

生体高分子のX線結晶構造解析

— 最近の進歩と成果 —



技術解説

井上 豪*, 松村 浩由**, 甲斐 泰***

X-Ray Crystal Structure Analysis of Biological Macromolecules
—Recent progress and our result—

Key Words : X-Ray Crystal Structure Analysis, Biological Macromolecule,
Synchrotron Radiation, Carboxylase, Molecular Mechanism

はじめに

虫眼鏡で物質を観察すると、物体の表面から散乱される光(可視光)をレンズで屈折、集光することにより、物体を拡大して見るができる。ところが一般に、観察に用いる光の波長よりも短い距離にある物体を分離して観察することは出来ない。用いる光の波長によって分離できる距離が制限されることを、分解能と呼んでいる。通常接する低分子化合物

や蛋白質分子は、1ナノメートルから10ナノメートル程度の大きさを持っている。このような大きさの分子を「見る」ためには、分子を構成する原子間結合の距離と同程度の波長を持つ光、つまりX線を用いなければならない。X線は光学レンズで屈折、集光することができないため、分子を見るという操作はもっと間接的な方法をとる必要がある。つまり、低分子化合物や蛋白質の単結晶を作ってX線を照射し、その結果得られる回折現象を利用する方法である。

X線は、19世紀末にレントゲンによって発見されて以来、20世紀の科学、技術の新しい進歩の担い手として広く活用されてきた。20世紀半ばには、X線結晶構造解析の手法により蛋白質の立体構造が解明され、生体中の諸現象が分子の構造に基づいて理解される端緒を開いた。

21世紀に入った今、蛋白質のX線結晶構造解析は、非常に迅速で高精度な立体構造解析の手法として、急速な発展を続けている。その主な要因は、高機能放射光の利用による構造解析手法の確立と、蛋白質の発現、精製、結晶化などの実験手法の進歩によってもたらされたものであるが、それをさらに加速している大きな力は、ポストゲノム時代の科学として今最も注目を浴びているプロテオーム解析、つまり遺伝子にコードされた蛋白質の基本構造をすべて決定しその機能との相関を明らかにしようとする研究が、いま世界的プロジェクトとして推進されていることである。

本稿では、X線結晶構造解析の最近の進歩と、それに基づいてなされた二酸化炭素固定酵素の構造化学について解説を試みたい。



* Tsuyoshi INOUE
1966年4月生
平成6年大阪大学大学院工学研究科
応用精密化学専攻博士課程修了
現在、大阪大学・大学院工学研究科
物質化学専攻、助教授、工学博士、
構造生物学
TEL 06-6879-7410
FAX 06-6879-7409
E-Mail inouet@chem.eng.
osaka-u.ac.jp



** Hiroyoshi MATSUMURA
1972年8月生
平成12年大阪大学大学院工学研究科
物質化学専攻博士課程修了
現在、大阪大学・大学院工学研究科
物質化学専攻、助手、工学博士、蛋白質の構造機能相関
TEL 06-6879-7410
FAX 06-6879-7409
E-Mail matsuzou@chem.eng.
osaka-u.ac.jp



*** Yasushi KAI
1943年5月生
昭和44年大阪大学大学院工学研究科
応用化学専攻修士課程修了
現在、大阪大学・大学院工学研究科
物質化学専攻、教授、工学博士、結晶構造化学
TEL 06-6879-7408
FAX 06-6879-7409
E-Mail kai@chem.eng.osaka-u.
ac.jp

X線結晶構造解析

X線結晶構造解析の最近の進歩を述べる前に、簡単にその原理について述べておきたい。回折現象の要因は物質中の電子であり、物質中の電子密度の粗密によって、異なる強さの回折X線が対応する方向に散乱される。その回折X線の波を表すものが式(1)の結晶構造因子である。 f_j は原子散乱因子と呼ばれ、単結晶の単位格子中に含まれる原子の種類によって決まる因子である。重い原子ほど核外電子の数が多いので、この因子は大きくなる。また、 (x_j, y_j, z_j) は原子jの単位格子中の分率座標である。また、 h, k, l はミラー指数と呼ばれ、回折を起こす結晶格子面を定義する指数である。式から明らかのように、単位格子中のすべての原子の種類と位置が分かれば、結晶構造因子つまりある方向に進む回折X線波を計算することができる。

