

構造生物学における放射光利用

月原富武

兵庫県立大学大学院 生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3丁目 2-1

大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2

要
旨

1960年初頭にミオグロビンとヘモグロビンの結晶構造解析が成功して、構造生物学の誕生となった。強力で波長可変性に富んだ放射光はX線結晶構造解析の可能性を広げた。我が国では1980年代から高エネルギー物理学研究所・放射光実験施設が国内外の研究者に広く利用されて、構造生物学の発展に大きく寄与した。1990年末からはSPring-8も供用を開始した。両施設は持続的に技術の革新を行って、常時最先端の実験環境を整えた。その結果、多くの世界に誇ることのできる成果を収めることができた。

1. 結晶学が生んだ構造生物学

1913年にブラッグ父子は回折理論を提唱し¹⁾、同じ分子が周期に整列した結晶にX線を照射すると、回折斑点が得られることを示した。それから20年ほどたった1934年に、バナールとクロフォートが、ペプシンのX線回折像を観測し²⁾、同じ蛋白質は同じ立体構造であるということが明らかになった。これは、それぞれの蛋白質のアミノ酸配列が特定の決まったものであるということさえ分かっていた時代には、同じ蛋白質はすべて同じ立体構造をしていることを実証した画期的な発見であった。その後20数年に及ぶ、バナールを中心とした英国での粘り強い研究の積み重ねによって、1960年代初頭にミオグロビン³⁾とヘモグロビン⁴⁾の結晶構造解析が成功し、初めて蛋白質の立体構造が頭わになった。これらの結晶構造解析は、構造生物学の誕生となり、1953年のDNAの繊維回折像に基づいた構造決定⁵⁾によって生まれた情報生物学と並んで、今日の生物学の発展の礎となった。

1960年代は蛋白質結晶学の揺籃期であり、最初の酵素の構造としてリゾチームの構造が決定された⁶⁾。1970年代は蛋白質結晶学の研究室が世界各地に拡がり、各国で蛋白質結晶学の基礎が固められた。1980年前後には巨大な球状ウイルスの結晶構造解析がアメリカの2つのグループによってなされた^{7,8)}。1980年代前半に我が国の若い研究者も加わったドイツのグループによって、光合成反応中心の結晶構造決定に成功し⁹⁾、初めて膜蛋白質の構造が明らかになった。この時代に私自身が経験したことであるが、ウイルス結晶の回折データ収集では、回転陽極X線による振動写真法、0.6度振動、1日1イメージずつ集めた。なお1照射ごとに結晶を交換し方位を揃えて0.1度の重なりをとって24時間単位で繰り返し撮影したので、1セット90度撮影するのに正味180日要した。隔世の感がある実験であるが、1照射しか得られない微小結晶の回折データ取

集に通じるものである。

2. 蛋白質結晶学における放射光利用の始まり

1980年代前半から、遺伝子工学をとりいれた蛋白質調製法の開発や、コンピュータの進歩と相まった構造解析ソフトウェアの開発が盛んに行われる中で、放射光施設が稼動し始めて回折強度データ収集法の高度化が始まった。我が国では、1983年に供用を開始した高エネルギー物理学研究所・放射光実験施設(PF)で、坂部知平教授(名古屋大学のち高エネルギー物理学研究所)は蛋白質結晶用に大型ワイセンベルグカメラ(坂部カメラ)の開発を行い、1980年代後半から広く一般ユーザーに利用されるようになった。この間、受光装置はフィルムからイメージングプレートに変わり、回折強度処理プログラムWEISSも東常行博士(京都大学のち理学電機科)によって開発された。それまで、我が国では4軸型自動回折計が主流であったために、欧米で進んでいた振動カメラの導入ははかどらず、大きな格子の回折強度測定は困難に陥っていたが、坂部カメラによって一挙に解決された。PFの蛋白質結晶ビームラインは極めて利用者本位に運営され、出張旅費も支給された。結晶を得さえすれば、日本の何処にいても蛋白質結晶構造解析を行うことが出来た。このビームラインは我が国の多くの研究者に世界と渡り合うことが出来る確信をもたらし、当時若かった我々蛋白質結晶学研究者にも大きな夢と希望を与えた。Fig. 1は当時撮影したウシ心筋のチトクロムc酸化酵素の5Å分解能の回折像であり、高等生物の膜蛋白質複合体として先陣を切るものであり、構造解析に向けて計り知れない勇気を得た。1990年代半ばからは第3世代放射光施設の運用が始まり、我が国でも1997年からSPring-8の一般供用が開始された。我が国のみならず欧米でも2000年代初頭に降蛋白質研究に関わる国家プロジェクトによる支援もあって蛋白質の構造研究

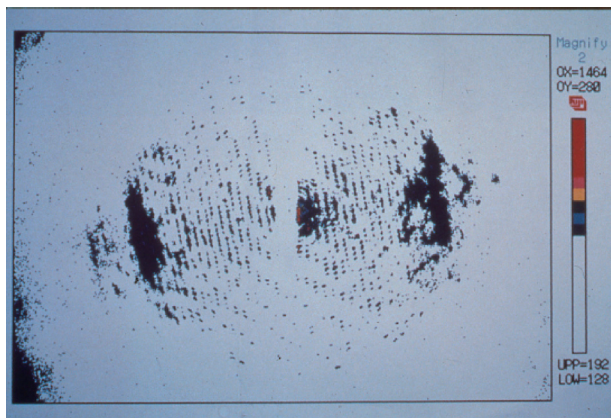


Fig. 1 (Color online) Diffraction pattern of bovine cytochrome c oxidase by using Sakabe camera equipped with an imaging plate at the Pfton Factory. The image was digitized at the Namba laboratory. Space group is $P6_2$ or $P6_4$ and cell constants are $a=b=174.5 \text{ \AA}$, $c=282.2 \text{ \AA}$.

