X線結晶解析より得られるタンパク質の動的構造

蛋白工学研究所 木 寺 詔 紀

Dynamic structures of proteins derived from X-ray crystallography are described. A new method of dynamic structure refinement is proposed. In the method, Debye-Waller factor is expanded in terms of the low-frequency normal modes whose amplitudes and eigenvectors are experimentally optimized in the process of the crystallographic refinement. Application of the method to human lysozyme showed : (1) Debye-Waller factor consists of two parts, highly anisotropic internal fluctuations and almost isotropic external terms. The former is smaller than the latter. (2) Correlation of fluctuations corresponding to the hinge-bending motion was detected.

protein dynamics/X-ray crystallography/Debye-Waller factor/normal mode refinement/human lysozyme/

1. はじめに

動的なタンパク質のイメージを最も鮮明に与える実験量は緩和現象を直接取り扱う NMR のそれであろう。そして、分子全体の運動のイメージとなると計算機シミュレーションのもたらしたものが大きい。分子動力学シミュレーションの結果をビデオで見たときのあのうごめいている姿はなんとも印象的である。

しかし、原子レベルで最も詳細な動的構造の情報を与えてくれる実験手段はやはり結晶構造解析であろう。結晶構造解析で原子は Debye-Waller のモデル（原子 j は平均構造 $\bar{r}_j$ のまわりでゆらぐ； $r_j = \bar{r}_j + \Delta r_j$ ）で記述されるため、すべての原子には、静的平均構造 $\bar{r}_j$ ばかりでなく動的構造 Δr_j の情報が常に伴っている。そしてそのモデルで決定されたタンパク質の立体構造が登録されている Brookhaven National Laboratory の Protein Data Bank (PDB) の原子情報の欄を見ると原子名、座標値に続いてその原子のゆらぎの大きさの指標である温度因子（ $B\text{-factor} = (8\pi^2/3)\langle\Delta r_j^2\rangle$ ； $\langle\Delta r_j^2\rangle$ は原子 j のゆらぎの大きさ）が記載されている。

そのように解析に用いられるモデルが、そしてその解析結果が公表される制度が動的構造の重要性を語っている。ところが一方で、結晶構造解析はむしろ剛直

で静的なタンパク質像を印象づける役割を果たしてきたという逆説的な事実と出会う。それは、多くの場合静的平均構造 $\bar{r}_j$ が動的構造 Δr_j から切り放されて議論されているという事情によっている。低分子化合物の X 線構造が熱振動楕円体（ゆらぎの大きさが楕円の大きさと表現される；図 3 参照）で表示されるのと対照的に、タンパク質では平均構造 $\bar{r}_j$ による骨格構造のみが表示され、文字どおりゆるぎないイメージを与えている。

解析によって得られた動的構造が積極的に議論されないことの理由は、1976 年に書かれた Blundell と Johnson の Protein Crystallography¹⁾ という教科書にうかがうことができる。温度因子の解説は次のように書かれている。

"In almost all crystal structures, B is determined empirically and also takes into account a variety of other factors such as static disorder, wrong scaling of measurements, absorption, and incorrect atomic scattering curves. Hence values of the mean displacement may only be taken as a rough approximation, although undoubtedly the high values of the Debye factor encountered in protein crystals do represent the greater mobility of the atoms of the protein molecules." (Debye factor は温度因子と同じ)

ここには結晶解析によって得られるタンパク質の動的構造に対する物理的意味と精度についての不信が表明されている。

Protein Dynamic Structures from X-ray Crystallography

Akinori KIDERA

Protein Engineering Research Institute

この不信を解消する端緒となった論文が Frauenfelder ら²⁾と Artymiuk ら³⁾によって1979年の Nature 誌に相次いで発表された。Frauenfelder らは myoglobin の X 線結晶回折を低温から複数の温度で測定することで温度因子の温度依存性を決定し、温度因子がタンパク質の動的性質を確かに反映した物理量であることを示した。Artymiuk らはヒトとニワトリの二つのリゾチームを別々に解析して得られた温度因子がよい一致を示すことから、温度因子が実験データやその解析上の系統的な誤差ではなく、動的構造を反映したものであると結論した。

以下に、タンパク質の X 線結晶構造解析による動的構造の研究を筆者らの研究を中心に解説する。そして、その動的解析の結果として得られる Debye-Waller のモデル（静的構造と動的構造の両者を同時に表現するモデル）によるタンパク質の描像をヒトリゾチームを例にして示そう。

