蛋白質, 核酸, ウィルスの構造解析

飯 高 洋 一*

Yoichi IITAKA: Structural Studies on Proteins, Nucleic Acids and Viruses.

Recent progress in the crystallographic studies on the title compounds has been reviewed showing how to approach the problems about the structures and functions of the biological molecules and to develop the frontier research in biological science. [J. Cryst. Soc. Japan 23, 169 (1981)].

蛋白質と核酸とは生物を形作り、生命を宿らせるのに必須の化合物であり、それぞれ数多くの特徴ある構造と生物学的機能をもった分子から成り立っている。近年、マイクロ構造の解明によってそれらの物質が受持つ機能の分子論的説明が可能になりつつあり、無生物界における物性論の抬頭の時代を思わせるものがある。このような方向の先鞭をつけたのは1953年(日本では結晶学会の創生期にあたる)に発表されたCrickとWatsonのDNAの研究^{1,2)}である。この研究ではCochran, Crick, Vandによるらせん構造体の回折理論³⁾の展開とFranklin, Wilkins, Langridgeらによる地味なX線回折の実験⁴⁻⁶⁾を忘れることができない。この解析においてはすべてのヌクレオチド残基が同等の構造をもってらせん状に配列していると仮定されているので、4種類の塩基が区別されないで平均構造が求められている。近年、化学的にDNAの塩基配列が容易にきめられるようになってきたが、それに伴い遺伝子DNA上の特定な箇所〔たとえばRNA合成酵素が結合するpromoter site,あるいは遺伝子工学で使われる制限酵素が認識する $d(T_pT_pA_pA_p)$ などの特殊な塩基配列の箇所〕の立体構造が他と異なるのではないかという疑問が持たれるに至った。特にプリンとピリミジン塩基とが交互に並んだ合成核酸では溶液中において塩濃度の違いにより異なったコンホメーションをとるものが知られている^{7,8)}が、核酸の合成技術が進んで任意の塩基配列のDNAの断片を作ることが可能になってきたので次のような化合物の単結晶が作られ、詳細な分子構造が解析されるに至った。

$d(A_pT_pA_pT)^{**9)}$ は2残基ずつ別の分子と相補対を作っていて残念ながら目的に沿う有用な結果が得られなかった。1979年には $d(C_pG_pC_pG_pC_pG)^{***10)}$ なる6量体、1980年になって $d(C_pG_pC_pG)^{11)}$ なる4量体の結晶が解析されたが、驚くべきことにこれらは左巻きの2重らせん構造をとっていることが分かった。しかもそれらは単にDNAの構造を反対巻きにしたものではなく、糖とリン酸のジエステル鎖のコンホメーションが異なり(この鎖がジグザグに走っているのでZ型DNA構造と呼ばれる。第1図)、塩基対の重なりも大きく異なるものである。ところで、ごく最近 $\cdots C_pG_p \cdots$ なる配列の間に $A_pA_pT_pT_p$ をはさんだ $d(C_pG_pC_pG_pA_pA_pT_pT_pC_pG_pC_pG)^{12)}$ なる12量体の結晶の解析が行なわれた¹²⁾が、このものはWatson,

* 東京大学 薬学部

** 5'-P-デオキシアデニル-(3'-5')-デオキシチミジリル-(3'-5')-デオキシアデニル-(3'-5')-デオキシチミジン

*** デオキシチミジリル-(3'-5')-デオキシグアニル-(3'-5')-デオキシチミジリル $\cdots$ デオキシグアニン

Crick の B 型 DNA に似た構造で右巻きであることが判明した. 従って上記のような劇的な構造変化を起こす原因は結晶化の条件もからみ簡単には論じられないが, DNA の構造は従来想像されていたよりも変化しやすいものようである. 解析のためこれらの結晶にはいろいろな重原子試薬が導入されたが, 中にはシス-ジクロロジアミノ白金(II)錯体(制ガン剤として知られている)もあり, この錯体が深い溝の側からグアニンの N_7 と O_6 とに結合している様子が明らかにされている¹²⁾.

1968年に転移 RNA の結晶化が成功¹³⁾して以来, Rich ら¹⁴⁾および Klug ら¹⁵⁾によって酵母の転移 RNA (正確にはフェニルアラニンをペプチド鎖にとりこませるのに使われる $tRNA^{Phe}$) の単結晶の解析が行なわれたことはよく知られている. 今年になって大腸菌のイニシエーター $tRNA$ (蛋白合成開始に使われる $tRNA^{Met}$) の解析¹⁶⁾が発表された. $3.5\text{\AA}$ 分解能でかなり詳細な点まで明瞭に示されているが, 前者との相違はあまりなく, それらの機能の違いがどこから生じるのかは未だ明確にされていない.

蛋白質結晶の解析は1960年を契機として急速に進展した. 多重重原子同型置換法によって解析されたミオグロビン(Mb), ヘモグロビン(Hb)分子の異様な構造に目を見張ったのは既に20年も前の話である¹⁷⁻¹⁹⁾が, Hb が酸素分子を脱着する際に示す協同現象の機構を詳細に論ずるにはその後10年あまりの歳月を要した.

