PDB entry 1F6H など) が登録されている。

極めて最新の情報では、「BINDING OF N-ACETYL-GLUCOSAMINE OLIGOSACCHARIDES TO HEW LYSOZYME: A POWDER DIFFRACTION STUDY」というタイトルで、2004年 2月に登録されているシリーズは、lysozyme とその阻害剤の大きさ (tri から hexa までの 5 種類) が異なるグルコサミンとの complex についての構造解析結果が含まれている。今後の論文内容が期待される。

APS での lysozyme の粉末 X 線回折データ測定については、古く 1998 年の BSR (International Conference on Biology and Synchrotron Radiation) に発表されていたが、それ以降の進展については、未報告となっていた。総説⁴⁾を参照すると、19-ID で CCD や IP を使って lysozyme など 3 種類の粉末 X 線回折データ測定はしていたようだ。2003 年以降は Von Dreele は APS に移り、SRI2003 での発表にもみられるように新ビームラインでの蛋白質粉末 X 線解析にも関係あるようで、今後の研究発展が想定さ

れる。

追加の情報としては、上記のように論文発表などを含めて精力的に活動している Von Dreele 著書の「Protein Crystal Structure Analysis from High-Resolution X-Ray Powder-Diffraction Data」を含めた総説 Method in Enzymology Vol. 368⁴⁾が、出版されたのでこの機会に紹介しておきたい。一部今回の記事の参照にもなっているが、Brookhaven, APS での蛋白質粉末 X 線結晶構造解析の今までの経過について、他には記載されていない興味深い記事がまとまっているので、是非とも一読されることを推奨したい。

3. IUCr 2002 (Geneve) での報告例

上記の論文以降の論文発表例が無いこともあり、情報収集の手立てを模索していたところ、2002年の国際結晶学会で、ESRF の J. Wright による粉末 X 線回折実験専用ビームライン (BM-14) での実験として、metmyoglobin を用いた低温測定へ向けての温度変化による結晶格子転移の観測という発表を聞くことが出来た⁵⁾。

温度を200 K 近く下げると、回折プロファイルの広がり、回折角度の急激変化をともなう転移がおき、それ以下の条件での回折強度低減も伴っていたことから、低温測定の難しさが確認されていた。

同学会では、当方から次章に記載するイメージングプレートを検出器とした蛋白質粉末 X 線回折データ測定の例をポスター発表する機会を持てたことから⁶⁾、これ以降相互の実験動向などに注目できるようになった。この発表については、翌年の ECM21 で J. Wright と共同研究の Berkbeck college の Dr. CockCroft の発表の際に引用してもらっている。ESRF では2003年夏の時点では、今まで BM-14 で実験していたが、粉末 X 線関係が ID-31 に変更になったこともあり、X 線の強度はあがって30分程でスキャンできるようになってきたが、それに伴って、X 線損傷が激しくなって、再現性がむずかしくなっていることがあげられていたが、低温実験も含めてサンプル調整のためにも生化学・構造生物学関係の共同実験者が増えた様子で、蛋白質試料特有の問題については早く解決できるようになると期待される。

上記2グループとの粉末 X 線回折研究者当方が明らかに違うところは、蛋白質結晶用装置を使用して、蛋白質の極微小結晶サンプルを用いることで、良好な粉末 X 線回折データが得られることを見たことがきっかけであると理解してもらいたい。

4. SPring-8 における蛋白質粉末 X 線結晶解析の経過

4.1 まず最初に

4.1.1 粉末サンプルについて

当方が用意しているのは、全て微小結晶を作成している。そのまま0.3 mm 径のリンデマン製キャピラリー中で

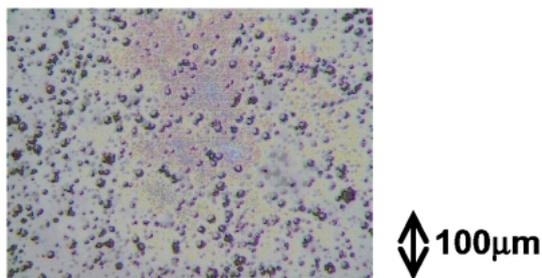


Figure 1. Microcrystals of bovine insulin crystal.

