ヒドロキシルアミン酸化還元酵素の構造解析 — 一回折強度の統計的評価による Hemihedral 双晶の結晶構造解析 —

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 五十嵐教之

東京工業大学生命理工学部 森山英明

Noriyuki IGARASHI and Hideaki MORIYAMA: Structural analysis of hydroxylamine oxidoreductase.

— Crystallographic studies from hemihedrally twinned crystals by analysis of intensity statistics —

The structure of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas europaea* has been determined by multiple isomorphous replacement. The crystals, space group $P6_3$, were shown to be hemihedrally twinned. The observed intensities were found to be detwinned by the least squares method after the Britton's algorithm [Britton, D. (1972). *Acta Cryst.* A28, 296-297], when several sets of intensity data were useful. The programs coded by Fortran language succeeded in determining the scale factors and degrees of twinings. The analysis of data collected at various positions of one crystal of this enzyme suggested the heterogeneous distribution of twinning in the crystal.

1. はじめに

筆者らは、硝化細菌 *Nitrosomonas europaea* 由来ヒドロキシルアミン酸化還元酵素（以下 HAO）の分子構造を X 線結晶解析の手法により決定した。¹⁾ 解析に用いた結晶は、hemihedral 双晶結晶であった。そこで、回折強度を統計的に評価し双晶率を決定する Britton の方法²⁾ を基にした、2 段階の最小二乗精密化を開発した。³⁾ この方法によりデータセット間の比較・評価を容易に行うことができ、回折強度を単結晶成分からのものに強度分離することができる。2 段階最小二乗精密化を、HAO 結晶に適用したところ正確に双晶率を決定することができ、効果的に強度分離を行えることがわかった。さらに回折強度分布からの双晶率の見積もりによる結晶評価の結果、HAO 結晶の非常にユニークな双晶結晶構造を明らかにすることができた。この観測を基に放射光を用いて単結晶成分からの回折強度測定を行うことができ、HAO の分子構造決定に成功した。本稿では、HAO の構造解析を通じ、双晶結晶の評価、双晶問題からの脱却方法について報告する。

2. 双晶について

結晶中のすべての原子・分子が 3 次元周期的に配列しているという性質を利用して X 線結晶解析が適用され、

結晶構造が原子レベルで明らかにされてきた。その一方双晶という現象もしばしば観測され、解析において障害となっている。双晶とは一つの結晶が複数の異なる方位を持つ結晶単位から構成される状態で、結晶解析のかなり初期の段階から観測され報告されている。⁴⁾ これまで多くの観測例が報告されているが、双晶は異常な結晶成長の結果であるという訳ではなく、一つの結晶の形態らしい。例えば、双晶結晶中において、双晶要素は完全に無秩序に結合していることは無く、必ず結晶面や結晶軸に関係付けられる。そのため、どのような双晶になるかは、サンプルの性質や結晶化条件によって決まる。双晶がどのように生成するかについては議論が分かれるところであるが、現在のところ、3 つに分類されている。相転移によるもの、物理的刺激によるもの、そして結晶成長過程に生じるものである。ここで一番問題になるのは、最後に挙げた結晶成長過程において双晶となってしまうものである。これは本来持っている性質上双晶となるもので必ず双晶になってしまい、多くの場合単結晶にすることが不可能である。今回の HAO の事例もこの場合に含まれる。

双晶の詳しい様式や分類については International table にレビューされているので、そちらを参考されたい。⁵⁾ ここではタンパク質の結晶について焦点を絞って話を進める。タンパク質の場合対称心が存在しないため、双晶様

式が限定される。すなわち、回折点がすべて完全に重なってしまう双晶と、回折点が完全には重ならない双晶の二つに分けられる。回折点が完全に重なってしまう双晶は、merohedral 双晶と呼ばれる。観測される回折強度は、構成する双晶要素それぞれからの回折強度の級和となる。hemihedral 双晶はこの merohedral 双晶の最も単純かつ一般的な場合で、結晶が二つの双晶要素のみから構成され、それらが2回対称で関係付けられている。この双晶対称が加わるため、双晶要素の割合が同じ場合には、回折パターンのラウエ対称が上昇する。

回折点が重ならない双晶の場合当然回折条件が異なるので、回折像から双晶であると容易に判断することができる。また、多くの場合偏光を利用した実体顕微鏡により容易に観察できる。しかし、merohedral 結晶の場合は回折像は完全に一致し、回折格子の形状が同じために偏光特性も同様になるので、単結晶と同じ振る舞いを見せる。そのため、双晶かどうかは回折強度分布からしか判断できない。