Hb 分子を構成する4つのサブユニット(α_1 , α_2 , β_1 , β_2 ; α_2 , β_2 は α_1 , β_1 と結晶学的2回軸で結ばれている)はそれぞれ1個の酸素分子(O_2)を取りこみ, ヘム鉄[Fe(II)]の第6配位座に収めるが, O_2 と結合したサブユニットの数が多くなるに従い, 未結合のサブユニットの O_2 への親和力が急激に強まる. その様子は第2図に示す通りである. 正確に言うと, 全く O_2 と結合していないデオキシHbの酸素親和力は何らかの原因で落とされているが, O_2 との結合量が増すに従い本来の姿に復すると考えた方が妥当である. 第1段の反応, $Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$ の結合定数, $A_1 = [HbO_2]/[Hb][O_2]$ が $5 \sim 60 \text{ atm}^{-1}$ であるのに対し最終段, $Hb \cdot 3O_2 + O_2 \rightleftharpoons Hb \cdot 4O_2$ では $A_4 = [Hb \cdot 4O_2]/[Hb \cdot 3O_2][O_2] \div 3000 \sim 6000 \text{ atm}^{-1}$ に達

第1図 $d(C_pG_pC_pG_pC_pG)$ の Z-DNA (左) と Watson-Crick 型 B-DNA (右) の構造の比較¹⁰⁾. 糖-リン酸エステル結合で作られるバックボーンをリン酸基を結ぶ太線で示す. Z型における左巻き, バックボーンのジグザグした走り, 塩基部分の一層の露出に注意.

第2図 ミオグロビン(Mb)およびヘモグロビン(Hb)の酸素吸着の平衡曲線. a は筋肉, b は肺における平均酸素圧. Hb については pH によって平衡がどのようにずれるかを示す(曲線上の数字は pH の値)

する。ミオグロビンでは $A \approx 1500 \text{ atm}^{-1}$ 程度である。これはサブユニット間の相互作用による協同現象のあらわれであるが、図のように O_2 を必要とする（酸素分圧の低い）臓器において酸素親和力が急激に低下することは、そこでの O_2 放出が楽になることであり、生理学的要求になっている。

さらに、水素イオン濃度が大きい（pH が低い）ほどその差は顕著であり、炭酸が多い筋肉中などでは O_2 を放出し易い。これは H^+ が O_2 に対し競合的に作用し、デオキシ Hb を安定化する方向へ平衡を片寄らせるため、赤血球中に多量に存在する 2,3-diphosphoglycerate などと同様に生理的に重要なエフェクターとして作用しているのである。このような興味ある Hb 分子の性質は Perutz らによってウマのメト Hb ($2.8 \text{ \AA}$ 分解能)²⁰⁾、ヒトおよびウマのデオキシ Hb ($3.5 \text{ \AA}$, $2.8 \text{ \AA}$)²¹⁻²³⁾、ヒトの一酸化炭素 Hb ($2.8 \text{ \AA}$)²⁴⁾ のほか、いくつかの異常 Hb²⁵⁾ や BME (bis-maleimido methylester) Hb²⁶⁾ の解析が行なわれ、それらの結果を総合して具体的かつ詳細に論じられている^{26,27)}。簡単に説明すると次の通りである。デオキシ型 Hb では三次構造すなわち、

α, β 各サブユニットの内部の構造がデオキシ型 (α^D, β^D) であるだけでなく四次構造、すなわちサブユニットが 4 個四面体的に結合して生じた四量体分子の構造も共にデオキシ型である〔これを $(\alpha_1^D \alpha_2^D \beta_1^D \beta_2^D)^D$ と書く〕。 α^D でも β^D でも $\text{Fe}(\text{II})$ は 5 配位で高スピン状態にあり、ヘムグループは僅かにピラミッド型に変形し、その頂点の Fe はヘムの平均平面から約 $0.5 \text{ \AA}$ ばかり第 5 配位座の F8 のイミダゾール窒素原子の方へとび出している。第 6 配位座にはバリンの側鎖が接近し、 O_2 の結合が妨げられている。前述のように、 $(\alpha_1^D \alpha_2^D \beta_1^D \beta_2^D)^D$ に 1 分子の O_2 がつく結合定数は $(\alpha_1^O \alpha_2^O \beta_1^O \beta_2^O)^O$ などにつく場合に比べ 1/100 のオーダーである。いま、かりに α_1^D の第 6 配位座に O_2 が結合して α_1^O になった場合を考えると、そのサブユニットの $\text{Fe}(\text{II})$ は 6 配位低スピン状態となり、ヘムはほぼ平面状となって第 5 配位座のイミダゾール環 (F-らせん領域のヒスチジン-F8 残基の側鎖) がヘムの方へ引張られると同時に F-らせん領域がヘムの面に平行に約 $1 \text{ \AA}$ 横へずれる。この動きは FG 領域におよび、隣接サブユニットに密接しているこの領域をベローのようにふくらませることになるが、その直接的な効果ならびに次に述べる塩結合が切れたことによる効果によってオキシ型四次構造への転移が進むことになる。デオキシ型三次構造では C 末端の一つ手前のチロシン残基 (HC2) の OH 基は水素結合で同一サブユニットの FG 領域に固定されており、同時に C 末端の残基は隣接サブユニットと塩結合を作ってデオキシ型四次構造を安定化している。ヘムに O_2 が結合して FG 領域が動くときそれらの水素結合と塩結合が共に切れ、デオキシ型四次構造が不安定になる。オキシ型四次構造は O_2 のついたオキシ型三次構造のサブユニットが作る安定な四量体分子の構造であり、デオキシ Hb 分子 1 個に 1 ないし 2 個の O_2 が結合するとオキシ型四次構造への転移が進み、 O_2 が未だ結合していないサブユニットは早く O_2 と結