遠心濃縮してキャピラリー封入したものに、X 線照射している。Von Dreele らの報告を見ると、crash したり sonication をかけているようだが、結晶化溶媒が結晶体積の約50%含まれていることから、触り方を間違えるとモザイク性の高い粉末回折実験には適さないものとなる可能性を憂慮して、このように対応している。蛋白質結晶化条件検索の際に確認する層図の「amorphous」と「crystal」の間に該当する「microcrystal」が析出する条件下を利用する。例えば卵白リゾチームの場合は、沈殿剤として用いている NaCl の濃度を高くすることで迅速に析出する微結晶を遠心濃縮して X 線データ測定用サンプルを作成する。液量は 4 microliter の結晶化用ドロップ1つ分相当で十分である (Fig. 1)。

4.1.2 測定温度条件

当方は、基本的に室温で実施している。

理由の1つは、以下に紹介する Bending magnet のビームラインで測定している限りでは lysozyme を使って 3 Å 分解能の範囲の測定時には、回折強度の急速な減少を伴うような X 線損傷は見られなかったことから、低温測定が必須ではなさそうだと考慮したからである。もう1つの理由は、同じビームラインで測定した単結晶 X 線回折データより、そのモザイク性評価の結果を念頭においているからである。Lysozyme については、室温でのデータ測定時には 0.09 degree と極めて小さいモザイク性が保てるのだが、同じ試料を低温 100 K で測定するために cryoprotectant の Paratone-N に迅速に置き換えて flash cooling すると、モザイク性は 0.27 degree とほぼ3倍広くなることが確認されている。これがそのまま粉末試料にも反映されるかどうかは、現在検討中で、蛋白質粉末試料の低温測定条件検索の際に注意したい。

4.1.3 粉末回折データ測定の条件検討

構造生物学ビームライン II として共同利用されている BL40B2 で実施した。測定装置は、イメージングプレート方式の R-Axis IV++ (area 300 mm × 300 mm, 100 micron/pixel) を用いている。BL40B2 では、ビームライン建設当時より、蛋白質結晶構造解析分野と小角散乱実験分野の2つの実験分野に対応する装置類が、同じ実験定盤上で組み替えることが出来るように準備されていた。その中の、小角散乱グループが広角までの測定を念頭に準備さ

で、迅速に測定できるようにしました。

測定データとしては、lysozymeのみと lysozyme-NAG4との複合体結晶の比較などが、5分から10分の露光時間で測定出来ることなどを検証済みである (Fig. 5) (Fig. 6)。(本装置の利点)

- 1) 検出面に集光した回折データが得られる。
ギニエ式カメラの構造上の利点である

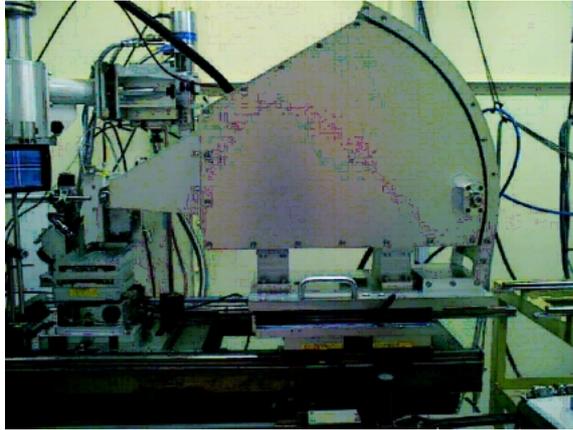


Figure 4. Setting layout of a new guinier camera at BL40B2.

