分子生物学から構造生物学へのダイナミクス

国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター 嶋本伸雄

The history of molecular biology is briefly described. The movement from molecular biology to structural biology seems to be an inevitable destination. Structural biology should be a biology, but this is not necessarily accepted by Japanese researchers analyzing protein structures. Problems specific to Japanese structural biology are discussed.

structural biology / molecular biology / DNA binding proteins / Trp repressor-operator complex / indirect readout

1. 学問の定義

近頃、「構造生物学」がしきりに唱えられて、研究費を取ってくる魔法の呪文として用いられ、行き詰まった停滞状況の学問を再生させる切り札として捉えられたり、トレンドに乗って学会に羽ばたくための翼になったり、それぞれの研究者のそれぞれの立場で、都合の良いように解釈されています。実は、これは構造生物学のためには、幸せなことです。学問が、ある見解で統一された解釈をされ、「一学とはこういうことです」と語られるようになったときには、もうその学問は、飛躍のエネルギーを失っているのです。つまり、その固有の主要な問題を解決してしまったか、回答が不可能であることが自覚されてしまったかの、どちらかです。実は、分子生物学は、実は早くもこの段階に達してしまい、体系化された考え方と技術として、生物学全体の基盤になってしまいました。

そのようなわけで、たとえ尊敬する大先輩から「構造生物学」とはこのようなものだ、と言われても（この拙文も含めて）、100%信用してはいけません。自然科学はあくまで自然が対象で、いかに偉大な師といえども、自然が教えることを無視して、学問を継承させることはできません。自然に対して受け身の姿勢を持たない科学は、腐臭を放つ大脳排泄物になってしまいます。あくまで、各人が真剣に自然と対決しながら、

学問を消化するのがコツなのです。

私は、研究費を取る呪文として用いたり、トレンドに乗る翼として構造生物学を捉えることは、好きではありません。ただし、我々科学者が持つ「さもしさ」からいって、この完全否定は困難です。そこで、もっと内容のある捉え方を可能にするために、歴史資料として、構造生物学の代表的な論争とその顛末を一つ紹介しましょう。

2. Trp リプレッサー／indirect readout 論争

Trp リプレッサーという大腸菌のタンパク質は、トリプトファンの合成を行う酵素群をコードしている *trp* オペロンのオペレーターに、L-トリプトファンとの複合体として結合します。そして、RNA ポリメラーゼが転写を開始するはずのプロモーター部位を立体的にブロックしてしまい、転写を阻害します。つまり、トリプトファンがある時には、酵素の合成を止めるための省エネ機構で、最も単純な転写抑制機構です。

1970年代の後半から、X線結晶構造解析で分子生物学に貢献しようという努力が、主として欧米で払われ、タンパク質がどの様にしてDNAの塩基配列を認識するのか、との間に答える努力が払われました。この問題に答えるには、DNAとタンパク質の複合体の構造解析が必須です。1988年に発表されたのは、ファージ434とλの2つの相同なリプレッサーで、認識配列の塩

History from molecular biology to structural biology

Nobuo SHIMAMOTO

Structural Biology Center, National Institute of Genetics

基とタンパク質のアミノ酸とが、直接水素結合によって結ばれていることが明らかになりました¹⁾。ところが、ほぼ同時に発表されたTrpリプレッサー・オペレーター-DNA複合体の構造では、DNAを認識するヘリックス・ターン・ヘリックスというモチーフは共通だったのですが、塩基とアミノ酸との直接の水素結合は無く、いずれも水分子を経由しているという相互作用しか見出されませんでした²⁾。そして、直接水素結合をして塩基の読み出しをするdirect readoutと、水分子を経由して認識するindirect readoutという概念が提唱されました²⁾。これが、indirect readoutをめぐる論争の始まりです。

もし、direct readoutだけがあるとすると、アミノ酸と塩基の認識はかなり予想ができることになりますが、indirect readoutも存在するとなると、可能性が多すぎて予想が困難になります。そこで、「Trpリプレッサーの場合は、DNA断片は確かに特異的配列を含むが、結晶内でのひずみのため非特異的複合体を形成しているのではないか」という希望的解釈をする人が出てきました。

これに油を注いだのが、「結晶構造解析に用いられたオリゴDNAは、ゲルシフトアッセイではリプレッサーとの結合が見られない、また、オペレーター-DNAはparindrome配列だが、その対称点が2通り取り得るため、最初の取り方が誤っているのではないか」と言う報告です³⁾。ここで、構造学といえども、タンパク質の機能的アッセイをしなければならない、という教訓が得られました。この教訓は後にどんでん返しとして、機能学者に返ってくることになります。

