最近の研究から

完全行列最小二乗法によるリゾチームの結晶構造精密化

生命工学工業技術研究所 原田一明

Kazuaki HARATA: Full-Matrix Least-Squares Refinement of Lysozyme Crystal Structures

Crystal structures of turkey and human lysozymes were refined at atomic resolution by full-matrix least-squares method with anisotropic temperature factors. The refinement converged at the R-value of 0.104 for turkey lysozyme and 0.115 for human lysozyme at 1.12 Å and 1.15 Å resolution, respectively, and the estimated r.m.s. coordinate errors for respective proteins were 0.031 Å and 0.034 Å. The magnitude and the degree of anisotropy of the atomic thermal motion have strong positive correlation with the square of distance from the molecular centroid. The statistical analysis suggested that such characteristics of anisotropic thermal motion are ascribed to the rigid-body rotation and local motions rather than the breathing motion.

1. はじめに

低分子化合物の結晶構造の解析においては、通常は異方性温度因子を用いた完全行列最小二乗法による精密化が行われている。他方、多くのタンパク質結晶では、高分解能X線回折データが得られずデータ数が少ないために、精密化すべきパラメーターの数に対するデータ数の比を考慮して等方性温度因子を用いている。また、精密化における個々の原子パラメーターの精度が低く、原子座標を独立に精密化すると非現実的な結合距離や結合角が生じることから、それを避けるために、結合距離、結合角、非結合原子間距離等が正常な値となるような束縛を加えての精密化が必要である。1万を越えるパラメーターによる最小二乗法計算を行うことは通常のコンピューターやワークステーションの能力を越えるため、計算方法としてはconjugate gradient アルゴリズムによる解法¹⁾やエネルギー最小化による最適化法²⁾を用いた精密化が一般的である。これらの方法により分子量数十万のタンパク質でもワークステーション上で容易に精密化の計算を行うことができるため、ほとんどのタンパク質の解析に利用されてきた。

さて、結晶学的には低分子結晶もタンパク質結晶も本質的な違いがあるわけではなく、構造解析における違いは技術的なものである。最近の解析技術の発展は低分子とタンパク質との間の溝を徐々に埋めつつあり、直接法によるタンパク質構造の解析の成功例、完全行列最小二乗法による構造の精密化等が報告されるようになってきた。とりわけ、放射光のような高輝度光源の利用と、イ

メージングプレートのような高感度かつ広い受光面積を有するX線検出器の出現が、高分解能データの迅速な測定を可能にした。高分解能データを用いたタンパク質結晶構造の精密化の例³⁾⁻⁹⁾を表1に示してある。我々は、リゾチームの結晶が atomic resolution, ultra high-resolution と呼ばれる高分解能領域までX線回折像を与えることから、可能な限りの高分解能のデータ測定を行い、低分子結晶の精密化に近い条件で構造を精密化することを試みてきた。タンパク質の高分解能データ測定においては、結晶を冷却してX線照射に対する安定性と測定可能な分解能を上げることが行われているが、我々は、タンパク質の構造、機能、分子運動の関心に主たる興味があり、したがって、タンパク質が活性を保持できる室温に近い条件でデータの測定を行っている。ここでは、ヒトおよび七面鳥のリゾチームのデータ測定と構造の精密化⁹⁾を中心に最近の結果を紹介したい。

2. 結晶の調製とデータの測定

X線回折データの測定に用いる結晶を作製するにあたっては、最も望ましい結晶の形や大きさは測定手段、例えば、放射光を用いるか、通常の実験室での測定であるか、また、測定に用いる回折計の種類や測定法によっても異なるであろう。表1では、筆者らの場合とcrambin以外はすべて放射光を用いてイメージングプレートによりデータ測定が行われている。筆者らは、X線源としては、Nonius社のFR571回転陽極型X線発生装置(スポットサイズ 0.2 mm, 通常出力は 40kV, 40~50 mA)を用い、回折計としてはFAST型TVデテクターを使用し

表1 異方性温度因子を用いたタンパク質高分解能精密化の例 (Protein structures refined with anisotropic temperature factors at atomic resolution.)

