X線構造解析を始めよう (9)

タンパク質結晶構造解析入門

名古屋大学 芦田玉一

Tamaichi ASHIDA: Introduction to Protein Crystallography

Introduction to elementary protein crystallography including items such as, features of protein crystals, crystallization of proteins, the heavy atom isomorphous replacement method, model building and refinement, and a brief history of protein crystallography, is presented.

X線結晶構造解析法はタンパク質分子を何等の仮定なしに「直接高分解能で見る」方法であり、今日のタンパク質および核酸の科学の発展に不可欠かつ最大の貢献を行ってきた。この方法は単に立体構造の決定だけではなく、構造・機能相関の研究に欠かせない最も重要な研究手段である。タンパク質結晶解析の重要性は今後ますます広く認識されるようになろう。とくに機能の発現に直接関連した研究、および方法論では解析の自動化を目指した研究が急速に進むことが期待されている。

この解説は、タンパク質結晶学の研究を始めようとする初心者が手っとり早くそのアウトラインを理解することを目的としている。方法の詳しい解説ではないことをお断りしておく。また、タンパク質結晶構造解析は結晶という一見特異な環境にあるものを見ているのであるが、とくに専門外の関連分野研究者が、タンパク質結晶学の生物科学における役割、成果および意義を正當に理解するために、まず最初にタンパク質の結晶の特徴をやや詳しく述べ、タンパク質の構造と構造・機能相関を調べるのに結晶がむしろ理想的な場であることを示したい。なお最後に、タンパク質結晶学の歴史にも触れておく。タンパク質結晶学そのものの理解にも貢献するからである。またタンパク質特有の原子および内部回転角等の命名法等は付録として纏めた。

1. タンパク質結晶の特徴

1.1 タンパク質結晶と溶媒 (水)

タンパク質結晶の重要な特徴は「結晶の中でタンパク質は生きていて活性を持っている」ことである。活性がなければ構造解析の意義は小さい。活性を持つのは「結晶の容積の30～70%、平均50%を結晶化溶媒 (ほとんどは水) が占めている」からである (図1)。なかには90%が水という例もある。タンパク質結晶ではこの溶媒 (水) が重要な役割を果たしている。活性を持つタンパク質は水和していて、その水は結合水といわれる。結合水

を奪えばタンパク質分子は構造を保持できず生物活性を失う。この意味で結合水は活性タンパク質分子の一部である。結合水の一部は分子内部の隙間および表面の窪みに入り、タンパク質分子と水素結合を結びその構造保持の役割を担っている。残りは分子表面の1～2層の水で、表面から4.5Å位までの距離にあり、表面の極性基と直接間接に水素結合し、タンパク質と結合している。その量はタンパク質分子の重量のほぼ20～40%である。この結合水を持つ分子が集まり、さらに隙間には流動性のある自由水が詰って結晶化することになる。したがって、タンパク質分子がお互いに直接接触している点は少なく、結晶場が分子構造に大きい影響を与えるとは考えられない。溶液中のタンパク質も結合水を持っているので、タンパク質分子の構造は結晶中でも溶液中でもほぼ同じであると考えられる。自由水と結合水との区別は画然としたものではなく、中間状態のものも多い。結晶内の結合水の多くは結晶解析で位置を決定することができる。

図1. タンパク質結晶の結合水と自由水の概念図。太線はタンパク質、細線内の点は結合水、空白の隙間は自由水が詰っている。

多くのタンパク質結晶では分子の一部が局部的に複数のコンフォメーションを示したり、無秩序状態にあることが明らかになっている。また基質やインヒビターとの結合に際して側鎖が大きく変形することも珍しくはない。結晶内のタンパク質分子の構造変化に対して自由水が緩衝帯の役割を果たしている。

タンパク質のように巨大な分子の結晶構造解析が可能であるのは重原子同型置換法が応用できたからであるが、これも自由水の存在という結晶の特徴を上手く利用できたことによる。

1.2 結晶中のタンパク質の活性

自由水の存在により、結晶内の環境が生体内の環境から大きくは異ならず、蛋白質は“生きて”いて、X線結晶構造解析の意義が大きいことになる。

一般に酵素の活性部位は分子表面には露出せず、少しくぼんだ所、クレバス、ドメインの接点などにあり、化学反応を進めるために環境の pH、誘電率等の制御が可能な場—活性中心—を構築している。酵素結晶を基質を含む母液に入れると、基質が自由水相中に拡散し、酵素の活性中心に接して酵素作用を受ける、生成物は拡散して結晶外に出る。基質の代わりに阻害剤を入れると、同様に酵素に結合して機能を阻害する。このような酵素作用の時間分割実験によるトレースを目標にした研究も試みられている。タンパク質結晶解析のフローセル (flow-cell) 法はガラスキャピラリー中に結晶を固定し、pH を変化させた溶液、基質を含む溶液などを流しながら X 線回折実験を行い、構造変化をトレースする方法であるが、これが可能なのも自由水の存在によるものである。

数種の酵素で結晶および溶液中の活性の比較研究が行なわれている。多くの酵素が結晶中でも触媒活性を持つが、溶液中のそれと比較して、反応速度が小さくなるのが普通である。まったく活性が認められなくなるものもある。しかしながら、その原因は、隣接分子が活性中心をブロックして基質が接近できない、反応進行に必要な構造変化が隣接分子のために困難、基質と生成物が大きくて結晶内では拡散速度が小さい、などである。分子のパッキングの故であって、分子構造が変わって活性を示さなくなるといふ実験事実は見られない。

多くの酵素の結晶で基質を結合する部位の熱振動が他の部分より大きく、基質の結合に必要な構造変化を起こしやすい状態にあることが示された。ある種のインヒビタータンパク質の活性部位は標的酵素と結合すると、結合部位の熱振動が小さくなり、構造が安定化することが観測された。結晶中であってもこのように機能・活性に直接関係した現象が見られ、それを結晶解析で明らかにすることができるのである。

1.3 結晶内と溶液内の分子構造

NMR 法が発展して、溶液内の構造も詳しく研究され

るようになってきたが、結晶内の構造と溶液内のそのの基本構造は同じであることが明らかになった。

そのほかにも結晶内と溶液内で基本的な構造が変わらないことを示す実験事実がある。(a) いろいろな種の同じタンパク質は結晶化条件が異なっても、また異なった対称系で結晶化しても基本的に同じ分子構造を示す。(b) 溶液中のタンパク質の化学修飾が結晶中の分子構造から旨く説明できる。すなわち、目的の側鎖の修飾の難易度が結晶内分子構造で見た側鎖への接近の難易度に応じて説明できる。(c) X 線小角散乱法で測定した慣性半径は結合水も含めて結晶構造から計算したものと良く一致する。基質等を結合させて生じる構造変化も旨く説明されている。

