1. タンパク質結晶構造解析法の進展

MAD 法による構造解析の進展

東京工業大学大学院生命理工学研究科 熊坂 崇
理化学研究所播磨研究所 山本雅貴

Takashi KUMASAKA and Masaki YAMAMOTO: Development of Structure Analysis by MAD Method

The crystallographic phase problem had not been routinely solved in protein crystallography. Nowadays, MAD method is widely used for crystallographic determination of unknown protein structures, since the scope of MAD application has been extended by the use of synchrotron radiation facilities, protein expression techniques, and computational development. The method has paved the way to high-throughput structure determination of protein crystals and introduced to structural genomics study. We describe here a brief summary of MAD method and its experimental.

1. はじめに

構造ゲノミクスが現実のものとなった理由のひとつに、多波長異常分散 (Multiwavelength Anomalous Diffraction; MAD) 法¹⁻³⁾の進展によって新規構造のルーチン解析の見通しが立つようになったことが挙げられるだろう。この手法では、1つの結晶から得られる回折強度データで位相問題を克服することができる。このため、以前から使われている多重同形置換 (Multiple Isomorphous Replacement; MIR) 法にあった諸問題をクリアすることができ、直接法の適用が困難なタンパク質の結晶解析において、今やタンパク質の新規構造を解析する主要な方法として利用されている。この方法が近年劇的に普及した背景には、放射光やタンパク質誘導体作成、計算機技術などの周辺技術の発展がある。これを踏まえ、本稿では、本法の理論的背景と実際の適用についてまとめた。

2. 位相問題と MAD 法の原理

低分子量の化合物についての結晶解析には、いわゆる直接法が一般的に用いられている。高分解能の回折データと少ない原子数の試料については、確率論的なこの方法は有効であり、1つの結晶から得られた1セットの回折強度データがあれば、多くの場合構造が決定できる。しかし、タンパク質の場合は、分解能や原子数の問題から、ほとんどの場合でこの方法が適用できないため、異なる作戦で臨まねばならない。

すでにアミノ酸配列が類似なタンパク質の構造が明らかの場合、それを実測した結晶の格子内に配置する問題である分子置換法は、1セットの回折強度データがあれば適用可能である。しかし、構造の類似性や分解能、単位格子

中の分子数などの制約によって解析できない場合がある。もちろん、類似構造のない新しいタンパク質の構造解析には適用できない。

MIR 法は、初めてタンパク質の構造を解析するのに成功した手法である。Kendrew らはミオグロビン結晶に、水銀などの重原子イオンを特異的に結合させることによって生じる回折強度変化を観察し、その部分構造を抽出することを手がかりに、位相問題を解決した。その後の解析の多くはこの方法で行われてきた。

MAD 法も位相決定の原理については、この MIR 法と変わらず、強度を変化させる部分構造に基づく作図 (Harker diagram) で位相が得られる。ただし、強度を変化させる因子が重原子の有無ではなく、波長に依存した異常分散効果である点が異なる。異常分散効果は、固有振動をもつ軌道上の電子に対する入射 X 線によって誘起される振動の共鳴現象であるが、入射 X 線の波長の変化に伴って回折強度と位相を変化させる。一般的な回折実験に使われる 1.0 Å から CuK α 線前後の波長領域では、鉄、銅、亜鉛などの K 吸収端や水銀、白金などの L III 吸収端が存在する一方、タンパク質を含む生体高分子の主要な構成原子である炭素、窒素、酸素、硫黄では、この効果は無視できる。このことは、導入した部分構造を抽出するのに適している。

この作図の原理は Karle によって定式化された⁴⁾ 1 種類の異常散乱子を含む結晶について、波長 λ における反射 $\mathbf{h}$ とその Friedel 対 $-\mathbf{h}$ に対する構造振幅 $|F(\pm \mathbf{h})|$ は、次式で与えられる。

$$|F(\pm \mathbf{h})|^2 = |F_T|^2 + a(\lambda) |F_A|^2 + b(\lambda) |F_T| |F_A| \cos(\phi_T - \phi_A) \pm c(\lambda) |F_T| |F_A| \sin(\phi_T - \phi_A)$$