2. 結晶解析における動的構造の取扱い

ここで動的構造が X 線結晶構造解析においてどのように取り扱われているか、そこで何が問題であるかを述べよう。実験で観測された逆格子点 $\mathbf{q}$ での回折強度 $I_{\text{obs}}(\mathbf{q})$ はモデルの構造因子 $F_{\text{cal}}(\mathbf{q})$ によって

$$I_{\text{obs}}(\mathbf{q}) \sim |F_{\text{cal}}(\mathbf{q})|^2 \quad (1)$$

$$F_{\text{cal}}(\mathbf{q}) = \sum_j f_j(\mathbf{q}) \exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) \langle \exp(i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j) \rangle \quad (2)$$

と説明される。ここで和は単位格子中の原子 j についてとる。 f_j は原子の種類で決まる原子散乱因子。 F_{cal} の右辺にある $\exp(i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j)$ の項が静的平均構造からの寄与、 $\langle \exp(i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j) \rangle$ は Debye-Waller 因子 (DWF) と呼ばれ動的構造を表現する。平均操作 $\langle \rangle$ は回折強度を測定する長時間の時間平均、更に格子間の相違を平均する意味をも併せ持つ。この平均操作は結晶解析で得られる動的構造の性質を決定している。長時間平均であることから、動的構造はゆらぎの平衡分布としての意味を持ち時間に依存しない（時間に直接関わる物理量を扱う NMR や分子動力学シミュレーションとは“動的”の意味が異なる）。そのため、静的なまたは緩和時間の極めて長いゆらぎ（static disorder）と速い緩和時間のゆらぎ（熱振動）が DWF の中に混ざり区別がつかないという問題が生ずる（問題 1）。平均操作が格子の乱れを取り込むことは、本来議論したいタンパク質の内部運動を直接観測することができないことになる（問題 2）。次に、DWF は 2 式の形のままでは複雑すぎる（高次のモーメントを含む）の

で、Gauss 近似をおこなひ、

$$\langle \exp(i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j) \rangle \sim \exp\left[-\frac{1}{2} \langle (\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j)^2 \rangle\right] \quad (3)$$

とすることで、分布の非調和性を無視する（この近似が妥当でない場合があり得る：問題 3）。更に、タンパク質の結晶では分解能に限界があり実験データの情報量が分布の異方性を決定できるだけ集まらない。そこで異方性を無視して 3 式を等方的温度因子で近似する（これは低分子系では採用されない粗い近似である：問題 4）。

$$\exp\left[-\frac{1}{2} \langle (\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j)^2 \rangle\right] \sim \exp\left(-\frac{B_j}{16\pi^2} q^2\right) \quad (4)$$

この B_j が PDB に登録されている B-factor である。

以上 4 点挙げた動的構造解析の問題は以下のように扱われている。

問題 1：異なる階層に属する運動はそれぞれ異なる温度依存性を持つことが期待されるので、広い温度範囲で X 線回折を測定すること（cryocrystallography）によってそれらを分離することができる⁴⁾。例えば、熱振動は低温では抑制されるが、static disorder には温度依存性が少ない。そこで、常温と低温での回折データを比較することでそれらを分離することができる。この実験は Frauenfelder ら²⁾によって行われた。最近では、常温に存在する運動のモードが基質の結合に必須であるという実験結果を得ている⁵⁾。

問題 3：タンパク質の結晶で得られる通常の分解能で問題となる非線形性は、高次のモーメントというよりは多峰性分布にある。このような非線形性は通常溶媒領域に露出した側鎖にみられ、そのような側鎖は二つの異なった構造を同時に用いることによってモデル化されている（multiple conformations）⁶⁾。この問題には、Debye-Waller のモデルを使わず分子動力学で得られる軌跡を実験データに合わせていく完全に非線形なモデルも提案されているが⁷⁾、モデルパラメータの数量が極めて大きくなる問題を残している。

問題 2 と 4：これら二つの問題は以下に述べる基準振動動的因子法で扱われている。

3. 基準振動動的因子法(normal mode refinement)

上記の問題 2 と 4 を解決するための糸口は既に Artymiuk ら³⁾の論文に与えられている。彼らは動的構造の解析に複数の非常に単純な運動を組み合わせたモデルを導入し、複雑な動的構造をそれぞれの運動からの寄与に分解して理解しようと試みた。その考え方