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \quad (1)$$

さて、一般には単位格子中に含まれる原子の種類と位置は分からない。これらが分かれば結晶構造が決まることになるので、結晶構造因子から逆にさかのぼって回折現象の基となっている結晶構造を導くことができないか、ということが次の問題となる。式(1)を逆フーリエ変換すると式(2)が得られる。

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} F(hkl) \exp\{-2\pi i (hx + ky + lz)\} \quad (2)$$

この式は電子密度関数と呼ばれ、 $\rho(xyz)$ は単位格子中の任意の点 (x, y, z) の電子密度を表している。 V は単位格子の体積である。 $\rho(xyz)$ を求めることは結晶構造を解析することに相当する。さて、この式を計算するには、限りなく多くの結晶格子面からの回折X線波を含めなければならない。実験上は「限りなく多くの」という条件は充足されないので、「可能な限り多くの」という言葉に置き換えて考えなければならない。このためには、できるだけ短い波長のX線を使用することや、良質で回折能の高い単結晶を作ることなどが必要となる。ただし、波長の短いX線を使うと物質からの回折X線は弱くなりまた分解能の優れた検出器が必要となるうえ、良質

の結晶を作ることは容易ではない。

波は振幅、位相、波長の3要素を持っている。ここで取り扱う回折現象では、回折X線の波長は入射X線と同じであるので、残りの振幅と位相が決まると回折波は定義できる。ところが、X線回折実験からは回折波の振幅は実測できるが、位相は実測できない。したがって、回折実験からの情報だけでは、式(2)は計算できないので、他の何らかの方法を用いて、回折X線波の位相を見積もって初期値とする必要がある。このように位相の初期値を求めることを位相問題といい、構造が解けるかどうかの決め手となる重要なステップである。

結 晶 化

一般に蛋白質の溶解度はイオン強度によって大きな影響を受ける。1%程度の食塩を混ぜることで蛋白質の溶解度は上昇する(塩溶効果)が、塩濃度をどんどん上げていくと次第に溶解度は下がりついには沈殿する(塩析効果)。このように蛋白質の溶解度を変える物質は塩類以外にもいろいろ知られており沈殿剤と呼ばれるが、沈殿剤は大きく分けて3種類に分類される。塩、高分子試薬、および有機溶媒である。これらの沈殿剤を含む溶液をリザーバーに入れ、リザーバー液と蛋白質溶液を1対1で混合して作った液をドロップにしてガラスに表面張力で吊り下げる(ハンギングドロップ蒸気拡散法)か、その蛋白質溶液をプラスチック容器の窪みに置いて(シットィングドロップ蒸気拡散法)、密閉空間の中で沈殿剤濃度の高いリザーバー溶液に対してドロップ状の蛋白質溶液から蒸気拡散させて、徐々に蛋白質溶液の沈殿剤濃度を高めることにより結晶を得ることができる(図1)。このような蒸気拡散法以外の結晶化方法も種々開発されているが、いずれの方法でも、蛋

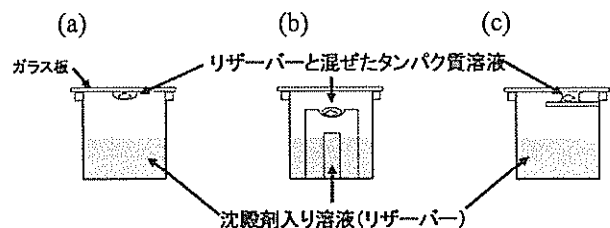


図1 代表的な蒸気拡散法による結晶化の概略図。
(a) ハンギングドロップ蒸気拡散法
(b) シットィングドロップ蒸気拡散法
(c) サンドイッチドロップ蒸気拡散法