は質と量の両面において画期的な進歩を遂げた。そうした中で蛋白質結晶学と放射光の関わり的事例を拾ってみよう。

3. 放射光 X 線による位相決定の進歩と構造解析の拡がり

蛋白質の結晶構造解析における回折斑点の位相決定は重原子同型置換法¹⁰⁾によって行われてきた。この方法では蛋白質の結晶(ネイティブ結晶)とそれに重原子を導入した重原子誘導体結晶が必要である。導入された重原子による回折強度の変化からネイティブ結晶の回折斑点の位相を決定する。

ネイティブ結晶と同型で良好な重原子誘導体結晶を調製することが容易でないときもしばしばある。一方、波長を自由に選ぶことができるという特徴を持っている放射光では、特定の波長の X 線を選択することによって、特定の原子による異常散乱を大きくして、原子散乱因子を変えることができる。そこで放射光結晶構造解析では、複数の重原子誘導体の代わりに、1つの重原子誘導体について異なる波長での回折強度データに基づいた多波長異常散乱法(MAD法)¹¹⁾による位相決定が可能になった。

多くの蛋白質ではその活性中心に大きな異常散乱を起こす金属原子などを含んでいる。また、蛋白質を構成するアミノ酸にはメチオニンのように硫黄を含むものが有り、蛋白質工学の手法によってこれらの硫黄原子を異常散乱効果の大きいセレンに置き換えることができる。これらネイティブ結晶に異常散乱を生じる原子を含んでいる場合には、重原子誘導体結晶を調製することなく、ネイティブ結晶のみで複数の波長で回折実験を行うことによって構造決定を行うことができる。中でもセレンメチオニン置換蛋白質の調製法が急速に進歩して、セレンメチオニン置換結晶のMAD法による構造解析は、放射光によって位相をルーチ

的に決定する手法として普及した。電子密度を精密化する計算法の進歩によって、単一波長での異常散乱効果のみで構造決定する単波長異常散乱法(SAD法)で多くの構造解析がなされるようになった。

さらに精密な回折実験を行い、蛋白質中に含まれる硫黄原子の小さな異常散乱効果を利用して、ネイティブ結晶だけで構造決定することを目指す研究も進んだ。北海道大学の田中勲教授のグループは、回折 X 線への結晶の周囲にある水等による吸収の影響を軽減するために、ループレスマウント法を開発した¹²⁾。そのマウント法を使って、回転陽極 X 線発生機の Cr の特性 X 線によって硫黄の異常散乱効果を利用した位相決定(S-SAD法)に成功した¹³⁾。放射光施設 PF では受光装置を含めビームラインを S-SAD 法用に最適化し、硫黄原子の小さな異常散乱効果を精密に測定できるシステムが整備されて、新しい構造が出てきている¹⁴⁾。この S-SAD 法は、新規構造の蛋白質結晶の位相をルーチン的に決定できる手法になってきた。一方、類似の構造の蛋白質がある場合も年々増えてきており、その類似の構造を利用して位相を決定する分子置換(MR)法もルーチン化されている。S-SAD 法と MR 法の両方の位相決定法を組み込んで、あらゆる蛋白質結晶も回折計に乗せれば構造が出てくるシステムの構築は可能になって来た。その実施体制の確立は生命科学の基礎研究のみならず、創薬等の応用研究への貢献の大きさは計り知れないものがある。

4. 放射光による回折強度測定法の進歩

4軸型回折計による小さな蛋白質の回折データ収集では、斑点間のスケール合わせを容易にするために結晶全体に X 線を照射する完浴法が適用された。一方、写真法による格子が大きい結晶の場合は斑点間の重なりを避けるためにビームを絞った回折実験が行われた。強度の強い放射光では特別な場合を除いて、後者と同様に結晶の一部にサイズの小さいビームを照射する方法によって回折データを収集する。今日では2000 Åを超える格子の結晶についても高分解能の回折実験が可能になっている。

結晶のセッティングに関しては放射光施設においても、ごく初期の頃は結晶の方位を調整した上で、特定の軸の周りに結晶を回転させて独立な反射を最少の実験で収集する方法が採用された。その後、回折データ処理法の進歩もあって、任意の方位で180度回転させてデータを収集して、反射ごとの多重度を上げて精度の高いデータにする方法が定着した。

回折強度データ処理では連続したイメージ間で強度を足し合わせて、各斑点の完全な強度を見積もる方法と、イメージごとで各反射の完全度を見積もって回折強度を求める方法があった。後者はウイルスなど巨大で散乱強度が弱くて、1つの結晶で1イメージしか得られない場合に適用

された。放射光実験では前者の場合が一般的である。

蛋白質の結晶は概ね30 MGyのX線照射によって回折能を50%失うとされる¹⁵⁾。しかし、X線照射の影響は温度によっても大きく変化する。1990年代まで回折実験は結晶の脱水を避けるためにガラスキャピラリー中に封入して、室温で回折実験を実施した。そのため、X線照射による結晶の損傷は深刻であった。とりわけリボソームの結晶ではX線損傷が極めて激しくデータ収集に苦しんでいた。そこで、100 K程度の窒素気流中で急速凍結して回折実験を行うことによって、回折強度の劣化を抑制することができた¹⁶⁾。それ以降、徐々に他の蛋白質結晶でもキャピラリー封入でなくループに乗せて凍結し、100 Kで回折実験を行うことが定着し、キャピラリーに封入する方法は特殊な技術になった。

放射光施設も日進月歩でX線の輝度が上がるにつれて、回折実験の律速は受光装置の読み取り速度になった。それが近年受光装置の読み取り速度の高速化によって、シャッターレスの連続測定も可能になった。その結果、数分のうちに1データセットの収集が行えるほどにまで高速化された。高速化にとどまらず、シャッターレスの高速連続測定は新しい回折データ収集法をもたらしめている。

こうした技術の進歩は迅速な回折実験に止まらず、結晶化可能な如何なる生体物質の大きな格子の結晶の構造解析、水素の位置のみならず電子密度分布と結合の性質の関係などの精密構造解析、ミクロンオーダーの微小結晶の構造解析に道を拓いている。

5. 我が国の放射光施設における構造生物学の顕著な成果

我が国の放射光施設 PF と SPring-8 は国家プロジェクト等の支援を得て持続的に最先端技術の開発と導入を計ってきた。それによって広く国内外の研究者に対して献身的な支援を行って、数々の先進的な構造をもたらしした。そのうちの幾つかについて紹介する。

(1) 2つのチトクロムc酸化酵素

PFにおける代表的な研究はその引用件数の多さや当時のインパクトの大きさから言っても、1995年8月の同じ週に Nature 誌¹⁷⁾ と Science 誌¹⁸⁻²⁰⁾ に掲載された細菌とウシのチトクロムc酸化酵素の構造であろう。これらは共に坂部カメラによる回折像から得られた構造因子を使って決定されたものである。Fig. 2 は細菌の酵素の全体構造とウシ酵素の活性中心の構造である。膜蛋白質複合体の全体構造としては光合成反応中心に続く2例目であり、呼吸という生命の根幹に関わる膜蛋白質の構造として注目された。蛋白質結晶学及び放射光施設としては後発の日本から発信されたことで米国を中心に大きな衝撃となった。

(2) ウシロドプシン

運用開始間もない SPring-8 での画期的な研究としてロドプシンの構造決定を挙げることができる。ロドプシンは網膜において光の認識に関わる蛋白質である。生体内で情報伝達を担う G-蛋白質共役受容体 (GPCR) の一つとしても知られている。GPCR は基礎生物学のみならず、医学的にも重要であり創薬ターゲットとしても注目されてい

