パデュー大学ロスマン研究室滞在記

大阪大学・蛋白質研究所 畑 安 雄

パデュー大学は、米国インディアナ州ウエスト・ラファイエット市にある州立大学で、ミシガン湖畔の大都市シカゴの南東 126 マイル、州のほぼ中央に位置する州都インディアナポリスの北西65マイルの所にある。同州にある二つの州立大学のうち、南部のブルームントン市にあるインディアナ大学が文科系学部中心であるのに対し、北部にあるパデュー大学は理科学部中心で、農学や生命科学において州の産業を指導する役割を担っている。フージャーというニックネームを持つインディアナ州は、合衆国の重要な農業中心地で、至る所にとらもろこし畑があり、収穫期になると黄色く色づいた背の高いとらもろこしが、郊外の道の見通しを悪くする程である。とらもろこし生産のおかげで州は潤うためか、州税も5%と比較的低く、物価も安い。その上、田舎の農村地であるせいか保守的で治安も良いので、危険なアメリカというイメージは全く無く、北海道と良く似た感じがして、日本人には生活しやすい所である。棲息する鳥の種類の多さを誇るインディアナの州鳥は、鮮かな赤色をしたカージナルで、飛び交う鳥の群れの中でも一際目をひく。州歌“On the banks of the Wabash”にもなっているように、北東から南西へ州を貫き、オハイオ川に合流するワバッシュ川は、文字通りフージャーの生活と密着している。パデュー大学のメインキャンパスがあるウエスト・ラファイエット市は、ワバッシュ川の西岸にあり、東岸のラファイエット市と共にティピカヌー郡に属する。ラファイエット市は、独立戦争で活躍したフランスの将軍 Marquis de Lafayette の名を取って市名がつけられ、インディアナ州で最初の白人部落 Fort Quiatenon があつた場所からワバッシュ川を少し上った所に、1825年に創設された。Fort Quiatenon は、ワバッシュ川沿いの毛皮貿易を保護するための要塞として1717年にフランス人貿易商達によって建てられたが、約50年後にインディアンの手に落ち、白人攻撃の基地として使われたので、1791年に大統領ワシントンの命令で破壊された。近年、急速に復興が進み、今では、毎秋にその場所で“the Feast of the Hunters' Moon”という祭りが開かれ、18世紀の生活様式及び技術工芸の実演や当時の食物の試食などが楽しめる。一方、ウエスト・ラファイエット市は、ワバッシュ川西岸の二つの町 (Kingston と Chauncey) が1888年に合併してできた。今日、ラファイエットとウエスト・ラファイエット両市の人口を合わせると65000人を越える。生活環境の良いラファイエットは、生活してみる価値のある学園都市の一つに数えられる。この学園都市ラファイエットの中枢的役割を担っているパデュー大学は、ラファイエットの商人 John Purdue からの\$150000、ティピカヌー郡からの\$50000、地域住民からの土地100エーカーの寄附によって創立され、Purdue の行為に感謝してその名がつけられた。1874年に6人の講師と39人の学生で講義が始まったが、現在では、メインキャンパスに32000人以上の学生がいる他、3分校に13000人の学生がいて、全米大学のうち25大校の中に入っている。大学には、ゴルフコース・レクレーション用屋内体育館・屋内球技場・フットボール場等のスポーツ施設や音楽会場・映画館・画廊等の娯楽施設が完備されていて

Yasuo Hata : My Memories of Rossmann's Laboratory in Purdue University

談話室は学会の話題、研究余話、滞在記、各種の提言などを掲載する欄です。会員相互の情報や意見の交換の場ですので、投稿を歓迎します(編集委員会)。

学内外に開放され、市民の人達も楽しめる数多くのプログラムやイベントが用意されている。さすがに「教育・研究・奉仕」をスローガンとするだけの事はあると感心させられる。