さて、結晶解析を行うためには、単結晶成分からの回折強度を測定しなければならない。回折点が完全には重ならない双晶では、それぞれの双晶要素の方位を決定し、重なりのない反射の回折強度から他の回折強度を分離するという方法が効果的である。これには、Kabsch のプログラムに代表されるデータリダクション法が有効である。⁶⁾ このタイプの双晶の場合、単一成分からの反射を利用できるため、重ならない反射の数にもよるが、多くの場合強度分離可能である。^{7) - 9)} それに対し、回折点がすべて重なり合う hemihedral 双晶の場合、強度分離は非常に困難となる。現在までのところこのタイプの双晶評価方法としては、(1) 回折強度に負はないことを利用し、強度を統計的に評価する方法、²⁾ (2) Wilson の強度分布関数を利用し、累積関数の形状から評価する方法、¹⁰⁾ そして、(3) モデルが利用できる、つまり Fc を計算できる時に、R 値や相関係数を最小化するように強度分離する方法^{11) - 13)} と大きく3つ提案されている。しかし、2番目の方法は原理的に双晶の判定には向いているが、正確な強度分離には向いていない。また、3番目の方法は利用できるモデルがない場合には適用できない。そのため、今のところ hemihedral 双晶結晶を利用し新規構造を決定するには、1番目の方法が唯一の方法であると言える。実際、1番目の方法もしくはそのアレンジを用いた解析例が多く報告されている。^{14) - 16)}

3. HAO の結晶化

ヒドロキシルアミン酸化還元酵素は分子量 20 万、分子中に補欠分子族として 24 個のヘムを持つ多ヘム電子伝達酵素である。¹⁷⁾ 最も特徴的な 24 個のヘムは、現在見つけられている酵素の中では最多のものであり、それらのヘ

ムがどのように配置しどのように機能しているか非常に興味深い。分子は3量体構造をとっており、そのサブユニットはアミノ酸 546 残基、ヘム 8 個から構成される。^{18), 19)} ヘムのうちの一つは還元時に 460nm に吸収を示すことから、ヘム P460 と名付けられた新規のヘムである。²⁰⁾ ヒドロキシルアミンを亜硝酸まで酸化し、その反応の際に生じた電子をシトクロム c554 に受け渡す機能を持つ。²¹⁾ このヒドロキシルアミン酸化反応は2段階反応で、各段階毎に2電子ずつ引き抜き計4電子を引き抜く反応である。

HAO の結晶は硫酸アンモニウムを沈殿剤として得られ、空間群 $P6_3$ に属し、格子定数 $a = b = 96.2 \text{ \AA}$, $c = 265.7 \text{ \AA}$ であった。²²⁾ 密度測定の結果から非対称単位中に2サブユニットが存在していると決定した。この結晶は最大分解能 $2.2 \text{ \AA}$ までの回折点を示し、良好な X 線回折像を与えた。X 線回折像を処理した結果、フィルム間の R-merge は $5.0 \sim 8.0 \%$ に収束した。上述の通り、hemihedral 双晶の場合双晶かどうかの判断は非常に難しい。実際、HAO の場合も結晶の外形、回折像など単結晶のそれとまったく同じであった。当初、我々は単結晶だと思い解析を進めていたが、以下の観測事実から、この結晶は [110] 方向の2回軸で関係付けられる hemihedral な双晶結晶であると判断した。(1) データセット毎の回折強度分布に多様性がある。一つのデータセットが与える低い R-merge に比べ、データセット間では $8.0 \sim 35 \%$ と一致しない。(2) 自己回転関数を計算すると結晶のパッキングからは想定不可能な2回回転対称を示すピークが存在し、その対称性がデータセット毎に異なっている。そして、その方向が [110] 方向である。(3) 重原子との差パターン関数を計算すると鏡像ピークが存在する。その鏡像対称間のピークの高さの比が、データセットにより変化する。(4) 差パターンや差フーリエ合成を行った際に鏡像対称間のクロスベクトルを示すピークが検知できない。これらはすべて hemihedral 双晶の性質上観測されるもので、双晶判定の指標になる。特に、結晶パッキングからは理解することのできない回転対称の存在は重要な指標となる。タンパク質の結晶の場合、一般的に溶媒とタンパク質の比率は制限されるが、²³⁾ 双晶対称を分子対称として考慮に入れると、過剰な分子が非対称単位中に存在することを想定しなければならないので、許される範囲 ($1.7 \sim 3.5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) を越えることが多い。HAO の場合でも、自己回転関数による対称要素の検索では二つの非結晶学的な2回回転対称が示された。この結果から計算される V_m 値は $1.36 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ となり、許容範囲を大きく越える。また、密度測定の結果から非対称単位中にサブユニットが二つ含まれることが示唆されているが、その結果とも一致しない。このように、hemihedral 双晶の場合直接的に双晶であることを示すことはできないが、複数の観測事実の矛盾点から双晶であることの推定ができる。