	分解能	温 度	R	方 法	文 献
Crambin	0.83	130K	0.104	FMLS	3
Ribonuclease					
native	1.2	r.t.	0.106	CGLS	4
GMP complex	1.2	r.t.	0.109	CGLS	4
Photoreactive yellow protein					
In dark	0.82	149K	0.125	CGLS	5
In light	0.85	149K	0.133	CGLS	5
Cutinase	1.0	r.t.	0.094	CGLS	6
Azurocidin	1.1	120K	0.159	CGLS	7
Lysozyme					
Hen (r.t.)	0.95	296K	0.105	CGLS	8
Hen (l.t.)	0.925	120K	0.090	CGLS	8
Turkey	1.12	285K	0.104	FMLS	9
Human	1.15	285K	0.115	FMLS	9

FMLS: 完全行列最小二乗法。

CGLS: conjugate gradient最小二乗法。多くの場合、最後の段階で誤差を計算するためにブロックマトリックス最小二乗法を行っている。

ている。そして、グラフィットのモノクロメーターで単色化したX線を0.4 mmのコリメーターを通したものを入射光として用いている。データ収集は振動法であるが、積分範囲が 0.1° 前後であるので結晶とデテクター間の距離がかなり短くても隣接する反射の重なる確率は少ない。したがって、結晶中のX線の透過する部分の体積が大きいほど積分強度が大きくS/N比が向上すると考えると、高分解能データを測定するためにはできるだけ大きい結晶を用いることが望ましい。

結晶の調製はバッチ法で行った。七面鳥リゾチームの場合は、2 mlの10% 1-プロパノール水溶液に100 mgのタンパク質を溶解し、5 mlの3M硫酸アンモニウム水溶液を攪拌しつつゆっくりと加える。溶液のpHを0.1M硫酸を用いて4.2に調製し、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過する。濾液を1 mlずつの容器に分割し、それぞれにあらかじめ作製しておいた小さな種結晶を加えた後、プラスチックの容器に入れて密封し静置する。2～3週間で細長い板状結晶が得られる。大きなものは長さ2 mm、幅0.8 mm、厚さ0.3 mm程度に成長する。他方、ヒトリゾチームの場合は、バッチ式蒸気拡散法を用いた。10 mM酢酸バッファーでpH4.5に調製した3M硝酸アンモニウム溶液にタンパク質を加えて2%溶液とし、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過した後、50 μl ずつマイクロブリッジ上に分割する。それぞれに種結晶を加えた後、リザーバー溶液として5 M硝酸アンモニウム溶液とともにプラスチック容器内に密封して1ヶ月程静置する。棒状または厚い板状結晶が得られ、大きいものは長さ2 mm、幅1 mm、厚さ0.3 mm程度に成長する。

結晶はガラスの毛細管に封入して測定を行った。測定温度は 12°C ～ 13°C であり、デテクターのノイズレベルを低くするために、防X線カバーの内部全体がこの温度に保たれている。この温度条件で結晶はX線照射に対して4～5

日間安定であり、1個の結晶で全データを測定することができた。デテクターの面積が小さく1回のセッティングで 2θ の全領域をカバーすることはできないために、まず、 $2\theta = 60^\circ$ で高分解能領域を測定し、 $2\theta = 30^\circ$ で低分解能側を測定した。七面鳥リゾチームの場合、結晶とデテクターとの間の距離を45 mmとした時に $1.12\ \text{\AA}$ 分解能までのデータを測定することができた。また、ヒトリゾチームでは50 mmで $1.15\ \text{\AA}$ 、ニワトリリゾチームの三斜晶系結晶では35 mm、 $2\theta = 65^\circ$ で $1.0\ \text{\AA}$ 分解能まで測定できた。デテクターを高角側にセットした場合は、デテクターの上下に測定不能領域が生じるため、結晶の向きを変えて再度測定する必要がある。また、結晶、ガラス管、結晶母液によるX線の吸収、結晶の回転に伴うX線透過部分の体積の変化は測定データに系統誤差を与えることが予想される。そのような誤差を補正するためには、できるだけ多くの等価な反射を異なった方向から測定したデータを用いて統計的に処理する必要がある。筆者らは、 (χ, ϕ) のセッティングについて、少なくとも、(0, 0), (90, 0), (90, 90)の3種類の異なったセッティングで測定し、単斜晶系と三斜晶系の場合には更に(45, 0)のセッティングで測定したものをマージしている。ただし、ゴニオメーターの構造上、(0, 0)以外のセッティングでの ω の回転領域は 50° ～ 100° に制限される。これにより、通常は5個以上の等価な反射を測定することができる。

