生命科学の飛躍のために一層深まるタンパク質結晶学の役割 ～X線結晶構造解析と構造生物化学

大阪市立大学複合先端研究機構 神谷信夫

Nobuo KAMIYA: Protein Crystallography for Progress in Life Science: X-ray Crystal Structure Analysis and Structural Biological Chemistry

ADP-Ribose pyrophosphatase reaction was traced by cryo-trapping protein crystallography at atomic resolutions around 1 Å. Several intermediate states were identified but dynamic structure changes in a climax of the hydration reaction were blurred by instabilities of the transition state. Crystal structures of photosystem II (PSII) were resolved at resolutions around 1.9 Å. Two structures of the oxygen-evolving complex (OEC) in a PSII homodimer were clearly different in an asymmetric unit under a threshold of radiation dose, 0.12 MGy, although the polypeptide frameworks of PSII, surrounding the OEC, were the same with each other. The reaction mechanism of ADPRase and the OEC structure alteration of PSII were discussed considering atomic parameter errors and reliabilities of their structures.

1. はじめに

タンパク質の結晶構造が1970年前後から報告され始めてすでに半世紀が経過している。¹⁾ この間に分子生物学からタンパク質工学が発展し、試料の調製量が増大して精製度が上がり、結晶化に成功するタンパク質の数が増えた。世界中の放射光施設に多くのタンパク質結晶構造解析用ビームラインが建設され、その高輝度特性により良質のデータが得られるようになり、回折強度測定に要する労力も著しく軽減された。また、コンピュータのハードウェアとソフトウェアの発達により解析ツールも整備されて、新しく結晶構造が報告されるタンパク質の数は指数関数的に増大した。その結果、プロテイン・データ・バンク (PDB) への登録数はすでに十万件を超えている。こうして蓄積されたタンパク質の膨大な構造情報は量子化学計算や分子動力学計算に利用されて、産業界では新薬の開発が盛んに行われている。まさにタンパク質の結晶構造解析は、現在の生命科学と構造生物化学の発展に重要な役割を担ってきたと言える。しかしここで改めて結晶学の立場からタンパク質結晶構造解析の現状を見直すと、PDBに登録された構造情報にはいささかの危うさも垣間見える。

2. タンパク質のX線結晶構造解析

結晶学会誌の読者には改めて記すまでもないが、無機物、有機物、生体高分子を問わず、一部の完全に近い半導体材料を除くあらゆる化合物のX線結晶構造解析は、結晶 (すべて同一・均一の単位格子が並進対称によって

積み上げられたものと定義されている) に入射したX線が指数 h, k, l の反射面で1回だけ反射すると仮定した運動学理論の下で、以下に示す3つの基本方程式に従って行われている。²⁾

$$|F(hkl)|^2 = I(hkl) \quad (1)$$

$$F(hkl) = \sum_{n=1}^N f_n e^{2\pi i(hx_n + ky_n + lz_n)} \quad (2)$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (3)$$

式 (1) は、逆空間 (または回折空間) の逆格子軸 a^*, b^*, c^* で規定される指数 h, k, l の反射に対する、結晶構造因子 $F(hkl)$ の振幅 $|F(hkl)|$ と回折強度 $I(hkl)$ を関係付けている。ただし両者の間のスケール因子などの補正はすでに終了しているとしている。式 (2) は、実空間の結晶軸 a, b, c で規定される座標 x_n, y_n, z_n にある原子 n から散乱された振幅 f_n のX線の波を、単位格子内の全原子 N 個にわたって足し合わせた結晶構造因子であり、実空間から逆空間へのフーリエ変換により導かれる。式 (3) の電子密度分布 $\rho(x, y, z)$ は、式 (2) の逆フーリエ変換にあたるが、結晶構造因子 $F(hkl)$ の位相は回折実験からは得られないため、別に求めた初期位相を構造精密化の過程で改良して用いられることになる。また式 (3) の V は単位格子の体積、求和は、フーリエ変換の原理に従って、指数 h, k, l それぞれの負の無限大から正の無限大までの範囲にわたる。

