

## タンパク質およびウイルスの結晶構造解析

福山 恵一 (ふくやま けいいち)

タンパク質結晶学が日本で黎明期であった1970年代の初め頃、私はX線結晶解析をはじめた。以来40年以上にわたってX線解析を中心に研究を続けてきたが、この間に対象とする分子、解析方法や装置だけでなく、X線結晶解析をとりまく技術や研究分野は様変わりした。ここでは私が関与したタンパク質やウイルスの結晶解析を中心に、方法論を含めてその間にどのようなことがおこり、どのように考え方が変わってきたかを述べてみたい。

### 1. 前期 (1970年代~1980年代)

私は40年以上X線結晶解析に携わってきたが、学生の頃(1970年代の初め頃)日本では対象が主に有機化合物で、タンパク質の結晶解析はまだ黎明期であった。ごく限られた研究室でタンパク質結晶に取り組んでおり、私が属した蛋白質研究所の研究室でさえ、有機化合物の結晶解析を同時並行で進めていた。世界的に見てもミオグロビンの結晶構造が初めて決定された10数年後で、この頃は代表的なタンパク質の結晶解析が幾つか進められていた。日本では、蛋白質研究所でシトクロムcに主力をそそいでおり、その他東京大学薬学部でリボヌクレアーゼ、名古屋大学理学部でインシュリンの構造解析が進められていた。私が直接的にタンパク質結晶を扱い始めたのは1970年代の中頃で、私が所属していた鳥取大学の研究室で植物型フェレドキシンをはじめたのがきっかけであった。この結晶解析をその後約5年間かけて一応完成させた。その結果を発表する場が、蛋白質科学会の前身の一つであるタンパク質構造討論会であり、またNature誌であった<sup>1)</sup>。

X線回折強度を測定し、それをフーリエ変換して電子密度にすることは今も昔も本質的に変わらない。しかし回折強度を測定する方法や、電子密度を解釈して分子モデルを組み立てる方法は大きく変わった。この時期回折強度データを収集するには4軸型回折計が主流であった(図1)。(それまでは回折写真を何枚も撮り、目視法で回折点の強度を測っていた。)回折計と回転対陰極X線発生機



図1. 4軸型回折計

を組み合わせた装置だと、1日で約3000個の回折強度が測定できた。蛋白質結晶の場合回折点の数は多いので、また蛋白分子は柔軟であるので測定中にX線損傷を受けやすい。従って何個もの結晶を使って、所定の分解能の回折データを揃えた。なお、蛋白質結晶は水を含んでおり、乾いて結晶が壊れないようにキャピラリーに封入して測定した。また、X線の吸収が結晶の方位により違うので(植物型フェレドキシンの場合薄い板状晶であったので、同じ指数の回折点でも数倍見かけの回折強度が違って観測された)、吸収補正することは必須であった。

一方回折データを電子密度に変換する場合でも、当時計算プログラムがなかったからプログラミングすることから行った。電子密度が計算されると、マジックペンで等高線を透明シートに写し、それを分子モデルと重ねて見た。その電子密度(等高線)



図2. リチャードボックス 斜めにあるのがハーフミラー、その下が分子モデルで、奥が電子密度。

と分子モデルをハーフミラーで重ねる道具がリチャードボックス (図2)<sup>2)</sup>である。このようにして真鍮製の分子モデルを組み立て、その後各原子の座標を読むのにもリチャードボックスを使った。このような一連の操作で、コンピューターにかけられるようになった。

植物型フェレドキシンより少し後に細菌型フェレドキシンの解析をはじめた。ところがこの結晶の重原子同型置換体がどうしても得られず、この分子に含まれる鉄原子の異常分散を利用して位相決定するという新しい方法に取り組んだ。8年余かけてこの結晶構造を決定し、1986年のタンパク質構造討論会で口頭発表し、またJ. Mol. Biol. に発表した<sup>3)</sup>。この方法は今ではsingle anomalous diffraction (SAD)法とよばれ、日常的に構造解析に適用されている。

この時期タンパク質の構造・フォールディングを決定することが大きな目標であった。1980年代の中頃タンパク質結晶の原子座標を精密化する計算プログラムが出回るようになり、解析精度は格段に向上した。具体的にはプログラムPROLSQが次第に浸透し、*R* 値など定量的にX線解析結果を評価できるようになった。私の場合、精密化を取り入れてタンパク質の結晶構造を決定し、この会で発表したものにフラボドキシンというFMNを含む酸化還元タンパク質がある<sup>4)</sup>。