筆者らの用いている回折計のソフトウェア¹⁰⁾はマージのためのプログラムを含んでいないため、独自に作製したプログラムを用いてマージを行っている。まず、測定データを ω の値に沿って 5° ～ 10° の範囲ごとに分割し、それぞれのセットに含まれる等価な反射を平均する。 R_{sym} の値は、通常は低角側で3%前後、高角側で5%前後である。そして、1000～3000個のデータを含む100～200個のセットについてスケール因子と等方性温度因子の差

を最小二乗法により決定し、それを用いて補正したデータをマージする。R_{merge} は七面鳥リゾチームで4.3 %、ヒトリゾチームで5.4 %であり、completeness は86 %および92 %であった。また、2個以上の結晶を用いる場合には、結晶の向きを変えてマウントして測定し、まず結晶毎にマージを行い、結晶間のマージには温度因子として異方性のパラメーターを用いる。結晶間のR_{merge} の値が結晶内に比べて大きい場合は各々のデータにかなりの系統誤差の存在する可能性がある。ニワトリリゾチームの場合は3個の結晶を用い、各々のR_{merge} が、4.3 %、4.2 %、3.6 %、3個の結晶についてのR_{merge} は3.0 %であった。¹¹⁾

3. 精密化

構造の精密化においては、七面鳥リゾチームの場合は1.3 Å分解能の構造 (PDB 1LZ3),¹²⁾ ヒトリゾチームは1.5 Å分解能の構造 (PDB 1REX)¹³⁾ を出発構造として用いて、まず、X-PLOR²⁾ による予備的な精密化を行った。X線回折データは、七面鳥リゾチームが10-1.12 Å分解能、ヒトリゾチームは10-1.15 Å分解能でそれぞれF > 2σのデータを用いた。七面鳥リゾチームにおいては、Asn59, Ser85, Ser100の3残基の側鎖にdisorderが見い出された。205個の水分子の座標を含むモデルに対するR値は18.0 %, R_{free} 値は23.5 %となった。ヒトリゾチームの場合は、disorderとみられる側鎖が14残基あり、139個の水分子の座標と、7個の硝酸イオンを含むモデルに対するR値は19.3 %, R_{free} 値が21.4 %となった。

次いで、SHELXL-93¹⁴⁾ を用いて最小二乗法による構造の精密化を行った。ただし、最終的に構造モデルが確定

表2 回折データの測定と精密化の結果 (Summary of data collection and structure refinement.)

	七面鳥リゾチーム	ヒトリゾチーム		
空間群	$P2_1$	$P2_12_12_1$		
格子定数 a	38.08Å	57.05Å		
b	33.29	60.96		
c	46.19	32.96		
β	110.17°			
測定データ	113,334	172,458		
独立なデータ	36,320	39,326		
R_{merge}	0.043	0.054		
分解能	22.3-1.12Å	25.9-1.15Å		
パラメーター数	10,631	11,279		
R (全データ)	0.104	0.115		
($F > 4\sigma$)	0.092	0.097		
Shift/ESD (最大)	0.282	0.262		
(平均)	0.007	0.016		
束縛パラメーターと結果				
	七面鳥リゾチーム		ヒトリゾチーム	
Restraints	Sigma	Mean deviation	Sigma	Mean deviation
DFIX	0.020	0.013	0.020	0.013
CHIV	0.150	0.080	0.150	0.081
FLAT	0.266	0.216	0.189	0.197
DELU	0.030	0.020	0.030	0.020
SIMU	0.129	0.034	0.195	0.042
ISOR	0.300	0.140	0.300	0.140