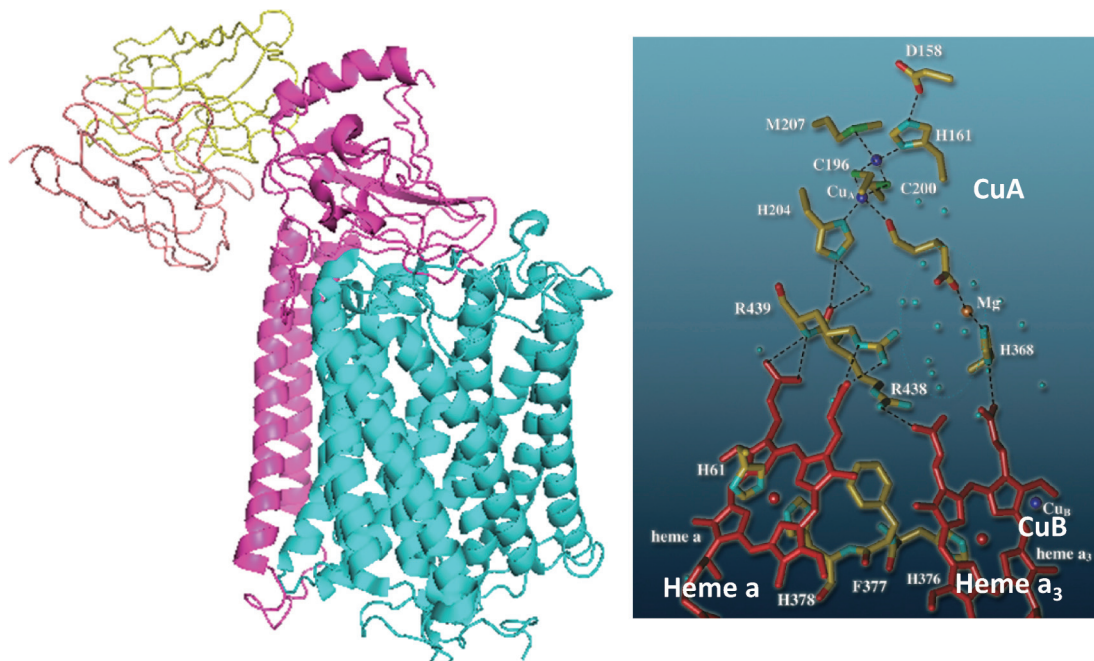


Fig. 2 (Color online) (Left) The structure of bacterial cytochrome c oxidase complexed with an Fv fragment¹⁷⁾ (PDB ID, 1AR1), and (right) the structure of active sites of bovine cytochrome c oxidase¹⁸⁾.

る蛋白質群である。ワシントン大学のパルチェフスキー教授、岡田哲二研究者らと理研の宮野主任研究員のグループは、ウシロドプシンの構造を異常散乱効果測定に最適化された SPring-8 のビームラインで得られた回折データによって MAD 法によって構造を決定した²¹⁾。ウシロドプシンの構造は、7 回の膜貫通 α -ヘリックス、細胞外の 4 本の β -シートで構成される GPCR を代表する構造となった (Fig. 3)。情報伝達に関わる G-蛋白質との結合部位のある細胞質側の構造は、分子スイッチとして働く GPCR であるロドプシンの分子機構を明らかにする第一歩にもなった。

(3) スナップショットを集めたカルシウム ATPase の動的構造

蛋白質はしばしば、あたかも意思を持っているかのように構造を変えて働くことがある。東京大学の豊島近教授による Ca^{2+} ATPase の構造解析は、そのように働く蛋白質が機能する姿の全容を捉えた比類のない研究である。 Ca^{2+} ATPase は細胞膜や小胞体などの細胞内小器官の膜にあって、ATP を分解して得たエネルギーによってそれらの膜を横切って Ca^{2+} を輸送して、細胞内の Ca^{2+} 濃度を調節する酵素である。 Ca^{2+} 濃度の調節によって筋肉の収縮や脳における記憶が制御されており、本酵素は生命活動を恒常的に維持する上で極めて重要な酵素である。豊島近教授のグループは、2000年に筋小胞体の Ca^{2+} ATPase の構造を最初に決定してから、SPring-8 で実験を重ねて Ca^{2+} ポンプとして働く際に生じる10種の間体の構造を決定した²²⁻²⁷⁾。それら一連の構造に基づいて、膜に結合した状態で蛋白質が大きく構造を変化させて Ca^{2+} を運ぶ精密な動きを明らかにした (Fig. 4)。この研究は放射光に

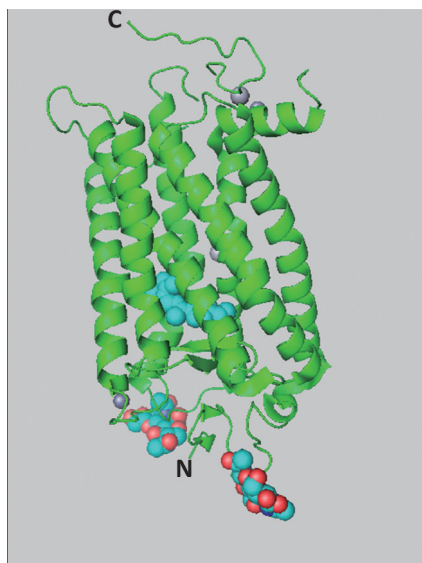


Fig. 3 (Color online) The structure of bovine rhodopsin consisting of seven transmembrane helices²¹⁾. A retinal molecule in the central region of the protein and sugar chains are drawn by spheres, whose carbon and oxygen atoms are in light blue and red colors, respectively. (PDB ID, 1F88).

よって蛋白質が機能する動的過程を原子レベルの精度で捉えることに成功した代表的な研究として高く評価されている。

(4) 光合成系 II (PSII)

PSII は光エネルギーを利用して水を酸素分子、水素イオンと電子に変換する。水素イオンは膜の一方側に蓄えられて ATP を生産するエネルギーとなる。電子も他の酵素に伝達されて、NADPH の生産に使われる。このように PSII は光エネルギー変換の根幹を担う蛋白質であることから長年結晶構造解析の対象として注目されてきた。大阪市立大学の神谷信夫教授と岡山大学の沈建仁教授のグループは、ラン藻の PSII の全サブユニットを含む構造 (Fig. 5)²⁸⁾ を決定するとともに、懸案であった活性中心の歪んだ椅子型構造の Mn_4CaO_5 とそれに配位している 4 個の水を確定した。しかし、一部の酸素原子と金属間距離が他の分光学的研究や理論との不一致が指摘された。その原因として X 線損傷の影響が考えられたので、X 線自由電子レーザー (XFEL) による回折実験に基づいた構造解析を行ったところ、X 線損傷を受けていない構造を決定することができた²⁹⁾ (Fig. 5 右)。その構造は多くの研究者によって人工光合成を目指す化合物設計のために盛んに利用されている。