ただし、 $|F_A|$ と ϕ_A は異常散乱成分の構造振幅と位相、

f^0 と ϕ_T はそれ以外の成分の構造振幅と位相であり、通常散乱因子 f_0 、異常散乱の実数項 f' 、虚数項 f'' としたとき、 $a(\lambda) = (f^2 + f''^2)/f_0^2$ 、 $b(\lambda) = 2f'/f_0$ 、 $c(\lambda) = 2f''/f_0$ となる。

f'' は位相の情報に直結しており、単一波長で手系の問題を解決することができる。この効果は Bijvoet によって絶対構造や位相の決定に利用された。⁵⁾ その後 Okaya と Pepinski によって、MAD 法が位相決定に利用できることが示された。⁶⁾

しかし、タンパク質への応用はただちには行われなかった。これには、異常分散効果の大きさが影響している。重原子の導入によって得られる強度変化は、そのイオンの電子数に比例するが、例えば水銀原子が1つ格子に入った場合、占有率を1として最大80電子分の寄与があるが、異常分散効果の場合は波長を最適化してようやく20電子相当程度であり、実験室で一般的に使われる $\text{CuK}\alpha$ 線では8電子弱相当と小さくなる。結局、タンパク質のような分子量の大きな分子からなる結晶の回折強度変化としては、核種にもよるが数%程度となり、微弱な異常分散の信号を抽出してこれらの計算を進める必要がある。このため、波長の最適化が可能な放射光施設が利用できるようになって、実現が可能になった。Hendrickson らは1985年にSSRLにてLamprey Hemoglobinの鉄原子の異常分散効果を使って、位相決定に成功した。⁷⁾ その後、第3世代放射光施設の利用、タンパク質発現精製技術の展開、計算機の高速度とソフトウェアの充実などがあいまって、現在に至っている。

3. 実験方法

MAD 法の適用に限り話を進めたい。まず、異常散乱因子を含む結晶を作成する必要がある。鉄や銅、亜鉛などを天然に含む金属タンパク質の場合は、利用できるX線の波長にもよるが、そのままの状態でもMAD法が適用できる。2種類の金属を含むタンパク質では、その位置を異常分散効果から得ることができる。

重原子誘導体は、MAD法の候補である。従来の重原子導入法が使える。ただし、MAD法だけを考える場合、MIR法のように結晶の同形性を考える必要はない。重原子導入によって結晶の状態(格子定数や分子構造など)が変化したとしても、1つの結晶からデータが得られるので、位相決定には問題がない。したがって、これまで避けられていた高濃度の重原子試薬溶液への浸漬や共結晶化もMAD法には有効である。

最近では、臭素などハロゲン塩の溶液への浸漬⁸⁾も試みられている。高濃度臭化物塩溶液の条件に結晶を曝し、ただちに凍結する。これらのタンパク質への結合はほかの方法に比べあまり強くないので、圧力・濃度の設定や、曝露後の凍結操作などによっては、良い結果が得られないこともある。キセノンなどの希ガス⁹⁾も例は多くないが、異常

図1 セレンの異常散乱因子。(Anomalous scattering factors of selenium.) 実測データからの算出値と理論値¹¹⁾を示した。 f'' が極大になるPeakと、 f' が極小になるEdgeに、対照点としてのRemoteを加え3波長ないし4波長の収集が一般的であるが、2波長でのデータ収集も行われている。算出にはChooch¹²⁾を利用した。

分散を利用した位相決定にも使われている。

タンパク質の発現技術によって、セレンをタンパク質に導入する方法も広く使われている。¹⁰⁾ アミノ酸のセレン誘導体(セレノメチオニン・セレノシステイン)は、異常分散効果を利用するのに適当な原子である。特定アミノ酸の生合成系を阻止し、これらの誘導体をタンパク質合成において取り込ませる方法である。誘導体タンパク質は溶解度が落ち、発現がうまくいかないことや結晶化条件が変わってしまうこともあるが、確実に導入できる方法である。また、異常分散差フーリエ図によってセレンを含むアミノ酸の位置が特定でき、モデル構築を行うのに有効である。

得られた結晶から十分な異常分散差のデータを収集するためには、 $\Delta f'$ と f'' の値を最適化するように波長を選択する必要がある。この項の見積もりは、吸収端の化学シフトや放射光ビームラインの装置の設定によって理論値¹¹⁾とは若干異なる値をとることがあるため、実験的に行うべきである。異常散乱因子の吸収端近傍で分光器の波長をスキャンしながら蛍光X線スペクトルを測定する(図1)。この際に、マルチチャンネルアナライザー(MCA)で蛍光X線のエネルギー成分を弁別し、標的核種に由来する蛍光X線が十分に観測されているかを事前に確認するとよい。特に、重原子溶液への浸漬によって得られる誘導体結晶では、重原子化合物が含まれていない溶液にいったん戻すバックソーキングを行ってから確認を行うと、結合度をより