私は、パデュー大学生物科学部の Rossmann 教授の研究室で、1982 年 4 月から 2 年間研究生生活を送らせて戴いた。この研究室では、X 線結晶構造解析の手法によりウイルス粒子や酵素分子の立体構造を決定し、その構造と機能の関係や分子進化を明らかにする研究が行われている。Rossmann 教授は、1964 年にパデュー大学へ移って来られたが、以前おられた英国ケンブリッジのキャベンディッシュ研究所での経験に基いて研究を進めてこられた。在英時代に Rossmann 教授は、ヘモグロビンの $\alpha\beta$ サブユニット間の相対配向の研究において回転関数法¹⁾を導入され、現在、蛋白質などの解析でよく用いられる分子置換法の先駆者となられた。これまでに Rossmann 研究室で結晶解析されたグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (GAPDH)、乳酸脱水素酵素 (LDH) やカタラーゼは、どれも四量体で 222-対称を有する回転関数の適用できる分子であったし、カタラーゼは、ヘモグロビンと同じくヘム蛋白質であった。また、GAPDH と LDH の分子構造中に、 α ヘリックスと β 鎖が $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ と交互に繰り返す Rossmann fold を見い出された。ウイルスの構造解析も早くから始められ、現在までに高分解能で解析された 4 種の球状ウイルスの一つである southern bean mosaic virus を 1979 年に 2.8Å 分解能で構造決定された²⁾。この解析で用いられた振動写真の反射強度数量化プログラム^{3,4)}は、Rossmann 教授が開発されたもので、現在広く使用されている。このように Rossmann 教授の研究範囲は広く、蛋白質分子の折りたたみ、分子進化、解析テクニックやプログラムの開発などであるが、最近では、ウイルスの構造・増殖機構・進化に特に興味を持たれ、研究の主流は、そちらにある。研究室の人員構成のうち、2 人の準教授 (Johnson 博士と Argos 博士) と 1 人の秘書は、Rossmann 教授とは十数年のつきあいになるそうであるが、他の研究者の出入りは激しい。教授と準教授は独立したプロジェクトを持っておられ、私の滞在中、全体で博士研究者 15 名程度、大学院生 6 名、技官 4 名という大所帯であった。研究者の専攻分野は、化学・物理・生物と広く、国籍も米国・日本・中国・インド・アルゼンチン・スペイン・スイス・オランダと各国に及び、談話室の壁にはあってある世界地図には各自の名前の書かれた赤旗が出身地の所に立てられていた。従って、世界各国の人達と友達になるには都合の良い場所であった。帰国後も当時の友人と文通できるのも楽しいものである。4 名の技官のうち 1 名は、装置の維持管理要員で、大抵の故障を修理する技能を持っているのには感心した。他の 3 名は、実験補佐要員であったが、私の滞在中にその数も減り、研究者とプロジェクトの数が多い割に技官の数が少ないという気がした。また、計算機プログラムの管理者がおらず、研究者各自が改造版をもっているので、初めてそれを使うと不便を感じる事もあった。研究者は皆、夜も週末も大変よく仕事をするが、これには二つの理由が考えられる。第一は、Rossmann 教授の生活リズムによる影響である。教授は、朝 9 時頃から夕方 6 時半頃夕食に帰宅されるまでと夕食後 8 時半頃から夜 11 時頃まで研究室におられる。昼食時は、談話室でサンドイッチを食べながら研究室の皆と歓談される。時々、この間に lunch time talk という主に外来者による講演が談話室で行われる。木曜日の昼食は、皆で外へビザか中華ランチを食べに行くのが習慣である。土曜日も昼 1 時過ぎまで研究室に来られる程の猛烈ぶりである。第二は、大型計算機センターの運用状況による影響がある。機種は CDC 6600 は、大学の規模や研究者の活動状況から考えて小さすぎる。学生の教育にも共用されていて、期末試験の時期になると、端末の順番を待つ学生が廊下一杯にあふれ、座りこんでプログラムのデバッグをしている。日中は、容量の小さいジョブばかり流れ、結晶学者が流す大きいジョブはほとんどはけない。だが幸い、計算機は、朝 8 時半から翌朝 5 時過ぎまで、及び、週末も短縮時間ではあるが稼動するので、すいている夜や週末に仕事をせざるを得ないのである。従って、当然、計算機の使用料も膨大で、全学費用の 1/4 以上を Rossmann 教授が負担しておられる。こういった計算機の状況も、最近、スーパーコンピュータ CDC Cyber 205 の導入によって多少改善されたようである。丁度、私の滞在中、教授自身がプログラムの書き換えをされていた。