しかしながらこれはあくまで理論上の話であって、実

際にはさまざまな制約から回折強度が測定される逆空間の範囲は有限であり、式(3)から計算される電子密度分布には必ず級数打ち切りの効果が含まれる。無機物や有機物の結晶構造解析であれば、実験装置を工夫したり、極短い波長のX線を利用して測定範囲を広げ、級数打ち切りによる誤差を小さく抑えることも可能である。これに対してタンパク質の結晶では、単位格子の並進対称性が厳密ではないために、ウィルソン・プロット²⁾から見積もられる結晶の温度因子 B_{cryst} が大きく、有意の信頼度で回折強度を測定できる範囲、すなわち分解能は多くの場合2 Å程度に過ぎない。言い換えれば、タンパク質の結晶構造解析では逆空間の情報のほんの一部しか使われず、したがって無機物や有機物の結晶構造解析と比べれば、電子密度図から得られる構造情報の信頼性は低いと言わざるを得ない。また上記の級数打ち切りによる誤差は、電子密度分布の広い範囲にわたって負のリブルを生じさせるが、タンパク質の結晶構造解析では、原理的にはあり得ない、この負の電子密度に対する留意が不足している場合も見受けられる。これは炭素、窒素、酸素などの軽原子より結晶構造因子への寄与が大きい金属原子の周りで強く現れることがあり、金属タンパク質の反応中心の構造を2 Å程度の分解能で議論する際には特に注意が必要である。

タンパク質の分子量は、一部の例外を除き5万前後の平均値の周りに分布している。その結晶の単位格子には膨大な数の原子が含まれており、2 Å程度の分解能の範囲に含まれる回折点の数は、構造パラメータの数の2倍程度にすぎない。これは構造を精密化する際に通常のフルマトリックス最小2乗法を適用できないことを意味している。そこでタンパク質の結晶構造解析では、便法として、アミノ酸残基、結合している補因子や基質に対する既知の構造情報を観測関数に加えた制限付き最小2乗法がもっぱら用いられている。この精密化法はきわめて有効なものであるが、原理的に、原子パラメータの誤差を計算から求めることはできない。すなわちPDBに蓄積されたタンパク質の構造情報には誤差が付随しておらず、物理的な測定結果としては、信頼度を判定できない曖昧なものと言わざるを得ない。

この問題は、対象となる結晶の分解能を少なくとも1 Åを超えるまで改善してフルマトリックス最小2乗法を適用すれば解決できる。しかしながら、現状でこれに成功しているものは、分子量が1万前後より小さい特別な場合に限られる。一方、クリックシャンク³⁾は、タンパク質の原子座標に対する精度の目安として回折成分による精度の指標(Diffraction-Component Precision Index, DPI)を提案している。これは、PDBに登録された多くの構造情報の信頼度を判断するうえで有効であるが、DPIは運動学理論を前提として考察されており、タンパク質