実は、誤っていたのは、結晶の方ではなくて、ゲルシフトアッセイの方だったのです。これらのアッセイでは、普通低イオン強度で電気泳動を行うのですが、このイオン強度では、短いオリゴDNAの二本鎖が十分維持できてなかったため、結合が観察できなかったのです⁴⁾。つまり、機能のアッセイにおいても、構造的要素を忘れてはいけない、という教訓が得られました。

自然界に存在するオペレーターの塩基配列を帰納的に比較し、また、変異を人為的に導入して、演繹的に塩基の結合への寄与を見ることによって、対称点は誤っていなかったことも明らかになりました⁴⁾。つまり、自然界の情報を最大限に帰納的に利用せよ、ということと、帰納的帰結だけでは不十分で、演繹的にモデルを吟味する必要がある、ということです。この間に、制限酵素EcoRVの特異的配列の認識が、indirect readoutであり、また非特異的配列との複合体の構造も明

らかにされたこともあって⁵⁾、indirect readoutの存在は、疑えない事実となりました。

ここで得られる教訓は、いろいろあります。皆さんで原報をみて、考えてみて下さい。Abstractに"wrong"と書いてある論文は、滅多にありませんから。ただ、誰が正しくて、誰が誤っていたか、とだけを読まないで下さい。登場人物は、勇気と知恵に溢れた科学者たちなのです。

3. 分子生物学の変遷⁶⁾と構造生物学登場の必然

当初、分子生物学、という名前は、結晶学者が使っていたのですが、実際には、分子遺伝学に繋がるDNAの物質科学を中心とする学問の名前になりました。この学問の端緒は、「生物のなかには今までに見つからない物理法則が存在するのではないか」、という今となっては誤解から始まったようです。その後、生化学の後進地帯であった米国で、抽象的な遺伝子の概念と論理を用いて、遺伝現象を説明するという分子遺伝学が急成長して、やがてDNAの物質科学も取り込んで、分子生物学に変貌しました。この第一回の革命により、物質を扱わない旧態の分子遺伝学は傍流として取り残されることになります。そして、本流は遺伝現象の多くの問題にめどを立て、1970年代には「分子生物学は終わった」といわれた時期が来たようです。

第2回の革命は、技術革命です。このあたりから、私は目撃者になっています。再び分子生物学は息を吹き返します。遺伝子クローニングと塩基配列決定技術、モノクローナル抗体技術、PCR、トランスジェニック生物技術など1970年代後期から80年代に確立した技術です。この時に、分子生物学が構造生物学に発展するように運命づけられたと、私は考えます。これらの技術により、分子生物学が、発生学、ニューロバイロロジー、はては医学の各分野へと、ヒトをめざすより複雑な生き物へと移動できる目処が立ちました。つまり、分子生物学という考え方と技術の体系が、生物学全体の基盤となったのです。

これらの動きは、いわば応用とも言えることです。一方、基礎生物学として、積極的に遺伝子を改変して、生体高分子からなるシステムの作用機構を解明し、生体におけるいろいろな制御機構を機械論として認識するように、分子生物学は2回目の脱皮を遂げます。タンパク質や核酸を改変できる自由を得たのですから、構造をかえて、機構がどう変わるか、と言う観察からどういう構造が機構を決定しているのか知りたいわけです。

当初は、遺伝子DNAのなかの一次配列上からスタ

ートするのですが、人間の頭は3次元構造を要求します。そこで、遺伝子構造 → 3次元構造 → 機能 という道を決定づけているアルゴリズムの解明が出てきます。これが、分子生物学が要求する構造生物学です。もっとも、機能を意識しないものは生物学ではないのですから、この構造生物学が、一般的な意味での構造生物学でもあると言って良いと、私は思います。

また、ゲノム解析がこの動きに拍車をかけます。多数の構造遺伝子がどんどん見つかるのですから、DNA配列のみの整理で満足する人はいないでしょう。なんとか機能を推定する手がかりはないか、というわけです。実は、第1の矢印は、ひとつの遺伝子がひとつの3次元構造に対応しているのですから、第2の矢印よりずっと簡単です。事実、数年以内に、経験的手法で目処が立つ、と主張する識者が多いのです。経験的手法とは、一口で言うと、難しい理屈抜きで、アミノ酸配列が似てなら構造も似てるだろう、との原則で、すでに解析された構造を基に類推する、という帰納的方法です。この分野は化学に似てきました。