これらの現象を総合すると、現在我々が結晶構造解析で観察している骨格構造あるいは活性中心の構造は安定でユニークなものであり、結晶中あるいは溶液を問わず少々の条件の変化では基本的分子構造が容易に有意に変わるものではないことを示しているように思われる。以上述べた結晶の特徴はタンパク質だけではなく、結晶性の tRNA および DNA オリゴマー結晶でも共通に見られることである。

2. タンパク質の結晶化

タンパク質結晶構造解析の成否は結晶の良否が左右し、その精度と信頼度を制御する。結晶化がタンパク質結晶解析の最大の律速段階である。貧弱な結晶では労ばかり多く、時間をかけてもよい結果は期待できない。とにかくよい結晶を作るように努めるべきである。

(1) 解析に必要な試料の量：

結晶化についての情報が少ないタンパク質では結晶化条件の探索だけでも 10～30mg の量が必要である。最もこれ以下で解析が完了する場合も珍しくはない。天然に極く微量しか存在しないタンパク質は遺伝子組換え等を利用して大量に得る方法が用いられる。

(2) タンパク質の溶解度、塩析・塩溶：

タンパク質溶液で、イオン強度を減少させて 0 に近づければ溶解度は小さくなる。この現象を利用して塩濃度を減少させて結晶化するのが透析法である。一方イオン強度が大きい場合にさらに大きくすると、溶解度はほぼ直線的に減少する。この現象を利用するのが塩析である。このとき小さい多価イオンがより有効であり、実際に硫酸塩や磷酸塩がよく用いられる。溶解度を下げる目的でエタノールあるいは 2-メチル-2,4-ペンタジオール等の有機溶媒が用いられることもある。ポリエチレングリコール (PEG, 分子量 1000～6000) もよく用いられるが、沈澱剤というよりは、結晶性を良くする目的で用いられることが多い。

(3) 結晶化に影響する因子：

結晶化には多くの因子、タンパク質濃度、純度、緩衝

溶液の種類, pH, 沈澱剤の種類と濃度, 温度, 等が関係する。有機溶媒, 金属イオン, イフェクター, 界面活性剤の種類と濃度 (疎水性タンパク質), 等が関係するものもある。そこで多くの因子の組み合わせの多くの条件を短時間で調べる目的で, 種々の条件の沈澱剤試薬をセットにしたクリスタルスクリーンというタンパク質結晶化条件探索用のキットが市販されていて, 好成績を納めている。便利な自動結晶化装置も市販されている。なお, 結晶化で再現性が乏しいことをよく経験する。タンパク質の純度および微量不純物に問題がある場合もある。新鮮な試料を用い, 迅速に結晶化することが必要である。

(4) 結晶化法:

現在最もよく用いられている方法は, *hanging drop vapor diffusion* 法である (図2)。容積約 5ml の容器の底 (リザーバー) に強塩濃度の塩析溶液あるいは有機溶媒等の沈澱剤溶液を 0.5 ~ 1ml 入れる。5 ~ 10 μ l の飽和に近いタンパク質溶液の小さい液滴をカバーガラスからぶら下げ, リザーバーの上に置き, 密閉する。蒸気拡散で結晶化条件に達するのを待つという方法である。この方法は少量の試料で多数の条件を一時に試みることができ, 進行状況や結晶をそのまま顕微鏡で観察できるので, 好んで用いられる。液滴を横におく *sitting drop* 法も時々用いられる。液滴内に種結晶を入れる方法もよく用いられる。ミクロ透析法は肉厚のガラスキャピラリーに 20 ~ 100 μ l のタンパク質溶液を入れ, 下端を透析膜で封じ, 沈澱剤溶液の中に入れ, 透析あるいは拡散で結晶化させる方法である。膜を使わず, キャピラリー中で2液を界面を乱さないで接触させる *自由界面法* も用いられる。

(5) 結晶の大きさと質:

放射光, イメージングプレートなどの強力な機器の発展で 0.1mm 角 (体積で) 以下の結晶でも回折強度測定が

できるようになったが, やはりできれば 0.3mm 角くらいの結晶が望ましい。迅速に, 高次の反射までできるだけ多くのデータを測定できることが理想的である。目的によっては, 回折強度測定にラウエ法も用いられるが, そのためには結晶性がさらに優れている (*mosaicity* が小さい) ことが要求される。なお, 顕微鏡観察で良くても, X線的には解析に適さないものも多く, 注意が必要である。

(6) 膜タンパク質 (疎水性タンパク質) 結晶化:

膜タンパク質には生物学的に重要な機能をもつものが多いが, 疎水性である故に一般に結晶化が難しい。界面活性剤を用いて結晶化を試みるが, 界面活性剤のフィルムに包まれたタンパク質分子が集まって結晶を作り, 溶媒 (ほとんどは水) も多量に含まれるので, 結晶性が劣るものが多い。界面活性剤の種類の選択も重要である。

(7) 結晶の密度と溶媒の量:

結晶格子に含まれるタンパク質分子の数 Z および溶媒の量を求めるために, 結晶の密度を測定する。密度勾配法が手っとり早い。密度と分子量から Z と溶媒の量を推定する。溶媒含有量 40 ~ 50 % に対応する Z が最も確からしい。

(8) 微小重力下 (宇宙) での結晶化実験:

地上で得られなかったタンパク質の結晶が宇宙で成長し, 構造解析に成功したという報告はまだないようであるが, 得られた結晶の X 線回折強度測定で S/N 比が数十%改良されたと報告されている例が多い。また, 解析の分解能 (電子密度図の解像度, 7.1 参照) も 0.5Å 程度向上したという例もよく見られる。地上の実験より 10 倍も大きい結晶や, 新しい形の結晶が得られたという報告もある。高分解能の解析で 0.5Å の分解能の向上は意義が大きい, そのタンパク質が重要であるほど宇宙実験の科学的意義が大きくなる。

3. X線回折強度の測定

タンパク質の結晶は空気中では, すぐ溶媒を失い, 壊れてしまう。そこで X 線実験に際しては結晶をガラスキャピラリー中に溶媒と一緒に封入して実験に用いる。

タンパク質結晶に含まれる多量の流動性溶媒や局部的無秩序構造は Bragg 反射には寄与しない, また, 見かけの温度因子が低分子の結晶よりも数倍も大きいので, X線回折強度は低分子のそれと比較して格段に弱い。一方, 結晶は X 線照射で放射線損傷を受け, ものにより数時間で壊れてしまうものもある。また解析に必要な反射の数は数千~数万である。(一例として, 分子量 3 万のタンパク質で 2Å 分解能の解析には 20,000 ~ 30,000 個の反射データが必要である, 反射数は分解能の逆数の 3 乗に比例し, また分子量に比例する)。格子定数が大きいので, 隣接した回折斑点の分離が難しい場合もある。この様に不利な条件が多いが, 弱い反射を短時間で多量に測定すること