するまでは計算時間を短縮するために conjugate gradient 法による計算を行った。構造モデルの化学構造を適正に保つために、束縛条件として DFIX (結合距離, 結合角に対する束縛), CHIV (不斉構造を保持するための束縛), FLAT (平面構造を保つための束縛) を用い、異方性温度因子を適切な値に保つために DELU (結合原子対の結合に平行な成分を等しく保つための束縛), SIMU (隣接する原子の熱振動楕円体の形状の類似性を保持するための束縛), ISOR (熱振動楕円体モデルを保持するための束縛) を適用した (表2)。また、均質な溶媒領域からの散乱の影響を補正するためのパラメーターとして SWAT を用いた。七面鳥リゾチームの場合、等方性温度因子を用いた計算でR因子は16.9 %まで減少した。異方性温度因子の導入は、原子座標が十分収れんした段階で行い、主鎖, disorder のない側鎖, disorder のない溶媒分子, disorder 部分の順で各々の段階での収れん状況を見ながら行った。異方性温度因子の導入により、R値が減少するとともに電子密度図のノイズレベルが減少し, disorder や溶媒分子の電子密度がより明瞭となった。新たに Arg21 と Arg128 に disorder が見出され、20個あまりの水分子の電子密度がノイズであったことが判明した。水分子の disorder に関しては、電子密度のピークが明瞭に分離しているものでピーク間距離が2.5 Å以下の場合を考慮した結果、14個の disorder が明らかになった。水分子の占有率は温度因子と相関が強く、交互に精密化した場合でも収れんしない水分子がかなりあったため、すべての水分子の座標と温度因子が収れんした段階で1回のみの精密化を行い以後はその値を使用した。水分子のパラメーターがほぼ収れんした段階でブロックマトリックス最小二乗法に移行し、収れん状況を見ながら1ブロックの残基数を15, 30, 45の順に増やしてゆき最後に完全行列による最小二乗法計算を行った。全データを用いた最終のR値は10.4 %, R_{free} の計算に10 %のデータを用いた場合はR値が10.3 %, R_{free} 値が14.0 %であった。shift/esdの最大値と平均値はそれぞれ0.28 および0.007であり、Fo-Fc 電子密度の最大値と最小値および平均値は0.26, -0.20, 0.04 eÅ⁻³であった。

ヒトリゾチームの場合、等方性温度因子を用いた精密化ではR値が17.9 %であった。七面鳥リゾチームと同様な方法で徐々に異方性温度因子を導入しつつ精密化を進めたところ、14残基の disorder のうち8残基は disorder ではないことが判明した。150個の水分子のうち disorder が14個であった。最後に完全行列最小二乗法を行ったところ、R値は全データに対して11.5 %, 10 %のデータをR_{free} の計算に用いた場合にはR値が11.2 %, R_{free} 値が15.7 %であった。shift/esdは最大値が0.26, 平均値が0.016となり、Fo-Fc 電子密度の最大値と最小値および平均値は0.25, -0.21, 0.04 e Å⁻³であった。

4. 結果の評価

最小二乗法による精密化の一つの利点はパラメーターの誤差が得られることである。X-PLOR に代表されるエネルギーの最小化による最適化法は誤差の計算ができないため、Luzzati プロット¹⁵⁾ のような方法でおおよその座標誤差が見積もられている。SHELXL-93 を用いた筆者らの精密化の計算においては、結合距離と結合角に束縛が課せられているので、それらに対する誤差の計算は意味をなさないが、各々の原子パラメーターに対する誤差は解析の精度を評価する上で有用である。また、shift/esd の値から、最小二乗法の収れんの状況を判断することができる。全原子の

図1 七面鳥リゾチーム（実線）とヒトリゾチーム（波線）の主鎖の座標パラメーターの esd 値の残基毎の平均のプロット。(Plot of averaged esds of main chain coordinates for each residue of turkey lysozyme (solid line) and human lysozyme(dashed line).)