研究室の X 線実験室には、Elliott 社製回転対陰極型 X 線発生装置 3 台 (GX 20 が 2 台、GX 6 が 1 台) 上に 6 台の振動カメラが設置されていて、Franks 型全反射ミラーで収光した X 線束を用いた振動写真

法で蛋白質やウイルス結晶の回折強度データを測定する方法が採用されていた。自動回折計は全く見あたらなかった。しかし、プロジェクトの数の多い事やウイルス結晶の測定すべき反射数の多い事もある。カメラは常に作動していた。化学実験室の4台の遠心分離機と旧式分光計も、毎日誰かがウイルスの単離・精製に使用していた。この部屋に隣接した端末室には、5台の端末とVG社製三次元グラフィックスがあり、グラフィックス用ミニコンピュータは、MMSXシステムによって大型計算機に連結され、データ転送ができる。グラフィックスのプログラムとしてはFRODOが使用されていた。その他、SBMVとカタラーゼ用の二つのモデル部屋があったが、GAPDHとLDHのモデルは廊下に並べてあった。また、いくつかの蛋白質の針金モデルが談話室の天井から紐で吊り下げられており、教授の座右には、LDH四量体の針金モデルが置いてあったが、蛋白質foldingのトポロジーに興味を持ってもらえる教授らしくて印象的であった。

私の研究課題は、アルファルファ・モザイク・ウイルス (AMV) の外被蛋白質のみから成る再構成 T=1 粒子の高分解能 X 線結晶構造解析で、鳥取大・福山恵一博士による低分解能解析を発展させるものであった。私は、ウイルスの解析に興味はあったものの、予備知識のないまま今回初めて解析に携わってみて、ウイルスの高分解能結晶解析が如何に難しく、またその反面、如何に面白いものであるかが分かった。

AMV は、遺伝子 RNA の異なる四成分粒子から成る植物ウイルスである。各成分粒子は、直径が 180Å と同一で、長さが各々 570Å, 430Å, 350Å, 300Å の桿状で、両端は正十二面体対称を有し、円筒部は P6 格子を形成し、6 回軸の各頂点には大きな穴のある事が知られている。これまでに解析された球状ウイルスとは形も性質も異なるウイルスである。二回のショ糖密度勾配遠心分離により四成分中一成分を単離したが、結晶を得るには到らなかった。一方、ウイルスを 1M-MgCl₂ で処理して RNA を除去し、pyrophosphate 緩衝液中で再構成してできた T=1 カプシドは、トリプシン処理で N 末端側の 26 残基を除去すると結晶化可能となり、外被蛋白質濃度約 10mg/ml の T=1 カプシド溶液を 0.2M クエン酸緩衝液 (pH 4.56) に対して透析すると、無色の六角板状結晶 (P6₃, $a=b=199.8\text{\AA}$, $c=314.5\text{\AA}$, $Z=2$) が得られた⁵⁾。しかし、ウイルス自身がイオン強度・pH・温度等の変化に非常に敏感なため、再現性よく結晶を得るのが困難であった。解析は、まず、native と PHMBs 誘導体結晶について、振動角 1.5° の 50 枚ずつの振動写真より得られた 4.5Å 分解能までの回折強度データを用い、単一同型置換法と分子置換法により行われた^{6,7)}。次に、振動角 0.5° の 148 枚の振動写真から得た native 結晶の回折データと先に得られた 4.5Å 分解能電子密度図から、分子置換法と位相拡張法により 3.5Å 分解能電子密度図を得た。その結果、AMV 外被蛋白質は、球状ウイルスの場合と同様、β バレル構造をしているが、集合の仕方に差異のある事がわかった。AMV (T=1) カプシドには、元の AMV の円筒部にあるような 6 回軸周りの大きな穴が 5 回軸周りにあり、粒子表面から内部まで通じている。従って、AMV は、球状ウイルスの場合のようなカチオンの欠損による膨張はせずに遺伝子を粒子外に放出するようである。