第2の矢印は厄介です。まず、機能はタンパク質ひとつでは出ません。常に他分子との相互作用で機能は出ます。したがって、単体の構造を類推しても中途半端にしか役にたちません。どういう風に相互作用するのかということが決め手です。また、精度の問題があります。酵素では、0.1 オングストローム距離が違っていると、反応がおきなくなることがあります。今の測定手段には、そんな精度はないのです。

良い例が、最初に構造が決められた、リゾチーム⁷⁾とキモトリプシン⁸⁾です。その構造の化学的考察から提唱された反応機構は、半椅子 (あるいはソファー) モデル⁹⁾と電荷リレーと呼ばれますが、どちらも後に、構造学以外の方法を主に用いて反証されました^{8), 9)}。これらのモデルは、1960年代の酵素反応機構論の高揚期を導く力のだったのですが、実は酵素反応機構論が下火になった今でも、この2つの酵素の機構は、まだ研究の対象なのです。もし、構造がもう一桁高く出せて、演繹的方法で反応機構が出たならば、酵素反応機構論は、もっと大きな貢献を生物学にしていたのに違いありません。

4. 構造から機能へ至る困難と成功例

DNAとタンパク質との複合体の構造の10年近い歴史にもかかわらず、タンパク質のアミノ酸配列から、いや、構造からすら、認識配列や結合の強さを、一義的に決定することには成功していません。この原因は、上で述べた以外にも、構造学 (者) の持つ帰納的性格

と、生物学 (者) の持つ演繹的性格との、相性の悪さがあるようです (特に日本では、学会が別で利害対立もあり (者) の相性は悪い)。構造からわかることは、大体の相互作用部位がどのへんか、といったたぐいのことなのですが、これは生物学 (者) の要求からはほど遠いのです。

しかし、相性の悪い夫婦も、優秀な両親にはなり得るようです。DNA結合タンパク質の構造生物学で最も見事な例は、と聴かれるならば、私は躊躇せずDNAクランプを挙げます。大腸菌DNAポリメラーゼIIIは、遺伝子の複製を行う酵素で、数千kbの長大なDNAを一気に合成します。しかし、βサブユニットを欠く酵素では、短いDNAしか合成できないのです。どのようにしてβは、こんな大事な仕事をするのでしょうか。もちろん生化学的なお膳立ても有ったのですが、発表された構造は、分子生物学者が嫉妬を感じたほど (実際何人かから私は聴きました)、単純で見事でした。ダイマーで、ドーナッツを形成していてDNAからはずれなくしている形だったのです¹⁰⁾。真核生物でも、トリマーでドーナッツでした。形=概念、という構造生物学の理想でした。

この後、分子生物学は、このドーナッツの形成が複製の調節に重要な役割を果たしていることを見出し、複製の研究は一水準上昇したのです。このように、良い構造生物学は、新たな研究のスタートを形成します。かつて酵素生化学者は、酵素の構造が明らかにされると落胆した、と言われていました。当時と比べると、構造学者は、心の底から歓迎される部族になったと言えるでしょう。

5. わが国での構造生物学の問題点とその克服

以上、なぜ分子生物学が構造を要求するようになったか、歴史的な説明をしました。生物学である限り、生物物理からであろうが、分子生物であろうが、生物の機能に対する概念を提出することが科学者の仕事です。ところが日本でのこの面での貢献は、異常に低く、研究の質も加味した「いくつ重要なタンパク質の構造を解いたか」という国際統計では、5~7位と他分野に比べて低いのです。何が原因でしょうか?