白質溶液の沈殿剤濃度をゆっくりと上昇させ、蛋白質の溶解度を徐々に下げて、結晶を十分な大きさに成長させようとするものである。

蛋白質によって、その溶解度に対する沈殿剤の効果は異なるため、新しい蛋白質を結晶化するたびに沈殿剤の種類や濃度を工夫しなければならない。また、蛋白質の溶解度は、蛋白質の純度および鮮度、pHや温度によっても大きく影響される。さらに、 Ca^{2+} や Mg^{2+} などの金属イオンや1%程度の界面活性剤を用いると、蛋白質の安定化に効果のあることも知られており、これらの試薬を添加剤として加えて条件検索を行うことも多い。これだけでも試さねばならない結晶化条件は膨大な数になるので、結晶化のためのスクリーニングキットを用いる方法、Sparse-Matrix法が開発された。これまでに論文報告されている蛋白質の結晶化条件で多く用いられた沈殿剤や添加剤をあらかじめ調製し、結晶化確率の高い試薬として結晶化スクリーニングキットが考案され商品化された。これを用いた結晶化条件の検索をSparse-Matrix法と呼んでいる。Crystal Screen and Crystal Screen 2 (Hampton Research), Wizard Screens I and II (Emerald BioStructures), Personal Structure Screens 1 and 2 (Molecular Dimensions)などが知られており、ハンギングドロップ蒸気拡散法やシッティングドロップ蒸気拡散法を利用してスクリーニングを行い、沈殿剤、pHなどの見当をつけた上で、最適条件を細かく検索するのが一般的である。また最近、微小重力や強磁場下で結晶の質を改良する例も報告されている。これらの方法がなぜ結晶化に効果があるかはまだ十分明らかではないが、実際の結晶化で顕著な効果がある例も色々と報告されるようになって来た。いずれにしろ、結晶化は蛋白質のX線結晶構造解析の中でも最も苦勞を要する重要なステップとなっている。

回折実験

さて、やっとの思いで作製した結晶にX線を照射して得られる回折波の強度は、用いたX線の波長の3乗に比例し、単位格子の体積の2乗に反比例する。例えば、低分子化合物のタウリンの結晶($a=5.3$, $b=11.7$, $c=7.9$ Å, $\beta=94.0$ deg.)に比べ、小さな蛋白質のリゾチームの結晶($a=78.3$, $b=78.3$, $c=37.0$ Å)でも、単位格子の体積は約500倍大きく、

リゾチーム結晶からの回折強度はタウリン結晶からのものの 2.5×10^5 分の一という計算になる。通常、研究室で低分子化合物の結晶構造を解析する場合、波長が0.71 Åの $\text{MoK}\alpha$ 線を用い、蛋白質の構造解析では1.54 Åの $\text{CuK}\alpha$ 線を用いているが、この波長の違いは約8倍強の回折強度の効果にしかならない。従って、蛋白質のX線結晶構造解析にはシンクロトン放射光(SR)を利用した回折強度データの収集が不可欠となる。

シンクロトン放射光は、電子や陽電子を光速近くまで加速し、磁場の中で曲げたときに発生する強力な電磁波のことである。リング型の高エネルギー加速器では電子や陽電子が周回軌道を回るように磁場をかけているが、その向きを変える時、軌道の接線方向にSRが発生するため、これをX線源として実験に利用することができる。また最近では、挿入光源の直線部分で、NとSの永久磁石を交互に並べ、電子や陽電子に周期的蛇行運動を行わせることによって、直線部分の進行方向により高輝度のSRを取り出せるアンジュレーターが開発され、さらに強力なX線が利用できるようになった。第3世代放射光実験施設として兵庫県の播磨に誕生したSPring-8 (Super Photon ring-8 GeVの略)で得られるSRは、蓄積リングで8 GeVまで加速された陽電子から得られる放射光であるため、単位面積・単位時間あたりのフォトン数(輝度)は、通常の実験室系で得られるX線と比べると、 10^6 - 10^8 倍であり、蛋白質の結晶からの回折強度が弱いという問題を見事に克服した夢の光である。

