セレンメチオニンを用いた多波長異常分散法による蛋白質の構造解析 —大腸菌転写制御因子 OmpR の 構造解析への応用—

北海道大学大学院理学研究科 田中 勲

1. はじめに

蛋白質の立体構造解析には時間がかかる。最初の蛋白質の構造解析が行なわれてから約40年間、これは今も変わらぬ事実である。しかし、その時間は、始めの頃の10年単位から、数年に、そして現在では、条件さえ整えば数ヶ月という単位にまで短縮されてきている。(それどころか「データをとってから××時間で構造が出た」というような話も、ちらほら聞かれるようになっていく。)蛋白質構造解析の迅速化のキーワードは、放射光であり、異常分散効果であり、そして蛋白質工学である。これらをフルに利用するセレンメチオニンを用いた多波長異常分散法は、構造解析界期待の新星である。

これまでの40年間、新規な蛋白質の構造解析は、ほとんど例外なく、重原子多重同形置換法(MIR法)によって行なわれてきた。MIR法では、ネイティブ結晶の他に重原子を組み込んだ重原子同形置換結晶を調製し、重原子を組み込むことによる回折強度の変化から蛋白質の構造を決定する。重原子同形置換結晶を調製するには、重原子を溶かした溶液に蛋白質結晶を浸すと重原子が結晶格子の中に浸透し、場合によっては「結晶中の特定の位置に結晶格子を乱すことなく固定される(同形置換)」という現象を利用する。構造解析に利用可能な同形置換体を調製するためには試行錯誤実験を繰り返さなければならず、このことが「蛋白質の構造解析には時間がかかる」最大の原因になってきた。

2. 多波長異常分散法

多波長異常分散法(MAD法)は、重原子同形置換結晶を必要としない点、画期的な蛋白質構造解析法である。MAD法では、重原子同形置換体を使う代わりに、原子によるX線の散乱が波長によって変化する現象を利用する。原子によるX線の散乱は殻構造をとっている電子によるが、これは一般には自由電子とみなしてよく、この場合、原子散乱因子は波長に依存しない。しかし、入射X線の波長が原子固有の共鳴吸収の起こる波長(吸収端)に近づくと、自由電子近似ができなくなり、原子散乱因子の複素項が無視できなくなってくる。これを異常分散効果と呼ぶ。異常分散効果が観測される波長では、一つの反射面の表と裏の反射強度が異なってくる。さらに吸収端近傍で波長を変化させると、異常分散を示す原子の散乱因子が(実部と虚部で)変化するために、ちょうど結晶に重原子を入れたのと同様な変化が期待される(図1)。多波長異常分散法では、吸収端近

図1 重原子同形置換法(MIR法)と多波長異常分散法(MAD法)。
MIR法では、ネイティブ結晶と重原子同形置換結晶に同一波長(λ)のX線をあて、重原子を入れることによる回折強度の変化から蛋白質の構造を決定する。MAD法では、1種類の結晶に波長の異なるX線をあてたときの異常分散効果の差(図では点線と実線でこれを示している)から構造解析を行う。後者における異常分散原子は、前者の重原子と同じように利用できる。

Protein Structure Analysis by Multiwavelength Anomalous Diffraction Method Using Selenomethionine
— An Application to the Analysis of *E. coli* Transcription Regulatory Factor OmpR —

Isao TANAKA

Graduate School of Science, Hokkaido University

傍の異なる数波長で回折データを収集し、それらの強度差を利用して構造解析を行う。

一般に異常分散効果は、金属のような重原子で顕著である。したがって、MAD法は金属を含む蛋白質に対してはじめて適用された¹⁾。1990年、ヘンドリクソンのグループは、蛋白質中のMetをSe-Metに置換した蛋白質を調製し、Seの異常分散効果を利用することで、一般の蛋白質の構造解析にMAD法が適用できることを示した²⁾。以後、データ収集法と解析法の改良により、MAD法で解析される蛋白質の数は年々増加している。

私達は、マクロファージ遊走阻止因子³⁾、DNA結合蛋白質OmpR⁴⁾、リボソーム蛋白質S7⁵⁾の構造解析にSe-Metを利用したMAD法を適用して、いずれも短期間で構造を決定した。中でもOmpRは、よい重原子置換体を調製することに手間取り、解析が難航していたものである。この蛋白質に対してMAD法を適用することにより、数ヶ月で構造解析を完了することができた。本稿では、Se-Met MAD法による構造解析の一例としてOmpRの構造解析について紹介する。

