

単結晶X線構造解析 基礎講座

第11回 タンパク質の結晶化～BioSAXSによる可否判定～

山野 昭人*

1. はじめに

単結晶X線構造解析における原理上の問題はいわゆる位相問題であるが、測定装置や放射光施設、ソフトウェアなど、環境が整った現在では、実行上の最大の問題は解析の対象となる物質の単結晶化、すなわち結晶化である。結晶化の問題は、生体高分子では特に顕著となる。これまでに解析された非対称の単一分子で最大のリボソームは、1980年に低分解能の回折を与える結晶の取得が報告されてから⁽¹⁾、実用的な分解能を与える結晶の取得までに20年以上が費やされた。当初結晶化は不可能だと思われており、真剣に取り組む研究者が限定されていたことも要因の一つであると思われる。結晶化が不可能だと思われた理由は、リボソームには複数のサブタイプがあり、均一性が低いと予想されたからであった。結晶化以前に均一性を評価できる手段があれば、結晶化に挑戦しようという研究者の数も多少なりとも増え、結果として数年の短縮は可能であったのかもしれない。本稿では溶液状態のタンパク質試料からのX線小角散乱と、結晶化の可否判定との関係を紹介する。

2. 粒径分布と結晶化の可能性

用いられる手法や手順は時代とともに進化してきているものの、現在においても、結晶化は基本的には試行錯誤の段階であり、最も労力の要る段階である。1980年代後半に結晶化のスクリーニング溶液が市販されるようになり、結晶化の第1段階の標準化は事実上確定したものの、単に溶液状態のタンパク質とこれらスクリーニング溶液を混合して結晶化の成否を見守るのみであった。1990年代に入ると、結晶化前のタンパク質溶液の粒径分布と、結晶化の可否の因果関係が盛んに利用されるようになった。結晶を得るためには、結晶化前のタンパク質溶液が単分散を示すことが、必要条件であるというものであった。これにより

結晶化の可否が、結晶化スクリーニング以前にある程度判定できるようになり、大幅な省力化が可能となった。タンパク質溶液が単分散でない場合には、単分散を目指して手を加えるという指針が得られるようになったためである。

3. 動的光散乱による結晶化可否判定

単分散か否かの判定に最初に広く用いられたのは動的光散乱である。結晶化可否判定に特化した装置も市販されるようになったことから、世界中の構造生物学教室で動的光散乱が用いられるようになった。動的光散乱は粒子のブラウン運動に起因する強度の揺らぎの速さから、粒径分布を求める方法である⁽²⁾。大きく遅く動く粒子を含む溶液では強度はゆっくりと揺らぎ、小さく速く動く粒子では速く揺らぐ。図1に動的光散乱装置から出力された、典型的な多分散と単分散の模式図を示す。図1(a)の多分散のままでは結晶化しにくい、フィルターを用いてアグリゲーションを除いた図1(b)は、結晶化が得られる可能性があると考えられる。動的光散乱の結晶化への応用という観点から、最も印象的な結果を示したのはBurleyらのグループである。彼らはタンパク質とDNAの共結晶に応用し、結晶化の可能性と粒径分布に、高い相関が

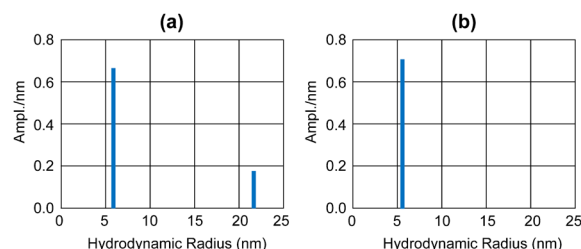


図1. 動的光散乱による粒径分布の測定。

(a) 典型的な多分散。本来のタンパク質に由来する粒径とアグリゲーションに相当する粒径とのバイモーダルになっている。

(b) aの試料をろ過しアグリゲーションを除いて単分散にしたもの。

*株式会社リガク X線機器事業部 応用技術センター

あることを示した。DNA とタンパク質がしっかり会合し、粒径分布が狭い溶液のみから結晶が得られたと報告している⁽³⁾。

動的光散乱装置には、DynaPro (Wyatt technology) のように静的光散乱の強度も測定できるものがある。静的光散乱により第 2 ビリアル係数 (A_2) を測定することができれば、タンパク質分子間に作用する力を推定することができる^{(4), (5)}。 A_2 が > 0 の場合、タンパク質分子間には反発力が働くため、結晶化に必要なタンパク質分子間の直接の相互作用は起こらない。逆に $A_2 \leq 0$ の場合、タンパク質分子間には強い引力が働き、アグリーゲーションになってしまう。結晶化が起こるのは弱い引力が働く $A_2 < 0$ の場合である。 A_2 はイオン強度に依存するため、塩濃度の加減の指針を得られることになる。