の結晶構造につきもののディスオーダーや占有率が1ではない不均一な領域の構造は適用範囲から除外されていることに留意する必要がある。

3. 酵素反応過程のその場観察

ADPリボースピロリン酸加水分解酵素(ADPRase、電子付録の図S-1参照)は、基質のADPリボース(ADPR)をアデノシンーリン酸(AMP)とリボース-5'-リン酸(R5'P)に加水分解する。^{4,11)} 高度好熱菌に由来するADPRase^{8,10,11)}の分子量はモノマー当たり19 kDaで、ホモダイマーとして機能する。ヌクレオチド誘導体のピロリン酸部位を加水分解するNudixファミリーに属し、活性部位にはNudixモチーフGX₃EX₇REUXEEXGU(U、疎水性アミノ酸残基; X、任意のアミノ酸残基)を有する。ADPRaseの反応にはMg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺といった2価の金属イオンが必要とされ、Nudixモチーフに含まれる3つのグルタミン酸残基(Glu82, Glu85, Glu86)が配位して反応中心を形成する。ADPRaseの反応機構に関する研究は、X線結晶構造解析や変異体の機能解析によりすでに進められていた。^{4,9)} われわれは当初1.7 Å程度に留まっていた結晶の分解能を0.9~1.2 Åの範囲まで改善したうえで、Mn²⁺イオンを結晶にソーキングして反応を開始させ、異なる反応時間でクライオトラップ(100 K)した結晶の構造解析を行って、反応のその場観察を試みた。^{10,11)} その結果、ADPRaseでは、アポ酵素(E状態)にADPRが結合した二元複合体(ES状態)、これに1個目の2価金属イオン(M1)が結合した三元複合体(ESM状態、ADPRはピロリン酸部分のコンフォメーションを変化させてADPR*となっている)、さらに2個目の2価金属イオン(M2)が結合した四元複合体(ESMM状態、これを経てADPRの加水分解が進み生成物のAMPとR5'Pが出現する)の3つの反応中間体を経て加水分解反応が進行することが示された(電子付録の図S-2, S-3参照)。

本稿では誌面の都合から詳細な議論を省略するが、本研究のように1 Å程度の分解能で結晶構造解析を行えば、ディスオーダーにより複数の成分が混在する領域についても、少なくとも2成分系までの構造には一定の信頼性を期待してよいようである。図1は反応時間6分のESM状態の構造からM1の周りの構造と対応する青の電子密度図(黒はES状態のADPRに対する電子密度図)を重ねたもので、Mn²⁺イオンに典型的な8面体型の配位構造を明瞭に確認することができる。この構造解析では、M1の周りに制限構造を設定しておらず、Mn²⁺イオンと2個の水分子(W1とW2)は独立に精密化されている。そのためM1とそれを取り巻く6個の酸素原子の間の距離は1.9~2.5 Åの範囲でばらついており、結合距

* 図S-1, 2, 3は、J-Stageの電子付録(Supplementary)をご参照下さい。

図1 M1の錯体形成とADPRの構造変化.^{10,11)} (Binding of M1 and structural change of ADPR.) 配位結合距離はÅ単位.

離の標準偏差は0.2 Å程度で、分解能1.1 Åで決定された構造のDPIから計算された値(0.05 Å)と比較すればかなり大きい。しかしながら、制限構造の影響を受けていない生の電子密度図から歪みの少ない8面体型の配位構造を見てとれることは、この部分の構造の信頼性を保証していると考えられる。なお本研究では、構造精密化の過程で分解能を上昇させるごとにコンボジットオミットマップを計算し、その都度、電子密度図との一致を確認した。また、異なる反応時間の間で計算される同型差フーリエ図は参照していない。この同型差フーリエ図は、重原子多重同型置換法による初期位相の決定でよく用いられるが、さまざまな差フーリエ図の中で最も信頼性の低いものである。

一方図2は、3成分が混在した反応時間15分の構造からESMM状態のM2周りの構造を描いたものである。この場合は、図1と同程度の信頼度で電子密度分布が現れたのは、ADPR*のα位の酸素原子とGlu82 (ESM状態になるとコンフォメーションが変化して、側鎖が分子の内部から反応キャビティの側に現れる)のカルボキシル基の酸素原子、1個の水分子(W3)の酸素原子の3個のみ($\|F_{obs} - F_{calc}\|$ を係数とする差フーリエ図にピークが現れても電子密度が有意でないものは排除した)で、8面体型の配位構造を明確にイメージすることはできなかった。これはESMM状態が、加水分解反応の直前の状態に相当し、直ちにダイナミックな遷移状態を経て生成物に変化するためと考えられる。すなわちM2に配位した水分子(図2では仮想的なものとして大きなシアンの球で表した)が、Mn²⁺イオンの高いルイス酸性により脱プロトン化されて水酸化物イオンとなり、それがADPR*のα位のリン原子を求核攻撃してADPRを加水分解すると想定することができる。すでに書いたように、結晶構造解析は、まったく同一・均一な単位格子の構造を結晶の並進対称により平均化して調べるものである。そのためダイナミックな遷移状態にある化学種の構造情報を明