3. OmpR 蛋白質

大腸菌などの原核生物は、時々刻々変化する環境に文字どおり裸で晒されている。しかし彼らは環境の変化にただ翻弄されているだけではない。生存のために、単純ではあるがそれだけに応答の速い環境適合システムを備えている。これは外界の環境の変化を感知する環境センサー蛋白質と、それからの情報を受けて最終的なエフェクター分子に伝える応答レギュレーター蛋白質の2成分からなる⁶⁾。センサー蛋白質は、細胞膜に固定されており、環境の変化を常時監視している。センサー蛋白質が検出した外界の情報は、膜を通して細胞質内に存在するレギュレーター蛋白質に伝えられる。レギュレーター蛋白質の多くは、DNAの発現調節にかかわる転写因子である。対処すべき情報に応じて、転写因子が結合すべきDNA上の箇所は異なっており、もちろん、発現してくる蛋白質はまったく異なっている。しかし、対処すべき情報の違いにもかかわらず、レギュレーター蛋白質は、全体として相同な構造を持っている。すなわち、情報を検知するセンサー部と、最後に発現してくる蛋白質は異なるが、中間の部分については共通なシステムなのである。

最近全構造解析が終了した大腸菌ゲノムの中から構造の類似した一群のレギュレーター蛋白質を抜き出すと、実に15種類ものレギュレーター蛋白質が類似した1次構造をとっていることがわかる⁷⁾。これらの蛋白質は、それぞれが異なる環境情報に対処するように応答

レギュレーター分子として設計されている。その中の一つ、浸透圧制御にかかわるOmpR蛋白質は、最も早くから2成分系の研究に使われてきた。その名をとって、これらのファミリー蛋白質をOmpRファミリーと呼ぶ。したがって、OmpRの構造解析は、単にこの蛋白質の機能を研究するだけでなく、原核生物が担っている情報伝達システムと環境適合システムの一般的原理を解明するという意味合いを持っている。

4. OmpR 蛋白質の構造解析

OmpRは239残基からなる蛋白質で、N末側の半分に磷酸化ドメインをC末側の半分にDNA結合ドメインを持つ⁸⁾。2つのドメインは、約10残基のリンカーでつながっている。私達は、このOmpRのDNA結合ドメイン(OmpR-C)を結晶化し、構造解析を行なった⁴⁾。結晶の空間群はP3₂21、格子定数は $a=b=59.1\text{ \AA}$ 、 $c=58.4\text{ \AA}$ であり、結晶学的に独立な単位(非対称単位)に1分子を含んでいる。Se-Met置換蛋白質を調製するために、OmpR-Cの遺伝子を組み込んだ発現ベクターを大腸菌メチオニン要求株(B834 (DE3) LysS)に形質転換し、これをSe-Metを含んだ最小培地で培養し、発現するSe-Met化OmpR-Cを精製、結晶化した。結晶化条件はネイティブの場合とほとんど同じであり、ほぼ同形の結晶を得た(格子定数は $a=b=59.6\text{ \AA}$ 、 $c=58.5\text{ \AA}$)。

回折強度は物質構造科学研究所の放射光研究施設において測定した。図2に波長をシフトしたときの蛍光X線を原子散乱因子の虚数項の理論値とともに載せた。回折データは、図2に示した3つの波長で、結晶を100 Kにまで急速冷却して収集した。結晶を冷却することで、

図2 蛍光X線測定によるMADデータ測定波長の選択。入射X線の波長を変化させながら、結晶からの蛍光X線を測定することで、Seの吸収端を正確に決定できる。吸収端の真上(エッジ)、それよりわずかに高エネルギー側(ピーク)、そこから十分に離れた点(リモート)の3点で回折データを収集した。

図3 OmpR-C結晶の異常分散差パターン図。

(a) 波長間差パターン図、(b) パイフット差パターン図。V11からV33は、3つのSe原子の寄与によるものである。3つのSe原子の位置をこの図から求めることは容易である。Se-Metを利用したMAD法の利点の一つは、求められるべきSeの数、占有率（一般には100%としてよい）が、はじめからはっきりとわかっていることである。このような“確かさ”が、これまでの重原子同形置換法ではなかった。また、Se原子は、原理的に、特殊位置に来ることはなく、見えるSeのすべてが位相計算にとって有効である。さらに、Seは分子組み立ての際のマーカーとして役に立つことも多くの研究者によって指摘されている。OmpRの結晶はそう良質ではなく、このパターン図は、私達がこれまでに扱ったMAD法のパターン図の中では、あまり質の良いものではない。