図2 *hanging drop vapor diffusion* 法. reservoir には沈澱剤溶液を入れ, カバーガラスに 5 ~ 10 μ l の飽和状態に近いタンパク質溶液の液滴をぶら下げる (カバーガラスの中心に白く見える)。密閉されていて, 蒸気平衡で結晶を析出させる。

が要求される。実験装置および問題点を見てみよう。

(1) イメージング・プレート (IP) :

富士写真フィルム(株)で開発された、ポリエステルフィルムに輝尽性蛍光体 (BaFBr:Eu²⁺) の微結晶を塗布した新しいタイプの高性能二次元放射線検出器である。感度は従来のX線フィルムより2桁大きく、適性露光域(ダイナミック・レンジ)は5桁に及ぶ広いものである。タンパク質結晶学では急激に従来のX線フィルムにとって代わり、タンパク質結晶のX線回折実験を容易にし、解析の分解能と精度の向上に画期的な貢献を果たした。

(2) プリセッション写真法:

回折斑点が単位格子の形状に対応した格子状に配列し、指数付けが容易な写真法である。結晶の予備実験および重原子置換結晶の適否を調べるのに最適である。しかし下記のIP回折計が便利となり、用いられなくなった。

(3) 振動写真法:

入射X線に垂直な軸の周りに一定の角度回転させて回折線を記録する方法である。格子定数が比較的大きくてもよく、短時間で多くの回折点を記録できるので強度測定に現在最もよく用いられている。振動カメラとワイセンベルグカメラがある。とくに坂部のワイセンベルグカメラが有力である。

(4) ラウエ写真法:

結晶は静止させ、連続波長のX線を用いる。放射光X線とIPが利用できるようになって再び脚光を浴びるようになった古くて新しい方法である。結晶相反応のトレースに力を発揮するであろう。

(5) IP回折計:

一般の実験室で最も広く用いられている。IP(およびその読取装置)と回転対陰極X線発生装置を組み合わせた自動測定装置である。結晶は振動させる。

(6) 二次元検出器:

多線式2次元検出器 (multiwire area detector),あるいはテレビ検出器を装着した回折計も実績を挙げるようになってきた。

(7) 放射線損傷:

X線実験における大きな問題はタンパク質結晶の放射線損傷である。X線照射によりラジカルが発生し、これが連鎖反応で次々に伝播し、タンパク質分子を破壊し、結晶格子を壊すと考えられている。X線照射時間の増加につれて、回折線幅が広くなり、強度が減少する。その速度はものにより差異が大きい。その結果、一組のデータを測定するのに数個の結晶を必要とするものもある。ところが放射光のように強力なX線源で測定できると、1個の結晶で壊れるまでに以前よりはるかに多くのデータが測定できるようになり、この問題はあまり重大な問題ではなくなってきた。ただし、大学の研究室レベルでの装置では依然として重大な難点である。

(8) 低温実験:

いろいろな点から低温実験が有利である、すなわち低温では、(i) 温度因子が小さくなり、高次のデータが測定でき、分解能と精度が向上する。(ii) 結晶のX線損傷は急激に軽くなり、分解能と精度は向上する。(iii) 反応速度が指数関数的に減少するので酵素反応等の固相反応に伴う構造変化をトレースすることが可能になる。ただし低温実験を行うためには、水を有機溶媒で置き換えて低温にしたり、急速冷凍して結晶構造を壊さないで溶媒を過冷のガラス状態にする必要がある。

4. 重原子同型置換法

タンパク質分子は通常の低分子より10倍以上も大きく、重原子法や直接法では構造決定はできない。幸いにも、タンパク質結晶構造解析では間接的ではあるが位相を実験的に求める唯一の方法である多重重原子同型置換法を用いることができる。

タンパク質結晶を重原子化合物を含む母液中に浸すと、重原子(団)が拡散して結晶内に入り、自由水相を通り、タンパク質の分子構造を変えず同型性を保ったまま単位胞中の少数の定点(できれば一つ)に定着すると必要な同型置換結晶が得られる(この際格子サイズも変化してはいけない、したがって、等構造(isostructural)と言うべきであるが、慣用的に「同型」(isomorphous)が用いられている)(図3)。

重原子同型置換結晶の良否が結晶解析の成否を左右する。悪いものでは信頼性のある位相が得られない。実際に、重原子の座標決定・精密化・位相決定・モデル作成と解析が進むまでは、置換結晶の良否の最終的判定はできない場合が多い。良い同型置換結晶を得るまで努力すべきである。不十分なものでは時間と労力の無駄である。

4.1 重原子同型置換結晶の作製

重原子の異常分散効果を利用すれば解析は一種類の重原子同型置換結晶だけでも可能ではあるが、やはり二種類は欲しいものである。良く用いられる重原子試薬は:

図3. 重原子同型置換結晶の概念図。(a) タンパク質結晶、(b) 重原子(●)同型置換された結晶、タンパク質の構造は不変。

$K_3UO_2F_5$, UO_2Ac_2 , $UO_2(NO_3)_2$, $HgAc_2$, $HgCl_2$, K_2HgI_4 , PCMB, PCMBs, K_2PtCl_4 , K_2PtCl_6 , $K_2Pt(CN)_4$, $KAuCl_4$, $SmCl_3$, $AgNO_3$ (Ac, acetate; PCMB, *p*-chloromercuribenzoate; PCMBs, *p*-chloromercuribenzenesulphonate) 等である。

試薬の濃度および浸漬の時間等の条件は試誤法で調節するが、時間と労力が必要である。もともと金属原子を含むタンパク質ではいったん金属原子をキレート剤で除き、次いでより重い金属原子で置換する方法が面白い。位相とタンパク質内の重原子位置（通常活性中心近傍にある）が同時に決定できることになる。最初から重原子化合物を含む溶液からタンパク質を結晶化させる共結晶化は成功例が少なく、有効ではない。

位相決定以外でも、重原子同型置換結晶が構造と機能に関する重要な情報を直接与える場合がある。重原子を含む阻害分子は位相決定と活性中心の同定の双方に有力である。また、重原子試薬はそれぞれ特定の極性を持つアミノ酸側鎖との親和力が強く、水銀化合物（イオン）は一般に Cys, His 等と、ウラニル化合物は Glu, Asp 等と、Pt 化合物は Met, His, Arg 等と結合する。この種の情報は電子密度図からモデルを作るのに有力な手がかりを与えることになる。