第3図 デオキシヘモグロビンの β サブユニット (O_2 が吸着されていないもの)。 $(\alpha_1^D \alpha_2^D \beta_1^D \beta_2^D)^D$ のうちの β_1^D または β_2^D に相当するもの。 α 炭素の位置に黒丸を置きそれらを黒の太線で結んで三次構造を示している。重要な側鎖が記入されている (説明本文)

合して一層安定なオキシ型になろうとするので O_2 との親和力が増すものと解されている。

Hb のように三次、四次の構造と、それらの構造変化が生理活性に必須の役割を演ずるものはいくらでも挙げることができる。たとえば、免疫グロブリン G (IgG) による免疫反応においては、ある抗原に対しそれを特異的に認識する抗体 IgG が結合するところからはじまり、結合によって IgG 分子の高次構造の変化が起こり、それによって各種補体分子との一連の結合や反応が引き起こされ、生成した活性な反応生成物が抗原を分解すると考えられている。その各段階における分子の相互認識機構は高次構造に基づいて理解される筈のものである。IgG 分子についてはこのような見地から数多くの X 線解析の仕事がある^{28,29)}。IgG 分子は多くのドメインから成り、各ドメインは大変固い構造をもっているがそれら相互の配置には多くの自由度がある。このため乱れた格子を作り易く、IgG そのものが作る結晶の構造は仮定なしには解析できない。しかし幸なことに、この分子が担っている機能のいくつかは部分構造体の結晶の解析で解明し得ている³⁰⁾。

酵素反応においても酵素と基質の双方において高次構造とその変化の研究が必須である。このことについては 1965 年にリゾチームの結晶の解析³¹⁾ が成功し、さらに差フーリエ法で基質アナログの結合状態が明らかにされた³²⁾ ことから新たな展開が見られた。酵素反応に関して従来から考えられていた酵素基質複合体 (ES complex) なるものの実体が、多少の仮定はあるにしても明確になり、反応中間体としてエネルギー的に安定な複合体を形成することによって活性化エネルギーが著しく低下し、かつ、基質特異性が生じることのほか、次の諸点が説明されたり明らかとなった。すなわち、反応部位を中心として顕著で重要なコンホメーションの変化を生じており (この変化は酵素、基質双方に見られる。酵素側の変化は induced fit と呼ばれる。基質側の変化は、リゾチームにおいては D 環の歪が注目されている。これは反応中間体としてのカルボニウムイオンの生成を助長する歪である)、また反応の場が設定されている (リゾチームの ES 複合体においては反応部位を中心に疎水領域と親水領域とが適当に形成され、極めて制限された状態でしか溶媒が介入し得ない。また、各種の解離基や活性な基が巧みに配置されていて、ある基の間には水素結合が形成されたり、真空中におけるが如き*強い静電的相互作用を生じたりする)。

生体高分子の結晶構造の解析は現在までに既に百数十件に達し、年々約 20 件の割合で増加している³³⁾。そのうちの多くのものは酵素蛋白である。生体内の反応における酵素の役割とその多種多様さを考えてみれば当然のことと言えるが、構造と機能の関係は限りない問題を秘めているのである。これらの問題は立体的な構造に立脚して論じられるべきことはいうまでもないが、静的構造と共に動的变化にも着目する必要がある。酵素反応における酵素と基質の変形の問題についてはよく知られているが、前述の一見 O_2 が結合し得ないほど空間的に余裕のないデオキシ型サブユニットに如何にして O_2 が入り得るかといった問題はごく短時間しか存在しない構造の存在を示唆しており、構造解析の結果もそのような問題に拡張解釈できるようにならねばならないであろう。酵素でもこの種の問題はいくらでもある。たとえば、解糖系に属し、ヘキソースにリン酸を付加する酵素、ヘキソキナーゼにおいては基質であるグルコースが高濃度に存在すると著しい変形が引き起こされることが分かっているが、その複合体の解析を行なってもなおグルコースの 6 位の OH と ATP の γ 位のリン酸基との間の距離は構造モデル上で約 $6 \text{ \AA}$ 離れており^{34,35)}、この上さらにどのような変形によって両者間の反応が引き起こされるのか未だ解明されていない。