位相問題

SRのもう1つの特徴は、SR光が赤外線からX線まで幅広い波長の光を連続して含む光源ということである。したがってSRは、実験の目的に応じて必要な波長の光だけを切り出して使うことができるという、研究室系のX線発生装置にはない大きな利点を持っている。これは、電子密度関数を計算する際の位相問題を解決するのに非常に有効な手段としても活用できる。位相問題を解析するもっとも重要な手法には、分子置換法、重原子同型置換法、および異常分散法の3つがある。分子置換法は今調べている蛋白質の構造が、構造既知の蛋白質と類似していることが予想される場合に有効な方法であり、構造

の全く分からない新規蛋白質の場合は適用できないが、類縁の蛋白質の構造が分かっている場合はきわめて有効な方法である。重原子同型置換法は、蛋白質の構造解析の最も基礎的手法であり、これまでの重要な蛋白質の新規構造のほとんどはこの方法で解析されてきた。蛋白質結晶のある決まった部位に重原子イオンを結合させることによって、初期位相を重原子に代表させて構造をとこうというものである。少なくとも2種類の良い重原子同型置換体結晶を作る必要がある。異常分散法は、シンクロトロン放射光の波長可変という特徴を活用できるようになって、飛躍的に進歩した。具体的には、1個の重原子同型置換体結晶を使って、重原子の吸収端近傍の波長のX線を用いた回折実験を行い、異常分散効果を反映した回折強度の差のパターソン関数を解くことによって重原子位置を求め、初期位相を計算する方法である。重原子同型置換法では常にネイティブ結晶(蛋白質そのものの結晶)と重原子置換体結晶の間の同型性が問題となるが、異常分散法では1個の結晶だけを用いて解析するため、同型性が問題になることはなく、位相計算の精度上げることが期待できる。その結果得られる電子密度の精度も高くなるので、分子モデルの構築も容易となる。また、SRは高輝度で指向性の高いX線であるため、位置分解能が高くS/N比に優れた回折パターンが得られることも大きな特長である。

SRは回折実験に利用されるだけでなく、次世代半導体など超微細加工や先進医療技術への応用化研究など、最先端科学技術のフロンティアにも光を与

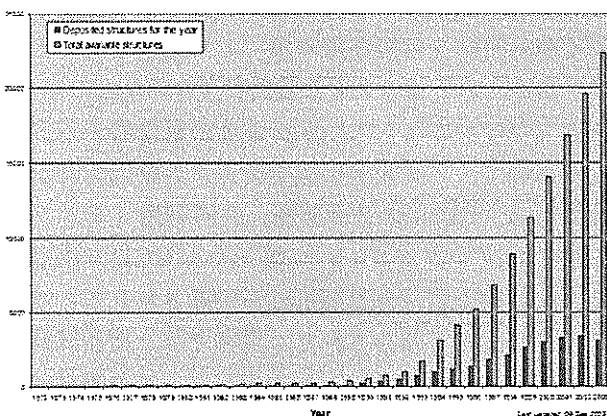


図2 蛋白質構造データベース(Protein Data Bank)に登録されたデータセット数

えており、その重要性は急速に高まっている。

蛋白質の立体構造に関するデータは、PDBに蓄積されているが、放射光実験施設および遺伝子工学の技術が出現した1980年代より登録数が急激に増加し、現在は22,700個のデータセットが登録されている(図2, 2003年10月1日調べ)。

二酸化炭素濃度の増加

近年、大気中の二酸化炭素濃度が急速に増加し続けており、地球温暖化の主要因と考えられていることから、その低減が地球規模の課題として緊急な対応を求められている。その主な原因は、地球の長い歴史の中で地中に固定された炭素資源の石炭、石油、天然ガスなどをエネルギーとして利用するようになったことにあり、また地表に固定された炭素資源である森林を計画的、組織的に伐採し利用し始めたこととされている。大気中の二酸化炭素濃度の上昇を抑えるためには、その大気への放出を抑えることが何よりも先決であるが、いったん大気に放出されてしまった二酸化炭素の回収は、植物による光合成において他にはない。