4. 2段階最小二乗法による双晶の評価

さまざまな観測事実から、本結晶は c 軸に対して互いに逆方向を向いた2つの同一格子から形成されているhemihedral結晶であると推定できた。この仮定をもとに、Brittonの方法[2]により双晶率（混合率）を求め、回折強度の分離を行うことを検討した。回折強度はそれぞれの格子からの回折強度の級和であるので、以下のように書くことができる。

$$\begin{aligned} I_o(hkl) &= \alpha I_c(hkl) + (1-\alpha)I_c(kh-l) \\ I_o(kh-l) &= \alpha I_c(kh-l) + (1-\alpha)I_c(hkl) \end{aligned} \quad (1)$$

(a)

(b)

図1 Britton plotによる単結晶と双晶結晶の比較
(Comparison of Britton plot between single crystal and twinned crystal)

(a) 単結晶の場合（空間群 $P6_3$ のミオグロビン結晶）

(b) 双晶結晶の場合（空間群 $P6_3$ のHAO結晶）

ここで α は双晶率、 I_o は測定された回折強度で、 I_c が双晶でない単一格点からの回折強度である。 α は双晶ではない場合、0もしくは1となる。双晶で関係付けられる反射間で双晶率を仮定すると、単一格点からの回折強度が以下のように導かれることがわかる。（ただし、双晶率が0.5の時は連立しなくなるので解けない）

$$I_c(hkl) = \frac{-\alpha I_o(hkl) + (1-\alpha)I_o(kh-l)}{1-2\alpha} \quad (2)$$

各々の反射に対し双晶率を0.0から0.49まで0.01刻みで仮定して、単一格点からの回折強度を計算し、負になる反射の数を数えるとBritton plotを描くことができる。本来負の回折強度はないので、実験誤差を考慮に入れなければ負の反射が生じたところが仮定が破れたところだと考えられる。実際、 R 値との相関においても最小の R 値を示す双晶率は、Britton plotから見積もられる双晶率と非常に近い値であることが確認されている^{(2), (14), (15)}。図1に単結晶の場合と双晶結晶の場合のBritton plotを示す。plotの立ち上がりの双晶率が、この結晶の大体の双晶率を示す。

Britton plotから求めた双晶率の近似値を基に、正確な双晶率とデータセット間のスケール因子を決定するために、2段階の最小二乗法による精密化法を開発した。この方法を用いることにより、データセット間の比較を容易にし、誤差を減じることが可能になる。タンパク質結晶からの回折は強度も弱く、S/N比も小さいため、個々の反射の強度測定の信頼性が低い。結晶自身の性質もモザイク性が高く、放射線損傷を受けやすいので、精度の高いデータを収集するのは難しい。実験誤差を減じ、データの信頼性を上げるには測定回数を増やす必要がある。そのためには、データセット間の評価・見積もりを正確に行う必要があることは自明であろう。

まず、単一成分の強度の平均値を I_c とすると、

$$\begin{aligned} \bar{I}_c(hkl) &= \sum_j \sqrt{wt_j} \cdot K_j \left(\frac{-\alpha_j I_{o,j}(hkl) + (1-\alpha_j)I_{o,j}(kh-l)}{1-2\alpha_j} \right) / \sum_j \sqrt{wt_j} \\ \bar{I}_c(kh-l) &= \sum_j \sqrt{wt_j} \cdot K_j \left(\frac{(1-\alpha_j)I_{o,j}(hkl) - \alpha_j I_{o,j}(kh-l)}{1-2\alpha_j} \right) / \sum_j \sqrt{wt_j} \end{aligned} \quad (3)$$