このような背景にはシンクロトロン放射光の登場があり、日本ではPhoton Factoryが稼働しはじめた。これにより実験室のX線発生装置より桁違いに輝度の高いX線が使えるようになった。また、平行性のよいビームがえられ、X線の波長も自由に選べるようになった。その結果、分解能・精度の高い回折データが得られるようになっただけでなく、タンパク質の分子量がそれまでよりずっと大きいものが視野に入った。もちろん測定に要する時間も大幅に短縮された。(それまで何日もかかっていたものが、数時間で測定できるようになった。) さらに波長をかえて位相決定・構造決定することが現実となった。また、X線解析の適用を広げたものに、遺伝子操作がある。これにより極微量しか天然に存在しない蛋白質や、ミュータントタンパク質のX線解析ができるようになった。

## 2. 中期 (1990年代～2000年頃まで)

この時期になるとX線回折データを収集するには放射光を利用するのが普通になった。放射光は強度が実験室のX線発生装置で発生するX線より桁違いに強い。従ってX線損傷の少ない結晶でなければ測定できなかった。このことを解決したのが結晶のflash cooling (急速凍結) 法である。こうするとX線損傷を格段に減らすだけでなく、高分解能解析ができるようになった。このため結晶をキャピラリーに封入するのではなく、ループで結晶をすくって急速に凍らせた。このような結晶を使うと、溶媒分子も多く同定でき、分解能も一般に向上した。このようなことで、この時期から原子分解能 (1.2 Å分解能以上) の解析が段々に増えていった。

放射光を利用するようになって、回折強度を4軸型回折計で用いて一点ずつ測定する方式から、振動写真で一挙に2次元ディテクターに記録する方式に変化した。日本では坂部カメラが開発され、またその頃登場したイメージングプレート (IP) がX線フィルムに代わって使われ始めた。IPはX線フィルムよりダイナミックレンジが格段によく、また暗室操作も必要でなく、IPリーダー

で処理できる。この時期坂部カメラがPFにおける標準装置となった。実験室においても、4軸型回折計に代わってIPを取り入れた装置に転換していった。私の場合細菌型フェレドキシンの回折強度を、分解能1.0 Å以上まで坂部カメラを使って再測定した。精密化した結果  $R$  値は約10%まで下がり、[4Fe-4S]クラスターのジオメトリーなどを精度よく決定することができた<sup>5)</sup>。

結晶解析計算をする方式もこの時期大きく変わった。この時期大型コンピューターはワークステーションに移行し、少人数で共有するようになった。こうなるとリチャードボックスで分子モデルを物理的に組み立てるのではなく、グラフィクスで画面を見ながら処理するようになった。代表的なプログラムにFRODOがあり、これが年とともに段々使いやすく改良された。もちろん結晶学計算に使う原子座標もモデルからすぐ変換でき、結果としてモデルビルディングの場所は要らなくなった。また、構造を精密化する計算プログラムも分子動力学 (molecular dynamics) を取り入れたXPLOREが広がっていった。XPLOREの方がPROLSQに比べて収束半径が広いという特徴があり、次第によく使われるようになった。私がこの方式で解析したタンパク質にペルオキシダーゼがあり<sup>6)</sup>、研究室で揃えたワークステーションで一連の計算をした。

タンパク質だけでなくタバコネクロシスウイルス (TNV) の構造解析も回折データをPFで収集し、ワークステーションで計算処理して構造決定をした。ウイルスの場合タンパク質に比べて約二桁分子量が大きく、測定量も計算量も桁違いに多い。なお、我々はTNVの構造解析において、ウイルス粒子がもつ正20面体対称を利用して位相を求めるといふ、従来の同型置換法や異常散乱法とは異なった方法で解析をした<sup>7)</sup>。新しい方法で構造決定したという点においてもTNVの解析は印象深い。

1990年代にタンパク質の立体構造を決めるということではX線解析の目標でなくなった。すなわち、タンパク質の構造と機能や性質と関連づけられて議論され、X線解析は構造生物学の一手段になった。ジャーナルにおいては、1990年代の中頃に

Structure, Nature Structural and Biology, Acta Crystallographica Section Dが相次いで創刊された。日本ではタンパク質構造討論会、日本蛋白工学会、それにタンパク質立体構造の構築原理ワークショップなど複数の学会や研究集会が一緒になった。1998年に蛋白合同年会在長岡で開催され、3回続いた後蛋白質科学会が設立された。2001年にその第一回の年会在大阪大学で開催された。この年会的副題には「新世紀における蛋白質科学」(Protein Science in the 21st Century)とあり、文字どおり新しい学会の誕生であった。