- 2) 高い角度分解能となる。

カメラ長が1000 mm と長いため、1ピクセルあた50ミクロンのイメージングプレートの読み取りをすることで、角度分解能は0.00275度/ピクセルとなる。この角度分解能で30秒露光で分解能3 Åまでの回折データが一括して測定できることで、カウンターを用いた長時間スキャンの際に懸念される X線損傷の影響が少ないと想定される。

- 3) 弱い回折線を正確に測定できる。

サンプル・ビームストッパー・イメージングプレート間を可能な限り真空にすることで寄生散乱の低減を図り、バックグラウンドを低くすることが可能になっている。この真空パスにするという構想は、小角散乱実験での経験と装置設定によるもので、小角散乱実験者とのコラボレーションの利点としてあげられる。

(本装置の不利な点)

- 1) 測定角度範囲の限界がある。

真空パスのイメージングプレート側窓の大きさから 2 symbol 最外角で31度までしか検出できない。波長1.000 Åを使って、1.9 Åまでである。カプトン150ミクロン厚みの窓材を使っているも、真空引きをすることで大きくひずみ変形が生じていることから、更に大きな真空パスに変更するには、注意を要する。

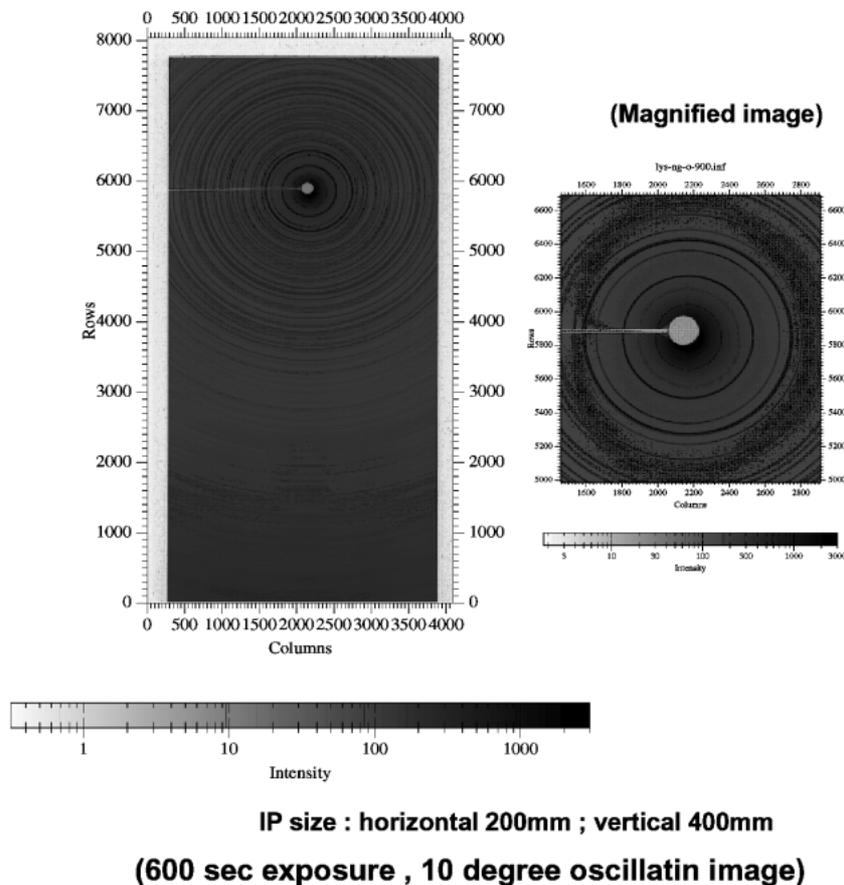
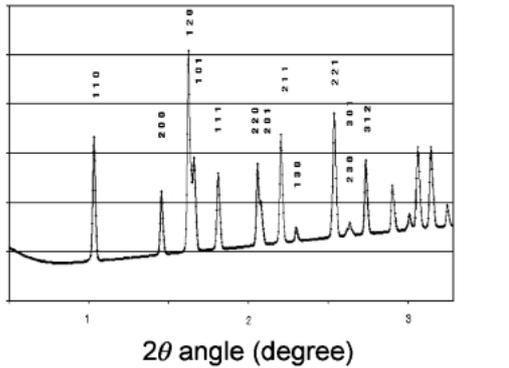


Figure 5. Powder pattern image of lysozyme-NAG4 complex crystal using a new guinier camera.