ここで、 j はデータセットナンバー、 wt_j は各反射の重みで、以下の式から求められる。

$$wt_j = \frac{2}{\sigma(I(hkl))^2 + \sigma(I(kh-l))^2} \quad (4)$$

K_j と α_j はそれぞれスケール因子と双晶率である。各々

の反射の観測強度はスケール因子と双晶率の関数で表されるが、双晶で関係付けられる反射間での足し合わせは、以下のように双晶率 α には依存せず、スケール因子だけの関数となる。

$$\bar{I}_c(hkl) + \bar{I}_c(kh-l) = \sum_j \sqrt{wt_j} \cdot K_j (I_{o,j}(hkl) + I_{o,j}(kh-l)) / \sum_j \sqrt{wt_j} \quad (5)$$

この式は、一般的に利用されるアルゴリズム²⁴⁾を用いて、双晶率とは独立にスケール因子を精密化できることを示す。これは実際には、 $G_j (= 1/K_j)$ が精密化される。

スケール因子が完全に決定された後、各々の双晶率が精密化される。最小化されるべき残差は、

$$R_j^2 = \sum_{hkl} \sum_{j=1}^q wtt_j R_j^2 \quad (6)$$

である。ここで、

$$R_j = \frac{K_j \{-\alpha_j I_{o,j}(hkl) + (1-\alpha_j) I_{o,j}(kh-l)\}}{1-2\alpha_j} - \bar{I}_c(hkl) \quad (7)$$

$\bar{I}_c(hkl)$ は全データセットの平均強度である。 wtt_j はスケリングの効果を考え、 wt_j/K_j^2 で計算される重みである。観測方程式は、

$$\sum_{m=1}^q \frac{\partial R_j}{\partial \alpha_j} = \Delta \alpha_m = -R_j^o \quad (8)$$

ここで、 R_j^o は双晶率 α の初期値により計算された残差の和である。式 (8) に重みを結合して、正規方程式が以下のように導かれる。

$$\sum_{hkl} \sum_{j=1}^q wtt_j \left(\sum_{i=1}^q \frac{\partial R_j}{\partial \alpha_m} \frac{\partial R_j}{\partial \alpha_j} \Delta \alpha_i \right) = - \sum_{hkl} \sum_{j=1}^q wtt_j R_j^o \frac{\partial R_j}{\partial \alpha_m} \quad (9)$$

1 から q までの m に対しこの式が成り立つ。 R_j の微分は式 (7) から導かれ、

$$\frac{\partial(R_j)}{\partial \alpha_i} = \delta_{ji} \cdot \frac{I_{o,j}(hkl) - I_{o,j}(kh-l)}{(1-2\alpha_j)^2} - \frac{wtt_j K_j}{\sum_{m=1}^q \sqrt{wtt_m}} \cdot \frac{I_{o,j}(hkl) - I_{o,j}(kh-l)}{(1-2\alpha_j)^2} \quad (10)$$

ここで、 $i=j$ の時 $\delta_{ji} = 1$ 。それ以外の時は $\delta_{ji} = 0$ 。 α の値は 0 から 1 の範囲になければならないので、もし範囲を越える場合は全体的にシフトする。

精密化の間、手系は以下のような相関係数を計算することで判定される。

$$CC(i,j) = \frac{\sum_{hkl} \{I_{c,i}(hkl) - \bar{I}_c(hkl)\} \{I_{c,j}(hkl) - \bar{I}_c(hkl)\}}{\left[\sum_{hkl} \{I_{c,i}(hkl) - \bar{I}_c(hkl)\}^2 \sum_{hkl} \{I_{c,j}(hkl) - \bar{I}_c(hkl)\}^2 \right]^{1/2}} \quad (11)$$

もし相関係数が -1.0 になる場合には手系を逆にとる。実際には双晶率を α から $1-\alpha$ に変換する。また、精密化の際には負の反射の発生率が調査されており、最も負の反射の数が少なくなるように、双晶率の値をシフトさせる。

以上のプログラムは Fortran 言語で書かれており、3つのルーチンから成り立っている。1番目に、Brittonの方法によって双晶率の近似値を見積もる。2番目に、スケール因子と双晶率の精密化を行い、最後に、等価反射の平均化を行う。以下に HAO での適用例を述べる。