6. 回折構造生物学の近未来

蛋白質の X 線結晶構造解析は 3 つの方向性を持って進歩してきた。それらは多様な構造、精密な構造、巨大な構造を追求する方向である。それぞれの観点から近未来の姿を描いてみよう。

(1) 調製困難な蛋白質の微小結晶構造解析

構造決定された蛋白質の数は13万件を超えているが、生命現象の様々な局面で鍵を握っている蛋白質が構造未知のまま多く残されている。それらは大抵大量精製・結晶化が容易でない。こうした大量精製が困難な蛋白質では、大きな結晶を調製することは難しく、微小結晶による構造解析は必須である。また、結晶化が困難とされてきた膜蛋白質のために開発された立方液晶法 (LCP 法) でも大きな結晶を作ることは容易でない。従って微小結晶による構造解析は近々の課題といえる。

そうした状況で、微小結晶に対応できる微焦点ビームラインが開発され、微小結晶構造解析に適用されている³⁰⁾。例えば、SPring-8 の BL32XU では、LCP 法で結晶化した膜蛋白質の $13 \times 13 \times 13 \mu\text{m}^3$ の微小結晶 1 個からの精度の高い回折データによって、異常散乱を利用した位相決定に成功した³¹⁾。

肉眼では見えない微小結晶に対する回折実験法も開発されている。数10個の微小結晶がのっているループ上をビームで二次元スキャンをして回折が得られる位置を特定し、それぞれの結晶の位置でシャッターレス測定が可能な

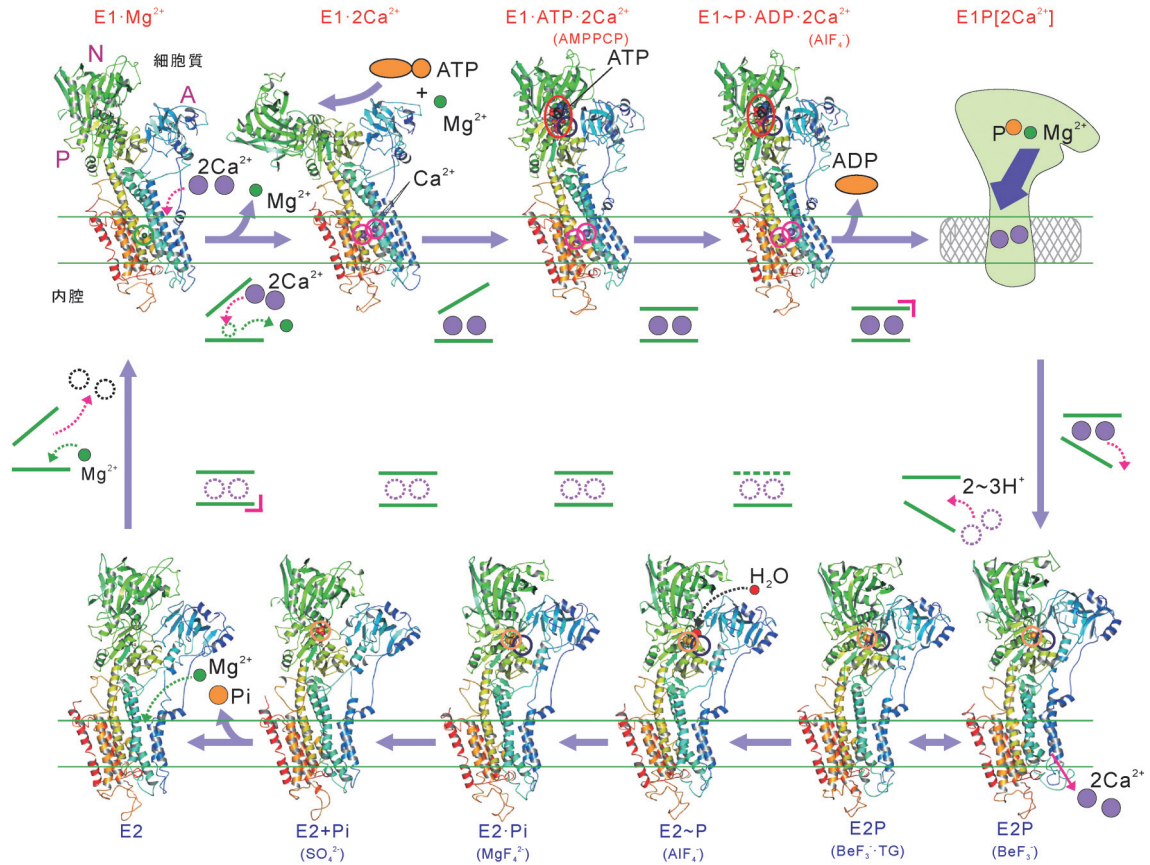


Fig. 4 (Color online) Ca^{2+} pumping mechanism of Ca^{2+} ATPase²²⁻²⁷. The mechanism was elucidated by 10 structures of reaction intermediates. The figure was kindly supplied by Professor C. Toyoshima, The University of Tokyo.

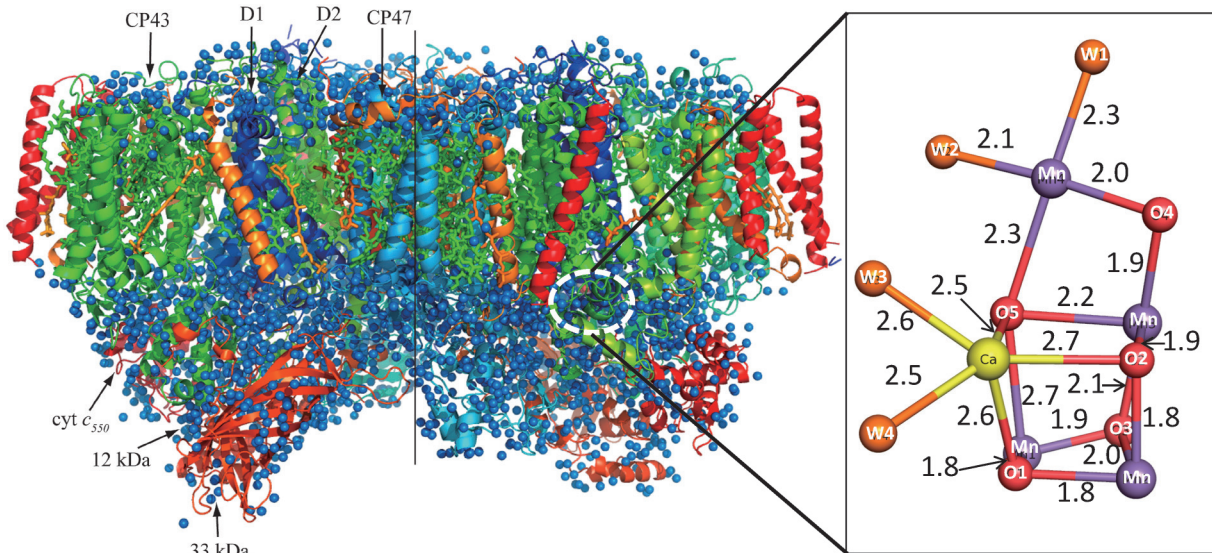


Fig. 5 (Color online) (Left) The structure of PSII with water molecules shown by lightblue sheres. (Right) The damage-free structure of Mn_4CaO_5 center with four water molecules determine at SACLA. The figure was kindly supplied by Professor J.-R. Shen, Okayama University.

