

d 電子から 1 億 Da を越える超分子まで、蛋白質結晶学の挑戦

月原 富武

兵庫県立大学大学院生命理学研究科ピコバイオロジー研究所

1. 蛋白質結晶学のはじめ、ペプシンの結晶による回折像の持つ意味の大きさ

蛋白質結晶学の起原は 1930 年代の英国におけるペプシンの X 線回折像に求めることができる。ラウエによる X 線回折像の撮影に続いて、1913 年にブラッグ父子が回折理論を確立した。その理論によると、結晶は 3 次元的に周期構造を持っており、そのために結晶によって散乱される X 線は不連続な斑点となる。蛋白質の結晶が回折斑点を生じたことは、特定の蛋白質は一定の立体構造を持つということである。このことはインスリンのアミノ酸配列の決定によって、蛋白質が一定のアミノ酸配列を持っていることが確定されるより 20 年も前のことであった。

ブラッグの理論によれば、回折斑点の強度は結晶中の電子密度分布によって決まる。逆に電子密度は、失われている位相情報を付与することによって回折像から求めることができる。すなわち、回折像という実験データをもとにその位相を決めることができれば、蛋白質の立体構造を知ることができる訳である。回折像の撮影に成功して、英国で直ちに位相決定に向けての挑戦が始まった。

2. 重原子同型置換法の確立とヘモグロビン、ミオグロビンの構造決定

原理的な可能性は見通すことはできても、現実的には当時対象にしていた結晶と比べて 2 桁以上大きな分子の結晶の回折像の撮影も克服しなければならない課題であった。X 線発生機と X 線カメラの進歩によって回折実験が可能になった。もっとも大きな問題である位相決定については、結晶の脱水による格子の変化に伴う回折強度の変化を分析して位相を決定する方法など様々な試みがなされたが、決定的な方法とはなり得なかった。1954 年に Perutz らはヘモグロビンに水銀化合物を結合させた結晶は、元のヘモグロビンの結晶と殆ど同じ格子定数であることを見つけた。そこで、鉍物等の構造解析で確立されていた同型置換法を発展させて、重原子同型置換法による構造決定法を確立した。1960 年には、ミオグロビンが 2.0 Å 分解能、ヘモグロビンが 5.5 Å 分解能で構造決定された。異常散乱を加味することなど若干の追加はあるが、今日もここで確立された方法によって蛋白質の X 線構造解析が行われている。1964 年にはリゾチームが酵素の最初の構造として報告された。

3. チトクロム c の構造決定に取り組んだ私の学生時代

1967 年に私が大学院に入った時、大阪大学蛋白質研究所ではチトクロム c の X 線結晶構

造解析に取り組んでいた。強力 X 線発生機や自動回折計の開発を行いながら、ハトの胸筋等から精製したチトクローム c の構造解析を進めていた。ミオグロビンの構造解析を行った Kendrew が蛋白質研究所を訪れて、「100g 以下の蛋白質で構造解析に成功した例はない」と助言した。この助言は含蓄の多いものであり、角戸先生はすぐにカツオの心筋のチトクローム c にターゲットを変更した。その頃から私自身も本格的にチームに加わった。そうして蛋白質研究所のチームは 1971 年に 4 Å 分解能の構造決定に成功した。この間、私自身は 1950 年代、1960 年代の原著論文でじっくり創成期の蛋白質結晶学の苦勞を学び、20 年先にも役に立つ多くのものを得た。

4. 8K words のコンピュータで解いた[2Fe-2S]フェレドキシン

1971 年に鳥取大学工学部に助手として赴任した。チトクローム c の電子受容体であるチトクローム c 酸化酵素の構造解析をしたいと考えて、当時甲南大学にいた吉川さんに相談した。しかし、少し待てということであった。そのかわりに松原先生、新先生を紹介してもらい、[2Fe-2S]フェレドキシンとその還元酵素(FNR)の複合体の仕事を始めた。結晶構造解析に結びついたのは[2Fe-2S]フェレドキシンであった。小さなコンピュータしかなくて、構造解析プログラムはすべて自前で作り、1978 年に 2.8 Å 分解能の構造解析によって活性中心の構造決定に成功した。その後、1981 年に全構造を福山さんが第 1 著者で Nature 誌に発表し先陣を切ることができた。

5. 留学先での球状ウイルスの構造決定で学んだこと

チトクローム酸化酵素をはじめ大きな複合体の構造研究をしたいと考えていたので、ウイルスの研究を始めていた米国のパデュー大学の Rossmann の所に 1978 年から 2 年間留学した。分子量では 2 桁大きな対象を扱うために、カウンターは使うことができず、旧式と思っていた写真法による強度測定が主役であったのには驚いた。しかし、よく考えてみると振動写真法は 2 次元受光計で、散乱された X 線をすべて逃すことなく捉える原理的に極めて優れた受光装置である。今もこの原理によって回折強度の測定が行われている。