正しく見積もることができる。こうして得られた実測スペクトルから異常分散項を見積もるためには、Kramers-Kronig 変換を行う Chocho¹²⁾などのソフトウェアが利用できる。

よりよい位相を得るためには、複数の波長から得られた回折データの強度差が、異常分散効果のみに由来することが必要である。しかし、データ収集に伴う誤差として、吸収効果や放射線損傷などがある。前者はソフトウェアによるローカスケーリングによる経験的な吸収補正が、後者の抑制には低温結晶学の発達が成果を挙げた。しかし、高精度データを求めて高輝度放射光光源が使われるようになると、液体窒素低温で対処しきれない結晶が存在することが明らかになってきた。これらの誤差を最小限にするためには、さまざまな工夫が必要になるが、この問題については、回折データの同質性の項で述べる。得られた回折像は通常用いられる回折像処理ソフトウェアで回折強度データに変換するが、全データで方位パラメータをそろえて処理を行い、等価反射をマージせず、ローカスケーリングを行うようにする。また、プログラム REVISE¹³⁾による補正も効果がある。

位相決定は、MAD 法が適用された当初には、前出の Karle の式に基づいて処理されていた。この式に基づき、2 波長以上のデータ収集によって得られる連立方程式を解くことで、 I^0F_{T1} , I^0F_{A1} , $(\phi_T - \phi_A)$ の3変数を得ることができる。そして、異常散乱子のみからの寄与である I^0F_{A1} から、パターンソン法や直接法などを適用し、その位置が決定できる。その結果 ϕ_A が得られれば、全体の位相が求められるという算段である。この手順で計算するソフトウェアとして MADSYS パッケージがある。しかし、データの精度が高まるに伴い、このような特別な扱いをせず、従来の MIR 法用のソフトウェアで位相決定を行う試みもされてきた。つまり、差パターンソン図から拾ったサイトを精密化するという考え方である。SOLVE¹⁴⁾ や autoSHARP¹⁵⁾ は異常散乱子の部分構造決定から位相精密化まで自動的に行える。メチオニンが多いタンパク質のセレン誘導体や、ハロゲン塩による誘導体では、非対称単位中に数十～100 個程度の原子が導入されてしまうこともあるが、これらの自動化ソフトウェアで対処できている例も多い。

その後の位相改良やモデル構築などのステップはほかの方法と大差ない。1つ留意するとすれば、重原子誘導体のデータしかない場合の取り扱いである。セレンメチオニン誘導体や重原子誘導体結晶のほうがよい分解能を与える場合などがあり、これのみのデータでのモデル精密化も行われている。

4. 回折データの同質性

MIR 法では、重原子誘導体のデータと元々のタンパク質結晶のデータで結晶がそもそも異なるうえ、重原子を特

異的に結合させているため、結晶格子や分子構造に若干の違いが見られることもしばしばである。このため、高分解能での位相決定は、一般に難しい。

しかし MAD 法では、1つの結晶から全データが得られれば、その点を考える必要はないはずで、結晶の同形性については問題がない。このため、高分解能での位相決定も可能になる。しかし、結晶の同形性以外に系統誤差を作り出す原因として、結晶の外形などによる X 線吸収の異方性や放射線による損傷¹⁶⁾などが問題となる。結晶外形や結晶をマウントするループの形状などで、吸収の効果が結晶方位によって変化したり、データの収集中に放射線損傷によって結晶が徐々に変化していくことで、各データの一致度が悪化することになる。MIR 法でも問題になるデータセット間の一致度は、強度差が小さい MAD 法においては特に注意してかかる必要がある。

異常分散効果を測る場合、 f' と f'' の項それぞれで異なった配慮を必要とする。Hendrickson らは f'' を精度よく収集する目的で Inverse Beam Geometry Setting を提案した。⁷⁾この方法は、振動写真法によるデータ収集において、Friedel 対が180度異なる角度で収集できることに由来しており、 a 度の回折像と $(180 + a)$ 度の回折像を交互にとり進める。これにより、吸収の効果をほぼ等しくでき、また、関連する Friedel 対を近接した時間内に収集することで、放射線損傷による経時的な系統誤差を減らそうとするものである。しかしながら一方の f' については、波長を迅速かつ再現性よく変更できる必要があり、実現されていなかった。そこで、われわれは3つの波長をあらかじめ用意し、迅速に切り替えられる放射光ビームライン用分光器として Trichromator を開発した。¹⁷⁾