受光装置によって5度~10度分データを収集して、最終的にすべての結晶のデータを合わせる³⁰⁾。

さらに結晶が小さくなれば、1個の結晶での走査角度範囲を狭くしなければならなくなる。1980年前後、1結晶1照射、0.6度振動でデータ収集していたウイルス結晶のことを考慮すれば、0.5度までは十分対応できるであろう。どこまで小さな結晶での回折データ収集を行うことができるかはX線損傷によって決まる。

一方、X線自由電子レーザー(XFEL)による回折実験では無数の静止回折像を集めて構造因子を求めている。損傷を受ける前に回折が起こるということでX線損傷の激しい結晶の回折データ収集に活用され、X線損傷が問題になっていたチトクロムc酸化酵素とPSIIの結晶に適用されて損傷を受けない状態の構造が決められた^{29,32)}。

損傷が起こる前に回折が起こることが完全に成り立つとすればXFELの強度が強くなりさえすれば小さな結晶から回折像を得ることができることになる。しかし、実際には 10^8 photons/ \AA^2 のパルスで酸素の原子散乱因子が5 fs以内に75%以上減少するというシミュレーションもあり³³⁾、強力なXFELだけで微小結晶による回折実験が可能になる訳ではないようである。将来XFELでのX線強度が桁違いに強くなると、10 fs以内にもX線損傷が起こり無損傷構造解析とはならない可能性がある。実際の蛋白質結晶で無損傷構造解析の限界となるパルス強度はまだ分かっていない。

現在、構造解析に適用されているのは干渉性散乱であるが、XFELのパルスがさらに短くなると非干渉性散乱が構造解析に活用できる可能性が示されており³⁴⁾、新しい構造解析法として期待される。

(2) 電子密度から化学に迫る超精密構造解析

X線結晶構造解析で得られる電子密度分布はその分解能によって得られる情報の質が変化する。1.5 \AA を超える分解能になると非水素原子の電子密度が原子ごとに分離し始める。0.8 \AA 分解能以上では水素原子の位置を確認できる。蛋白質によって駆動される化学反応では多くの場合水素が関与するので、蛋白質中の水素原子位置を決めるだけでも蛋白質の働きの仕組みの解明に大きく貢献できる。さらに高い分解能では、経験則による束縛を取り去った構造決定及び、電子密度とその分布の形状と化学結合の関係を議論できるようになり、新しい研究分野を切り開かれている。

京都大学の三木邦夫教授のグループは高電位鉄硫黄蛋白質(HiPIP)とNADH-チトクロム b_6 還元酵素(b_6R)の電子密度分布解析をそれぞれ0.48 \AA ³⁵⁾、0.78 \AA ³⁶⁾で行った。その詳細は本誌既報の論文等に譲るが、その要点と意義について述べる。その研究では電子密度とその分布の形状を求めることを目指しており、高分解能の回折データで且つ、X線損傷の影響を避けることが強く求められる。そのため、X線吸収線量を0.1 MGyに抑えた高分解能回

折実験を行った。構造解析の結果、ペプチドの平面性の指標である ω が10度以上ずれたペプチドの存在、[4Fe-4S]クラスター内での電子密度の偏り、システイン残基のS γ 原子の3p電子と非極性基(フェニル基等)の水素との相互作用によるS γ 原子の負電荷の減少、FADのイソプロキサジン環内でのC-C及びC-N結合の次数、非極性基の水素原子が関わる水素結合などを明らかにすることができた。これらの研究成果は、2つの電子伝達蛋白質の電子伝達の仕組みを解き明かす貴重な成果にとどまらず、X線結晶構造解析による電子密度およびその分布の形状に基づいて、結合や原子の化学的性質を解き明かすことができることを強く示唆している。今後、このレベルの研究を蓄積することによって、構造・電子密度から化学・物理を介して蛋白質機能の理解を深める研究分野が広がることを期待する。

さらにこのレベルの構造の蓄積は、従来の蛋白質構造に関する経験則をより真実を反映したものに近づけることにも有用である。そのことは、通常の分解能での構造解析の適正化にも繋がる。

(3) 蛋白質中の化学反応過程を可視化する時分割構造解析

蛋白質が働く際の構造変化を追跡する場合、順次生じる状態を止めてスナップショットを撮る方法と変化する構造を直接観測する方法が考えられる。前者は先に述べたようにCaATPaseにおいて成功し、酵素の働きの全容を見事に捉えた。後者は強力なフェムト秒パルスであるXFELの出現によって現実にもなった。岩田想教授(理化学研究所・京都大学)のグループはSACLAにおいてバクテリオロドプシンの時分割構造解析を行いプロトン輸送機構の解明に成功した³⁷⁾。その研究では、光励起後16 ns後から1725 μ s後まで合計13段階の構造を決定した(Fig. 6)。それらの構造を光照射前の構造と比較して構造変化の詳細を捉え、プロトン輸送機構の理解を深めることができた。この研究に続いてSACLAではチトクロム酸化酵素のCO光解離³⁸⁾及びPSIIの光励起³⁹⁾の時分割構造解析が行われて、それらの酵素の働きの仕組みの解明が進んだ。これらは蛋白質機能の理解に向けて、位置及び時間の両次元で十分高い分解能の動的構造解析が開始されたことを示すものである。今後の拡がり期待される構造生物学の新しい分野が現実のものになった。

(4) 電子線とX線の融合によるオルガネラや巨大な複合体の構造解析

極低温電子顕微鏡(cryoEM)による巨大な複合体の単粒子構造解析の急速な進展には目を見張るものがある。cryoEM単粒子構造解析は、像を数多く観測して平均し、異なる方位の像を合わせて精度の高い構造を得る。その過程で互いの像の間で相対的な方位を決める。方位を決める際に、同じ鮮明さの像であった場合には対象が大きいほど正確に決めることができる。ここに電子顕微鏡単粒子構造