の延長線上に、より詳細な運動のモデルを用いる基準振動動的因子法 (normal mode refinement)^{8)~10)}がある。我々は、運動のモデルとしてタンパク質の内部自由度と外部自由度 (剛体としての並進回転) の基準振動を採用して、動的構造の解析をした。

まず最初にタンパク質の基準振動について説明しよう。内部自由度の基準振動は低分子系と同様に、エネルギー極小構造での二次微分行列の固有値問題を解くことによって理論的に得られる (基準振動解析)¹¹⁾。ヒトリゾチームの基準振動モードの例を第1図に示す。例として、最低振動モードから順に1, 10, 50番目のモードを主鎖原子の運動を表す矢印で表示した。低分子化合物で伸縮、変角などのモードがあるように、タンパク質でも構造によって決まる特徴的なモードがある。第1モードは二つのドメイン間の相互の動きを、第10モードは右側のドメイン全体の動きを、第50モードは左側のドメインの一部に限定された動きを表している。振動数が低いモードほど協同性が高くなっていることがわかる。動的構造のモデルとしての基準振動の重要な性質は、第一に上に見たように協同的な運動を表現し得ること、第二に自由度の数だけある基準振動の中で (ヒトリゾチームで6000余り)、少数 (高々数百程度) の低振動 (大きな振幅を持つ) モードだけでタンパク質の運動のほとんどを記述することができる

ることにある^{9), 11)}。この性質によってパラメータの数を増やさずに異方性を含んだより精密な動的構造の記述ができるわけである (問題4の解)。

外部自由度の基準振動は、最も一般的な TLS モデル¹²⁾ (タンパク質全体の剛体的並進(T), 回転運動(L)とその交差項(S)からなる) を用いる。これらのモードは基本的には内部運動モードと直交しているので内部運動モードで表現されない部分、即ち格子の乱れからの寄与を吸収することができる (問題2の解)。

基準振動によって Debye-Waller 因子は以下のように記述される。

$$\langle \exp(i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j) \rangle \sim \exp \left[-\frac{1}{2} \sum_{\mathbf{k}, l} q_k q_l \sum_{m, n} \phi_{jkm} \phi_{jln} \sigma_{mn} \right] \quad (5)$$

q_k は逆格子ベクトル $\mathbf{q}$ の要素, ϕ_{jkm} は基準振動 m (内部運動と外部運動のモードを含む) の固有ベクトルの要素 (ベクトル (ϕ_{j1m} , ϕ_{j2m} , ϕ_{j3m}) が第1図の矢印を表す), σ_{mn} は基準振動モードの分散共分散で振幅と相関の程度を表す。4式と比較すると5式が異方性を表現していることがわかるだろう。

つぎに、基準振動による動的構造のモデルの精密化の方法について触れる。第1図に示したようにタンパク質のゆらぎはいろいろな形のモードの和として表現される。モードの形はある程度精密化された平均構造があれば、そこから基準振動解析によって前もって計

fluctuations =

図1. ヒトリゾチームのゆらぎは基準振動モードの和として表現される。最低振動モードから順に1, 10, 50番目のモードを主鎖原子の運動を表す矢印で表示した。基準振動動的因子法ではモードの振幅 A_m を変数として実験データに合うゆらぎをさがす。

算しておくことができる。従って、動的構造の精密化は各モードの寄与（第1図の振幅 A_m ）を少しずつ変えて実験データに最も良く合うように最適化することによって行われる。モードの形は理論的に予想されたものを用い、それらの全体に対する寄与の割合を変えて実験の電子密度分布に合わせてやうという考え方である。 F_{cal} の精密化での変数は平均構造の座標値 $\bar{r}_i$ と動的構造を決めるモードの分散共分散 σ_{mn} である。計算の詳細は文献9), 10), 13)を参照されたい。