MAD 法では、振動角と波長の組み合わせが最終的な位相決定にも影響を与える。このことについて、行った実験を紹介したい。¹⁸⁾この分光器を使うことで、振動角と波長の順序を任意に組み合わせることができ、波長 λ_1 での a 度の回折像に続いて、波長での λ_2 での a 度の回折像を迅速に収集できるようになった。その実際の効用について、波長を固定して振動角を変えながらデータを収集する従来の方法と、同一振動角で波長を変更しながらデータを取り進める方法 (Trichromatic mode; 以下、迅速波長切替法) で、そのデータの統計を求め、位相計算を行った。試料として、六角柱状結晶が得られるセレンメチオニル化 Chitosanase (ChoA)¹⁹⁾を用いた。これは最高で1.7 Åの反射を与え、比較的放射線損傷を受けにくい良好な結晶である。また、結晶形状が棒状のため結晶の異なる位置に X 線を当てることができ、比較実験に都合がよい。

図2に示すように、回折イメージごとの温度因子は、経時変化は従来法のほうが若干高いものの、トータルではさほど変わらない。しかし、イメージごとで温度因子の値は、新しい手法では等価なイメージ間で一致しているのに

図2 異なるデータ収集法によるフレーム温度因子の変化。(Variation of fall-off factors in the two data collection methods.) データの対応は表1を参照。

図3 異なるデータ収集法による電子密度の違い。(Comparison of the electron densities calculated with the two data collection methods.) (a) 迅速波長切替。(b) 従来法。前者では、チロシン側鎖の六員環の穴が開いて見えている。

表1 データ収集と位相計算の結果。(Statistics of Data Collection and Phase Calculation.)

収集法	迅速波長切替(Trichromatic)			従来法		
Data	Cho11	Cho12	Cho13	Cho21	Cho22	Cho23
観測反射数	Remote	Peak	Edge	Remote	Peak	Edge
観測反射数	260,402	269,821	269,362	261,577	263,567	263,387
独立反射数	65,579	66,482	66,428	65,695	66,480	66,449
I/σ	18.5	17.4	17.5	19.8	18.7	17.1
$R_{\text{merge}} (^{\circ})$	4.9	5.3	8.4	4.5	4.8	7.6
$R_{\text{iso}} (^{\circ})$	—	5.7	4.8	—	6.4	7.8
$R_{\text{cutoff}} (\text{iso})$	—	0.82 / 0.84	0.83 / 0.88	—	0.78 / 0.83	0.76 / 0.86
$R_{\text{cutoff}} (\text{ano})$	0.94	0.91	0.99	0.94	0.91	0.99
Lack of closure (iso)	—	8.9 / 14.0	8.1 / 12.5	—	11.4 / 14.7	10.3 / 16.8
Lack of closure (ano)	8.98	16.56	7.32	8.11	15.91	6.37
Figure of merit	0.4508	—	—	0.4887	—	—
Phasing power	1.82 / —	1.19 / 0.82	1.22 / 0.81	1.85 / —	1.38 / 0.89	1.40 / 0.90
$\langle \Delta\phi \rangle$	44.2	(33.9)	—	47.8	(39.4)	—

対し、従来法では、その差がある値をもっている。この結果、新しい手法では、波長間の一致度である R_{iso} が良い値を示した。しかし、 f'' については考慮されていないため、 R_{merge} はかえって悪化し Friedel 対間の一致度が悪いことを示している(表1)。

位相計算の統計値にもその傾向は表れているが、最終的に得られた位相についてみると、精密化したモデルから得られる位相との差 $\langle |\Delta\phi| \rangle$ では、全体で3度強、分解能範囲を限定すると最大で7度程度、モデルに近いことが示された。その結果、電子密度図においても有意な差が出ており(図3)、この方法が有用であることを示すことができた。この結果から、このような特殊な光学系を使わなくとも波長の再現性が確保できれば、放射線損傷を考慮して適当な範囲ごとに波長を変えながら行うことで、良い結果が得られるものと理解できる。