図2 M2と求核性水分子の活性化サイト.^{10,11)} (M2 binding site and activation site for nucleophilic water molecule.) シアンの球は求核性水分子のサイトを推定して描いた。配位結合および水素結合距離はÅ単位。ESM状態で現れるGlu82のディスオーダー構造(紙面手前と奥)には対応する電子密度図を重ねて示した。
編集部注：カラーの図は電子版を参照下さい。

らかにすることは本質的に不得意であると言わざるを得ない。

タンパク質の結晶構造解析では、酵素の反応過程を追跡して反応機構を明らかにすることができる。しかしながら、反応のクライマックスとなる遷移状態については、現状では計算化学に依存するところが大きい。この事情は産業界で進められている新薬の開発でも同様と思われるが、筆者としては、タンパク質の結晶構造解析から得られた構造情報をPDBに登録する際には、電子密度がない、あるいはその信頼度が低いところに置かれたままのモデルは除去する、またできるだけ妥当な誤差を明示するなど、構造情報の信頼性を確保する必要があると考えている。というのも、PDB構造は、酵素やシグナル受容体タンパク質の量子化学計算や分子動力学計算の初期構造として、そのまま利用される場合が多いためである。計算化学では一般的に、PDB構造に水素原子を追加して初期構造モデルを最適化する。しかしながら、例えば上記のADPRaseについて、6個の水分子を配位したMn²⁺アコイオンを制限構造として用いて得られた構造情報が登録されていたとすると、構造の信頼性が疑われる場合もあり得る。このような場合でもこれまでは、独自に構造を検討して計算の初期構造モデルを構築することは、おそらく行われていなかったであろう。そのようにも結晶構造解析の結果は、関連する研究者から疑う余地のないものと考えられてきたのである。

4. 光合成・光化学系Ⅱの結晶構造解析

光合成は、太陽光のエネルギーを利用して、地球上のほとんどすべての生物の栄養源となる炭水化物を合成している。その初発過程を担う光化学系Ⅱ(PSII)は、酸

図3 電子密度図とPSIIダイマーに含まれる2個のOECの平均構造^{16,18)} (Electron density maps and averaged structure of two OECs in the PSII dimer.) 青の電子密度図は 5σ 、緑のオミット差フーリエ図は 7σ のレベルで描かれている。Mn, Ca, オキソ酸素, 水の酸素原子はそれぞれ、紫、黄、赤、橙で示した。図中の数字はÅ単位の平均距離。編集部注：カラーの図は電子版を参照下さい。

素を発生させる過程で水から電子を引き抜き、後続の二酸化炭素を還元する酵素群に受けわたしている。PSIIは分子量が5万程度の疎水性コアサブユニット4個(D1, D2, CP43, CP47)と、分子量1万程度の疎水性小サブユニット12～13種類(*cyr b-559*や*PsbI*など)がチラコイド膜の中で会合し、さらにこの会合体に、膜表在性の親水性サブユニット3種類が結合した複雑な形態をもつ超分子複合体である(電子付録の図S-4参照)。この複合体の内部には多数のクロロフィルやヘム、カロテノイド、酸素発生錯合体(OEC)、脂質などの補因子と、基質となる水分子が内包されている。これらを含むPSIIモノマーの分子量は35万、結晶の非対称単位を構成するダイマーでは70万にも及ぶ。OECには4個のMn原子と1個のCa原子が含まれ、マイナス2の電荷をもつオキソ酸素で結ばれているが、OECの化学組成と構造は長い間未解明のまま残されていた。PSIIの酸素発生反応は、有名なKokサイクルモデルによって説明されてきた。PSIIが太陽光の光子を1個ずつ吸収すると、それに呼応してOECから電子が1個ずつ放出され、その酸化数がS1状態から順に、S2状態、S3状態へと上昇する。3個目の光子を吸収するとS4状態と呼ばれる遷移状態を経てS0状態となり(この過程で2個の水分子から4個の電子が引き抜かれた酸素分子が生じる)、4個目の光子を吸収してS1状態に戻る。