4. リゾチームの動的構造

上に述べた基準振動的因子法でX線結晶回折データを解析することによって、内部自由度で記述される異方性を含んだゆらぎを抽出することができる。ヒトリゾチームの解析結果を例にして説明しよう。みかけのゆらぎ（PDBに記載されている B -factorに相当する）は、外部自由度で認識される部分（格子の乱れ等を含む：外部ゆらぎと呼ぶ）とひとつのタンパク質分子に固有のゆらぎである内部自由度で記述される部分（内部ゆらぎと呼ぶ）とに分けられる（図2）。図3にORTEP¹⁴⁾による α 炭素の熱振動楕円体を表示した。これがDebye-Wallerのモデルで得られるタンパク質の動的な描像である。この図では静的平均構造 $\bar{r}_i$ は単にゆらぎの中心位置を表現しているに過ぎない。熱振動楕円体はそうにゆらいでいると見ることもできるし、その範囲内で平均構造に任意性があるということもできる。

どれだけゆらいでいるか？：内部ゆらぎ（主鎖原子で $\langle \Delta r^2 \rangle^{1/2} = 0.25 \sim 0.55 \text{ \AA}$ ）は結晶中の低分子有機化

図2. 主鎖原子の根平均自乗ゆらぎ $\langle \Delta r_i^2 \rangle^{1/2}$ を各残基ごとに平均した値をプロットした。細い実線がみかけのゆらぎ $[(\text{内部ゆらぎ})^2 + (\text{外部ゆらぎ})^2]$ 、破線が外部ゆらぎ、太い実線が内部ゆらぎ。

図3. ヒトリゾチームの α 炭素の熱振動楕円体をORTEPによって表示した（楕円体の軸の大きさは $\langle \Delta r_i^2 \rangle^{1/2}$ の3倍に拡大してある）。(a)みかけ（内部ゆらぎ+外部ゆらぎ）のゆらぎ。(b)内部運動によるゆらぎ。

合物に通常見られるゆらぎと同じ程度である。Artymiuk³⁾らも予想したとおり、外部ゆらぎの大きさは内部ゆらぎよりもむしろ大きい。タンパク質の結晶は容積にして40-60%が溶媒分子によって占められており、低分子結晶のような稠密な分子間相互作用を持たない。そのためタンパク質の重心位置が格子中でゆらぐことによって、外部自由度で記述される大きなゆらぎが生じていると考えることができる。多くの計算機シミュレーションが温度因子から得られるみかけのゆらぎとの一致で計算の正否を判断してきたが、それは過大評価をもたらしていたことになる。

どこがよりゆらいでいるか？：分子の外側がより大きくゆらいでいる。ゆらぎの大きさと分子の重心からその残基までの距離との相関係数は、みかけ、外部、内部ゆらぎの順に0.63, 0.81, 0.51である。外部ゆらぎとの高い相関は外部自由度にある分子全体の剛体的回転のモードによるもので、重心から遠い原子がより大きくゆらぐことによっている。内部ゆらぎにも確かにその傾向があることが確認できるが、その傾向は外部ゆらぎによって若干誇張されてみえる。内部ゆらぎの全体のパターンは分子動力学シミュレーションの結果と良い一致を示す。

ゆらぎの向きは見えるか？：内部運動の異方性は大きい（熱振動楕円体の軸比にして平均1.8）。図3(a)と(b)の違いを見て分かるように内部ゆらぎの異方性はより

等方的な外部ゆらぎに完全にのみ込まれて、みかけのゆらぎに顕著な異方性は見えてこない。みかけと外部ゆらぎの熱振動楕円体の平均の軸比はそれぞれ1.3と1.2である。従って、大きなゆらぎを持つ側鎖を除いて、見かけのゆらぎだけを議論するのなら今まで使われてきた粗い近似としていた4式の等方的温度因子でそれほど問題はなかったことになる。しかし、タンパク質固有の内部ゆらぎは計算機シミュレーションが予測したように極めて異方的である。

協同的なゆらぎが見えるか？：リゾチームに特徴的なhinge-bending運動を見ることができる。本来協同的な性質を持つ基準振動をモデルとして採用していることから、ゆらぎの相関をX線データによって精密化された振動構造の内挿として推定することができる^{9),15)}。第4図に α 炭素iとjのゆらぎの相関を表す $\langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle$ を示す。対角線に近い部分の正の相関は

共有結合で近接している原子間の相関を表し、特にループA、Bが剛直体としてふるまっていることがわかる。二つのドメイン間(β , γ , δ)の部分にも負の相関が見られる。