図2 X-PLOR による精密化後（左）と SHELXL-93 による精密化後（右）のヒトリゾチーム Tyr63 残基の 2Fo-Fc 電子密度。X-PLOR 使用時には disorder を仮定して精密化を行った。(Electron density of Tyr63 of human lysozyme after the X-PLOR refinement(left) and SHELXL-93 refinement (right). A disordered structure was assumed in the X-PLOR refinement.)

座標パラメーターに対する esd 値の平均は七面鳥リゾチームで 0.031 Å, ヒトリゾチームで 0.034 Å であった。主鎖の部分について esd を残基ごとに平均してプロットしたものを図1に示す。esd のペプチド当たりの平均値は七面鳥リゾチームに比べてヒトリゾチームの方がやや大きい、いずれの場合もほとんどが 0.01 ~ 0.02 Å の範囲内である。X-PLOR で等方性温度因子を用いた場合の結果と比較すると、2つの構造を重ね合わせて C α の座標を比較する限りでは r.m.d. 値は七面鳥リゾチームが 0.078 Å, ヒトリゾチームが 0.069 Å であることから、主鎖の構造は精密化の方法の違いによる影響をほとんど受けないことがわかる。比較的大きな違いとしては、七面鳥リゾチームの2本の β 鎖をつなぐループ部分である 46-48 残基が約 0.3 Å ずれている程度である。

異方性温度因子を導入することによる最も大きな効果は、構造モデルと電子密度との一致が向上し、ノイズレベルが低下するため電子密度図がより明瞭になることである。例えば、ヒトリゾチームの Tyr63 の側鎖は 1.5 Å 分解能の解析では disorder と考えられており、筆者らの X-PLOR を用いた精密化の段階でも、disorder を考えたモデルの方が妥当と思われた。しかしながら、SHELXL-93 による精密化の段階で、図2に示すように disorder が存在しないことが確認された。また逆に、七面鳥リゾチームの場合は2残基について disorder が新たに見出された。タンパク質の周りの溶媒分子の様子を図3に示した。水分子の場合は、電子密度図からも明らかなように大部分は球対称ではない。したがって、等方性温度因子のモデルよりも異方性温度因子のモデルに対してよりフィットすることは明らかである。

ヒトリゾチームの C α 原子の温度因子を楕円体で表示した構造を図4に示す。異方性温度因子パラメーターの誤差を主鎖残基ごとの平均としてプロットしてみると、大部分は 0.008 ~ 0.02 Å² の範囲である (図5)。温度因子の

図3 熱振動楕円体で表したヒトリゾチーム結晶中の溶媒分子の立体図。(Stereo-drawing of solvent molecules in the crystal of human lysozyme represented with thermal ellipsoids.)

図4 C α 原子を熱振動楕円体で描いたヒトリゾチームの主鎖の構造の立体図。(Stereo-drawing of the backbone structure of human lysozyme. C α atoms are drawn with thermal ellipsoids.)

図5 七面鳥リゾチーム（実線）とヒトリゾチーム（波線）の主鎖の温度因子パラメータのesd値の残基毎の平均のプロット。(Plot of averaged esds of main chain thermal parameters for each residue of turkey lysozyme (solid line) and human lysozyme (dashed line).)