浸漬法で重原子がうまく置換したかどうかは、X線回折強度が元の結晶のそれから変化したかどうかで調べる。回折強度の変化が過大であったり格子定数が変化すると利用できない。試薬によっては、タンパク質分子自体の構造が有意に変化したり、同型性が壊れたり、結晶が壊れたりすることもよく見られる。強度変化は10%程度が一応の目安になろう。格子定数の変化は程度の問題ではあるが、小さくても高次の反射の位相決定には（悪）影響が大きく、フーリエ図の精度を制約することになる。

4.2 重原子同型置換法の適用

(1) スケール因子決定：

X線回折強度を測定すると、タンパク質結晶（構造因子を F_P とする、簡明のためにミラー指数は省略する）と重原子同型置換結晶（構造因子 F_{PH} ）のそれぞれについて、Wilson's plot により、スケール因子と温度因子を求める。結晶は多量の溶媒を含み、そのうち一部は回折に寄与し残りは寄与しない（バックグラウンドを高くする）、置換された重原子の量は定かではない、強度データの $(\sin\theta/\lambda)^2$ の範囲が小さい、などの不利な条件があるので、アバウトな値しか得られないが、他に方法がない。なお、 $(|F_{PH}|^2 / |F_P|^2)$ の比について同様のプロットを行えば、単独のプロットより確かな相対スケール因子と温度因子の差、 ΔB , が得られる。重原子同型置換法の初期に要求されるのはこの二つであり、この方法が有力である。

(2) 差パターソン関数-重原子位置の決定：

重原子Hの位置は $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ を係数とする差パタ

ーソン関数で求めることができる。幸いにもこの便宜的な関数で、ノイズは多いが、重原子間ベクトルが現れ（少数の重原子間ベクトルと多数の重原子-タンパク質原子間ベクトルが含まれるが、前者だけが浮び上がる）、その位置を決定することができる。重原子同型置換法が成功した理由の一つはこの点にある。

(3) 重原子同型置換法の原理：

F_P , F_{PH} , および重原子だけの構造因子への寄与（計算値） F_H の間の関係は：

$$F_P = \sum f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (1)$$

$$F_H = \sum f_H \exp[2\pi i(hx_H + ky_H + lz_H)] \quad (2)$$

$$F_{PH} = F_P + F_H \quad (3)$$

この3つの量は複素平面上のベクトルで、式(3)で示すように三角形を作る（図4a）。

そこで、原点を中心にして半径 $|F_P|$ の円を描く。次に第1の重原子同型置換結晶の F_{H1} を計算し、原点からベクトル F_{H1} を描き、その先端を中心とした半径 $|F_{PH1}|$ の円を描く。この2つの円の交点はともに式(3)を満足する。次に第2の重原子置換結晶について同様の作業を行うと、3つの円が一点で交わるP点が位相 ϕ を与える。このようにして、少なくとも2種の重原子同型置換結晶が必要である。ところが、測定値にも計算値（重原子の位置、占有率等のパラメータの誤差による）にも誤差が含まれるので、3つの円が一点で交わることは偶然しか期待できない。

この問題は位相の確率分布を考慮して巧みに解決され

図4. 重原子同型置換法 (a) 位相平面（実数軸： r , 虚数軸： i ）上に、 F_P , F_{PH} , F_H （添え字1, 2は重原子置換結晶の番号）、 ϕ (F_P の位相角)、原点を中心とする半径 $|F_P|$ の円、ベクトル F_{H1} の先端を中心とする半径 $|F_{PH1}|$ の円、を描く。3つの円の交点Pが位相 ϕ を示す。(b) 位相角の確率分布の計算、式(4)、 $\epsilon_1 = ||F_P| - d_1|$. d_1 は太線で示す原点を通る線分（位相 ϕ ）と F_{PH1} の円との交点の原点からの距離。

図5. 位相角確率分布の一例. 重原子同型置換結晶4種を用いたもの.

(a) 中心の短い線分は $-F_H$ ベクトル, +は位相確率分布の重心. ϕ_b : 最良位相角, ϕ_m : 最確位相角. (b) 横軸 ϕ , 縦軸 $P(\phi)$, m : figure of merit.

た. すなわち, $0 \sim 2\pi$ のどの角度も正しい位相である確率が0ではなく有限の値をもっている, と考えるのである. 図4bで, 任意の位相 ϕ の線分を描く. この線分と第1の同型置換結晶の $|F_{PH}|$ の円との交点の原点からの距離を d_1 とする. F_P の円との交点の距離は $|F_P|$ である. この2個の交点の間の距離 $\varepsilon_1(\phi)$ ($=||F_P| - d_1|$) が小さいほど, ϕ が正しい位相である確率が高い. $\varepsilon_1(\phi)$ は F_{PH} の観測値と位相を ϕ としたときの計算値の差であり, 式(3)の位相三角形が閉じない量である. そこで, F_P の位相が ϕ である確率を $P(\phi)$ とすると,

$$P(\phi) = \exp[-\varepsilon_1^2(\phi)/2E_1^2] \quad (4)$$

で表される. ただし E_1^2 は第1の重原子置換結晶の $|F_{PH}|$ の自乗平均誤差である. 同型置換結晶が複数個あれば, 同じ操作を行い, $P(\phi)$ は右辺の積となる. 実際には, $0 \sim 2\pi$ の全領域について例えば 10° おきに式(4)を計算し, 位相確率分布(図5)を求める.

(4) 異常分散効果の利用:

重原子のX線異常分散効果を利用するとさらに有力である. F_{PH} のFriedel対を $F_{PH}(+)$ と $F_{PH}(-)$ で表すと,

$$\begin{aligned} F_{PH}(+) &= F_P(+) + F_H(+) + iF''_H(+) \\ F_{PH}(-) &= F_P(-) + F_H(-) + iF''_H(-) \end{aligned} \quad (5)$$

となり, $|F_{PH}(+)| \neq |F_{PH}(-)|$ である. とくに放射光で, $\Delta f''$ の大きい波長を選択すると, この差が大きく精度良い測定ができる. そこでこの対を別々の2種の重原子置換結晶と見做すと, 1個の重原子置換結晶だけからでも位相決定が可能になる. 現在この方法がよく採用されている. さらに, もともと重原子を含むタンパク質結晶で

はまったく同型置換結晶なしの構造決定も可能である. タンパク質中にMetが含まれている場合は, SをSeで置換したSe-Metを組み込み, 利用する機会が多くなっている.