Lysozyme-NAG4 complex



Lysozyme only

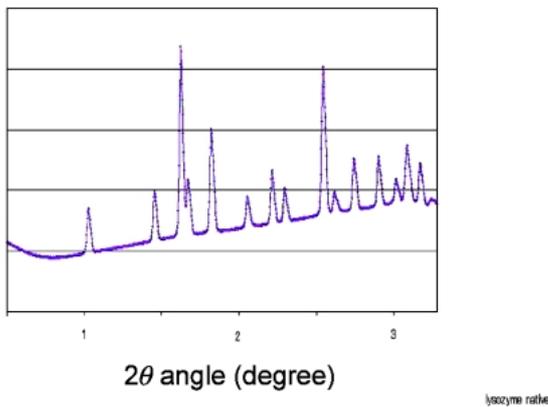


Figure 6. Profile of powder diffraction image processed by a software Fit2d.

4.3 これから

以下のことは現在課題実験で検討中の内容ではあるが、有効な結果が出ているので、報告したい。

これまでの蛋白質粉末 X 線回折データを見ると、低角側でも overlap は多いことから、できるだけ細い並行性の高いビームが有利であることは、明らかであった。

BL40B2 は、SPRing-8 標準の 2 結晶モノクロメーターで単色化した後で、1000 mm のベントートロイダルミラーで集光させてビームサイズが、(横)300 ミクロン×(縦)250 ミクロンで使用していたが、並行性の高いアンジュレータービームを使用できる条件を探していた。

BL40XU は、High Flux ビームラインとして 2 枚の KB ミラーで集光させて実験出来るようになっているが、エネルギー分解能は悪いことが、粉末 X 線実験の際には難しかったのだが、同ビームラインにチャンネルカットモノクロを導入・調整した際に、蛋白質粉末 X 線回折の可能性を検討させてもらった。通常の 40XU 条件よりはフラックスは 2 桁ほど低くなっているものの、BL40B2 で測定した同じ lysozyme サンプルを用いると、回折プロファイルを見ると半値幅が約 1/2 の 0.01 度以内になっていることが確認

Lysozyme-NAG4 complex

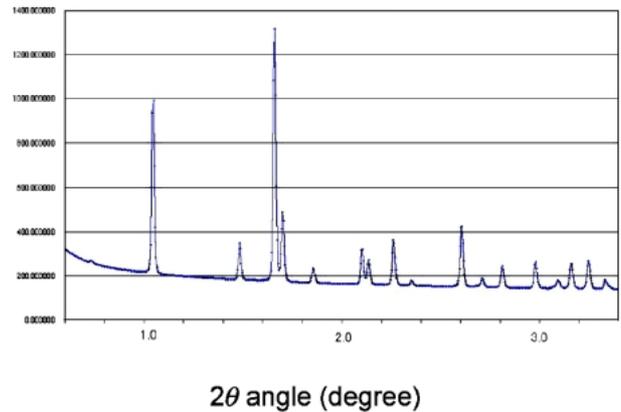


Figure 7. Profile of powder diffraction image collected at BL40XU.

できた。ビームサイズの(横)250 ミクロン×(縦)40 ミクロンも効果的であると考慮される。露光時間は 30 秒から 120 秒でデータ収集出来た (Fig. 7)。

最初に述べたように、欧米の放射光施設での蛋白質粉末 X 線回折の実験場所が、最初は BM の既設の装置を使って検討し始めて、今まさに、より高分解能のデータを測定可能な場所として ID のビームラインを使うようにシフトしているその動向も一致していると思われる。

4.4 解析関係ソフトウェアについて

既存の公開されているソフトウェアが以下のように充実しているため、活用していることを紹介したい。

1) 積分強度算出

Blue IP ((縦)400 mm×(横)200 mm サイズ) で測定した X 線回折データは、富士フィルム製イメージングプレートリーダー BAS2500 を用いて 50 ミクロン/ピクセル仕様で読む。そのデータを 2-θ conversion する際には、Fit2d を用いている。これは、ESRF の Andy Hammersley が開発したもので、多数の 2 次元検出器の積分強度算出用ソフトウェアとして、公開されているものである。