さて、Rossmann 教授の研究室では、AMV の他にも幾つかのウイルスの構造解析が行われていたが、対象が植物ウイルスから動物ウイルスへ広がってきている。これは、ウイルス結晶学の当然進むべき方向であろう。まず、植物ウイルスでは、southern bean mosaic virus (SBMV), cauliflower mosaic virus (CIMV), cowpea mosaic virus (CpMV), tobacco streak virus (TSV), cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), belladonna mottle virus (BdMV), tobacco ringspot virus (TobRV) の研究が進められていたが、その主なものについて紹介する。既に構造が決定されている SBMV T=3 粒子の 2.88Å 分解能での構造精密化が行われていた。ウイルスが有する非結晶学的対称を利用した Hendrickson-Konnert 法で 65 サイクル精密化して、R 値が 25.5% にまで改良され、約 40 個の水分子が同定された。現在、A・B・C サブユニットの構造及び相互作用について詳細な検討がなされている所である。また、AMV と同じ方法で得られた SBMV T=1 粒子の結晶解析も進行中である⁸⁾。CIMV は、hanging drop 法により立方晶系と思われる微小結晶が得られていた。このウイルスは、直径約 500Å の単一球状ウイルスで、二本鎖 DNA を遺伝子にもつユニークなものであるが、収量が極めて低いため、困難が予想される。