植物の光合成によって大気中の二酸化炭素濃度が軽減されるか、という点については議論のあるところだが、少なくとも今急速に減少しつつある森林面積を回復していくことは地表に固定される炭素量を増やすことにつながる。もちろん森林面積を回復することは、地上の生命圏に大きな影響を与え、自然の持つ再生力や活力を高めることにもつながる。また、端的には森林から得られる木材を人間の生活に役立てることによって、木材として炭素を固定し活用することにもつながる。農作物などによる二酸化炭素固定は、大気中の二酸化炭素が植物や動物との間を循環するだけで、その削減には役立たないといわれるが、少なくともその循環によって生命を維持し活動するエネルギーを得ることができる。21世紀初頭には世界の人口は60億人を超えたと言われている。20世紀初頭には15億人であったことを思うと、この100年間で世界の人口は4倍にも膨れ上がったことになる。もちろんこのことが、エネルギーの消費を加速し、大気中の二酸化炭素濃度を上昇させる結果を招いているのであるが、エネルギーよりもさらに深刻な問題となりつつあるのが食糧危機である。20世紀後半に進められた農業改革によって、世界の

農業生産力は飛躍的に向上したが、その効果以上に人口の増加が顕著なため、10年を経ずして世界的な食料不足が顕在化するとも言われている。

大気中の二酸化炭素の固定とその有機資源への再生という二役を、一貫したプロセスの中で果たしていくものは、植物による光合成において他にはない。自然が持つ機能を効率よく働かせるシステムを作り上げて行くことが理想ではあるが、一方では自然の持つ機能を目的に応じて改良することも考えられなければならない。特に人口爆発という現実がある以上、自然の持つ光合成の仕組みをより効率の良いものに改変することは、重要かつ緊急の課題と言える。

炭酸固定酵素

植物による二酸化炭素固定の主なものは、イネやムギ、樹木などC3植物といわれるものではRuBisCO(リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ/オキソゲナーゼ)が、またトウモロコシやサトウキビなどC4植物といわれるものではPEPC(ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ)が触媒する。C3植物とC4植物では、葉の仕組みも炭酸固定の代謝機構も異なっており、C4植物の方が、低濃度の二酸化炭素環境でも、乾燥条件下、高温高光照射下でも炭酸固定反応が進行するため、効率の良い炭酸固定機構を持っているということができる。

このような炭酸固定酵素は非常に大きな蛋白質複合体であり、RuBisCOでは分子量5.5万の大きなサブユニットと分子量1.5万の小さなサブユニット8個ずつから構成され、1分子の分子量は56万にも達する。一方、PEPCは分子量10万のサブユニット4個からなり、1分子の大きさは40万である。RuBisCOの触媒する反応は、炭素数が5個のリブローズビスリン酸に二酸化炭素を固定するものであり、PEPCの場合は炭素数が3個のホスホエノールピルビン酸に炭酸水素イオンを固定する。このように小さな基質分子の反応に、なぜこのように大きな蛋白質複合体が必要となるのかは、非常に興味を持たれる。

PEPCの結晶構造解析

RuBisCOの結晶構造解析は1990年ごろから多く報告されてきたが、PEPCの構造研究は全く進んで

いなかった。我々のグループは、京都大学の泉井桂教授のグループと協力して、PEPCの結晶構造解析に取り組み、1989年に最初の結晶化に関する論文を発表した後、10年余の年月を経て1999年に初めてPEPCの立体構造に関する論文を発表した。その後、各種複合体の構造を解析し、PEPCの炭酸固定反応について、詳細な機構を提案している。