大きさを B_{eqv} で見た場合、七面鳥リゾチームではタンパク質全原子の平均値が $18.2 \text{ \AA}^2$ 、主鎖の原子の平均値が $15.1 \text{ \AA}^2$ であった。これらの値はX-PLORによる精密化後の B_{iso} の値である $14.4 \text{ \AA}^2$ 、 $12.5 \text{ \AA}^2$ に比較してかなり大きい。同様の傾向はヒトリゾチームにおいても見られ、対応する B_{eqv} が $19.6 \text{ \AA}^2$ 、 $16.1 \text{ \AA}^2$ であり、 B_{iso} が $15.6 \text{ \AA}^2$ 、 $12.9 \text{ \AA}^2$ であった。この原因としては2点が考えられる。第1は、 B_{eqv} は異方性温度因子のテンソルの固有値の平均に相当するため異方性が大きくなると相対的に大きくなる傾向にあることである。第2の原因としては、SHELXL-93が溶媒領域からの散乱の補正に用いているパラメータであるSWATの吸収補正の効果が考えられる。SWATの導入により、大きな結晶をCuK α 線で測定する場合に起こる低角側の回折強度の減少が補正されるために温度因子が大きくなるものと思われる。温度因子、とりわけ異方性温度因子は測定

図6 ヒトリゾチームのC α 原子の B_{eqv} 値の分子の重心からの距離の二乗に対するプロット。(Plot of B_{eqv} of C α atoms of human lysozyme against the square of the distance from the center of gravity.)

データの系統誤差の影響を受けやすいため、温度因子を問題にする場合にはできるだけ系統誤差を補正しておく必要がある。系統誤差をチェックする方法はX-PLORでoverall Bを異方性のパラメータを用いて計算することである。このパラメータで補正できるような系統誤差が存在し、かつ構造モデルが正しい場合はR値は減少するであろう。

タンパク質分子における温度因子の特徴を調べるために、幾つかの統計的な解析を行った。タンパク質の温度因子は分子の中心からの距離の二乗と強い相関のあることはよく知られている。C α 原子の B_{eqv} の値をプロットしたのが図6である。また、原子の熱振動の異方性を評価するためのパラメータとして異方性因子(fanis)を次のように定義して計算した。

$$f_{anis} = [(V_{11} - B_{eqv})^2 + (V_{22} - B_{eqv})^2 + (V_{33} - B_{eqv})^2]^{1/2} / B_{eqv}$$

ここで V_{11} 、 V_{22} 、 V_{33} は異方性温度因子のテンソルの固有値である。図7に示すように f_{anis} もまた分子の中心からの距離の二乗と正の相関のあることがわかる。このことは、分子の外側ほど温度因子の異方性が大きいことを示している。このように温度因子の大きさと異方性が分子の中心から離れるにしたがって大きくなる現象の原因としては、分子内のローカルな運動の他に分子の伸縮運動(breathing motion)もしくは回転運動が考えられる。¹⁶⁾ 前者の場合には、分子の中心から各々の原子へのベクトルに平行な成分が表面付近ほど大きくなり、後者の場合は逆に垂直成分が大きくなることが予想される。平行成分の割合を示すパラメータとして f_{rad} を次の式により計算した。

$$f_{rad} = [(\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{V}_1)^2 + (\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{V}_2)^2 + (\mathbf{e}_0 \cdot \mathbf{V}_3)^2]^{1/2} / [(\mathbf{V}_1 \cdot \mathbf{V}_1) + (\mathbf{V}_2 \cdot \mathbf{V}_2) + (\mathbf{V}_3 \cdot \mathbf{V}_3)]^{1/2}$$

図7 ヒトリゾチームのC α 原子の熱振動の異方性因子の分子の重心からの距離の二乗に対するプロット。(Plot of anisotropy factor of thermal motion of C α atoms of human lysozyme against the square of the distance from the center of gravity.)

図8 ヒトリゾチームのC α 原子の熱振動の分子の重心からのベクトルに平行な成分の重心からの距離に対するプロット。(Plot of radial component of thermal motion of C α atoms of human lysozyme against the distance from the center of gravity.)