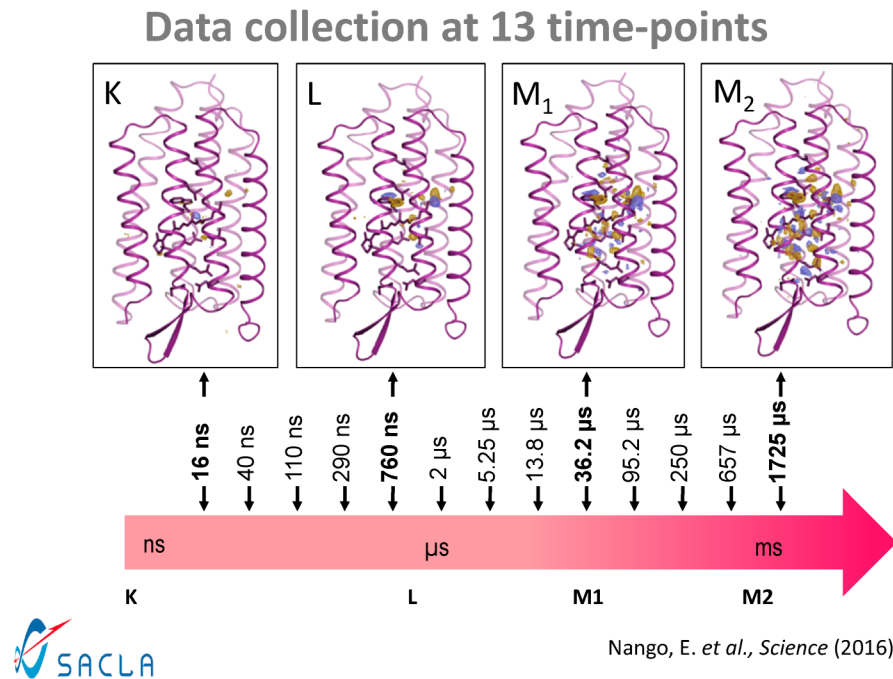


Fig. 6 (Color online) Dynamical structure determination of bacteriorhodopsin at SACLA³⁷⁾. Thirteen structures of reaction intermediates after photo-activation were determined by SFX method at SACLA. Structures at 16 ns, 760 ns, 36.2 μs, 1725 μs after photo-activation, which correspond to K, L, M₁, M₂, respectively, are shown. Proton pumping mechanism was clearly shown by structural change. The figure was kindly supplied by Dr. E. Nango, Riken.

解析が小さな対象に比べて大きい対象を得意とする理由がある。

しかし、cryoEM 単粒子構造解析の最大の特徴は結晶化を経ずして構造を決定できることである。オルガネラをはじめ、結晶化が困難な対象は EM と X 線の融合による全体構造の解析は当然の戦略である。その典型例は、難波啓一教授（大阪大学）のグループによる細菌のペン毛の構造研究である。1989年に X 線繊維写真によって細菌のペン毛の低分解能構造を報告して⁴⁰⁻⁵¹⁾以来、X 線結晶学と電子顕微鏡構造解析の技術を存分に活用して細菌のペン毛の構造、構造構築機構と作動原理の解明を行ってきた。最近では cryoEM 単粒子構造解析の高分解能化を計って一層研究を進展させている。一連の研究はペン毛というナノマシンの見事な回転方向をスイッチする仕組みを明らかにして、この分野で世界をリードしている。X 線構造解析と cryoEM 単粒子構造解析を融合した超分子構造研究法を構築して、ペン毛の構造の全容の解明している研究の概要を Fig. 7 に示している。

巨大な複合体の構造研究が cryoEM 単粒子構造解析によって続々と出されている中で、リボソームのように RNA 主体のものや、対称性の高いウイルスの場合は cryoEM 単独で全体構造が出されている。多くの複合体は個々のサブユニットは X 線結晶構造解析による高分解能構造と cryoEM による全体構造の融合によって全体の原

子座標が求められている。それらの中には一部乱れた部分もあり、そのままでは結晶化は難しいと思われるものも少なくない。そうした試料であっても重要な部分の構造を決めることができるのは cryoEM の利点である。一方、cryoEM 単粒子構造解析も分解能を上げるためには構造が揃った試料の調製が必須である。即ち cryoEM 単粒子構造解析の高分解能化は結晶化の可能性を切り開くものでもある。2 次元、3 次元結晶の利用は、構造解析の精度を上げるために最も効果的な手段であり、cryoEM 単粒子構造解析と並行して結晶化を行うことは賢明なことである。

7. おわりに

構造生物学は分子から細胞まで異なった階層での構造を原子レベルの精度で解き明かすことを目指している。そのために様々な手法がそれぞれの特徴を生かして、適用されている。当面、X 線構造解析では、多様な構造、精密な構造、複雑系の構造のうち何を求めるにしても結晶による回折の利用が中心になり、他の方法では取って代わるのでできない質の構造を提供できる。

しかし、いずれの方法の場合にも試料の精製に加えて結晶化という難題を抱える。結晶化の成否及び結晶の質を決める第 1 要因は、調製した試料の立体構造の均一性の高さである。その均一性をモニターしながら結晶化を行う方