* 溶液、特に水溶液に浸ると静電的相互作用は著しく弱められる。

蛋白質の構造の動的な変化を調べるには H-D 交換速度の解析³⁸⁻³⁹⁾ や蛍光の偏光解消⁴⁰⁾ あるいは消光現象⁴¹⁾ を使って行なわれてきた。最近 ^1H 核や ^{13}C 核を使った NMR の緩和時間の測定から、運動の振動数や相対的振幅を求めようとする試みが提出されている^{42,43)}。一方、X線解析では各原子の熱振動パラメーターが分子内部あるいは分子全体としての運動のモードや振幅を反映している筈で、低分子の場合には異方性熱振動パラメーターを精密に求めて振動モードの解析も行なわれている。蛋白結晶については異方性熱振動の取扱いまでした解析例は極めて少ないが、等方性パラメーターだけでも蛋白分子の運動の特徴が大まかにつかめることが示されている。ニワトリの卵白とヒトのリゾチームの解析結果* を使って対応する主鎖原子の平均2乗変位 $\langle V^2 \rangle$ を比較したところ⁴⁴⁾ 強い相関があることが示され、この見掛け上の振動がリゾチーム分子固有の性質を反映していることが示唆されている。分子振動のモードに関しては、(1)剛体モード、(2)呼吸モード(中心からの距離と共に変位が増す)、(3)蝶番モード(活性部位の裂け目に沿って走る2つの葉状領域が活性部位を蝶番の軸にして動く)などが考えられているが、それらがどのように混じっているのかは異方性のパラメーターがないとはっきりしない。しかし局所的な振動の状態についてかなりはっきりみられていることは、一般に分子表面に位置する残基の振幅が大きく、しかもその残基が規則的構造(α や β)領域に含まれていないと特に大きくなり得る。 $\langle V^2 \rangle$ の値が $0.2\text{\AA}^2$ を越える主鎖領域を図示したのが第4図で、活性部位をはさむ2つの葉状領域の振幅が大きいのが目立っている。このほかに induced fit を起こす領域の振幅も大きく、酵素活性との関係が注目されている。しかしながらこのようにして求めた $\langle V^2 \rangle$ は振動による項 $\langle V^2 \rangle_v$ のほかにいろいろな箇所でも異なったコンホメーションをもつ分子が乱れて配置していることによる項 $\langle V^2 \rangle_c$ などを含んでおり、それぞれの項を分離して論じることが極めて難しい**。メトミオグロビンについて 220°K から 300°K まで温度を変えて $1.5\text{\AA}$ 分解能のデータを集めて解析した結果⁴⁵⁾ はヘムの周辺で

第4図 リゾチーム(ヒト)分子で主鎖の $\langle V^2 \rangle$ が $0.2\text{\AA}^2$ を越える領域を2重線で囲って示す⁴⁴⁾。基質の結合領域をはさんでその両側の葉状域の $\langle V^2 \rangle$ が大きいのが目立つ

第5図 $\langle V^2 \rangle_v$ および $\langle V^2 \rangle_c$ の温度依存性⁴⁵⁾

* 後者の方が1残基多いほか、51残基の入れ替わりがあるが、分子構造は互によく似ている。結晶構造は全く異なる。分解能はそれぞれ $2\text{\AA}$ と $1.5\text{\AA}$ 。

** Frauenfelder ら⁴⁵⁾ によると、第5図のように、 $\langle V^2 \rangle_c$ はそれぞれの原子である緩和温度、 T_r (図では平均値を示す) 以下になるとそれぞれのコンホメーションに凍りつくため一定となり、 $\langle V^2 \rangle_v$ もデバイ温度以下では温度によらずほぼ一定になると考えられる。理論的には $\langle V^2 \rangle_v$ は低温で零点振動に収斂するが、 $\langle V^2 \rangle_c$ はそれよりかなり大きな値に留まるであろう。

F-らせんの動きが大きいほかはかなり固い構造であること, 第6配位座に至るリガンドの通り道にあたる部分の動きが大きいことなどが示されている(第6図)。

ウィルスは単結晶として得られる生体高分子の中では最も複雑な構造をもつものの一つである。これはまた最も簡単な構造をもつ生きものとして(代謝系をもたず, それ自身では増殖しないことなどから無生物であるとの主張もあるが), それを構成する高分子の構造やそれらの間の相互作用を調べるのが重要であるが, それだけではなく, 環境の違いによる構造の動的変化, 特に各構成成分を混ぜたときに起こる再構成の過程を調べ, その機構を明らかにすることは大変興味深い。ここ2,3年来, 長年の研究が実を結び, 分子量数百万のウィルスの構造解析が次々に成功を収めているが, これは今までの例に洩れず解析方法の開拓と実験法の進歩によってもたらされたものといえる。結晶学的に非等価な同一のサブユニットを多数持つ場合の分子の対称性の利用と, 龐大な数の回折強度の精密な測定方法の開発とは特筆に値するものである。古くからウィルス結晶に対し, 分子置換法を進展させることで重原子を導入することなく解析することが試みられてきた⁴⁶⁻⁴⁹⁾が, 結局は重原子同型置換法が成功した。TMV (Tobacco Mosaic Virus) に関してはDNAのような非結晶学的らせん構造をもつ回折像の解析が行なわれたが, その重原子同型置換法は単結晶の場合とは数式の取扱いの上で少々異なっ

第6図 ミオグロビン分子の主鎖の $\langle V^2 \rangle$ を示す概念図。第3図と同じ書き方で三次構造を示す。斜線域は, 250°Kにおいて99%の確率で主鎖の原子が見出される領域⁴⁵⁾

第7図 (a), (b): TMVのコート蛋白質が作る円盤の結晶 (P22₁2₁). (c): なまのTMV分子(サブユニット16½個で1回転のらせん). (a), (b)の結晶を作るリングはサブユニット17個で1枚. それが同じ方向に2枚重なった円盤が構造単位であると考えられている. (a)図では円盤が2組2回軸で重なった4枚のリングが格子点と体心位置にある. この結晶はTMVからRNAを除いてコート蛋白だけにするとできる