5. HAO 結晶における双晶結晶の強度分離

HAO の回折強度データの収集は、研究室の R-AXIS II C²⁵⁾ と高エネ放射光実験施設の巨大分子用ワイセンベルグカメラ^{26), 27)} を利用して行われた。作製した結晶は結晶毎に強度分布が異なっていたので、その分布の変化を評価するため 50 を越える native 結晶のデータ収集を行った。また、構造解析に多重原子同型置換法を適用するために重原子置換体結晶の調製を行い、回折強度の測定を行った。その結果、水銀と白金の置換体結晶がハーカーピークを与えることがわかった。以後これらの強度データを用い検討を行った。

まず最初にデータセットの双晶率を、データセット毎に Britton plot から見積もった。図 2 に示すように plot は

図2 Britton plot と双晶率の決定 (Determining the degree of twinning by Britton plot)

実線は全データ、点線は $I > 10\sigma$ の反射を用いて計算している。矢印は実際に精密化された双晶率 (0.158) を示している。

鋭く立ち上がり、容易に双晶率を決定することができた。弱い強度の反射は誤差の割合が高くなるため、 10σ 以上の反射を利用したplotをすることによりさらに双晶率を見積もり易くなる。 10σ 以上の反射を利用して求められた双晶率は、全反射を用いたplotの立ち上がりと同じである。plotの立ち上がりから双晶率を見積もる方法は、Reynoldsらが推奨する方法と同様である。¹⁵⁾

最初の双晶率の精密化は分解能 $5\text{\AA}$ までの反射を用いて行った。しかし、双晶率が0.33を越えるデータセットにおいて、強度分離の計算を行った後でもなお、負と見積もられる反射が多く発生した。そこで、Britton plotから約0.33以下の双晶率であると推定される16のデータセットを抽出し、精密化を行った。これは単一格子から

表1 (a) スケール因子 (G) の精密化 (The refinement of scale factors)

Data No.	G	$\sigma(G)$	$R(\%)$
1	1.350	0.005	6.9
2	1.623	0.005	6.1
3	0.486	0.002	6.2
4	0.578	0.003	5.5
5	0.957	0.004	6.2
6	0.555	0.002	4.9
7	0.415	0.003	7.1
8	0.835	0.003	4.2
9	0.631	0.003	4.9
10	0.433	0.003	4.5
11	0.637	0.003	4.7
12	0.415	0.002	7.1
13	0.561	0.003	5.6
14	0.459	0.002	7.1
15	0.358	0.002	6.8
16	3.780	0.003	1.6
Overall R factor = 4.4%			

表1 (b) 双晶率 (α) の精密化 (The refinement of degrees of twinings)

Data No.	α			$R(\%)$	Nref_zero ³	*4
	Initial ¹	Final ²	$\sigma(\alpha)$			
1	0.10	0.08	0.05	6.2	2	0
2	0.21	0.21	0.03	4.9	2	0
3	0.10	0.09	0.04	5.9	2	0
4	0.21	0.75	0.03	4.6	44	0
5	0.04	1.00	0.05	5.5	0	0
6	0.20	0.81	0.03	4.0	4	0
7	0.13	0.12	0.04	6.6	18	0
8	0.33	0.67	0.02	3.3	22	0
9	0.33	0.35	0.02	4.2	64	4
10	0.32	0.34	0.02	4.3	70	8
11	0.33	0.65	0.02	3.7	58	2
12	0.16	0.11	0.04	6.7	0	0
13	0.31	0.36	0.02	5.3	182	12
14	0.28	0.29	0.02	6.3	36	4
15	0.28	0.30	0.02	6.8	38	2
16	0.24	0.36	0.02	4.1	4	0
Overall R factor = 4.9%						

1. Britton plotから見積もられた双晶率
2. 精密化後の双晶率
3. 強度分離後の強度が負となる反射数
4. $I > 10\sigma$ の反射だけを用いた場合の、強度分離後の負の反射数

の強度を見積もる (2) 式の性質上、双晶対称の関係にある2点の強度の割合が50%に到達すると、不定になってしまうことに起因する。直感的には、(2) 式の分子における強度の差分に含まれる誤差が、分母の値が小さくなることにより増幅されてしまうことを意味する。このため双晶率が0.5に近づけば近づくほど式の信頼性が無くなり、完全に割合が同じ、つまり双晶率が0.5の場合には解けなくなる。