(5) best Fourier:

位相の確率分布(図5)で得られる $P(\phi)$ 極大の最確位相角 ϕ_m を用いる‘最確フーリエ’は一見良さそうであるが, とくに解析の初期段階ではノイズが多く, 通常は用いられない. タンパク質結晶解析では独特の的確な方法が考案されている. 確率分布が散漫なもの, あるいは図5の例のようなバイモーダルな分布がよく見られるが, 例えば, 図5の例で, ϕ_m を用いると 150° 近辺の有意な確率を持つ位相角をまったく無視する, すなわち情報の一部を無視することになる. しかし, $0 \sim 2\pi$ のすべての角をその確率に応じてフーリエ合成に取り込むこと, すなわちすべての情報を利用することが求められていると考えるのである. そのためには, 位相平面上で $|F_P|$ の円周上に重み $P(\phi)$ を付け, その重心をフーリエ係数とするのがよいことがわかる. (証明は参考文献参照). このフーリエは位相確率分布をそのまま取り入れたという意味で best Fourier (最良フーリエ) と呼ばれ, 最も‘無難な’フーリエであり, 実際に最もよく用いられている. 実際には, 重心[極座標で($m|F_P|$, ϕ_b)と表す]を計算で求め, 振幅 $m|F_P|$, 位相角 ϕ_b (最良位相角と呼ばれる)を用いて電子密度分布を計算する. 位相角だけではなく, 確率分布に対応したフーリエ係数への重荷まで求めていることに注意されたい. m ($=0 \sim 1$) は $0 \sim 2\pi$ のすべての角の ϕ_b からの差の重荷平均であり, 有効度因子 (figure of merit) と呼ばれ, 確率分布がシャープであるほど1に近く, フーリエ図に大きく寄与する. m の統計は解析の進歩を示す一つの指標として用いられるが, E^2 に依存し, その適切な見積りが必要である. 異なる結晶間の m の比較には意義が少ない.

一例として, 一つの F_P の位相確率分布で, $\phi=0^\circ$ が確率50%, $\phi=90^\circ$ が確率50%, その他は確率0%と得られたとする. この時, $(0.5|F_P|, 0^\circ)$ と, $(0.5|F_P|, 90^\circ)$ をとともにフーリエ合成に用いれば全情報を利用することになる. これは2つの重心, $[(1/\sqrt{2})|F_P|, 45^\circ]$ を単独に用いるのと同等である. 有効度因子は, $m = \langle \cos 45^\circ \rangle = 1/\sqrt{2}$. 一方, ϕ_m は選びようがなく, 最確フーリエは不合理であることがわかる.

5. 分子置換法

タンパク質分子の中には, 例えばヘモグロビンやウィルスのようにまったく等しいかあるいはほとんど等しい複数個のサブユニットからできているものが多い. それらが結晶中で厳密な対称をもたないときに, パターソン関数の検討からサブユニットの相対方位と位置を定めよう

とする方法がある。また類似のタンパク質の構造がすでに報告されているときに、両者のパターン関数の比較から構造決定を試みる方法がある。この方法はまとめて分子置換法と呼ばれる。いま、結晶学的な対称関係にない2個の同じ分子が非対称単位内にある場合を考える。元来のパターン関数を $P(x)$ で表し、それを回転させたパターン関数を $P(x')$ とする ($x' = [C]x$, $[C]$ は回転マトリックス)。非対称単位内の両分子の方位の差だけ回転させて重ね合わせたときに2つの分子内ベクトルセットが最も良く一致する。そこで回転関数 $R(\theta_1, \theta_2, \theta_3)$ を、

$$R(\theta_1, \theta_2, \theta_3) = \int_U P(x) P(x') dx \quad (6)$$

と定義し、指標とする。積分は分子内ベクトルが現れる領域に限られる。 $\theta_1, \theta_2, \theta_3$ の全領域について式 (6) を計算し、関数値が最も大きいピークが2個の分子の相対方位を与える。構造既知のタンパク質結晶と比較する場合はそのパターン関数を $P(x)$ とする。構造が異なる可能性がある部分は $P(x')$ の計算から除外することが必要である。積分領域の設定などの条件を適当に選ぶと、予期以上に有力な方法である。方位が得られると次は、分子間ベクトルに着目して位置を求める。分子の重心間ベクトルに対応したパターン関数を合成して、元のパターン関数との一致の具合を見る。あるいは分子を非対称単位中で動かして R 因子を計算する、などの方法が用いられる。

生物界で、同一機能を持つタンパク質は種が異なりアミノ酸配列がかなり異なっても基本構造は同じであり、また、機能が異なっても部分的に類似の立体構造を持つタンパク質が多いことが明らかになってきた。分子置換法の応用範囲は広い。

6. モデル作成と精密化

6.1 フーリエ図の改良

構造因子の位相角が得られると、フーリエ図が合成される。一般には分解能の不足と位相角の精度の不足で、直ちにモデルの作成が始められるというような良質のフーリエ図が得られることは少ない。このような場合に良く用いられるフーリエ図を改良する有力な手段がある。第一は溶媒領域の電子密度平滑化 (solvent flattening) である。自由水の溶媒領域は定まった構造を持たず、その電子密度は水の平均電子密度であり、平滑である、という論拠で、溶媒領域を低い平坦な密度の領域に修正する方法である。第二は、電子密度平均化法で、単位胞内に結晶学的に等価ではない複数のサブユニットがあるとき、その構造はほぼ等しいので、その電子密度を平均するとより信頼度の高い電子密度図が得られる、という方法である。その他に、タンパク質領域の電子密度には上

限があるから、高さに適切な制限を加えるというヒストグラムマッピング法が用いられる場合もある。

このようにして修正されたフーリエ図をフーリエ変換して位相角を求め、それを用いてより良いフーリエ図を得るわけである。この過程は何回か繰り返すことが多い。解析の初期段階でとくに有力な方法である。

6.2 モデルの作製

電子密度は単位胞を3次元の格子状に細分し、その格子点で計算する。かつては透明なシートに一つ一つの断面の密度を等高線で表し、それを重ねて Richards Box という装置を利用して、モデルを作っていた。現在はモデル作製は専らコンピュータ・グラフィックスで行われているが、縮尺した電子密度図を透明シートに描き、重ねて見ると (ミニマップ)、分子全体が見られ、分子境界が見やすく、またペプチド鎖のトレースも容易であることから、便利に用いられている。とくにコンピュータ・グラフィックスでは全体を見るのは難しく、ブロック毎の検討しかできないので、ミニマップをそばに置いて対照しながらモデルを作っていくのは賢明なやり方であろう。

コンピュータ・グラフィックスでは、フーリエ図はある値以上の電子密度を持つ領域を '鳥かご' 状の網目で囲って示す方法が用いられる (図6)、一方、標準の結合距離、結合角をもった部分構造を作り、結合の捻れ角を調節して、電子密度に最もうまく適合するようにモデルを作り上げていく。ペプチド結合は剛体として扱えるので、主鎖の内部回転角、 ϕ ($C'-N-C\alpha-C'$) および ψ ($N-C\alpha-C'-N$)、および側鎖の内部回転角を調節すればよい。モデル作成の支援プログラムとしては、TURBO-FRODO や O 等のよくできた高機能のソフトが用いられている。最初にモデルを作るのは 2.5 ~ 3 Å 分解能の段階が多いが、モデル作製のスタートは、大きくて特徴のある形を持った芳香族側鎖や、もしあれば金属原子が目印になる。一次構造が分かっているならば、二次構造予測法で α ラセンの可能性の高いペプチド鎖部分が推定できるので、大きいよりどころになる。 α ラセン部分は一般に電子密度が高く認識が容易である。モデル作製は時間がかかる根気の