ている⁵⁰⁾。また、いずれのウィルスにおいても蛋白サブユニットの配列は必ずしも結晶学的対称性を満たしていないので非対称単位にある多数の化学的に同一か、あるいは僅かしか異なるサブユニットの電子密度図の重ね合わせによるS/Nの向上が大きな効果を挙げている。

今までに高分解能の解析に成功したものには TMV のほかに TBSV⁵¹⁾ (Tomato Bushy Stunt Virus, 2.9Å 分解能), SBMV⁵²⁾ (Southern Bean Mosaic Virus, 2.8Å), STNV⁵³⁾ (Satellite Tobacco Necrosis Virus, 4Å) があり、目下進行中のものには Adenovirus Hexon⁵⁴⁾, pf 1⁵⁵⁾, Erysimum latent virus⁵⁶⁾, cowpea mosaic virus⁵⁷⁾ などがある。

TMV は古くから研究されている有名なウィルスである。RNA を持った生のウィルスは第7図のようにらせん状に並んだ蛋白サブユニット*と、同じくらせん状の RNA とが結合したものであるが、これは単結晶にはならず、配向ゲルとして得られる。らせん軸に垂直な方向の配向性はランダムである。これに重原子を導入するには1サブユニットに1個存在するシステイン残基に有機水銀化合物を使って共有結合で水銀を入れたほか、OsO₄, Pb²⁺, UO₂F₆ なども soaking 法で入れられ、これらを使って 4Å 分解能の電子密度図が計算された(第8

第8図 なまの TMV 配向ゲルの回折像の解析によって得られた 4Å の電子密度分布図⁵³⁾。

(a): らせん軸方向から見た図で RNA 鎖の走りを示す。蛋白の 1 サブユニットに結合するヌクレオチド 3 残基 (2 残基の塩基は省略) の骨格を太線で、半径 40Å の位置を破線で書いてある。R は蛋白の側鎖である。(b): らせん軸に垂直にウィルスの中心部分を示す。V は内壁を形成する縦の α -らせん領域、Pb は Pb²⁺ イオンの結合箇所。(c): らせん軸に垂直に見た TMV の断面図。(b) 図を説明する構造の模式図である。RS: right slewed, LS: left slewed helix, RR: right radial, LR: left radial helix の 4 本のらせんがより合わさって一つのサブユニットを作る。ここには二つのサブユニットが重なり、その間に RNA が紙面に垂直方向に走っているところを示している。B は塩基面、N は N 末端、C は C 末端の略

* らせんのピッチは約 23Å で 3 回転に 49 個のコート蛋白サブユニットを含む。その 1 個はアミノ酸残基 158 個からなる 1 本のポリペプチド鎖が折りたたまれたもので、分子量は約 17,500 である。ウィルスの全長は約 3000Å、半径の最大値は 90Å、中央に半径 20Å の穴が通っていて全体として中空の円筒状のウィルスである。

図)⁵⁸⁾。その結果はサブユニット内の4本の α -らせん領域が明らかにされ、ポリペプチド鎖の約70%の部分が図上で同定されている。RNAに関しては糖、リン酸、塩基の各部分が分離して認められ、B型DNAに似た構造で(ただし一重らせん)、一つのサブユニットあたり3ヌクレオチド残基が対応し、それらの塩基が面を α -らせん(LRらせん)を囲うように、らせん軸に平行に配置している様子が明らかにされている。

このようならせん構造体の解析では半径が大きなところでは分解能が落ちてははっきりしない。しかし、一方においてRNAを除いたコート蛋白だけを適当な条件で結晶化させると、17個のサブユニットがリング状に集まり、さらにそれが2枚上下を同じ向きにして重なった円盤を単位として結晶化することが知られていて^{59,60)} ($P 2_1 2_1$, $a=228.2$, $b=223.9$, $c=174.3\text{\AA}$, 第7図参照), その単結晶の高分解能の解析が成功している^{*61,62)} ので、両者の結果を比較検討することができる。コート蛋白の結晶解析では、一つのサブユニット内でのポリペプチド鎖に関し、それが円盤の外周からはじまり半径方向に走る四つのらせんを折返し形成し再び外周で終わる様子が明瞭に示されているが、RRとLRらせんの間の24残基は乱れていて見えない(第9図)。前述の生のTMVの解析ではこの部分は乱れておらず、RNAとの結合に与る領域(90, 92番のArgを含む)や、らせん軸方向に走る短かいらせん領域(これによって中空の部分の疎水性内壁が形成される)が作られている。

このような解析結果をみると、サブユニット蛋白がRNAと複合体を形成してウィルスとなるのに具合がよいように実に巧妙に作られていて、両者を混ぜるだけでひとりでにウィルス粒子が形成される(Fraenkel-Conratの再構成の実験⁶³⁾として知られている)ことも当然のように思えてくる。再構成の過程は結晶の成長に似て興味深い。現在考えられている機構⁶⁴⁾は、まず円盤状コート蛋白の中心部にヘアピン状RNA(TMVのRNAには核形成の

第9図 TMV コート蛋白が作る円盤の結晶の構造⁶²⁾。(a):円盤の軸の方向から見た図で、四つのサブユニットがリング状に配列しているのが分る。四つのらせんの並び、半径80Å付近の疎水性外壁(一部を黒くぬって示してある)を形成する β -シート領域、サブユニットを横に結合する疎水性(黒)および親水性(点のメッシュ)領域などが示されている。(b):(a)に直角の方向から見た図。RRとLRの間の乱れた構造の領域はなまのTMVではV-らせんなどが形成されている。サブユニットを縦の方向に結合する水素結合(点線で示す)は extended salt-bridge 領域を形成する。すなわち、Asn, Glu, Arg, Asp, Lys などの荷電した側鎖と水とで形成される水素結合の網の領域