2) Indexing

無機物・有機物の結晶格子は、めずらしく大きいものでも 50 Å 以上になることは、ほとんど無いであろう。従来の indexing ソフトウェア (ITO, DICVOL, TREOR など) では、新規に解を得ることが難しく、空間群・結晶格子が既知のものであったためソフトウェア checkcell で精密化をすることは可能であったが、未知の結晶形については探索がむずかしかった状況である。

2003 年 9 月にリリースされた MacMile ver.3. を用いることで、明確に空間群と格子定数が算出されることが確認された。

(追記すると) SDPD (Structure determination by powder diffraction data) Structure Solution Mailing List 中のこのリリース当初のコメントでは、Test data として Von

Dreele らの lysozyme データを用いられて、結晶格子が大きいので、波長を1/10の値を使って、結晶格子の1/10のパラメーターで算出するしかないかというコメントがあったが、当方のデータ (Fig. 6) 中の低角の反射数20個を使うことで、迅速に単一の解が求まることは直ぐに確認出来たので、速やかに Dr. Armel LeBail に test data として使ってもらえるように開示することが出来ている。(詳細については <http://groups.yahoo.com/group/sdpd/> を参照願いたい。)

1) 構造精密化

GSAS (General Structure Analysis System)

Allen C. Larson & Ribert B. Von Dreele (Los Alamos National Laboratory) が開発した Rietvelt 解析を主とした粉末回折データによる構造精密化用パッケージソフトウェアを用いる。構造精密化の際に用いる蛋白質立体構造情報の PDB (Protein Data Bank) data の input などの、蛋白質粉末 X 線解析関係のモジュールについては、整備されてきており、迅速精密化計算が可能になっている。Profile fitting には Pawley 法などが選択でき、例えば、結晶形としては同型なので combined refinement with restraints で行なった lysozyme-NAG4 のデータ処理については、数分以内で計算処理完了している。

例えば、BL40B2 で測定した空間群が tetragonal の lysozyme の 3 Å までの反射プロファイルデータを用い構造精密化したところ、wRp 0.0470, Rp 0.0319 と最小二乗法による位相の解が得られている (Fig. 8, Fig. 9)。

同ソフトウェアで引き続き、electron density map 計算までは可能となっており、dn6 形式などの表示ソフトウェアに対応する形式を選択出来るようにまで整備されていると印象である。例えば、Windows 版の spdbv などの蛋白質およびリガンド分子表示ソフトウェアをしようすることで、電子密度—モデル一致の確認も Windows-PC 上で出来ることと説明されている。

以上のソフトウェアについての情報は全て、CCP14 (Collaborative Computational Project Number 14) for Single Crystal and Powder Diffraction のホームページより download site までたどり着くことができるので参照願いたい (<http://www.ccp14.ac.uk>)。

4.5 蛋白質粉末回折法の適応範囲

以上の示したように一部の構造解析は可能ではあるが、単結晶解析と明らかにことなることは粉末 X 線回折データは、 2θ -I の一次元データの形で取り扱われるので、蛋白質の結晶としては比較的小さい結晶格子が 50 Å 程度のもので、Indexing のための低角側20反射を選び出す際にでも overlap がない反射のみにすることが難しいものである。Simulation してみるとわかることです、4 Å 分解能データでは、分離した回折ピークは無くなっているところから、Profile fitting が必須である。合わせて数 micrometer サイズの結晶の集合体を用いていることから回折強度

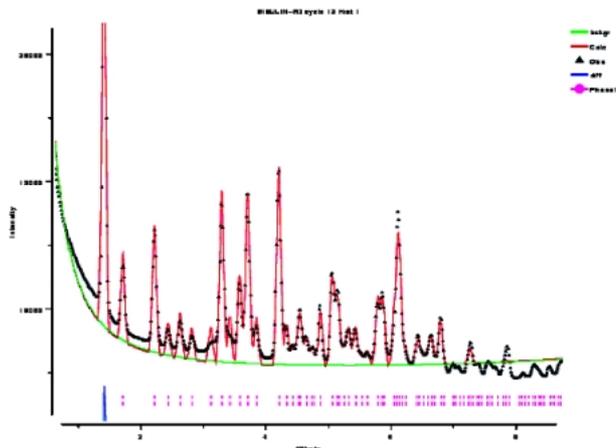


Figure 8. Result of refinement process using GSAS. Sample: insuline powder diffraction data at SPring-8.