重原子同型置換法と非結晶学的対称による平均法を適用して、インゲン豆モザイクウイルスの構造決定に成功した。長年にわたって多くの研究者が関与した研究で、最終段階の重要な位相決定に関わることができたのは幸運であった。位相決定法として平均法が極めて有効であることを実感できた。

6. 放射光、遺伝子工学、コンピュータの進歩による蛋白質結晶学の普及

1980 年代半ばには、蛋白質結晶学は放射光による新しい測定法と、遺伝子工学を取り入れた新たらしい蛋白質調製法と膨大な計算を可能にするコンピュータの進歩によって、便利な

位相決定法である多波長異常散乱法 (MAD 法) をもたらした。その結果、X 線結晶構造解析は広く普及し多くの研究者が利用する方法になった。

7. チトクロム酸化酵素の研究の成果と今後の課題

共同研究者の吉川さんのグループの 15 年に及ぶ試行錯誤によって 1993 年に良質の結晶を得た。1995 年には高等生物の膜蛋白質として最初の構造であり、且つ当時最も複雑な組成の蛋白質複合体として *Science* 誌に報告した。その後、1998 年に *Science* 誌で報告した 3 報目の論文では、構造に基づいた全く新しいプロトンポンプ機構の提案を行い、今も活発な論争を行っている。我々の説は確固とした構造基盤を持っているが、これまでのバクテリアの酵素の研究に基づいた定説とは一致しない多くの問題を抱えていた。さらに、13 種のサブユニット構成であるために変異体による機能解析が欠落していた。慶応大学の島田さんのグループは *Hela* 細胞で発現系の構築に成功して、変異体による機能解析によって我々の説の妥当性を実証した。このことによって、1998 年当時、賛同者は皆無であった我々の説は、ミトコンドリアの酵素のプロトン機構としては妥当なものであるという認識になって来た。

しかし、変異体による研究は経験的な証拠を得たに過ぎず、プロトンポンプ機構の本質的理解に至った訳ではない。そのために、量子化学計算によるアプローチもなされて、酵素の構造の特徴が我々の主張するプロトンポンプ機構を可能にしていることが示された。この機能の研究を深める上で決定的に重要なのは水素原子の動向である。今これを課題に高分解能の構造解析に向けて取り組んでいる。

8. 大きさへの挑戦、60M Da の 2 重殻ウイルスと 1G Da 超のクロレラウイルス

X 線結晶構造解析の最大の特徴は、大きい分子量を対象にできることと得られる構造の精度の高さである。分子量限界に挑戦する研究として、1980 年代後半から 60M Da の 2 重殻ウイルスの構造解析に取り組んだ。スタートは決して遅くなかったが、1990 年代半ばに力が分散したために、英国と米国のグループによる別種の 2 重殻ウイルスに先を越された。2003 年にようやと中川さんが第 1 著者で *Structure* 誌に最大の分子量の構造として報告できた。どこまで巨大な粒子が結晶になることができるかが、結晶構造解析の限界を決める。これに挑戦するために 1G Da を越えるクロレラウイルスの結晶化に取り組んでいる。

9. 若い研究者の果敢な挑戦、ボルトとギャップ結合

核膜孔をはじめとする核輸送に関わる研究に取り組んでいる過程で、分子量が 10M Da を越える巨大なボルトに出くわした。2002 年に精製、結晶化を開始して 6 年後に第 1 報を出すことができ、2009 年にその殻構造を *Science* 誌に報告することができた。細胞間を直接連結して細胞間輸送に関わるギャップ結合チャネルは 2003 年に研究を開始し、2009 年に隣り合

う2つの膜を貫通した状態の構造決定に成功し、**Nature** 誌に掲載された。両研究ともにそれぞれの分野の要石とも言える成果をもたらし、注目されている。ともにこの種の研究としては異常に長い期間を要した訳ではないが、この間若い研究者が途中で論文を発表することなく、粘り強く且つ高い意欲を持って研究を遂行することは容易なことではない。様々な環境要因はこうしたことがより困難な方向に向かっているように見える。先を見据えてじっくり研究に取り組む若い研究者に敬意を表したい。

10. 蛋白質 X 線結晶構造解析の果たすべき役割と将来

精密な構造(電子密度)と巨大な構造を決定することによって生命の理解を深めることが、X 線結晶構造解析に課せられた課題である。全く異なった方向のように思えるが、克服すべきことは、結晶化、回折実験、位相決定と共通している。精密構造解析では活性中心金属の d 電子の電子密度分布の決定を行うことができる分解能の解析も射程に入りつつある。