ここでPSIIの結晶構造解析の歴史を振り返ると、2001年から2004年の間にわれわれも含めて3つの研究グループから独立に分解能3.8～3.5 Åの結果が報告され¹²⁻¹⁴⁾ 2009年には2.9 Å分解能まで改善されたが¹⁵⁾ 注目されるOECの構造を明確にすることはできなかった。これはOECの構造を規定している金属-オキソ酸素間の結合距離が、Mn-オキソ酸素間で1.9 Å前後、Ca-オ

キソ酸素間で2.4 Å前後と予想されていたのに対して、2.9 Åまでの分解能ではこれらの結合距離に見合うものを特定できなかったためである(電子付録の図S-5参照)。一方、Kokサイクルモデルが提案された1970年以来、EXAFSやESR、赤外分光法などにより、OECの酸素発生反応について膨大な情報が蓄積されてきた。また計算化学的な研究も行われさまざまな反応機構のモデルが提案されたが、いずれもOECの構造情報を基礎としていないために定説となるには至らず、結晶構造解析により新たなブレイクスルーがもたらされることへの期待が高まっていた。われわれの研究グループ¹⁶⁻¹⁸⁾ から2011年に報告された1.9 Å分解能の結晶構造は、PSIIの酸素発生機構に関する研究をまったく新しいステージに導くものとして高い評価を受けた(図3参照)。その後の10年間に、これを基礎として、すでに得られていた情報のまとめが行われ、また新たな研究が展開されて、現在では酸素発生機構の全容解明まであと一歩というところまで来ているように思われる。

さてすでに述べたように、タンパク質の結晶構造解析では制限付き最小2乗法がもっぱら用いられるが、PSIIのOECのように、文字どおり初めて構造が明らかにされた補因子については、どのような制限構造を用いればよいのだろうか？

ここでわれわれが採用した戦略は、(1)まずOECの領域を除くPSIIの結晶構造を精密化し、(2)その結果の電子密度図から金属原子を同定、(3)数サイクルの精密化作業の後のオミット差フーリエ図からオキソ酸素と、金属原子に直接配位した水分子を同定してOECの制限構造を構築し、(4)さらに数サイクルの制限付き最小2乗法を適用して最終的な構造とするというものであった。(2)と(3)で得られた電子密度図とオミット差フーリエ図は、それぞれ図3に示した最終的なものとよく一致していた。なお構造精密化の最終段階では、非対称単位を

* 図S-4, 5は、J-Stageの電子付録(Supplementary)をご参照下さい。

図4 低X線照射量で決定されたPSIIのOECの構造.¹⁹⁾ (Structures of the oxygen-evolving complex in photosystem II determined at low X-ray doses.) (a) 0.03 MGyのOEC構造と1 σ レベルの電子密度のステレオ図, (b) 0.03 MGy(ハイライト)と0.12 MGy(フェード)の構造における1個目のモノマーのOECの重ね合わせ, (c) 2個目のモノマーのOECの重ね合わせ.

構成するホモダイマーの2個のOECが高い相同性を示すと仮定して、2つの制限構造をさらに平均して用いた。これは、最終的に計算されたDPI値が0.11 Åで、これから結合距離の誤差を求めると0.16 Åとやや長めと思われ、2個のOEC構造を平均すれば結合距離の標準偏差を小さく抑えることができると考えたためであった。しかしながらこの平均化した制限構造を用いる戦略は、後述するように、回折強度データを収集する際のX線照射量を軽減させる研究¹⁹⁾を進めた結果、ホモダイマーでありながら2つのモノマーのOECの構造が同一ではないことがわかり、これらを同一と仮定した点において不適当であったことが判明した。