X線照射による損傷を大幅に低減することができ、2.2 Å分解能の強度データを1個の結晶から収集することができた。一般に異常分散効果によるシグナルは、同形置換によるシグナルと比べて1桁小さくなる。微弱な異常分散効果を検出するために、すべての回折データ収集の条件ができるだけ一定になるように細心の注意を払う必要がある。

この結晶は、非対称単位中に5個のセレン原子を持っている。その位置を決定するために差パターン図を計算した（図3）。図から明らかなように5個のSe原子の内の3個までの座標は、パターン図から、容易に求めることができた。残りの2個については、この3個の原子を使って決めた位相をもとにパイフット差フーリエ図を計算することによって得ることができたが、パラメータの精密化が困難であったので、以後の位相

図4 OmpRのDNA結合ドメインの構造。

計算には含まなかった。構造解析後にこれらの原子座標も正しかったことが判明した。パターン関数に現れなかったSeは分子表面に露出していて、温度因子が比較的高いものである。計算された電子密度図を使って118残基のうち101残基を含んだタンパク質モデルを構築し、ネイティブ結晶の回折データを用いて座標の精密化を行なった。

OmpRのDNA結合ドメインは、N末端側の4本鎖βシートと、それにづく3本ヘリックスバンドル、C末端のβヘキサピンから構成される構造をとっている。分子中の3本ヘリックスバンドルには、DNA結合蛋白質によく見られるヘリックス-ターン-ヘリックス（HTH）モチーフが存在しているが、これまでに知られているHTHモチーフと異なり、ターン部分に11残基からなる長いループを持っている（図4）。この部位は、変異体を用いた研究から、RNAポリメラーゼと相互作用する部位と考えられている。この解析により、OmpRファミリー蛋白質は、共通の疎水性コアを持ち、類似した立体構造とDNA結合様式を持ちながら、HTHモチーフが変化した柔軟性のあるループ部分でRNAポリメラーゼに対して多様な結合をしていると考えられるに至った。この多様性は、RNAポリメラーゼとプロモーター相互作用の多様性と密接に関係していると推定される。

5. MAD法の将来

MAD法が蛋白質の構造解析法として誕生するためには、①放射光、②遺伝子工学の発展が不可欠であった。続いて③極低温実験法、④計算法の発展により、同方法は、さらに強力な蛋白質構造解析法となって来て

いる。極低温実験法の発展により、1つの結晶ですべてのデータを集めることができるというMAD法本来のメリットを引き出すことができるようになったし、SHARP⁹⁾のような最尤法を組み込んだ重原子精密化プログラムの開発により、セレンの微弱な異常分散シグナルから良質の電子密度図を計算することができるようになった。西播磨に建設中の第3世代の放射光施設であるSPring-8の桁違いに強い放射光を使うことにより、異常分散シグナルはさらに感度よく検出できるようになるだろう。MAD法がMIR法以上に汎用的に利用される日も遠くないと思う。

OmpRの構造解析は、近藤英昌(現北工研)、中川敦史(北大院理)、西平順(北大医)、西村善文(横浜市大総合理)、水野 猛(名大農)の諸氏との共同研究である。

文 献

- 1) Guss, J. M., Merritt, E. A., Phizackerley, R. P., Hedman, B., Murata, M., Hodgson, K.O. and Freeman, H.C. (1988) *Science* **241**, 806-811.
- 2) Yang, W., Hendrickson, W. A., Crouch, R. J. and Satow, Y. (1990) *Science* **249**, 1398-1405.
- 3) Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Nishihira, J. and Sakai, M. (1996) *Nature Struct. Biol.* **3**, 259-266
- 4) Kondo, H., Nakagawa, A., Nishihira, J., Nishimura, Y., Mizuno, T. and Tanaka, I. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 28-31.
- 5) Hosaka, H., Nakagawa, A., Tanaka, I., Harada, N., Sano, K., Kimura, M., Yao, M. and Wakatsuki, S. (1997) *Structure* **5**, 1199-1208.
- 6) Parkinson, J. S. and Kofoed, E. C. (1992) *Annu. Rev. Genet.* **26**, 71-112.
- 7) Mizuno, T. and Tanaka, I. (1997) *Mol. Microbiol.* **24**, 665-667.
- 8) Kato, M., Aiba, H., Tate, S., Nishimura, Y. and Mizuno, T. (1989) *FEBS Lett.* **249**, 168-172.
- 9) La Fortelle, E. de and Bricogne, G. (1997) *Methods in Enzymology* **276**, 472-494.