さて、PEPCの結晶構造解析がRuBisCOの研究に比べて10年以上遅れたことには、以下に列記するような、明らかな理由が存在する。

- 1) 酵素の抽出・精製が困難で、その技術開発に年月を要したこと
- 2) 結晶化が困難であったこと
- 3) 結晶が不安定で、保存中あるいはX線照射によって容易に崩壊したこと
- 4) 重原子同型置換体結晶の作成に難航したこと

研究を進める上で、それぞれに困難は存在し、それをどの様に克服するかは、その内容によって当然異なる。上に挙げたものの中で、3)については、高機能放射光施設の推進とフェーズを合わせて解決されたものである。この施設がなければ恐らくPEPCの結晶構造解析は実現しなかったか、あるいは実現が大幅に遅れたことは間違いない。3)を克服するためには、いくつかの要点が解決されなければならなかった。たとえば、結晶が保存中に容易に崩壊することから、結晶化後すぐに放射光実験をする必要が生じる。放射光実験に合わせて結晶化すれば良いが、いつも計算どおりにはいかないのが、SPring-8ができてからビームタイムが多く割り当てられるようになったことは非常に大きな利点であった。また、結晶がX線照射によって容易に崩壊することから、X線照射時間を可能な限り短くして実験を進める必要がある。分子量の大きな蛋白質複合体などの場合、測定しなければならない回折強度の数は数十万点にも及ぶので、二次元検出器を備えた自動回折計が必須である。SPring-8新営後、共同利用ビームラインにイメージングプレートあるいはCCD方式による二次元検出器付自動回折計が設置されたことで、この点は大きく改善された。現在では、結晶試料を液体窒素で凍結させることによって、X線照射による結晶の劣化を防ぐ工夫が一般化しており大きな効果を挙げている。

PEPCの炭酸固定機構

PEPC(図3)は、 Mg^{2+} 存在下、ホスホエノールピルビン酸(PEP, $HO_2CC(OPO_3H)=CH_2$)に炭酸水素イオン(HCO_3^-)を固定し、オキサロ酢酸(OAA, $HO_2CC(=O)CH_2CO_2H$)と無機リン酸を生成する反応を不可逆的に触媒する。PEPCはアロステリック酵素で、大腸菌由来のPEPCでは、アスパラギン酸(Asp)が活性阻害因子、グルコース-6-リン酸(G6P)が活性化因子となる。 SO_4^{2-} は、G6Pのリン酸基類似のイオンという意味でアナログである。また、基質アナログとしてPEPに類似のDCDP($HO_2CC(CH_2PO_3H)=CCl_2$)を用いた。

大腸菌由来PEPCおよびその一連の複合体の構造解析によって、活性阻害されたPEPCの構造、活性中心金属の位置、活性中心金属に基質が結合する構造が順次明らかとなり、また第二の基質分子である炭酸水素イオン(HCO_3^-)は、基質結合部位上方の

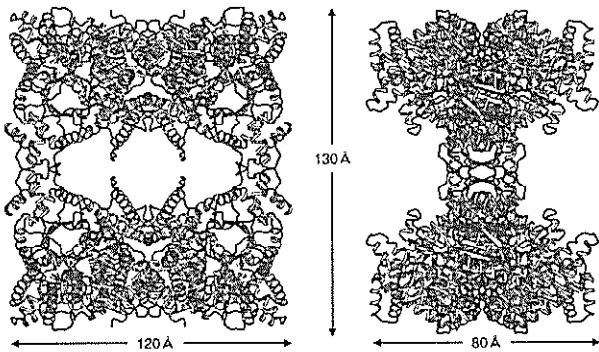


図3 大腸菌由来PEPCの分子構造。
1モノマーサブユニット883残基の四量体分子。

非常に柔らかいループ構造に保持された3つの連続する塩基性残基で認識され、反応時に活性部位に運ばれることが明らかとなった(図4)。

さらに、トウモロコシ由来PEPCの構造解析をした結果、この構造は活性型であることが明らかとなった。不活性型の大腸菌PEPCと活性型のトウモロコシPEPCを比較した結果、酵素活性に必須の残基のうち Arg587は不活性型の構造では阻害因子(Asp)と直接相互作用して基質結合部位から遠い位置に固定されているが、阻害因子が結合していない活性型構造では、Arg587を保持するループが大きく構造変化して基質結合部位方向に約15 Å移動することが分かった(図5)。