上記の研究で1.9 Å分解能の回折強度データを測定するために用いた結晶はただ1個であり、結晶の長軸1.2 mmの方向に結晶をスライドさせながら測定してもX線照射量は0.43 MGyに留まった。X線照射量を軽減する研究は、0.43 MGyではOECの12%についてMn原子が2価まで還元されているという指摘に対応するために計画された。結晶化とその後の脱水処理の条件を再検討して同型性の高い多数の結晶を準備できるようにしたうえで、0.03 MGyと0.12 MGyのX線照射量で回折強度を測定し、それぞれ1.87 Å分解能と1.85 Å分解能の構造解析を進めた。¹⁹⁾ 図4aは、0.03 MGyのOEC構造に1 σ レ

図5 0.03 MGyの構造における2つのOECの重ね合わせ。¹⁹⁾ (Superposition of two OECs in the 0.03 MGy structure.) 2個のOECをハイライトとフェードで区別した。

ベルの電子密度を重ねたステレオ図である。先の1.9 Å分解能の場合と比べると、分解能はほとんど改善されていないが、X線照射に伴う電子密度図の劣化が少なく、特にOECのオキソ酸素に対応する電子密度分布がよりはっきりと現れている。

この研究のトピックスは、図4bとcに見られるように、2個のモノマーのOEC構造が0.03 MGyと0.12 MGyの間ではほとんど区別できないほど似ているのに対して、0.03 MGy、0.12 MGyのいずれにおいても、それぞれの2つのOEC構造には違いが見られることであった(図5参照)。これからは以下の2つの重要な論点が浮かび上がる。まず第1に、X線損傷に伴うOEC構造の変化には0.12 MGy前後にしきい値がある。すなわち、X線照射量をこれより小さく抑えれば、1.9 Å程度の分解能の構造情報にX線損傷の効果はほとんど見られないと考えられ、PSIIのその後の結晶構造解析に明確な指針を提供することとなった。また第2に、DPIに基づく結合距離の誤差(0.03 MGyで0.17 Å, 0.12 MGyで0.16 Å)の見積もりはOECの構造については過大評価の可能性があり、別に見積もりは誤差の上限と考えるべきであり、別に誤差の下限を見積もることができれば、より確かな誤差の値が得られるかもしれない。

そこでわれわれはPSIIモノマーのほぼ中心にあり、OECばかりでなく、OECが水から引き抜いた電子を運ぶ電子伝達系(反応中心のクロロフィルダイマーとそれに隣接するクロロフィル、フェオフィチン、プラストキノンからなる)を安定に支えているD1、D2のコアサブユニット(電子付録の図S-4参照)に注目した。これら2つのサブユニットはPSIIの中で最も安定なものと考えられることができる。図4と図5に示したOEC構造の重ね合わせは、D1とD2のC α 炭素を最小2乗法で重ね合わせた

際の座標変換によっており、その標準偏差は、0.03 MGyと0.12 MGyの構造で同じ位置にあるモノマー間（図4bとc参照）では0.04 Å程度であった。これをOECの結合距離誤差の下限值として、上記のDPIに基づく上限値との間で中間値（0.1 Å）を求めて結合距離の誤差とすることとした。