表1aに、1段階目のスケール因子の精密化の結果を示す。全体の R 値は4.4%に収束し、データセット毎に計算された R 値は1.6~7.1%であった。続いて双晶率の精密化を行った。手系の修正をし再度精密化を行ったところ、4536の独立な反射に対し全体の R 値は5.0%と、単結晶における同一データ間の一致度に匹敵すると評価できるまでに収束した。最終結果は表1bにまとめた。 R 値は十分収束したが、やはり0.3~0.7までの双晶率のデータセットに関しては負の反射の発生率が高い。同様の計算を 10σ 以上の反射に限定して行くと、ほとんど負の反射は生じない。双晶率を求める際には信頼性のある反射のみを利用した方が得策かもしれない。

この2段階最小二乗法による強度分離の効果は、重原子との差パターン図によって評価することができる。図3のように鏡面対称となっていたピークの片方が、強度分

図3 強度分離前後のハーカー面 ($w = 1/2$) (The Harker sections ($w = 1/2$) before and after detwinning)

- (a) 強度分離前. クロスで示したピークが鏡像ピーク.
- (b) 強度分離後.

離を行うことにより消失していることが明瞭にわかる。

6. HAO 結晶の双晶構造と、放射光の利用による単結晶成分の回折データの収集

ここに紹介した2段階最小二乗精密化は、データセットの評価を簡単に行うことができる。この双晶率決定法をさまざまなデータセットに対して適用した結果、HAO

表2 同一結晶から測定されたデータセットの比較¹
(Comparison of data sets collected from an identical crystal)

	crystal_1		crystal_2		crystal_3	
Data	A-1	A-2	B-1	B-2	C-1	C-2
Resolution (Å)	4.0	4.0	3.5	3.5	3.5	3.5
R _{sym} (%) ²	6.5	7.1	7.6	8.1	7.5	8.6
Peakheight (%) ³	77	99	99	96	83	88
Degree of twinning(α)	0.37	0.45	0.47	0.35	0.09	0.17

1. 同じアルファベットのラベルは、同じ結晶から測定されたデータセットを示す。
2. $R_{\text{sym}} = 100 \sum |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum I_i$
3. 自己回転関数における双晶対称ピークの高さ。原点を100とする。

図4 HAOの双晶結晶構造 (The twinned structure of HAO crystal) 矢印のラベルは表3に対応している

表3 X線照射位置による強度分布の変化 (Intensity data statistics at different incident positions of X-ray beam)

Data ¹	SR1	SR2	SR3	SR4
R _{sym} (%) ²	5.7	4.0	4.2	5.3
Scale factor (G)	1.36	0.95	0.91	0.82
R _{merge} before detwinnig (%) ³	28.1	23.2	18.5	45.5
R _{merge} after detwinnig (%)	3.4	3.3	2.2	3.8
Degree of twinning (α)	0.00	0.06	0.62	0.98

1. データセットラベルは図6と同様
2. $R_{\text{sym}} = 100 \sum |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum I_i$, 分解能40~3.0Åまでのフレーム間の等価反射に対して計算
3. $R_{\text{merge}} = 100 \sum |I_i - \langle I_i \rangle| / \sum I_i$, 分解能100~5.0Åまでのデータセット間の等価反射に対して計算

結晶特有の双晶構造を明らかにすることができた。この考察を基に、放射光の細くて強いビームを利用して双晶率の異なる位置からの回折強度データを収集することが可能になり、ほぼ単結晶成分からの強度データを収集することができた。

表2は、同一の結晶から測定された二つのデータセットを比較している。これは同一結晶においてさえ、結晶中での位置により双晶率が異なっていることを示している。そこで、位置による双晶率の変化を観測するために、図4のようにX線照射位置を変えて強度測定を行った。この測定のためには光束が細く、輝度の大きなX線を必要とするため、測定はすべて放射光実験施設BL-6Aを利用した。結果は表3に示している。これらのデータセットは当初まったく一致せず、最大で45%もの不一致が見られた。これに前述の精密化を適用し強度分離をした結果、2.2~3.8%の誤差で一致した。見積もられた双晶率の変化は非常に興味深いもので、c軸に沿って双晶率が変化していた。以上の結果から、このHAO双晶結晶は図4のようにc軸に関して互いに逆方向を向いた二つの結晶ドメインから形成されていることが示唆された。放射光を利用し結晶の先端部分のみにX線を照射することができれば、片方の単結晶成分による回折強度を測定できると予想された。