CpMV の六方晶系結晶は、単位格子が $a=b=451\text{\AA}$, $c=1038\text{\AA}$ と巨大なもので、高分解能領域では隣接反射が重なり合い、長い間データ収集に苦労されていたが、最近、SR 光を用いれば少なくとも $3.5\text{\AA}$ 分解能での解析が可能となった⁹⁾。これは、現在で最大の格子定数をもつ結晶である。一方、最近、格子定数 $400\text{\AA}$ 前後の CpMV 立方晶系結晶が得られ、水銀誘導体結晶も調整され、 $3.5\text{\AA}$ 分解能の電子密度図が得られた。更に $2.8\text{\AA}$ 分解能での解析が行われているようで、間もなく構造が決定されるであろう。bromovirus 科に属する CCMV は、pH 5 で安定であるが、イオン強度の低い状態で pH 7.5 にすると、粒子の直径が約 $260\text{\AA}$ から約 $300\text{\AA}$ に膨張し、蛋白・核酸分解酵素の作用を受けやすくなる。粒子パッキングの差異に基づくユニークな性質を理解すべく結晶解析が始められた。PEG 6000 を用いた蒸気拡散法により $3\text{\AA}$ 分解能まで反射が出る斜方晶系結晶が得られ¹⁰⁾、native 結晶について $3.5\text{\AA}$ 分解能までのデータが収集された。現在、重原子誘導体の調整中である。BdMV¹¹⁾ は、単一同型置換法で低分解能解析が行われていたが、重原子誘導体の質に問題があるようであった。以上の植物ウイルスに加えて、動物ウイルスの human rhinovirus R14 (HRV 14) と mengovirus 及び昆虫ウイルスの black beetle virus (BBV) が解析されていた。動物ウイルスは、人間に対する病原性を有する大型のものが多く、また、脂質スパイクを伴ったエンベロープを有するものも多いので、現在の所、結晶解析の対象となるウイルスの種類は、ピコルナウイルス科、ノダウイルス科、パルボウイルス科等に限られる。また、動物や昆虫の組織を利用した細胞培養或いは組織培養によってウイルスを増殖させるための施設が必要になる。パデュー大学では Cell Culture Lab を設けて限られた研究者が仕事に携わり、定期健康診断による健康管理を実施していた。ピコルナウイルス科には、enterovirus, cardiovirus, rhinovirus, aphthovirus の四つの属がある。粒子は、1 本鎖 RNA を含む直径約 $300\text{\AA}$ の球状ヌクレオカプシドで、分子量は、約 8.5×10^6 にもなる。通常、分子量 34000, 30000, 25000, 7000 の 4 種のポリペプチドが各 60 個ずつ集って $T=1$ 粒子を形成している。human common cold virus HRV 14 は、まず、硫酸によって斜方晶系結晶が得られた¹²⁾が、双晶で X 線による損傷も大きかった。そこで、結晶化条件が検討され、 5 mg/ml のウイルスを含む内液の PEG 8000 濃度 0.25% 、外液の PEG 8000 濃度 0.5% という条件で、hanging drop 法により $2.8\text{\AA}$ 分解能まで回折データの得られる立方晶系結晶が得られた¹³⁾。この結晶は、格子定数 $a=445.1\text{\AA}$ で単位格子中に 4 個のウイルス粒子を含み、各粒子は、結晶学的 3 回軸の上に載っている。最初、空間群は $P23$ として解析が進められたが、うまくいかず、回折データの再検討がなされた結果、 h 奇数の反射出現に疑問が持たれた。そして、 $P2_13$ と訂正された結果、重原子誘導体の調製がうまくいき、現在、 $2.8\text{\AA}$ 分解能解析が進行中との事である。mengovirus は、cardiovirus 属の一つで、mouse L cell 中で増殖され、硫酸を用いた蒸気拡散法により、 $7\text{\AA}$ 分解能までの回折データが観測しうる $0.6\sim 0.9\text{ mm}$ の大きさの結晶が得られた¹⁴⁾。この結晶の空間群は $P23$ 、格子定数 $a=422\text{\AA}$ で、単位格子中に 4 個のウイルス粒子が含まれている。これらの粒子は結晶学的 3 回軸上に載り、各々は 222 対称で関係づけられている事が self-rotation function により分った。また、mengovirus 結晶と rhinovirus 結晶間の cross-rotation function により、属の異なる二つのピコルナウイルス間で同様なカプシド構造をしている事が明らかになった¹⁵⁾。一方、BBV は、ノダウイルス科に属し、ショウジョウバエ (*Drosophira*) の細胞中で増殖された。ウイルス粒子は、直径約 $310\text{\AA}$ の球状で、分子量 44000 の外被蛋白質が 180 個収容しうる大きさであるため、 $T=3$ 粒子であると考えられる。結晶化は、硫酸による hanging drop 法により中性付近で行われ、菱形十二面体結晶が得られた¹⁶⁾。この結晶は、空間群 $P4_232$ 、格子定数 $a=352\text{\AA}$ で、単位格子中に 2 個のウイルス粒子を含み、 $2.8\text{\AA}$ 分解能までの回折データが得られる良質の結晶であった。現在、重原子誘導体結晶の調製中である。

以上の様なウイルスの結晶構造解析の他に、蛋白質の結晶構造解析も行われていた。その内、最も力が注がれていたのは、*Clostridium pasteurianum* 産生の窒素固定化酵素ニトロゲナーゼの 1 成分であるモリブデン-鉄-イオウ蛋白質の構造解析であった。この蛋白質は、分子量 22 万の $\alpha_2\beta_2$ 型四量体で、2 個の Mo, 32 個の Fe, 約 30 個の不安定性硫黄を有する。嫌気性菌が産生する空气中で不安定な蛋白質であるため、結晶のマウントに至るすべてが嫌気性物質用実験室で行われていた。結晶は、高分解能の

回折データが得られる良好なものであった¹⁷⁾が, cofactor である Mo や Fe が外れ易いため, 重原子誘導体の調製が困難なようであった. その他, ウシ肝臓カタラーゼの 2.5Å 分解能での Hendrickson-Konnert 法による構造精密化及び細菌型カタラーゼとの構造比較, 高熱菌型乳酸脱水素酵素の分子置換法による 3.5Å 分解能の構造解析, ウサギのホスホグルコムターゼの 2.7Å 分解能での構造解析などのプロジェクトが進行中であった.