図5は、同様にして0.03 MGyの2つのOECを重ね合わせたものであるが、5個の金属原子にはほとんど動きが見られないのに対して、Ca-O1、Mn3-O3、O4-W6の距離には0.3 Å程度の違いがある。上記のOECに対する結合距離誤差の見積もり0.1 Åを正規分布の標準偏差とすれば、これらの違いはいずれも3 σ のレベルで99.7%の信頼度があることとなり、2つのOECの構造が確かに異なっていると判断することができる。さて2つのOECは、結晶の非対称単位を構成している2個のモノマーの分子内部にあって表面から遠く隔たっている。したがって2個のモノマーのパッキング環境の違いはOECにはほとんど影響しないはずであるが、それにもかかわらずオキソ酸素の位置が変化していることは、OEC構造の本質的な柔軟性を反映していると考えられる。またこの結果を逆に見れば、PSIIの酸素発生機構に現れる反応中間体（S0～S3状態まで、遷移状態にあたるS4状態を除く）でOECの金属原子はほとんど動かず、またオキソ酸素の構造変化も0.3 Å程度と小さなもので、1 Åを超えるような大きな変化は起きにくいと考えられるかもしれない。OECに起こるのはMn原子の価数変化であり、例えば5配位から6配位への配位構造の切り換えはあり得るものの、ADPRaseのGlu82に見られたようなアミノ酸側鎖の大きなコンフォメーション変化は期待しにくいためである。なおわれわれはこの研究に引き続き、0.12 MGy以下の低いX線照射量でpHに依存したOECの構造変化を追跡し、2つのOECが異なる挙動を示すことを確認している。また最近、Mn原子の異常分散効果を利用してOECの4個のMn原子の価数を決定したところ、2つのOECでS状態が異なっていることも明らかにすることができた。

5. おわりに

本稿では、はじめに、タンパク質の結晶構造解析がこれまでの生命科学と構造生物化学の発展に大きく寄与してきたことを述べた。その輝かしい成果は、すでに十万件を超えているPDBへの構造情報の蓄積として記録されている。しかしながら1970年前後から15～20年間の黎明期について考えると、タンパク質の結晶構造解析の現在の隆盛を簡単には予想できなかったように思われる。黎明期においては、タンパク質試料の調製と結晶化には多大な労力を要した。幸運にも結晶化に成功しても、それに続く回折強度の測定や初期位相の決定、結晶構造の精密化のそれぞれの過程でも、結晶化と同等の

高い壁を越えなければならなかった。1990年前後から始まった放射光科学の進展を含むさまざまな技術開発により、その後の状況は格段に改善されて現在に至っている。この間上記のような多くの困難をそれぞれ克服してタンパク質の結晶構造解析を発展させてきた原動力とは、そもそも、いったい何だったのだろうか？

この問題に対する回答は人それぞれで異なるであろうが、筆者としては、単位格子の並進対称性によって成り立っている結晶を対象とした構造解析であれば、信頼性の高い構造情報が得られる、という20世紀初頭から積み上げられたX線結晶学に対する信頼感が、これまでの歴史の流れを作り出してきたのではないかと考えている。タンパク質の構造情報は、現在ではNMR法からも得られ、すでにPDBに一定の貢献をしている。NMR法は溶液試料を対象としており結晶化を必要としない点では有利である。しかしながら、対応可能な分子量に2万程度以下というかなり強い制限があり、誤差の大きいNOEの距離情報に基づくため構造の信頼性の点では結晶構造解析に及ばない。また最近では電子顕微鏡による単粒子平均法の進展が著しい。これも結晶化を必要とせず、分子量が100万を超えるような超巨大集合体の構造解析に威力を発揮するものと期待されてされている。ただし、回転平均に基づいて得られた構造情報の精度がどの程度になるか、それを見極めるためには今しばらくの時間を要する。本稿ですでに述べたPSIIは、モノマー当たりの分子量は35万で19～20種類の異なるサブユニットが会合した複合体であり、結晶の分解能を当初の3.7 Åから1.9 Åまで改善するために多大な労力を必要とした。しかしいったん1.9 Å分解能の結晶構造解析に成功すれば、その原子座標の誤差はDPIで0.1 Åの程度で、信頼性の高い構造情報を提供することができる。今後しばらくすると、PSIIに対しても電子顕微鏡の単粒子平均法から得られた結果が報告されるかもしれないが、その構造の信頼度がいかにほどになるか、興味をもたれるところである。