図6. 鳥籠状に表した電子密度図の一例。分子の一部の骨格が書きこんである。図はあるタンパク質の Ca-結合部。

要る作業である。電子密度がうまく説明できない部分は多く、とくに主鎖の両末端部、分子表面のランダム構造部分、あるいは、Lys, Arg, Glu, Met 等の長い側鎖等では電子密度が低く、構造をまったく定められない場合が多い。実際に多くのいろいろなコンホメーションをとっているであろう。

一次構造も分かっているタンパク質では、電子密度だけでは識別ができない側鎖も多く、2Åの分解能の解析では同定できる側鎖は約60%と言われている。

6.3 精密化

フーリエの解釈でモデルができると、より信頼度の高い構造を得るためにパラメータの精密化が行われる。しかしながら、分解能が低く、反射数が1原子当り数個から10個程度と少なく反射数とパラメータ数の比が異常に小さいこと、また一方、初期モデルの精度が悪く、主鎖の流れはほぼ正しいとしても、多くの原子位置が通常の最小自乗法では収束できないほどずれていること、さらにコンホメーションがまったく異なっている部分もある、というような状態であるので、精密化するためには、最小自乗法による精密化—差フーリエ合成—モデルの再検討と、新しく構造が決った原子の追加、という過程を何回もサイクルすることが必要である。

(1) 最小自乗法:

タンパク質結晶の解析では、通常束縛条件なしの最小自乗法精密化が成功することは例外的であり、一般に束縛条件付きの方法が用いられている。結合距離、結合角、捻れ角、平面性、非結合原子間距離等が異常にならないように束縛している。分解能が低いとき、あるいは、モデルの精度が悪いときは剛体グループを旨く利用する方法、プログラム CORELS, がパラメータ数を小さくして有効である。解析の最終段階では、分子内の結合距離、結合角、捻れ角等の標準値からのずれおよび非結合原子間距離に対応するポテンシャルエネルギーの最小化を、構造因子の精密化と組み合わせる方法（プログラム PROLSQ）がよく用いられる。構造因子は周期関数の和であるので、真の構造にほど近くなければ通常の最小自乗法では pseudo minimum に落ち込んで真の構造に達しないことが多い。この難点を計算で解決するためにプログラム XPLOR は simulated annealing 法を用いて成功した。この方法ではまず 3000K 程度の高い温度における分子運動をシミュレーションする。運動が激しいので pseudo minimum を飛び出して、別の minimum に移ることができる。その後焼きなます (anneal) と真の構造へ収束するというわけである。このプログラムは 構造精密化のスピードアップに大きく貢献し、広く用いられている。

精密化の進展は通常 R 因子で判定する。最初のモデルでは R はほぼ 0.4 ~ 0.5 であるが、精密化が進んで R がほぼ 0.20 あるいはより小さくなると精密化がうまく進ん

だことがわかる。最近よく用いられる指標に 'free R ' がある。これは、全観測データのうち 5 ~ 10 % をあらかじめ精密化から除いておき、精密化の進展に応じてそのデータのみで R 因子を計算したものである。精密化に含めていないのでより客観的な指標であり、全体の R 因子と対比して評価に用いられる。

(2) 差フーリエ合成:

精密化の途中で、モデルの検討によく用いられるのが構造因子の観測値と計算値の差を係数としたフーリエ合成である。 $[2F_o(hkl) - F_c(hkl)]$ が係数として用いられることが多いが、これは誤った位置に置いた原子のピークを押え、真の電子密度に最も近いフーリエ図を与えるものである。最終段階では $[F_o(hkl) - F_c(hkl)]$ が用いられ、計算に含めていない原子だけが正のピークとして現れる。通常のフーリエ図および差フーリエ図でのモデルの検討は念を入れて行こなわなければいけない。フーリエ図からも、モデルからも疑問のない構造が正しい構造である。溶媒分子の同定には水素結合等の幾何学的条件の考慮が必要である。

タンパク質の結晶構造がいったん決定されると、擬基質やインヒビター等の小さい分子が同型性を保ったまま結合した結晶が得られた場合（観測構造因子 F_{PL} ）、その結合状態は $(F_{PL} - F_P)$ を係数とした差フーリエ合成図で容易に調べることができる。そのフーリエ図に小分子が正のピークとして現れるが、同時にその結合により生じたタンパク質自体の構造変化も現れる。この方法は同型性が保たれているかぎり回折強度を測定するだけで容易に実行できるので広く便宜に用いられている。またこの目的の場合は必ずしも高分解能のワンセットのデータは必要ではなく、低分解能のあるいは部分的なデータでも信頼度の高い情報が得られるので大いに有利である。この方法は最初リゾチームの解析で用いられてから、タンパク質の活性・機能について最も確実な構造的基礎を与えてきたものである。

7. 解析の精度と結果の整理

7.1. 分解能

全体的な解析の信頼度の目安は分解能である。Bragg 角 0° から $\theta_{\max}$ までの反射データを用いた解析の分解能として、対応する $d_{\min} (= \lambda/2\sin\theta_{\max})$ Å を用いる。光学理論では $0.72d_{\min}$ が分解能であるが、タンパク質の場合は誤差もあり、データ数も不完全であるから、 $d_{\min}$ をそのまま便宜的に用いている。ここで分解能とはフーリエ図上で近接した2個の原子が分離して見える限界の距離である、決定された原子の座標の精度（後述）を直接示すものではないことに留意されたい。

低分子の解析は一般に 0.8 ~ 1.0 Å 分解能であり、さらに高分解能の精密解析も行われる。ところがタンパク質

図7. 分解能と電子密度図. Cys-Ser-Glu-Trp-OH.3H₂Oでモデル計算. 温度因子は、主鎖原子 (β原子も含む) は5Å², 側鎖原子は7Å², 水 (遊離した3個) は10Å². (a) 1.5Å分解能, (b) 2Å分解能, (c) 3Å分解能.