7. 構造解析と双晶形成

以上の結果を基にHemihedralなHAO結晶の強度分離に成功し、多重重原子同型置換法により分解能2.8Åでの構造決定に成功した。図5に決定された分子構造を示し

図5 ヒドロキシルアミン酸化還元酵素の分子構造 (Molecular structure of hydroxylamine oxidoreductase)

図6 HAO結晶の分子パッキング (Crystal packing of HAO in relation to twinning)

- (a) 太線と細線は3量体分子を表している。分子A, A', 分子B, B', 分子C, C'が集合体を作っている。分子A, A'に対して分子B, B'が結晶対称によって関係付けられる分子。点線で囲ったところが集合体間の接触部位。非結晶学的2回回転軸(NCS軸)はc軸に垂直に走っている。
- (b) 分子の並びを模式的に表したもの。分子C, C'が図のように並進すると、分子B, B'と分子C, C'との位置関係は分子B, B'と分子A, A'との位置関係と同じになる。

た。大きさは大体 $100\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 100\text{\AA}$ で、にんにくのような形状をしている。主に α ヘリックスから構成され、ヘムを包み込む3量体構造、24個のヘムの特徴的なリング構造、ヘムのクラスター構造、新規ヘムP460の構造など、HAOの機能を解明する多くの知見を明らかにすることができた。¹⁾

決定された結晶構造からHAOの双晶形成が推論できる。結晶中の分子パッキングを図6に示す。分子は結晶中で非結晶学的2回対称(NCS)の関係にある分子と一つの集合体を作り、その集合体がc軸に平行な2回らせんで関係付けられている。らせんの方向は集合体同士の相対位置で決定される。集合体間の接触は、NCS軸1とNCS軸2で代表される二つの様式があり、1, 2, 1, 2というようにらせんを作っていく。集合体内で分子は2回回転対称で関係付けられているため、二つの接触様式は非常に似かよっている。実際、NCS軸がa軸から30度の方向に $12.9\text{\AA}$ 並進するともう一つの様式になる。図6(b)のように、分子C, C'が平行移動してNCS軸2がNCS軸1と同じような相対位置になると、分子Bと分子C'の関係と分子B'と分子Aの関係が同じになり、そこを起点に

成長した結晶は双晶結晶となる。集合体が少し並進するだけで双晶対称の関係に変わるのである。ふたつの2量体の間には溶媒と易動のC末ドメイン(現在まだモデルを組むことができていない)があるので、この相対的な配置は簡単に変化できる。

非常に類似した分子間のパッキングと非結晶学的2回回転軸の存在が、双晶性を生んでいることは想像に難くない。これはタンパク質が結晶成長中に双晶を形成してしまう最も一般的な原因ではないかと考えられる。同様の解析例も報告されている。^{6), 7)} また、報告されているタンパク質双晶のほとんどが、非結晶学的2回軸を有していることもこの推論を支持するだろう。^{7), 8), 10), 15), 16)}

8. おわりに

本稿ではHAOの解析を例にとり、双晶結晶の評価、取り扱いについて解説し、双晶がどのように形成されるかについて報告した。双晶という現象は結晶解析には障害となることが多い。報告されている例は氷山の一角であろう。双晶と気づかずに闇に葬り去られた結晶もあるだろう。クロスベクトルがどうしても見つからない、相同

性は非常に高いのに分子置換の解が見つからない等の場合、双晶が一つの可能性として存在する。こういう現象もあるということが少しでも頭にあれば、双晶かどうかの判別は容易につく。ここで紹介した Britton plot は簡便に双晶を判断できるし、本稿では詳しく紹介しなかったが、強度の分布関数も、強度データが良質な場合には非常に効果的である。すべての情報は必ず強度データに含まれているのである。