5. おわりに

MAD 法は解析の迅速化・ルーチン化に大きな寄与を果たしている。MAD 法のさらなる進展としての異常分散

効果による位相決定という観点からは、放射光の高輝度X線や高精度X線検出器の出現によるデータ精度の向上とともに、より簡便かつ迅速に位相決定に必要なデータを集める方法について検討されている。ここでは述べなかったが、SAD (Single-wavelength Anomalous Diffraction) 法がその1つである。単一波長データの f'' 項を利用する方法は、原理的に Bimodal な位相確率分布から逃れられず、位相改良法との組み合わせが重要である。その位相決定能力については、まだ結論が出ていないようであるが、データの冗長度を上げることでようやく位相が決定できるような事例²⁰⁾も報告されており、より高精度のデータ収集が必要であることを示している。単波長で位相の精度が足りない場合は別波長のデータを追加して測定するなど、現時点ではMAD法との使い分けによって、より現実的な効率化を図る必要があるだろう。また、タンパク質微小結晶への適用や長波長X線による硫黄などの比較的軽い原子の異常分散効果の利用²⁰⁾は今後の課題の1つであり、これらを視野に入れて、解析のルーチン化と迅速化をさらに進めていく必要があるだろう。

文 献

- 1) W. A. Hendrickson: *Science* **254**, 51 (1991).
- 2) W. A. Hendrickson and C. M. Ogata: *Methods Enzymol.* **276**, 494 (1997).
- 3) M. A. Walsh, G. Evans, R. Sanishvili, I. Dementieva and A. Joachimiak: *Acta Cryst.* **D55**, 1726 (1999).
- 4) J. Karle: *Int. J. Quant. Chem.* **7**, 357 (1980).
- 5) J. M. Bijvoet: *Proc. Acad. Sci. Amst.* **B52**, 313 (1949).
- 6) Y. Okaya, R. Pepinsky: *Phys. Rev.* **103**, 1645 (1956).
- 7) W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerley and E. A. Merritt: *Proteins* **4**, 77 (1988).
- 8) Z. Dauter and M. Dauter: *Structure* **9**, R21-R26 (2001).
- 9) O. Sauer, A. Schmidt, C. Kratky: *J. Appl. Cryst.* **30**, 476 (1997).
- 10) W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. LeMaster: *EMBO J.* **9**, 1665 (1990).
- 11) S. Sasaki: *KEK Report* **88-14**, 1 (1989).
- 12) G. Evans and R. F. Pettifer: *J. Appl. Cryst.* **34**, 82 (2001).
- 13) F. Hai-fu, M. M. Woolfson and Y. Jia-xing: *Proc. R. Soc. Lond.* **A442**, 13 (1993).
- 14) T. Terwilliger and J. Brendzen: *Acta Cryst.* **D55**, 849 (1999).
- 15) E. de La Fortelle, G. Bricogne: *Methods Enzymol.* **276**, 472 (1997).
- 16) C. Nave: *Rad. Phys. Chem.* **45**, 483 (1995).
- 17) M. Yamamoto, T. Kumasaka, T. Fujisawa and T. Ueki: *J. Synchr. Rad.* **5**, 414 (1998).
- 18) T. Kumasaka, M. Yamamoto, E. Yamashita, H. Moriyama and T. Ueki: *Structure* **10**, 1205 (2002).
- 19) J. K. Park, K. Shimono, N. Ochiai, K. Shigeru, M. Kurita, Y. Ohta, K. Tanaka, H. Matsuda, M. Kawamukai: *J. Bacteriol.* **181**, 6642 (1999).
- 20) M. S. Weiss, T. Sicker, R. Hilgenfeld: *Structure* **9**, 771 (2001).

プロフィール

熊坂 崇 Takashi KUMASAKA
東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻
Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology
〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259
4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, 226-8501, Japan
TEL & FAX. 045-924-5707
e-mail: tkumasak@bio.titech.ac.jp
最終学歴：1996 年東京工業大学大学院生命理工学研究科博士後期課程修了
専門分野：タンパク質結晶学

山本雅貴 Masaki YAMAMOTO
理化学研究所播磨研究所 X 線干渉光学研究室
X-ray Coherent Optics Laboratory, RIKEN Harima Institute
〒678-1205 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Mikazuki, Sayo, Hyogo 678-1205, Japan
TEL. 0791-58-2806, FAX. 0791-58-2807
e-mail: yamamoto@postman.riken.go.jp
最終学歴：1991 年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了
専門分野：放射光構造生物学