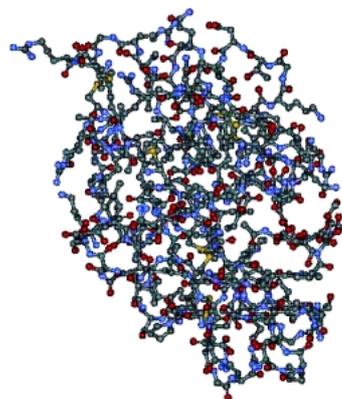


Figure 9. A view of the N-acetylglucosamine complex with chicken egg lysozyme as determined from X-ray powder diffraction data at BL40B2.

も弱くなっているため、比較的強い回折が得られる lysozyme でも、最高分解能は 2.7 Å 程度である。

高い分解能の実測データは望めないという限界を理解した上で、その適用範囲を考えてみるとしたら、以下のようなことになるのであろう。

1) 特異的蛋白質結合部位へのリガンド結合の有無の判定

機能未知蛋白質であっても、その DNA 配列の類似性から酵素反応などの活性分子が推定される。その立体構造が解明された場合、リガンド分子との特異的な結合の有無について、迅速に検索が可能なることを示唆している。non-specific な結合とは明確に区別できる検証が可能となろう。

例えば、薬物代謝を系統的・物理化学的に考察するために血清アルブミンのような複数の結合サイトを持つ蛋白質については、そのどこに一番親和性が高いかなどの検証について迅速に解析できることは利点が高いと想定される。従来の方法では薬物個別にアルブミンとの複合体結晶化条件を探して大きな単結晶を用いて結晶構造解析を行なって

いる例が多いのですが、粉末 X 線回折データを取るために 4 マイクロリットルの結晶化用ドロップ 1 つで出来て、その結合の有無が判定できることは興味深いのではないかと。

2) 結晶化条件スクリーニング中の有利な結晶形の早期判定

空間群と格子定数の検索・精密化が可能となっていることを利用できると思う。低角側 20 反射のみを用いて、ソフトウェア MacMile を用いて Indexing が可能であるから、頻繁に見つかってしまう非対称単位あたりの分子数が 4 個以上などとなっている特別大きな結晶体積になっているものなどは、データ測定候補から早めに除くことができると想定しています。

更に応用していくと、例えば、結晶化条件検討のツールとして最近いろいろなところに出てき始めた、micro-drop 式のユニットで多数の結晶化条件を検索する場合、その判定が顕微鏡下での形状観察にとらわれずに、各そのまま X 線照射することでアモルファスとの区別も明確に判断できるであろう。

3) 微小結晶回折実験への適用サンプルの選択

蛋白質結晶化用ドロップに X 線を照射して、良好な結晶の核が数ミクロンサイズで形成されているのであれば、均一な粉末回折イメージが確認される。このサイズの目安については、当方の同じ部門で X 線トポグラフィで微小結晶をスキャンしてもらったところ、トリプシンは厚みが 1 ミクロン以下と薄かったが、縦には 5 ミクロンほどの板状結晶になっていることは確認済みである (personal communication: 高野・鈴木ら, 2002 年)。2 次元検出器で得られた回折パターンの分解能や半値幅を比較しながら、回折強度が十分得られ半値幅も狭いものを選択することができれば、集合体の中の 1 つにマイクロビームを照射するか、少し結晶化条件を変更して 10 ミクロン程度の単結晶に成長させるかなどの応用が期待される。