以上, 私の滞在中のパデュー大学 Rossmann 研究室の様子を述べさせて戴いたが, 現在, 当研究室ではウイルス及び蛋白質の X 線結晶構造解析の分野における最先端の研究が行われていると言えよう. 特別最新の実験設備を有している訳ではないのに, 当研究室から数多くのすばらしい成果が報告されてくる事に驚かされる. もちろん, これは, 数多くの興味ある最新のプロジェクトをうまく指導され, かつそれをするに足る研究費を得ておられる Rossmann 教授の卓越した手腕に依るのであるが, それだけではない. その教授の下に世界各国から集ってきた数多くの若い優秀な研究者が, アメリカ競争社会の中でしのぎを削りながら立派な研究を行っているからでもあろう. これには当研究室で研究生生活を送った多くの日本人結晶学者の貢献度が大きい事は言うまでもない.

最後に, 米国滞在中の 2 年間終始お世話戴いた Rossmann 教授御夫妻に深く感謝致します. また, 私に渡米の機会を与えて下さった大阪大学名誉教授・角戸正夫先生, 大阪大学蛋白質研究所の勝部幸輝・田中信夫両先生を始め, お世話になった多くの方々に深く感謝致します.

文 献

- 1) M. G. Rossmann and D. M. Blow : *Acta Cryst.* **15**, 24 (1962).
- 2) 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 (London)* **286**, 33 (1980).
- 3) M. G. Rossmann : *J. Appl. Cryst.* **12**, 225 (1979).
- 4) M. G. Rossmann, A. G. W. Leslie, S. S. Abdel-Meguid and T. Tsukihara : *J. Appl. Cryst.* **12**, 570 (1979).
- 5) K. Fukuyama, S. S. Abdel-Meguid and M. G. Rossmann : *J. Mol. Biol.* **150**, 33 (1981).
- 6) S. S. Abdel-Meguid, K. Fukuyama and M. G. Rossmann : *Acta Cryst. B* **38**, 2004 (1982).
- 7) K. Fukuyama, S. S. Abdel-Meguid, J. E. Johnson and M. G. Rossmann : *J. Mol. Biol.* **167**, 873 (1983).
- 8) J. W. Erickson and M. G. Rossmann : *Virology*. **116**, 128 (1982).
- 9) R. Usha and J. E. Johnson : *J. Appl. Cryst.* **17**, 147 (1984).
- 10) K. L. Heuss, J. K. M. Rao and P. Argos : *J. Mol. Biol.* **146**, 635 (1981).
- 11) K. L. Heuss, J. K. M. Rao and P. Argos : *J. Mol. Biol.* **146**, 629 (1981).
- 12) J. W. Erickson, E. A. Frankenberger, M. G. Rossmann, G. S. Fout, K. C. Medappa and R. R. Rueckert : *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 931 (1983).
- 13) E. Arnold, J. W. Erickson, G. S. Fout, E. A. Frankenberger, H. J. Hecht, M. Luo, M. G. Rossmann and R. R. Rueckert : *J. Mol. Biol.* **177**, 417 (1984).
- 14) U. Boege, D. G. Scraba, K. Hayakawa, M. N. G. James and J. W. Erickson : *Virology* **138**, 162 (1984).
- 15) M. Luo, E. Arnold, J. W. Erickson, M. G. Rossmann, U. Boege and D. G. Scraba : *J. Mol. Biol.* **180**, 703 (1984).
- 16) M. V. Hosur, T. Schmidt, R. C. Tucker, J. E. Johnson, B. H. Selling and R. R. Rueckert : *Virology*. **133**, 119 (1984).
- 17) T. Yamane, M. S. Weininger, L. E. Mortenson and M. G. Rossmann : *J. Biol. Chem.* **257**, 1221 (1982).