ここで、 e_0 は分子の中心から各々の原子への単位ベクトルである。この値を分子の中心からの距離に対してプロットすると図8のようになり、ほとんど相関がないことから、伸縮運動の寄与は小さいことが予想される。他方、図4のプロットから温度因子は $B_{\text{eqv}} = ar^2 + b$ のような関数にフィットさせることができるが、分子を剛体と見なした場合、右辺の最初の項は回転運動からの寄与、 b は並進運動からの寄与に相当する。¹⁶⁾ 剛体振動の解析によれば、温度因子のこのような特徴的な分布は主として回転運動と分子内のローカルな運動として説明されるが、詳細に関しては紙面の関係で省略する。

剛体運動が分子の見かけ上の結合距離、結合角の値に影響することは良く知られており、タンパク質のような大きな分子の場合はその影響も大きいことが予想される。

そのような分子運動は平均の電子密度を歪んだものとするため、電子密度の中心を原子の位置とする歪んだ構造から計算された結合距離や結合角は正常な値からずれたものとなる。したがって、正常な構造を保って精密化を行うためには束縛条件の導入が必要となる。結晶を冷却する等によって、分子の剛体振動やローカルな運動を無視できる程度に小さくしない限り、高分解能の解析であっても束縛条件をすべて外すことはできないであろう。また、束縛条件を導入して構造を適正に保つことは、構造が電子密度からずれることになり、その影響が温度因子に現れる。その結果、温度因子の楕円体モデルを保持するためには、温度因子パラメーターに対しても束縛条件の導入が必要になる。さらに、楕円体モデルでは、分子の回転運動や側鎖のriding motionによって生じる電子密度分布の歪みを完全に取り込むことはできないため、そのような場合は異方性温度因子を用いても十分に電子密度に構造モデルを合わせることはできず、したがって、R値は一定以下には下がらないであろう。原子座標とは異なり、精密化された温度因子が物理的・化学的に妥当なものであるかを定量的に判断する方法は確立されていない。例えば、束縛条件無しで精密化された温度因子が非常に異方性の高いものであった場合、熱振動とともに電子密度上では区別できないようなdisorderを含む可能性もある。ニワトリリゾチームの室温と低温での精密化の比較では、低温データを用いた場合により多くのdisorderが見出されている。⁸⁾ 異方性温度因子の妥当性をチェックする一つの方法としてrigid bond test¹⁷⁾があり、SHELXL-93ではDELUによってrigid bondの条件を満たすように温度因子を束縛することができる。タンパク質の機能は分子内運動と密接に関係しており、温度因子は分子内運動を解析するためのパラメーターとして重要であるが、その信頼性をどう評価するかは今後の課題である。

5. おわりに

以上、高分解能のX線回折データを用いた構造の精密化について筆者らの仕事を中心に概説したが、文献に記載されないようなノウハウ的なものを含めてという編集部要望があり、部分的に多少詳しく述べた。完全行列最小二乗法によるタンパク質結晶構造の精密化はまだあまり例が無く、分子量1万以上のタンパク質に関しては筆者らの報告が唯一のものと思う。最小二乗法はパラメーターの誤差を計算できる点で望ましいが、計算を行う上での最大の障害はコンピューターの計算時間である。最近のワークステーションは完全行列を作るための数GBのメモリーの搭載は容易であるが、計算速度を考えるとベクトル計算機が必要である。筆者らは、スーパーコンピューターのCRAY C90を用いているが、リゾチームの

完全行列最小二乗法の1サイクルに要する計算時間は約2時間である。精密化の段階ではconjugate gradientの手法を用い、最後に誤差を求めるためにのみブロックマトリックスの最小二乗法を計算するのも一つの方法であろう。