結晶では、温度因子が低分子結晶よりも大きいだけではなく、結晶溶媒の構造の無秩序性、タンパク質自体の (主に分子表面の) 構造の無秩序性が大きく、格子構造の周期性のずれも無視できず、さらにX線損傷も無秩序性を増大する。これらがすべて協調して、高次の反射を弱く、ついには測定できなくしてしまう。この結果、タンパク質結晶では、1Å程度の分解能の解析ができるものはまったく例外的なものである。できるだけ高次のデータまで測定しても、小さい結晶性が良いタンパク質で1.5Å程度の解析ができれば最高である。複雑なものでは3~3.5Å程度でも満足しなければならない。さらに結晶性が悪いものも多い。

では、いろいろな分解能のフーリエ図の特徴、およびそこから得られる構造情報を図7を参考にして纏めてみよう。1.5Å: 原子がほぼ分離して見える。しかし、C=O基では電子の少ないC原子はやや見難い。2~2.5Å: ほとんどすべての側鎖が特有の形を表し、同定できる。モデルの作成がさほど難しくなく、信頼度の高い精度の構造が得られることがわかる。ただし、細部は明確ではない場合もある。3Å: ペプチド主鎖がほぼトレースでき、側鎖が同定できるものも多い。S-Sグループがまだ明瞭には現れないこともある。5~6Å: 分子のおおよその外形が見やすい。αらせんは棒状に現れ、ヘム基は中心が厚い円盤状に見える。

1.5~2Å分解能の解析で、用いられる観測値 (反射) の数は原子一個当たり数個、すなわち変数の数と観測値の数がほぼ同程度になる。図7をみると側鎖のコンホメーション等についてもある程度信頼度のある解析を行うためには最低2~2.5Åの分解能が必要であることがわかる。

7.2 温度因子

タンパク質結晶では、Bは非常に大きく、10Å²以上が一般的である。温度因子は熱振動の平均自乗変位を示すパラメータであるが、タンパク質結晶では原子の動き易さを示すパラメータであると考えられることもできる。実験

および計算の難点に由来する誤差がほとんどすべて温度因子に集積するのでその定量的解析は難しいが、精度を上げて温度因子を詳しく調べることは構造と活性の研究に極めて貴重な情報を提供してくれるようである。束縛が小さい単結合のまわりの側鎖の回転、隣接した偶数の側鎖が協調したフリップ運動、基質等の取り込みに必要な局所的な呼吸運動、さらにこのような運動に伴う溶媒分子の運動等の影響がすべて温度因子に含まれてくる。活性中心周辺の熱振動の観察から活性に関する有用な情報が得られることも多い。

7.3 解析精度

解析の全体的な精度はR因子 (free Rも含める) で決定する。低分子の結晶解析とは異なり、タンパク質結晶では0.10~0.20程度にしかならない。R因子と分解能に対して原子の座標値の平均誤差が理論的に計算されていて (Luzzati plot)、一例を示すと、2Å分解能でR=0.23ならば平均誤差は約0.2Å, R=0.12なら誤差は約0.1Åである。精度の評価の一つの目安にできよう。

個々の原子の座標値の精度は分子内の原子の位置によるばらつきが大きい。分子内部の原子の熱振動は小さくフーリエ図は明瞭で座標値の精度は高い、一方、分子表面の原子の見かけの温度因子は大きく電子密度は小さく精度は低い、対応する電子密度がまったく現れず位置が決められない原子も多い。タンパク質分子表面近くにある、水素結合で結合している溶媒分子も電子密度が明瞭であれば信頼度が高い。定性的には個々の原子座標の精度はフーリエ図上の電子密度の高さによって定まる。

7.4 構造の整理検討

タンパク質結晶では、いろいろな観点からの結果の整理が必要である。分子の作図は、全原子を図示すると複雑すぎるのでいろいろな便法が用いられる。最も簡単でよく用いられるのは全アミノ酸残基のCαを連ねた主鎖構造の図で、ミオグロビン以下多くのタンパク質でよく用いられてきたものである。立体図の一例を図8に示す。二次構造は、主鎖の内部回転角 (φψ)、主鎖間のN-H...O=C水素結合のパターンおよび、Cα間距離等を調べることにより明かにされる。構造の図示によく用いられるコンピュータプログラムはORTEP, PLUTO等の初期のもの他に、構造の特徴をうまく表す多くのプログラムが開発され、利用されている。

得られた構造の検討に必要な構造パラメータについて述べておきたい。束縛条件付きの精密化を行ってれば、結合距離が同種の結合の平均距離から有意にずれることはないが、結合角は構造により系統的にかなり大きくずれるものがある。中でも主鎖の結合角τ(NCαC')は104°~117°と広く分布することには注意が必要である。主鎖の内部回転角 (φψ) のRamachandranプロットは、二次構造の頻度などの特徴の他に、主鎖構造の精度を教

図8. C α 原子を結んで描いた（立体）分子図の一例。

えてくれる。Gly 以外で ($\phi\psi$) が許容領域から大きくずれるものは構造の慎重な検討が必要である。ペプチド結合はトランス (T) で、内部回転角 ω が 180° から 15° 以上ずれることはほとんどない。ただし、Pro のペプチド結合ではシス型もほぼ 5% の確率で見られる。内部回転角 χ^1 (N-C α -C β -C γ) は、側鎖のコンフォメーションを示すが、G $^+$, T, G $^-$ の頻度の比はほぼ (1 : 2 : 3) である。その理想値 60° , 180° , 300° からのずれが大きい構造はよく再検討する必要がある。アミノ酸残基ごとの温度因子、水素結合、露出表面積の見積、溶媒分子の構造、等の情報も構造の理解に必須である。

解析に用いられたすべての観測値、詳細な構造パラメータは論文発表と同時に "Protein Data Bank" に登録される。

8. タンパク質結晶学の歴史

タンパク質の結晶が初めて得られたのは 1927 年の酵素ウレアーゼ (分子量 483K) の結晶である。続いて、1930 年代前半にペプシン、トリプシン、キモトリプシン、ヘモグロビン、インシュリン、タバコ・モザイク・ウィルスなどが結晶化されている。

タンパク質結晶の X 線による研究は 1934 年 Bernal と Crowfoot (後の Hodgkin で、インシュリンを解析した) がペプシンの結晶の X 線結晶回折写真を撮って始まった。結晶内でタンパク質分子が、一定の立体分子構造を持ち、規則正しい三次元結晶格子を作っていることが明らかにされた。また、結晶が多量の水を含んでいて、空気中では容易に乾燥し結晶格子が壊れること、ところが結晶を母液を加えた封管中に入れておけば結晶は壊れず、シャープな回折線が得られることも明かにした。タンパク質結晶の重要な有用な性質が最初の実験で明らかにされたのである。Perutz がケンブリッジでヘモグロビンの構造解析を開始したのは 1937 年である。

1951 年、Pauling と Corey はアミノ酸や小さいペプチドの結晶構造解析から、ペプチド鎖の局所的な構造および主鎖間水素結合のルール等を定め、さらに繊維状タンパク質の規則構造として α ラセンおよび β シートのモデルを提案した。この二つは球状タンパク質中でも最も多く