* 多重重原子同型置換法により2.8Å分解能で解析されたが、非対称単位に34サブユニットも含まれているので、それらの電子密度図を重ね合わせ鮮明な像が得られた。

第10図 TMVの形態形成⁶⁴⁾。サブユニットが積重なると同時にRNAの5'末端を引込んで行く。従って伸長と共に外に出ている5'末端側の長さが短くなる。成長は7図(a)のディスクが積重なるのか、この図のようにサブユニットが順次結合して行くのか論争の種であったが、現在はこの図のように考えられている。

ための特別な領域があり、そこで折れ曲るらしい)が入り、成長核が形成され、その後は第10図のように成長する。無生物結晶の転位モデルによる成長の説明も試みられていることは注目に値する^{65,66)}。

TMVのほかに高分解能の解析が行なわれたTBSV, SBMVはいずれも粒状ウィルスで互に似た構造をもっている。TBSVの蛋白サブユニットは分子量約4

万、約377アミノ酸残基からなる1本のポリペプチド鎖で二つのドメインS, Pを形成しN末端の数十残基は乱れていてよく見えない。Sドメインは厚みが約30Åあり、ウィルスの外壁(shell)を形成する。Pは隣接サブユニットのPとダイマーを作り、外壁からとび出している。このウィルスの対称は正20面体で(正20面体と正12面体とはdualであるから、どちらを考えてもよい。第11図は正12面体と見た方が考え易い。以下そのように考える)、正5角形内の五つの領域それぞれに三つのサブユニット(A, B, C)が含まれているので($T=3$)、サブユニットの総数は $5 \times 3 \times 12 = 180$ 個である*。

TBSVでは立方晶系 $a=383.2\text{\AA}$ 、空間群I23の23の位置にウィルス分子が存在するので単位胞中2分子だが、一般点が $Z=24$ なので独立なサブユニット数は $(180 \times 2)/24=15$ となる。ウィルスの回折強度測定はいずれも写真法で、Arndt-Wonacottカメラを使い振動写真を撮影、フィルムスキャンナーで濃度をデジタル化して計算機による処理で積分強度を算出している。TBSVでは 0.5° の振動で50組とり、 ω 角の 25° を覆ったが75%の反射が一部露出の状態となっている。それらをWinker, Schuttのプログラムで処理し、第1表のような龐大な強度データを得ている。X線による損傷で25個の結晶が使われた。解析結果はSBMV

第11図 TBSVおよびSBMVウィルス分子⁶⁸⁾。

正12面体を形成する正5角形は五つの3角形から成立ち、一つの3角形には三つのサブユニットが含まれる。従って計180個のサブユニットでウィルス分子が形成されるが、その三つのサブユニットA, B, Cは擬3回軸($Q3$)でしか結ばれないので、それぞれ多少構造が異なる。AとBとはかなり似ているが、その様子を図の下方にA/B, Cで示してある。図の上方に示すように、表面から突出した部分(P)はTBSVでは大きくSBMVでは小さい。これは抗原性などの違いに反映している。AとBのサブユニットのP部は $Q2$ のまわりで、Cのは2のまわりでダイマーを形成する。現在分解能約 $2.8\text{\AA}$ の解析が成功しているので、サブユニット内部のポリペプチドの走り方などは文献^{51,52)}に詳しく示されている

* SBMVはTBSVと同じく $T=3$ で180個、STNVは $T=1$ で $5 \times 1 \times 12 = 60$ 個である。

第1表 ウィルスの解析に際して測定された反射の数と精度

結 晶	分解能	全測定反射数	独立な反射数	R*
TMV				
母 結 晶	2.8Å	817,000	200,000	0.10
水 銀 置 換 体	2.8	626,000	163,000	0.11
S BMV				
母 結 晶	2.8	652,887	321,586	0.135
PHMBS**置換体	2.8	633,954	318,227	0.156
K ₃ (UO) ₂ F ₃	2.8	631,979	320,184	0.165
K ₂ PtCl ₄	3.5	309,233	157,065	0.111
AuCl ₄	3.5	278,156	149,992	0.122
S T N V				
母 結 晶	4.0	169,000	117,000	0.067
沃 素 置 換 体	4.0	145,000	105,000	0.090

$$* R = \frac{\sum_h \left(\sum_i |F_{hi}| - |\bar{F}_h| \right)}{\sum_h \sum_i |F_{hi}|} \quad \begin{array}{l} \text{TMV および STNV} \\ i \text{ は対称で同価反射} \end{array}$$

$$R = \frac{\sum_h \left(\sum_i |F_{hi}|^2 - |\bar{F}_h|^2 \right)}{\sum_h \sum_i |F_{hi}|^2} \quad \begin{array}{l} \text{SBMV} \\ i \text{ は同価反射} \end{array}$$