細菌べん毛タンパク質の構造

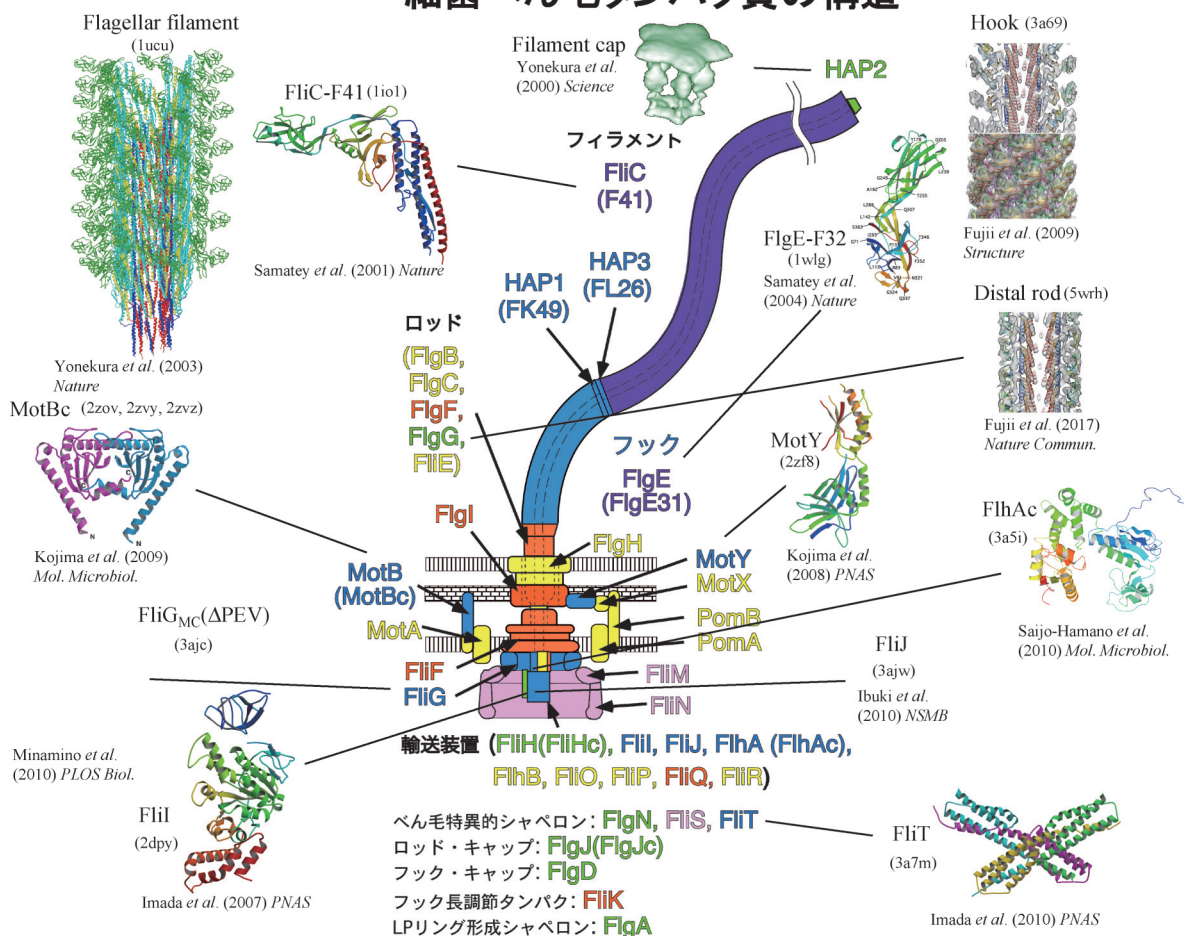


Fig. 7 (Color online) The structure of bacterial flagellum determined by cryoEM and X-ray crystallography⁴⁰⁻⁵¹. The figure was kindly supplied by Professor K. Namba, Osaka University.

法としては水溶性蛋白質については動的散乱などが有効に使われている。膜蛋白質を含む大きな複合体についてはEMの低分解能画像が均一性の確認には極めて有効である。

蛋白質の結晶構造解析を振り返ってみると、3.0 Å, 1.5 Å, 0.8 Å と分解能が上がってくると全く質の違った構造が見えてくるにも拘らず、最初に出た分解能での構造解析で止まるのが通例である。結晶が出るか出ないかの研究は多くあるが、例えば3.0 Å 分解能から1.5 Å 分解能へ向上させる方法の系統的な研究は見られない。3.0 Å ~ 2.0 Å 分解能の結晶を1.5 Å さらに0.8 Å 分解能に高品位化する研究はX線結晶構造解析が生命科学で新たな研究を切り拓く上で鍵になる研究である。

巨大な複合体の構造解析も座標精度の向上が求められるようになるのは自明である。低分解能のcryoEM単粒子構造とX線高分解能構造との融合による擬似原子分解能構造では機能メカニズムの理解にとって致命的な限界が生じる。回折実験法は如何なる大きさの対象にも対応できるようになっており、cryoEMによる構造解析と並行して結

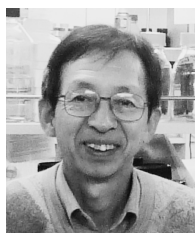
晶化を行うことは重要である。

参考文献

- 1) W. H. Bragg and W. L. Bragg: Proc. Roy. Soc. London Ser. A. **88**, 428 (1913).
- 2) J. D. Bernal and D. Crowfoot: Nature **133**, 794 (1934).
- 3) J. C. Kendrew, R. E. Dickerson, B. E. Strandberg, R. G. Hart, R. D. Davies, D. C. Phillips and V. C. Shore: Nature **185**, 422 (1960).
- 4) A. F. Cullis, H. Muirhead, M. F. Perutz, M. G. Rossmann and A. C. T. North: Proc. Roy. Soc. London Ser. A **265**, 161 (1962).
- 5) J. D. Watson and F. H. C. Crick: Nature **171**, 737 (1953).
- 6) C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sarma: Nature **206**, 757 (1965).
- 7) S. C. Harrison, A. J. Olson, C. E. Schutt, F. K. Winkler and G. Bricogne: Nature **276**, 368 (1978).
- 8) C. Abad-Zapatero, S. S. Abdel-Meguid, J. E. Johnson, A. G. W. Leslie, I. Rayment, M. G. Rossmann, D. Suck and T. Tsukihara: Nature **286**, 33 (1980).
- 9) J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel: J. Mol. Biol. **180**, 385 (1984).