構造生物学とまったく別の立場として、これらに用いる技術の開発を行うというメソドロジストの立場があります。日本ではこの面での貢献は大きく、フォトンファクトリーのシンクロトン放射X線解析施設は、世界一の評判ですし、近々エネルギーでは世界一のSPRING-8も動き始めます。機構を追求する構造生物学と構造生物学の手段を確立するメソドロジストとの2

つの立場が、ひとりの人間のなかで両立し得るかどうかは、技術が要求するエネルギーの程度で決まり、構造生物学の場合はなかなか困難だと言うのが現状です。日本では、この2つの独立した立場の差が、よく認識されてない傾向が有るように思えます。

構造生物学は、最初のTrpリプレッサーのところで述べたように、帰納的方法と演繹的方法との両者の組み合わせを要求する場合があります。非常に幅広い技術が、機構の証明のために要求されます。ところが日本では、科学の棲み分けが美德と誤解されていて、ルーチン化した技術ですらなかなか他分野には取り入れられないのです。このようなことでは、良い仕事ができるはずがありません。

実は、国外でも国内でも、「技術改良に時間を使うより、今ある技術で少しでも多く面白い構造を解こう」という立場で研究を行っているグループが、ほとんどの良い仕事をしています。また、そうしないと、重要な構造を解く競争に勝ち抜けない、という面もあります。一方、メソドロジストと別の生物学者が対等な共同研究をする、という伝統的な日本のやり方は、構造生物学においては、あまりうまく行っていません。例えば、どんどん変異株を作って良い結晶を得る、というようなことが、両者の間の谷間に落ちてしまっ、て、実質上できないからです。これをやろうとすると、どちらかが主になり、もう一方が手伝いにならざるを得ないのです。

今後、構造生物学のインフラの改善は、確実に進むでしょう。そうすれば、この問題が、もっと先鋭化してきます。機械もある、お金もそこそこある、しかし、なぜ面白い研究が出てこないのか、という訳です。こんなことになっては、面白いはずがありません。今後、この分野に参入される方は、このような歴史を念頭に置いて、単に景気の良かけ声に踊らされることなく、自分の足場をしっかりとって、構造生物学を楽しめることを希望いたします。個人の立場のための紙面は許されませんでしたが、私は私で、ここで述べた構造生物学よりもっと広い意味での構造生物学を楽しむつもりです¹¹⁾。いつかお会いしましょう。

文 献

- 1) Jordan, S. R. and Pabo, C. O. (1988) *Science* **242**, 893-899 ; Aggarwal, A. K., Rodgers, D. W., Drott, M., Ptashne, M. and Harrison, S. C. (1988) *Science* **242**, 899-907.
- 2) Otwinowski, Z., Schevitz, R. W., Zhang, R. G., Lawson, C. L., Joachimiak, A., Marmorstein, R. Q., Luisi, B. F. and Sieglar, P. B. (1988) *Nature* **335**, 321-329.
- 3) Staacke, D., Walter, B., Kisters-Woike, B., Wicken-Bergmann, B. and Müller-Hill, B. (1990) *EMBO J.* **9**, 1963-1967 ; *ibid.* 3023 (corrigendum).
- 4) Haran, T. E., Joachimiak, A. and Singer, P. B. (1992) *EMBO J.* **11**, 3021-3030 ; Joachimiak, A., Haran, T. E. and Singer, P. B. (1994) *EMBO J.* **13**, 367-372 ; Yang, J., Gunasekera, A., Lavoie, T. A., Jin, L., Lewis, D. E. A. and Cavey, J. (1996) *J. Mol. Biol.* **258**, 37-52.
- 5) Winkler, F. K. (1992) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 93-99 ; Vipond, B., Halford, S. E. (1993) *Molec. Microbiol.* **9**, 225-231 ; Lawson, C. L. and Carey, J. (1993) *Nature* **366**, 178-182.
- 6) 例えば、富澤純一 (1994) 蛋白質・核酸・酵素 **39**, 1399-1409.
- 7) Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. and Sarma, V. R. (1965) *Nature* **206**, 757-761.
- 8) Blow, D. M., Birktoft, J. J. and Hartley, B. S. (1969) *Nature* **221**, 337-341 ; Relayは否定されているが、今は新たな論争に発展している。Fray, A. P., Whitt, S. A. and Tobin, J. B. (1994) *Science* **264**, 1927-1930 ; Warshel, A., Papazyan, A. and Kollman, P. A. (1995) *Science* **269**, 102-103.
- 9) Schindler, M. and Sharon, N. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 4330-4335 ; Anderson, W. F., Grutter, M. G., Remington, S. J., Weaver, L. H. and Matthews, B. W. (1981) *J. Mol. Biol.* **147**, 523-543 ; Jolles, P. and Jolles, J. (1984) *Mol. Cell. Biochem.* **63**, 165-189.
- 10) Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1992) *Cell* **69**, 425-437.
- 11) 嶋本伸雄 (1994) ナノバイオロジー入門, 講談社サイエンティフィク, 東京.