** *p*-hydroxymercuribenzoate sulfonate

と比較され、両ウィルスの構造の本質的な部分での類似性がある一方、Pドメインの違いによる表面構造の違いなどが指摘されており、免疫特性などの生物学的活性との結びつきが議論されはじめています。いずれのウィルスでもRNAの存在は電子密度図の上で検知されていない。これはRNAの構造の乱れによるのか、対称がコート蛋白のとは異なるためなのか（各粒子毎に結晶学的に異なった位置で結合している可能性あり）分らないが、小角散乱の実験（特に中性子回折でコントラスト変化法を使った実験⁶⁷⁾からRNAはSドメインのすぐ内側に存在していることが示されている。Harrisonの紹介記事⁶⁸⁾にあるようにウィルスの結晶学は今や幕をあけた感がある。生体各種分子の複合体が如何にして生命を宿らせるようになったのかははなはだ興味深い問題で、われわれはここに生命の誕生の記録映画の一コマを見ている思いがする。

さて、今まで最近のいろいろな研究を紹介したが容易に気がつくことは、この方面の研究ははなはだ材料が豊富でしかも各論的であるということであろう。いくら研究してもほとんど無尽蔵に材料が出てくる。もちろん普遍性のある重要な問題とそうでない問題とがあるが、多少とも複雑な生物をとり上げたとき、生きているために何が真に重要であるのかは一口に論じられる筈がない。何らかの形でかわりのある物質は極めて多く、それらの果す役割を一つ一つ解明するには膨大な研究が必要であるがそれをしなければ生きていることの本当の姿は分らないであろう。一方、たとえ複雑な構造のものでも、その機能を的確に論ずるには解析の精度を上げることが必要であり、かつ動的な変化の状況を明らかにすること、それができなくてもどのような変化が起こり得るかの可能性を見出すことが重要であることが痛感される。このような研究の推進に対して強力X線源を提供する放射光実験施設の役割は大きく、その進展に大いに期待したい。

文 献

- 1) J. D. Watson and F. H. C. Crick : *Nature*, **171**, 737 (1953).
- 2) F. H. C. Crick and J. D. Watson : *Proc. Roy. Soc. A* **223**, 80 (1954).
- 3) W. Cochran, F. H. C. Crick and V. Vand : *Acta Cryst.* **5**, 581 (1952).
- 4) M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes and H. R. Wilson : *Nature*, **171**, 737 (1953).
- 5) R. E. Franklin and R. G. Gosling : *Nature*, **171**, 737 (1953).
- 6) R. E. Franklin and R. G. Gosling : *Acta Cryst.* **6**, 673 (1953).
- 7) F. M. Pohl and T. M. Jovin : *J. Mol. Biol.* **67**, 375 (1972).
- 8) F. M. Pohl : *Nature*, **260**, 365 (1976).
- 9) M. A. Viswamitra, O. Kennard, P. G. Jones, G. M. Sheldrick, S. Salisbury, L. Falvello and Z. Shakked : *Nature*, **273**, 687 (1978).
- 10) A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich : *Nature*, **282**, 680 (1979).
- 11) H. Drew, T. Takano, S. Tanaka, K. Itakura and R. E. Dickerson : *Nature*, **286**, 567 (1980).
- 12) R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura and R. E. Dickerson : *Nature*, **287**, 755 (1980).
- 13) B. F. Clark, B. P. Doctor, K. C. Holmes, A. Klug, K. A. Marcker, S. T. Morris and H. H. Paradies : *Nature*, **219**, 1222 (1968).
- 14) F. L. Suddath, G. J. Quigley, A. McPherson, D. Sneden, J. J. Kim, S. H. Kim and A. Rich : *Nature*, **248**, 19 (1974) ; *Science*, **185**, 435 (1974).
- 15) J. E. Ladner, A. Jack, J. D. Robertus, R. S. Brown, D. Rhodes, B. F. C. Clark and A. Klug : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4414 (1975).
- 16) N. H. Woo, B. A. Roe and A. Rich : *Nature*, **286**, 346 (1980).
- 17) J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff and D. C. Phillips : *Nature*, **181**, 662 (1958).
- 18) M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will and A. C. T. North : *Nature*, **185**, 416 (1960).
- 19) A. F. Cullis, H. Muirhead, M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. C. T. North : *Proc. Roy. Soc. A* **265**, 15 (1961).
- 20) M. F. Perutz, H. Muirhead, J. M. Cox and L. C. G. Goaman : *Nature*, **219**, 131 (1968).
- 21) M. F. Perutz, H. Muirhead, L. Mazzarella, R. A. Crowther, J. Greer and J. V. Kilmartin : *Nature*, **222**, 1240 (1969).
- 22) H. Muirhead and J. Greer : *Nature*, **228**, 516 (1970).
- 23) W. Bolton and M. F. Perutz : *Nature*, **228**, 551 (1970).
- 24) E. J. Heidner, R. C. Ladner and M. F. Perutz : *J. Mol. Biol.* **104**, 707 (1976).
- 25) J. A. Frier and M. F. Perutz : *J. Mol. Biol.* **112**, 97 (1977) ; B. C. Wishner, K. B. Word, E. E. Lattman and W. E. Love : *J. Mol. Biol.* **98**, 179 (1975) ; J. V. Kilmartin, N. L. Anderson and S. Ogawa : *J. Mol. Biol.* **123**, 71 (1978).
- 26) M. F. Perutz : *Nature*, **228**, 726 (1970) ; J. Baldwin and C. Chothia : *J. Mol. Biol.* **129**, 175 (1979).
- 27) R. E. Dickerson and I. Geis : *Proteins : Structure, Function and Evolution*, 2nd ed. Chap. 3, Benjamin-Cummings Co. to be published.
- 28) 飯高洋一 : *生物物理化学*, **22**, 15 (1978).
- 29) 松島正明, 木原隆, 大崎健次 : *蛋白質・核酸・酵素*, **25**, 20 (1980).