本研究は東京工業大学・生命理工学部・田中信夫教授の指導のもと、筆者が在学中に行われたものである。田中研究室、共同研究者の福森研究室の皆様へ感謝致します。

本研究の一部は、科学研究費補助金（特別研究員奨励費）および TARA 坂部プロジェクトの援助により行われた。

文 献

- 1) N. Igarashi, H. Moriyama, T. Fujiwara, Y. Fukumori and N. Tanaka: *Nature Struct. Biol.* **4**, 276-284 (1997) .
- 2) D. Britton: *Acta Cryst.* **A28**, 296-297 (1972) .
- 3) N. Igarashi, H. Moriyama, T. Mikami and N. Tanaka : *J. Appl. Cryst.* **30**, 362-367 (1997) .
- 4) R. W. Cahn: *Adv. Phys.* **3**, 363-445 (1954) .
- 5) E. Koch: *International Tables for Crystallography, Vol. C*, pp. 10-14. Dordrecht: Kuwer Academic Publishers. (1992) .
- 6) W. Kabsch: *J. Appl. Cryst.* **21**, 916-924 (1988) .
- 7) G. Lu, Y. Lindqvist and G. Schneider: *Acta Cryst.* **D51**, 13-20 (1995) .
- 8) J. Liang, S. Ealick, C. Nielsen, S. L. Schreiber and J. Clardy: *Acta Cryst.* **D52**, 207-210 (1996) .
- 9) S. E. Lietzke, V. E. Carperos and C. E. Kundrot: *Acta Cryst.* **D52**, 687-692 (1996) .
- 10) D. C. Rees: *Acta Cryst.* **A36**, 578-581 (1980) .
- 11) P. Murray-Rust: *Acta Cryst.* **B29**, 2559-2566 (1973) .
- 12) M. R. Redinbo and T. O. Yeates: *Acta Cryst.* **D49**, 375-380 (1993) .
- 13) F. X. Gomis-Rüth, A. Fita, R. Kiefersauer, R. Huber, F. X. Avilés and J. Navaza: *Acta Cryst.* **D51**, 819-823 (1995) .
- 14) R. G. Fisher and R. M. Sweet: *Acta Cryst.* **A36**, 755-760 (1980) .
- 15) R. A. Reynolds, S. J. Remington, L. H. Weaver, R. G. Fisher, W. F. Anderson, H. L. Ammon and B. W. Matthews: *Acta Cryst.* **B41**, 139-147 (1985) .
- 16) A. Goldman, D. L. Ollis and T. A. Steitz: *J. Mol. Biol.* **194**, 143-153 (1987) .
- 17) K. K. Anderson, T. A. Kent, J. D. Lipscomb, A. B. Hooper and E. Munck: *J. Biol. Chem.* **259**, 6833-6840 (1984) .
- 18) D. M. Arciero and A. B. Hooper: *J. Biol. Chem.* **268**, 14645-14654 (1993) .
- 19) L. A. Sayavedra-soto, N. G. Hommes and D. J. Arp: *J. Bacteriol.* **176**, 504-510 (1994) .
- 20) R. H. Erickson and A. B. Hooper: *Biochim. Biophys. Acta* **275**, 231-244 (1972) .
- 21) T. Yamanaka and M. Shinra: *J. Biochem.* **75**, 1265-1273 (1974) .
- 22) T. Mikami, N. Tanaka, T. Sato, H. Moriyama, M. Numata, T. Fujiwara, Y. Fukumori, T. Yamanaka, M. Sato, K. Kakiuchi, Y. Katsube and S. Kishimoto: *J. Biochem.* **110**, 681-682 (1991) .
- 23) B. W. Matthews: *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497 (1968) .
- 24) W. C. Hamilton, J. S. Rollett and R. A. Sparks: *Acta Cryst.* **18**, 129 (1965) .
- 25) M. Sato, M. Yamamoto, K. Imada, Y. Katsube, N. Tanaka and T. Higashi: *J. Appl. Cryst.* **25**, 348-357 (1992) .
- 26) N. Sakabe, N.: *Nucl. Instrum. Methods* **303**, 448-463 (1991) .
- 27) N. Sakabe, S. Ikemizu, K. Sakabe, T. Higashi, A. Nakagawa, N. Watanabe, S. Adachi and K. Sasaki: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1276-1281 (1995) .

プロフィール

五十嵐教之 Noriyuki IGARASHI
高エネルギー加速器研究機構, 物質構造科学研究所, 物質科学第2研究系, 〒305 つくば市大穂 1-1
e-mail: noriyuki.igarashi@kek.jp
最終学歴: 東京工業大学 生命理工学研究科 バイオサイエンス専攻博士課程修了
専門分野: 蛋白質結晶学, 構造生物学
現在の研究テーマ: 多ヘム電子伝達酵素の構造研究
趣味: スポーツ. 最近はめっきりスポーツ観戦.

森山英明 Moriyama Hideaki
東京工業大学 生命理工学部, 〒226 横浜市緑区長津田町 4259
TEL. 045-924-5710
e-mail: hmoriyam@bio.titech.ac.jp