さて、このように高分解能データを用いる精密化によりどのような新たな情報が得られるかは大きな関心事である。まず、座標精度が向上するので、機能部位やリガンドの構造を精密に決定でき、機能に関与する構造の変化等をより詳しく検討できる。また、束縛なしで精密化した構造の結合距離や結合角の値から、束縛条件として用いている低分子化合物由来のパラメーターの適否を検討することができる。差フーリエ図より水酸基やカルボキシル基の水素原子を決定できれば、水素結合をその有無を含めてより厳密に決めることができる。ごく最近では、構造の精密化と合わせてペプチド鎖等の電荷密度の解析を行い、結合電子密度を構造因子計算に含めることによりさらに解析精度を上げることも試みられている。¹⁸⁾ 異方性温度因子を用いた精密化を行うことにより、原子の熱振動の大きさのみならず方向性を知ることができる。さらに、剛体モデルを用いた解析から結晶内の分子の剛体振動の様子を知ることができる。筆者らは、タンパク質分子の熱振動から剛体振動部分を差し引くことにより、分子の内部運動を見積もることを試みている。⁹⁾ タンパク質機能との関係を示す興味深い結果も得られているが、紙面の都合で割愛した。このように、タンパク質構造の精密解析からは、従来の構造解析の主たる目的であったタンパク質の生物機能に注目した解析のみならず物理的、化学的にも興味ある結果の得られることが期待される。

文 献

- 1) W.A. Hendrickson: *Methods Enzymol.* **115**, 252 (1985).
- 2) A.T. Brünger, J. Kuriyan, and M. Karplus: *Science* **235**, 458 (1987).
- 3) B. Stec, R. Zhou, and M. Teeter: *Acta Crystallogr. Sect. D* **51**, 663 (1995).

- 4) J. Sevcik, Z. Dauter, V.S. Lamzin, K.S. Wilson: *Acta Crystallogr. Sect. D*, **52**, 327 (1996).
- 5) U.K. Genick, S.M. Soltis, P. Kuhn, I.L. Canestrelli, and E.D. Getzoff: *Nature* **392**, 206 (1998).
- 6) S. Longhi, M. Czjek, V. Lamzin, A. Nicolas, and C. Cambillau: *J. Mol. Biol.* **268**, 779 (1997).
- 7) S. Karsen, L.F. Iversen, I.K. Larsen, H.J. Flodgaard, and J.S. Kastrup: *Acta Crystallogr. Sect. D* **54**, 598 (1998).
- 8) M.A. Walsh, T.R. Schneider, L.C. Sieker, Z. Dauter, V.S. Lamzin, and K.S. Wilson: *Acta Crystallogr. Sect. D* **54**, 522 (1998).
- 9) K. Harata, Y. Abe, and M. Muraki, *Proteins: Struct. Func. Gen.* **30**, 232 (1998).
- 10) A. Messerschmidt and J.W. Pflugrath: *J. Appl. Cryst.* **20**, 306 (1987).
- 11) Y. Abe, M. Muraki, M. Fujiwara, K. Ohbu, and K. Harata, submitted for publication.
- 12) K. Harata: *Acta Crystallogr. Sect. D* **49**, 497 (1993).
- 13) M. Muraki, K. Harata, N. Sugita, and K. Sato: *Biochemistry* **35**, 13562 (1996).
- 14) G.M. Scheldrick, SHELXL-93, Program for crystal structure refinement, University of Göttingen (1993).
- 15) V. Luzzati: *Acta Crystallogr.* **5**, 802 (1952).
- 16) M.J.E. Sternberg, D.E.P. Grace, and D.C. Phillips: *J. Mol. Biol.*, **130**, 231 (1979).
- 17) F.L. Hirshfeld: *Acta Crystallogr. Sect. A*, **32**, 239 (1976).
- 18) F. Benabicha, V. Pichon-Pesme, C. Jelsch, and C. Lecomte, Eighteenth European Crystallographic Meeting (1998), Abstract E6-P5.

プロフィール

原田一明 Kazuaki HARATA

生命工学工業技術研究所,

〒305-8566 茨城県つくば市東1-1

National Institute of Bioscience and Human-
Technology 1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566

Tel/Fax 0298-54-6194

E-mail: harata@nibh.go.jp

最終学歴: 名古屋大学大学院理学研究科修士課程
修了, 理学博士

専門分野: 構造生物学, 超分子化学

現在の研究テーマ: タンパク質の結晶構造, シクロ
デキストリン複合体の構造と機能