### 3. 後期 (2000年代～現在)

2000年ごろ第3世代のシンクロトン放射光施設SPring-8が稼働し始めた。この施設を使って回折強度データを収集するに、ディテクターがIPからCCDに変わった。IPだと読み取りに1～2分かかったが、CCDだと数秒である。強いX線だと測定の律速はIPの場合読み取り時間になってしまう。CCDの出現により、高輝度X線の特徴を生かした回折データ収集が可能となった。1枚のフレームの回折パターンはSPring-8のX線だと数秒で撮れるようになった。前期では何週間もかかって1データセットを揃えていたが、中期におけるPFでは3～4時間となり、それがSPrng-8では一時間もかからなくなった。

解析計算をするコンピューターも、主流はワークステーションからパソコンに移っていった。文字通りコンピューターは各個人が持つようになり、放射光施設でも装置をコントロールするコンピューターを除いてユーザーがパソコンを持ち込み、解析・評価しながら測定するようになった。

X線結晶解析をする方式・目的はさらに進化した。その一つにタンパク質分子の構造変化を見るようになった。結晶解析は原理的に静止構造・平均構造しかえられないが、酵素の反応過程で短寿命分子種の構造をトラップして見るようになった。私の行った事例ではγ-グルタミルトランスペプチダーゼがある。ここでは液体窒素温度で酵素反応の中間体で止め、この構造をX線解析法でみた<sup>8)</sup>。