- 30) R. J. Poljak et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 3305 (1973) ; *ibid.* **71**, 3440 (1974) ; *ibid.* **71**, 1427 (1974).
- 31) C. C. F. Blake, R. H. Fenn, A. C. T. North, D. C. Phillips. and R. J. Poljak : Nature, **196**, 1173 (1962).
- 32) 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).
- 33) 文献 27) の Chronological Summary of Protein Structure Determinations.
- 34) M. Shoham and T. Steitz : J. Mol. Biol. **140**, 1 (1980).
- 35) W. Bennett, Jr and T. Steitz : J. Mol. Biol. **140**, 183 (1980).
- 36) S. W. Englander, N. W. Downer and H. A. Teitelbaum : Rev. Biochem. **41**, 903 (1972).
- 37) M. Praissman and J. A. Rupley : Biochemistry, **1**, 2446 (1968).
- 38) C. K. Woodward and A. Rosenberg : J. Biol. Chem. **246**, 4105 (1975).
- 39) M. Nakanishi, M. Tsuboi and A. Ikegami : J. Mol. Biol. **70**, 351 (1972).
- 40) J. Yguerabide, H. F. Epstein and L. Stryer : J. Mol. Biol. **51**, 573 (1970).
- 41) J. R. Lackowicz and G. Weber : Biochemistry, **12**, 4161 (1973).
- 42) A. A. Ribeiro, R. King, C. Restivo and O. Jardetzky : J. Amer. Chem. Soc. : **102**, 4040 (1980).
- 43) K. Wüthrich and G. Wagner : Trends Biochem. Sci. **3**, 227 (1978) ; Nature, **275**, 247 (1978).
- 44) P. J. Artymiuk, C. C. F. Blake, D. E. P. Grace, S. J. Oatley, D. C. Phillips and M. J. E. Sternberg : Nature, **280**, 563 (1979).
- 45) H. Frauenfelder, G. A. Petsko and D. Tsernoglou : Nature, **280**, 558 (1979).
- 46) M. G. Rossmann and D. M. Blow : Acta Cryst. **16**, 39 (1963) ; *ibid.* **17**, 1474 (1964).
- 47) R. A. Crowther : Acta Cryst. **22**, 758 (1967) ; *ibid.* **B 25**, 2571 (1969).
- 48) A. Jack : Acta Cryst. **A 29**, 545 (1973).
- 49) G. Bricogne : Acta Cryst. **A 30**, 395 (1974),
- 50) G. J. Subbs, R. Diamond : Acta Cryst. **A 31**, 709 (1975).
- 51) S. C. Harrison, A. J. Olsen, C. E. Schutt, F. K. Winkler and G. Bricogne : Nature, **276**, 368 (1978).
- 52) 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).
- 53) T. Unge, L. Liljas, B. Strandberg, I. Vaara, K. K. Kannan, K. Fridborg, C. E. Nordman and P. J. Lentz Jr : Nature, **285**, 373 (1980).
- 54) R. M. Burnett, M. G. Grütter and J. L. White : Acta Cryst. **A 34**, S4, S-51 (1978) ; The 7th Aharon Katzir-Katchalsky Conference, Israel Academy of Sciences and Humanities (1980).
- 55) D. A. Marvin, C. Nave, A. G. Fowler, S. Malsey, H. Siegrist, and E. J. Wachtel : The 7th Aharon Katzir-Katchalsky Conference, Israel Academy of Sciences and Humanities (1980).
- 56) P. M. Colman : The 7th Aharon Katzir-Katchalsky Conference, Israel Academy of Sciences and Humanities (1980).
- 57) J. M. White and J. E. Johnson : Virology, **101**, 319 (1980).
- 58) G. Stubbs, S. Warren and K. Holmes : Nature, **267**, 216 (1977).
- 59) R. Leberman, J. T. Finch, P. F. C. Gilbert, J. Witz and A. Klug : J. Mol. Biol. **86**, 179 (1974).
- 60) J. T. Finch, P. F. C. Gilbert, A. Klug and R. Leberman : J. Mol. Biol. **86**, 183 (1974).
- 61) P. F. C. Gilbert and A. Klug : J. Mol. Biol. **86**, 193 (1974).

- 62) A. C. Bloomer, J. N. Champness, G. Bricogne, R Staden and A. Klug : Nature, **276**, 362 (1978).
- 63) H. Fraenkel-Conrat and R. C. Williams : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **41**, 690 (1955).
- 64) 岡田吉美 : 蛋白質・核酸・酵素, **25**, 1 (1980).
- 65) P. J. G. Butler and A. Klug : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **69**, 2950 (1972).
- 66) W. F. Harris : Nature, **240**, 294 (1972).
- 67) C. Chauvin, J. Witz and B. Jacrot : J. Mol. Biol. **124**, 641 (1978).
- 68) S. C. Harrison : Nature, **286**, 558 (1980).