最後に、結晶構造解析と電子顕微鏡による単粒子平均法の間で、平均される分子の数について考えてみる。平均直径が100 Åのタンパク質が空間群P1で結晶化したとすると、結晶の有効体積(100 μm)³に含まれる分子の数は10¹²個に及ぶ。一方、電子顕微鏡による単粒子平均法で平均される分子の数を100万(10⁶)個とすると、結晶構造解析で平均される分子の数は電子顕微鏡法の実に100万倍となる。10¹²個とか100万(10⁶)個のうちには完全には同一・均一でないものが含まれているはずであるが、その数がいかにほどになるのかは不明である。しかしながら、いずれにしろこのような大数の領域でも、平均される分子数が100万倍も違うということであれば、信頼性の点で結晶構造解析のほうが有利であろう。

最後に筆者は、生命科学に占めるタンパク質の結晶構

造解析の地位は、今後もしばらくはゆるぎないであろうと予想している。タンパク質の結晶構造解析を基本的な手法として今まさに研究を進めている、あるいはこれから研究を始めようとしている読者の方々には、タンパク質の結晶構造解析が、現存するほかの方法と比べて、より信頼性の高い構造情報を提供するものであることをまず念頭においていただきたい。その上で、これまでと同様に分解能の高い良質の結晶を調製する努力を惜しまず、生命科学と構造生物化学のさらなる飛躍に貢献されることを期待している。

文 献

- 1) B. Rupp: "Biomolecular Crystallography", Garland Science, New York (2010).
- 2) 桜井敏雄: "X線結晶解析", 裳華房, 東京 (1996).
- 3) D. W. J. Cruickshank: *Acta Crystallogr. D* **55**, 583 (1999).
- 4) S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, M. J. Bessman and L. M. Amzel: *Nat. Struct. Biol.* **8**, 467 (2001).
- 5) S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, Y. Ohnishi, Y. Ichikawa, J. B. Maurice and L. M. Amzel: *Biochemistry* **41**, 9279 (2002).
- 6) L. Kang, S. B. Gabelli, E. C. Cunningham, S. F. O'Handley and L. M. Amzel: *Structure* **11**, 1015 (2003).
- 7) M. Zha, Q. Guo, Y. Zhang, B. Yu, Y. Ou, C. Zhong and J. Ding: *J. Mol. Biol.* **379**, 568 (2008).
- 8) T. Wakamatsu, N. Nakagawa, S. Kuramitsu and R. Masui: *J. Bacteriology* **190**, 1108 (2008).
- 9) A. S. Mildvan, Z. Xia, H. F. Azurmendi, V. Saraswat, P. M. Legler, M. A. Massiah, S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, L. W. Kang and L. M. Amzel: *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 129 (2005).
- 10) Y. Furuike, I. Miyahara, Y. Akita and N. Kamiya: *Biochemistry* **55**, 1801 (2016).
- 11) 古池美彦, 宮原郁子, 神谷信夫: 日本結晶学会誌 **58**, 186 (2016).
- 12) A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauß, W. Saenger and P. Orth: *Nature* **409**, 739 (2001).
- 13) N. Kamiya and J. -R. Shen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98 (2003).
- 14) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata: *Science* **303**, 1831 (2004).
- 15) A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni and W. Saenger: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 334 (2009).
- 16) Y. Umena, K. Kawakami, J. -R. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55 (2011).
- 17) 梅名泰史: 日本結晶学会誌 **54**, 247 (2012).
- 18) 神谷信夫, 沈 建仁: 日本結晶学会誌 **59**, 64 (2017).
- 19) A. Tanaka, Y. Fukushima and N. Kamiya: *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 1718 (2017).

プロフィール

神谷信夫 Nobuo KAMIYA
 大阪市立大学複合先端研究機構
 The OCU Advanced Research Institute for Natural
 Science and Technology (OCARINA), Osaka City
 University
 〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本3-3-138
 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan
 e-mail: nkamiya@ocarina.osaka-cu.ac.jp
 最終学歴: 名古屋大学大学院理学研究科博士課程, 博士(理学)
 専門分野: 構造生物化学
 現在の研究テーマ: 光合成・光化学系IIなどの
 タンパク質・酵素の構造生物化学