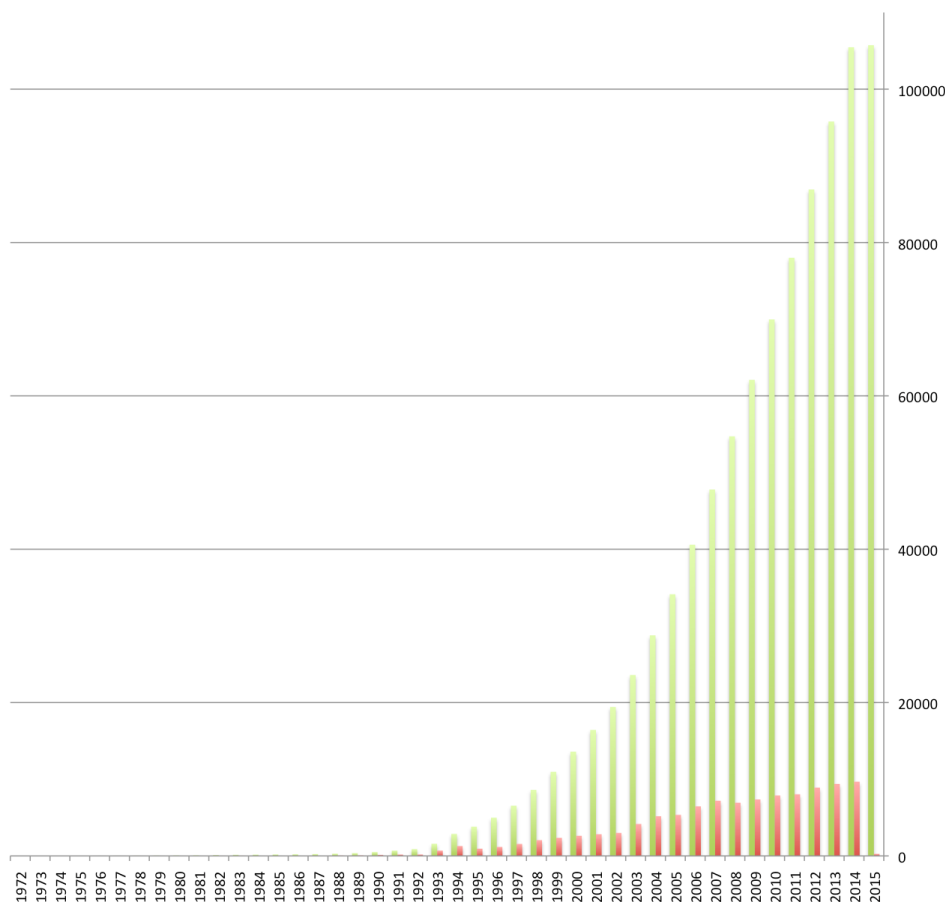


図3. PDBの登録件数の推移 累計登録件数を緑色、各年の登録件数を赤色棒グラフで表している。

また、ヘムオキシゲナーゼでは反応生成物の一つである一酸化炭素分子（ガス）の存在場所を、ヘリウム温度で捉えた。これには酵素反応を起こす代わりに、ヘム鉄に一酸化炭素を結合させた結晶にレーザー光を照射し、光解離させてガスの行方を追った<sup>9)</sup>。このようなことに加えて、タンパク質分子の固さ・柔らかさを視野に入れた研究も多くなった。私が行った例では、植物型フェレドキシンのフレキシブルな領域（温度因子が大きい領域）は分子種に共通しており、柔らかい領域が他の電子伝達タンパク質と接触している領域に対応していることを明らかにした<sup>10)</sup>。機能の理解により迫ったといえる。

解析ソフトウェアは自動化が進み、ブラックボックスとなった。分子モデルを作る場合もかなり人間の手を经ずに出来るようにソフトウェアが開発された。<sup>11)</sup>結果、結晶学の専門家以外の多くの

人々が現在ではタンパク質結晶学に携わっている。X線解析の結果である原子座標をおさめているデータベースProtein Data Bank (PDB)は1970年代のはじめ約10件でスタートしたが、登録されている件数は1993年に1000件を超えた。それが2014年に10万件を超えた(図3)。また、蛋白質学会の時代では蛋白質・核酸複合体の解析例は普通になったし、分子量も桁違いに大きくなった。私はアルファモザイクウイルスの構造解析を1980年代のはじめ放射光がない時代に手がけた<sup>12)</sup>。一枚の振動写真を撮るのに1日かかったが、近年では数秒で、しかも精度は向上した。1980年代の中頃に始まった膜蛋白質の構造解析<sup>13)</sup>も、今ではずいぶん多くなっている。最近ではSACLAを利用してフェムト秒の蛋白質構造が捉えられるようになった。

X線結晶解析はかつてタンパク質の構造をみる唯一の方法であったが、NMRや電子顕微鏡でも決定

されている。中性子結晶解析も使われるようになり、X線結晶解析では苦手であった水素原子の位置を決定することや、窒素と酸素の原子種も容易に区別できている。また、中性子解析をしてX線照射によってクライオ温度でも構造が変化していたことがわかった<sup>14)</sup>。蛋白質学会はこれら私の分野を含め、タンパク質の科学を広くカバーする中心的学会になったといえる。

タンパク質結晶学のものの考え方や取り組み方の約40年間の変遷の詳細については、“昭和と平成の今昔物語-タンパク質結晶学の周辺-”<sup>15)</sup>という出版本を参照していただきたい。

## 文 献

- 1) K. Fukuyama, *et al.*, *Nature* **286**, 522-524 (1980)
- 2) F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **37**, 225-230 (1968)
- 3) K. Fukuyama, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **199**, 183-193 (1988)
- 4) K. Fukuyama, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **265**, 15804-15812 (1990).
- 5) K. Fukuyama, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **315**, 1155-1166 (2002).
- 6) N. Kunishima, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **235**, 331-344 (1994).
- 7) Y. Oda, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **300**, 153-169 (2000).
- 8) T. Okada, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6471-6476 (2006).
- 9) M. Sugishima, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **341**, 7-13 (2004).
- 10) H. Kameda, *et al.*, *PLoS ONE* **6**, e21947 (2011).
- 11) M. Yao, *et al.*, *Acta Crystallogr. Sect. D* **62**, 189-196 (2006).
- 12) K. Fukuyama, *et al.*, *J. Mol. Biol.* **167**, 873-894 (1983).
- 13) J. Deisenhofer, *et al.*, *Nature* **318**, 618-624 (1985).
- 14) M. Unno, *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* **137**, 5452-5460 (2015).
- 15) 昭和と平成の今昔物語 -タンパク質結晶学の周辺-、福山恵一、BookWay (2014).

**略 歴：**

- 1949年 香川県に生まれる
- 1971年 大阪大学理学部高分子学科 卒業
- 1973年 岡山大学大学院理学研究科科学専攻修士課程  
修了
- 1973年 鳥取大学工学部工業化学科 助手  
(1980年5月～1982年4月 米国パーデュー大学  
生物科学部博士研究員)
- 1979年 理学博士 (大阪大学)
- 1987年 大阪大学理学部生物学科 講師
- 1991年 同 助教授
- 1995年 同 教授  
(1996年4月 大学院理学研究科・教授、  
2006年4月 専攻・学科名が生物科学となる)
- 2013年 定年退職 大阪大学名誉教授
- 2013年 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻で  
研究に従事