見られるペプチド鎖の規則的な構造 (二次構造) である。

Watson と Crick が X 線繊維写真の解析から DNA の二重らせん構造を提案し、分子生物学の発展の緒口を作ったのもこの頃 (1953 年) である。多くの生体高分子の中で、立体構造が解析されて生物科学に最大のインパクトを与えたのはこの DNA の二重らせん構造の提案であろう。DNA は長い二重らせんであり、延伸すると分子自体が 1 次元の周期構造をもつ結晶であると見做すことができ、質の高い X 線繊維写真を与え、構造が決定されたのである。

1940 年代後半に Kendrew が Perutz のグループに加わり、ヘモグロビンと類縁のミオグロビンの研究を開始した。このグループは 1950 年すぎからとくに重原子同型置換法の開発を始め、1954 年に Perutz は重原子同型置換法がタンパク質結晶の回折 X 線の位相角決定に有効であることを示した。この方法を用いて、Kendrew 等は 1958 年にミオグロビンの 6Å の解析を、1960 年に 2.8Å の解析を報告し、Perutz 等は 1960 年にヘモグロビンの 5.5Å の解析を報告した。Perutz はその後も長く種々のヘモグロビンの研究を続け、その複雑なしかし極めて合目的な生物学的機能を原子レベルでほぼ解明したと考えられている。この頃から欧米の数カ所で酵素タンパク質の結晶解析が始まり、数年後にリゾチーム、キモトリプシン、リボヌクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼなどの解析が続く、徐々に解析例が増加した。ここで、酵素機能の本質の理解に立体構造が不可欠な重要な情報であることが明らかにされた。しかしながら、当時は結晶解析の成果は高く評価されながらも、まだごく一部の専門家だけのものであるというように見られていた。

1980 年代になって放射光 X 線光源、X 線回折機器、および解析計算のコンピューターとソフトウェアの発展により、構造解析も格段に容易に、速く、かつ精度が高くなり、質量ともに大きく発展した。一方、遺伝子工学、タンパク質工学が発展し、タンパク質 (および核酸) の一次構造の決定が容易にかつ正確になり、さらに部分的にアミノ酸残基を変換した人工変異タンパク質も作れるようになった。このような解析法と生物科学の進展で、タンパク質結晶構造解析の必要性が広い分野で認識されるようになり、大学のみならず民間でも、研究者が急激に増加してきた。

この分野で、Sumner, Pauling, Perutz, Kendrew, Watson, Crick, Wilkins, Hodgkin, Lipscomb, Huber, Deisenhofer, Michel がノーベル賞を受賞している。この狭い分野にこれだけ多くの受賞者が出たことは、この分野がそれだけ重要で注目されていることを示している。

わが国では、1965 年に大阪大学タンパク質研究所角戸研究室でチトクローム c の結晶化が始まり、4Å 分解能の解析が 1969 年に、続いて 2.3Å の解析が 1972 年に完成した。その後名古屋大学の坂部の高分解能のインシュリ

ンの解析が続いたが、国内の研究者の数はしばらくは極めて少数であった。1980年代になって、放射光という超強力なX線源とイメージングプレートという強力な2次元検出器の助っ人を得て、ハード面が大いに発展してきた。とくに、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の坂部のスクリーンレス・ワイセンベルグカメラは世界中から利用希望者が集まり、世界で最も多くの質の良いデータを供給している。一方、研究者も徐々に増加し、解析の成果の数も増えてきた。つい最近(1995年)、チトクロームcオキシダーゼ複合体の2.8Å分解能の解析が月原らによって報告された。これは総分子量が50万に近い膜タンパク質で、分解能の高い解析は困難ではないかと見られていたものであるが、精度の高い解析が成功した。10年に近い、とくに結晶化の努力の結果得られたこの成果は意義が大きく、画期的なインパルスを与えた。このように世界をリードする成果も現れるようになってきた。Spring8 もいよいよ稼働を始めようとしており、研究環境もさらに改善されようとしている。

9. 付録—タンパク質構造の専門用語

原子、内部回転角命名法 タンパク質ペプチド鎖を図9に示す。iはアミノ酸残基の序号。側鎖の原子は主鎖のC α に結合しているC β から順にC γ (O γ)、C δ 、と呼ばれる。詳しくは命名法[IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *J. Mol. Biol.* **52**, 1-17 (1970)]を参照のこと。側鎖の内部回転角(捩れ角)は順に、 χ^1 (N-C α -C β -C γ)、 χ^2 (C α -C β -C γ -C δ)、で表される。一般に内部回転角、 $\theta = 0^\circ, 60^\circ, 180^\circ, 300^\circ (= -60^\circ)$ がそれぞれ、シス、ゴーシュ(G $^+$)、トランス(T)、ゴーシュ(G $^-$)に対応する。ペプチド結合は40%程度の二重結合性を持ち、 ω (C α -C'-N-C α)はトランスで、4個の原

図9. (a) タンパク質ペプチド鎖の原子および内部回転角命名法。'i'はアミノ酸残基番号 (b) 内部回転角、A-B-C-Dと結合しているときに、結合B-Cの内部回転角は、B(手前)とCを重ねて投影し(Newmann投影)、Aを基点にして時計方向にDまでの角を測る。

図10 全20種のアミノ酸側鎖C β から示されている。

子はほぼ平面状である。したがって(ϕ, ψ)が分子のコンフォメーションを決定する。

アミノ酸側鎖 図10に示す。

文 献

- 1) T.L.Blundell & L.N.Johnson: Protein Crystallography, Academic Press, (1976). (古いですが、数少ないまとまった成書)
- 2) H.W.Wyckoff, C.H.W.Hirs & S.N.Timasheff ed.: Diffraction Methods for Biological Macromolecules (Methods in Enzymology, Vols. 114 & 115), Academic Press, (1985). (古いですが、方法が詳しい)
- 3) 芦田玉一, 田中信夫: 新実験化学講座, 基礎技術5, 構造解析, pp.257-303, 丸善(1977). (古いですが、邦文のまとまった解説)
- 4) 日本結晶学会誌, vol.38, No. 1. (1996) (特集号-タンパク質結晶学と構造生物学, 国内研究者による最近の成果と動向の解説)

プロフィール

芦田玉一 Tamaichi ASHIDA
連絡先: 〒465 名古屋市名東区大針1-299
1-299 Oobari, Meito-ku, Nagoya 465, Japan
Tel. Fax. 052-703-2046
最終学歴: 大阪大学理学部化学科
専門分野: X線結晶学, 構造化学
現在の研究テーマ: タンパク質構造化学
趣味: 読書, 囲碁, ゴルフ, 草花栽培