5. おわりに

X線結晶構造解析における動的構造はそこに用いられているDebye-Wallerモデルの帰結であり、静的平均構造のみを取り上げるのは実験結果の正しい評価とはならない。そして動的構造の理解をする手立ても基準振動動的因子法ではは出そろった。……とそこまで主張してきて「タンパク質のゆらぎはどのような生物学的意味を持っているのだろうか？」という問が聞こえてくる。結晶解析に関してだけでも、古くはゆらぎが抗原認識に関連する^{16),17)}、最近では常温に存在する運動モードが基質結合に必須である⁵⁾などその重要

図4. ヒトリゾチームの α 炭素間のゆらぎの相関 $\langle \Delta r_i \cdot \Delta r_j \rangle$ 。xは強い正の相関をoは強い負の相関を表す。対応する構造上の位置を右上の図で示した。リゾチームは図の右側の第一ドメイン(1-39, 90-130残基)と左側の第二ドメイン(40-89残基)がクレフトを形成する構造を持っている。図中のゆらぎの相関 β γ δ がクレフトをはさむhinge-bending運動に対応している。

性に関する多くの実験事実が蓄積されている。しかし最終的には、温度因子によって与えられる平衡分布では十分ではなく、時間軸に沿った過程を原子レベルで観測する手段(時分割 Laue 法¹⁸⁾などの実験手段や計算機シミュレーション)が必要となってくるだろう。

この研究は京都大学理学部郷信広教授、蛋白工学研究所松島正明氏、東京工業大学伊中浩治氏と共同で行われた。ここに深謝する。

文 献

- 1) Blundell, T. L., Johnson, L. N. (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, London.
- 2) Frauenfelder, H., Petsko, G. A., Tsernoglou, D. (1979) *Nature*, **280**, 558-563.
- 3) Artymiuk, P. J., Blake, C. C. F., Grace, D. E. P., Oatley, S. J., Phillips, D. C., Sternberg, M. J. E. (1979) *Nature*, **280**, 563-568.
- 4) Frauenfelder, H., Parak, F., Young, R. D. (1988) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17**, 451-479.
- 5) Rasmussen, B. F., Stock, A. M., Ringe, D., Petsko, G. A. (1992) *Nature*, **357**, 423-424.
- 6) Smith, J. L., Hendrickson, W. A., Honzatko, R. B., Sheriff, S. (1986) *Biochemistry*, **25**, 5018-5027.
- 7) Gros, P., van Gunsteren, W. F., Hol, W. G. J. (1990) *Science*, **249**, 1149-1152.
- 8) Kidera, A., Go, N. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **87**, 3718-3722.
- 9) Kidera, A., Go, N. (1992) *J. Mol. Biol.*, **225**, 457-475.
- 10) Kidera, A., Inaka, K., Matsushima, M., Go, N. (1992) *J. Mol. Biol.*, **225**, 477-486.
- 11) Go, N., Noguti, T., Nishikawa, T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **80**, 3696-3700.
- 12) Schomaker, V., Trueblood, K. N. (1968) *Acta Cryst.*, **B24**, 63-76.
- 13) 木寺詔紀(1992)日本結晶学会誌, **34**, 186-191.
- 14) Johnson, C. K. (1976) *ORTEP-II*, Report ORNL-5138, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- 15) Kidera, A., Inaka, K., Matsushima, M., Go, N. (1992) *Biopolymers*, **32**, 315-319.
- 16) Westhof, E., Altschuh, D., Moras, D., Bloomer, A. C., Mondragon, A., Klug, A., Van Regenmortel, M. H. V. (1984) *Nature*, **311**, 123-126.
- 17) Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Alexander, H., Houghten, R. A., Olson, A. J., Lerner, R. A., Hendrickson, W. A. (1984) *Nature*, **312**, 127-134.
- 18) Schlichting, I., Almo, S. C., Rapp, G., Wilson, K., Petráš, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E. F., Petsko, G. A., Goody, R. S. (1990) *Nature*, **345**, 309-315.

きでら あきのり

蛋白工学研究所第2研究部主任研究員。82年京都大学工学部高分子化学科博士課程修了。工学博士。以来コーネル大学化学科博士研究員、京都工芸繊維大学工学部助手を経て、88年より現職。私の机の横には小さなCDプレーヤーがぶら下がっています。「大部屋の孤独」を守るための必需品です。この文章はShostakovichの24の前奏曲とフーガを耳元に聞きながら書きました。

連絡先 蛋白工学研究所第2研究部

TEL06-872-8202