- 10) D. W. Green, V. M. Ingram and M. F. Perutz: *Proc. Roy. Soc. London Ser. A* **225**, 287 (1954).
- 11) W. A. Hendrickson: *Science* **254**, 51 (1991).
- 12) Y. Kitago, N. Watanabe and I. Tanaka: *Acta Cryst.* **D61**, 1013 (2005).
- 13) N. Watanabe, Y. Kitago, I. Tanaka, J. Wang, Y. Gu, C. Zheng and H. Fan: *Acta Cryst.* **D61**, 1533 (2005).
- 14) M. Sato, D. Liebschner, Y. Yamada, N. Matsugaki, T. Arakawa, S. S. Wills, M. Hattie, K. A. Stubbs, T. Ito, T. Senda, H. Ashida and S. Fushinobu: *J. Biol. Chem.* **292**, 12126 (2017).
- 15) R. L. Owen, E. Rudino-Pinera and E. F. Garman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4912 (2006).
- 16) K. von Bohlen, I. Makowski, H. A. Hansen, H. Bartels, Z. Berkovitch-Yellin, A. Zaytzev-Bashan, S. Meyer, C. Paulke, F. Franceschi and A. Yonath: *J. Mol. Biol.* **222**, 11 (1991).
- 17) S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig and H. Michel: *Nature* **376**, 660 (1995).
- 18) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa: *Science* **269**, 1069 (1995).
- 19) T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa: *Science* **272**, 1136 (1996).
- 20) S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. Fei, C. Peters Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki and T. Tsukihara: *Science* **280**, 1723 (1998).
- 21) K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano: *Science* **289**, 739 (2000).
- 22) C. Toyoshima, S. Iwasawa, H. Ogawa, A. Hirata, J. Tsueda and G. Inesi: *Nature* **495**, 260 (2013).
- 23) C. Toyoshima, Y. Norimatsu, S. Iwasawa, T. Tsuda and H. Ogawa: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **104**, 19831 (2007).
- 24) C. Toyoshima, H. Nomura and T. Tsuda: *Nature* **432**, 361 (2004).
- 25) C. Toyoshima and T. Mizutani: *Nature* **430**, 529 (2004).
- 26) C. Toyoshima and H. Nomura: *Nature* **418**, 605 (2002).
- 27) C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura and H. Ogawa: *Nature* **405**, 647 (2000).
- 28) Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55 (2011).
- 29) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, Y. Nakajim, T. Shimizu, K. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago and J.-R. Shen: *Nature* **517**, 99 (2015).
- 30) M. Yamamoto, K. Hirata, K. Yamashita, K. Hasegawa, G. Ueno, H. Ago and T. Kumasaka: *IUCr J* **4**, 529 (2017).
- 31) K. Kumazaki, S. Chiba, M. Takemoto, A. Furukawa, K. Nishiyama, Y. Sugano, T. Mori, N. Dohmae, K. Hirata, Y. Nakada-Nakura, A. D. Maturana, Y. Tanaka, H. Mori, Y. Sugita, F. Arisaka, K. Ito, R. Ishitani, T. Tsukazaki and O. Nureki: *Nature* **509**, 516 (2014).
- 32) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, J. R. Shen, S. Yoshikawa and H. Ago: *Nat Methods* **11**, 734 (2014).
- 33) V. Y. Lunin, A. N. Grum-Grzhimailo, E. V. Gryzlova, D. O. Sinitsyn, T. E. Petrova, N. L. Lunina, N. K. Balabaev, K. B. Tereshkina, A. S. Stepanov and Y. F. Krupnyanski: *Acta Crystallogr.* **D71**, 293 (2015).
- 34) A. Classen, K. Ayyer, H. N. Chapman, R. Röhlberger and J. von Zanthier: *Phy. Rev. Lett.* **119**, 053401 (2017).
- 35) Y. Hirano, K. Takeda and K. Miki: *Nature* **534**, 281 (2016).
- 36) K. Takaba, K. Takeda, M. Kosugi, T. Tamada and K. Miki: *Sci Rep.* **7**, 43162 (2017).
- 37) E. Nango, A. Royant, M. Kubo, T. Nakane, C. Wickstrand, T. Kimura, T. Tanaka, K. Tono, C. Song, R. Tanaka, T. Arima, A. Yamashita, I. Kobayashi, T. Hosaka, E. Mizohata, P. Nogly, M. Sugahara, D. Nam, T. Nomura, T. Shimamura, D. Im, T. Fujiwara, Y. Yamanaka, B. Jeon, T. Nishizawa, K. Oda, M. Fukuda, R. Andersson, P. Báth, R. Dods, J. Davidsson, S. Matsuoka, S. Kawatake, M. Murata, O. Nureki, S. Owada, T. Kameshima, T. Hatsui, Y. Joti, G. Schertler, M. Yabashi, A. N. Bondar, J. Standfuss, R. Neutze and S. Iwata: *Science* **354**, 1552 (2016).
- 38) A. Shimada, M. Kubo, S. Baba, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, T. Nomura, T. Kimura, K. Shinzawa-Itoh, J. Baba, K. Hatano, Y. Eto, A. Miyamoto, H. Murakami, T. Kumasaka, S. Owada, K. Tono, M. Yabashi, Y. Yamaguchi, S. Yanagisawa, M. Sakaguchi, T. Ogura, R. Komiya, J. Yan, E. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago, S. Yoshikawa and T. Tsukihara: *Sci Adv.* **3**, e1603042 (2017).
- 39) M. Suga, F. Akita, M. Sugahara, M. Kubo, Y. Nakajima, T. Nakane, K. Yamashita, Y. Umena, M. Nakabayashi, T. Yamane, T. Nakano, M. Suzuki, T. Masuda, S. Inoue, T. Kimura, T. Nomura, S. Yonekura, L. J. Yu, T. Sakamoto, T. Motomura, J. H. Chen, Y. Kato, T. Noguchi, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, E. Nango, R. Tanaka, H. Naitow, Y. Matsuura, A. Yamashita, M. Yamamoto, O. Nureki, M. Yabashi, T. Ishikawa, S. Iwata and J. R. Shen: *Nature* **543**, 131 (2017).
- 40) K. Namba, I. Yamashita and F. Vonderviszt: *Nature* **342**, 648 (1989).
- 41) I. Yamashita, K. Hasegawa, H. Suzuki, F. Vonderviszt, Y. Mimori-Kiyosue and K. Namba: *Nat Struct Biol.* **5**, 125 (1998).
- 42) K. Yonekura, S. Maki, D.G. Morgan, D.J. DeRosier, F. Vonderviszt, K. Imada and K. Namba: *Science* **290**, 2148 (2000).
- 43) F.A. Samatey, K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto and K. Namba: *Nature* **410**, 331 (2001).
- 44) K. Yonekura, S. Maki-Yonekura and K. Namba: *Nature* **424**, 643 (2003).
- 45) F. A. Samatey, H. Matsunami, K. Imada, S. Nagashima, T. R. Shaikh, D. R. Thomas, J. Z. Chen, D. J. Derosier, A. Kitao and K. Namba: *Nature* **431**, 1062 (2004).
- 46) K. Imada, T. Minamino, A. Tahara, K. Namba: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 485 (2007).
- 47) T. Minamino and K. Namba: *Nature* **451**, 485 (2008).
- 48) S. Nakamura, N. Kami-ike, J. P. Yokota, T. Minamino and K. Namba: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17616 (2010).
- 49) J. Ruan, T. Kato, C. L. Santini, T. Miyata, A. Kawamoto, W. J. Zhang, A. Bernadac, L. F. Wu and K. Namba: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 20643 (2012).
- 50) K. Imada, T. Minamino, Y. Uchida, M. Kinoshita and K. Namba: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 3633 (2016).
- 51) T. Fujii, T. Kato, K. D. Hiraoka, T. Miyata, T. Minamino, F. F. Chevance, K. T. Hughes and K. Namba: *Nat. Commun.* **8**, 14276 (2017).

著者紹介



月原富武

兵庫県立大学大学院 生命理学研究科,
大阪大学蛋白質研究所

専門：構造生物学, 蛋白質結晶学

【略歴】

1969年大阪大学大学院理学研究科修士課程修了

1970年同博士課程中途退学, (理学博士)

1971年鳥取大学工学部助手

1973年同講師

1978年同助教授

1991年徳島大学工学部教授

1995年大阪大学蛋白質研究所教授

2008年兵庫県立大学特任教授

Synchrotron radiation in structural biology

Tomitake TSUKIHARA Department of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Akoh, Hyogo 678-1297, Japan
Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Abstract Structures of myoglobin and hemoglobin determined by X-ray crystallography around 1960 effected the birth of structural biology. Synchrotron radiation which was tunable and extremely strong expanded possibility of X-ray crystallography in structural biology. In our country Photon Factory has provided structural biologists with beamlines since 1980th to produce novel protein structures. SPring-8 has offered beamlines since end of 1990th. Both facilities have continuously conducted technological revolution to keep the cutting edge of experimental conditions. Many structures that were highly evaluated have been produced by both facilities.