5. まとめ

2003 年 8 月末に開催された ECM21 (21th European Crystallographic Meeting) の「One day single crystal and powder diffraction software workshop」中に説明された Jon Wright の話「Rietvelt Structure Refinement of protein powder diffraction data using GSAS」を、積極的に興味深く聞きに来ていた研究者が定員の 70 名程はいたことも含めて、蛋白質の粉末結晶解析に興味を持つ人が欧米には急速に増えている感がある。今まで気になっていたことがここまで来ているかというように面白がっている感もあった。APS では Von Dreele を中心とした粉末 X 線回折用ビームラインのみならず、解析ソフトウェアの蛋白質構造解析に向けての充実した開発があり、ESRF でも粉末 X 線回折専用ビームライン ID-31 を中心としたプロジェクト研究の動きを念頭に置くと、SPring-8 においては、今回

紹介した大型ギニエカメラを用いることと、良好な微結晶サンプルを作ることで半値幅の狭い粉末回折データを測定出来るという特徴がある。この利点を発揮するためにも、今後の更なる実験対象サンプルの充実や、構造解析ソフトウェアの開発など新たな展開に期待していきたい。

6. 最後に

2001 年秋以降、蛋白質結晶を用いた粉末回折実験の可能性が未知数であったころより、上記のような課題実験を許可してくれた関係各位には、感謝したい。

尚、この報告内容は、SPring-8 財高輝度光科学研究センターの井上勝晶氏、岡俊彦氏 (現在は慶応義塾大学に勤務)、八木直人氏、山本雅貴氏を含める多数の研究関係者のご援助による結果であるので、この場をかりて御礼申しあげたい。

この記事を機会として、「蛋白質」を用いた「粉末」X 線結晶構造解析に興味を持たれる研究者が、粉末構造解析の分野の方に限らず、構造生物の分野の方でも積極的に増えることを期待したい。

参考文献

- 1) R. B. Von Dreele and H. Appl: *Crystallography* **32**, 1084 (1999).
- 2) R. B. Von Dreele, P. W. Stephens, R. H. Blessing and G. W. Smith: *Acta Crystallogr.* **D56**, 1549 (2000).
- 3) R. B. Von Dreele: *Acta Crystallogr.* **D57**, 1836 (2001).
- 4) Robert B. Von Dreele p254-267 in *Method in Enzymology* Vol. 368, Macromolecular crystallography, Part C Edited by Charles W. Carter Jr. and Robert M. Sweet, Elsevier Academic Press (2003).
- 5) J. Wright: *Acta Cryst.* **A58** (Supplement), C213, (2002).
- 6) K. Miura et al.: *Acta Cryst.* **A58** (Supplement), C290 (2002).
- 7) 参考資料: SPring-8 Beamline Handbook
参考データベース: PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

著者紹介



三浦圭子

財高輝度光科学研究センター

E-mail: miurakk@spring8.or.jp

専門: 結晶構造解析・薬学

自己紹介:

製薬会社勤務から、なぜか放射光実験施設に就職してしまったという感想を持ちながら仕事をしていました。最近、この分野の薬学への寄与が更に注目されており、楽しんでいるところです。



植木龍夫
（財）高輝度光科学研究センター
E-mail: ueki@spring8.or.jp
専門：構造生物物理

略歴：

1962年3月大阪大学工学部卒業

現在は、JASRI コーディネーターとして勤務

Recent Progress in Macromolecular Crystallography Using X-ray Powder Diffraction method

Keiko MIURA JASRI/SPring-8 1-1-1 Kouto, Mikazuki, Sayo, Hyogo 679-5198, JAPAN
Tatzuo UEKI JASRI/SPring-8 1-1-1 Kouto, Mikazuki, Sayo, Hyogo 679-5198, JAPAN

Abstract

Powder diffraction is the workhorse of X-ray crystallographic methods. We introduce recent results of its application to macromolecular crystals in the world, including experimental results in some synchrotron radiation facilities. We also introduce our unique guinier-camera and our experimental results in SPring-8. The use of high resolution powder diffraction may make it possible to screen for the formation of protein/drug complexes and to determine their structures.