また、やはり活性発現に必須のHis138は、硫酸イオンが活性化因子(G6P)結合部位と思われるとこ

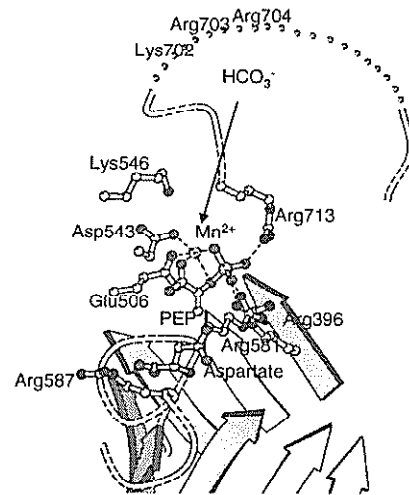


図4 PEPCの炭酸固定反応のメカニズム

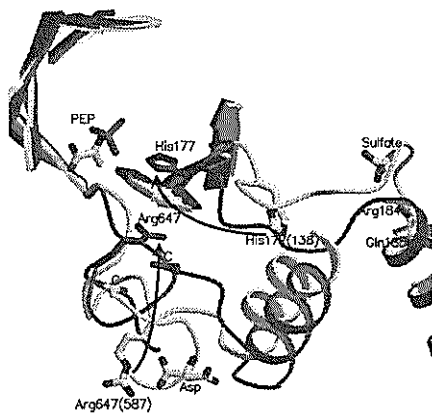


図5 PEPCの基質結合部位近傍の活性型構造(黒色)と不活性型構造(灰色)の比較

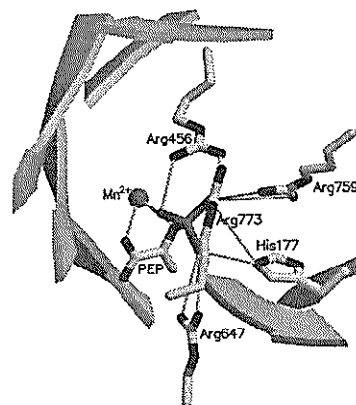


図6 PEPCの基質結合モデル

ろに結合することで、基質結合部位方向に約10 Å 移動することが分かった。

不活性型PEPCが活性型PEPCに変わると活性に必須の残基が大きく移動することは、非常に興味深い。2つの活性残基、Arg587とHis138が移動した位置に基づいて基質結合モデルを組み立てると(図6)、これら2つの塩基性残基は、基質PEPが活性中心金属に配位する際、リン酸基周辺に隣接してイオン対結合を形成し、基質の配位をアシストする働きをしていることが分かる。

おわりに

炭酸固定酵素に関するこのような研究を推し進めていくと、酵素分子の各部分がそれぞれに役割を持っており、環境の変化によって巧みに制御されている

ことが明らかになってくる。この制御の仕組みを、時、所、目的に応じて特殊化や最適化することは出来ないだろうか。酵素の機能を部位特異的変異によって改変し、それを発現する形質転換植物を作ること、光合成の仕組みそのものを変えることに相当する。地球上の様々な環境のもとで、それぞれに適した植物が太陽エネルギーを効率よく炭水化物に変換し、二酸化炭素濃度を低減すると同時に人類の生存に必要な恵みをもたらしてくれる“夢の植物”を作り出していくことは出来ないだろうか、と思いながらそのための基礎研究を日々展開している。

なお、二酸化炭素固定酵素(PEPC)に関する我々の研究については、最近の総説をご参考ください(Y. Kai *et al*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 170-179, 414(2003))。