A_2 は濃度を変えたタンパク質溶液からの光散乱の強度を測定することにより、下記の式から求めることができる。

$$\frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2C$$

ここで K は光学係数、 C はタンパク質溶液の濃度、 M は平均分子量、 A_2 は第 2 ビリアル計数、 R_θ は入射光と散乱光のレイリー比である。

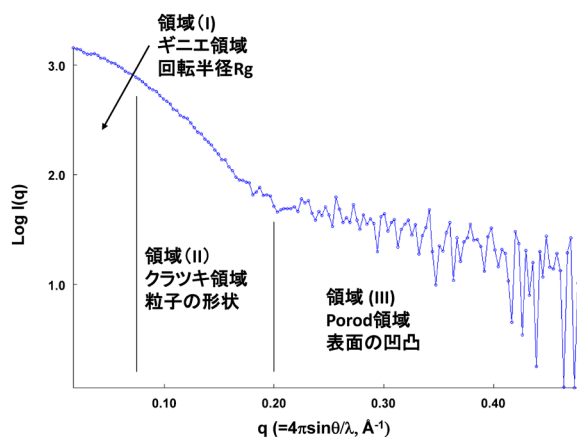


図 2. X 線小角散乱曲線。
最も低角の原点に近い領域からギニエ領域、クラツキ領域、Porod 領域と呼ぶ。

4. X 線小角散乱による結晶化可否判定

現在ではタンパク質の結晶化の鍵となる残基に変異を施すコンストラクトの作成が比較的容易になっており、結晶化ロボットも普及したことから、動的光散乱の使用頻度は頭打ちとなっているような印象を受ける。粒径分布に加えて、構造に関する有用な情報が取得できる、容易に測定できるなどの付随する利点があれば、測定する意義が弱くなっているのが現状であろう。

低角度散乱領域の強度情報に基づくギニエプロットは、粒径のみならず分子間に働く相互作用の情報を取得することができる。X 線や中性子、静的光散乱で利用することができる。構造生物学の研究者が比較的利用しやすい粒径分布の測定手法という観点からは、X 線小角散乱を挙げることができる。世界中の放射光施設の中には、X 線回折データの取得と平行して、X 線小角散乱データを測定できるところもある。また構造生物学の研究室には、回折データ取得用もしくは結晶のスクリーニング用として、微小焦点の回転対陰極型の X 線源を備えた回折装置が備わっていることが多いため、X 線小角散乱用装置の追加も容易である。

ギニエプロットは図 2 中に示すいわゆるギニエ領域とも呼ばれる低角度領域について、回折強度 $I(q)$ ($q = 4\pi \sin \theta / \lambda$, $\text{\AA}^{-1}$) を q^2 値に対して対数プロットしたグラフである。直線を当てはめ、その傾きから慣性半径 R_g を求めることができる。これにより溶液状態での実質的な分子サイズを知ることができる。

$$\ln I(q) = \ln I(0) - \frac{1}{3} R_g^2 q^2$$

ギニエプロットの利点は、分子サイズの他に、分子の会合状態を知ることができる点にある⁽⁶⁾。図 3 に模式図を示す。結晶化に適した状態は図 3a である。図 3b のようにギニエプロットが直線から上方に外れる場合には、アグリーゲーションが起こっていると考えられ、したがって結晶化に適した溶液状態となっていない。逆に図 3 (c) のように下方に外れる場合には、分子間に斥力が働いているとされ、結晶化に必要な分子間の引力が働かない。したがって、この場合も結晶

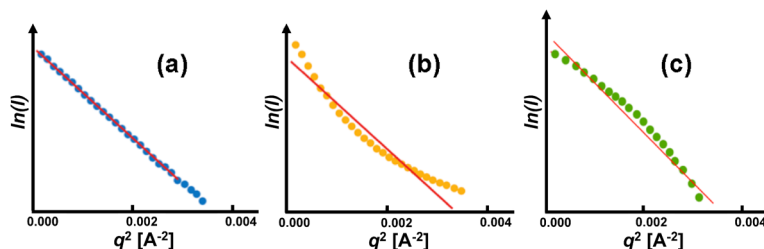


図 3. ギニエプロットの模式図。

図 3 (a) は結晶化に適した状態、図 3b はアグリーゲーションが生じている状態、図 3c はタンパク質分子間に斥力が働いている場合に相当する。

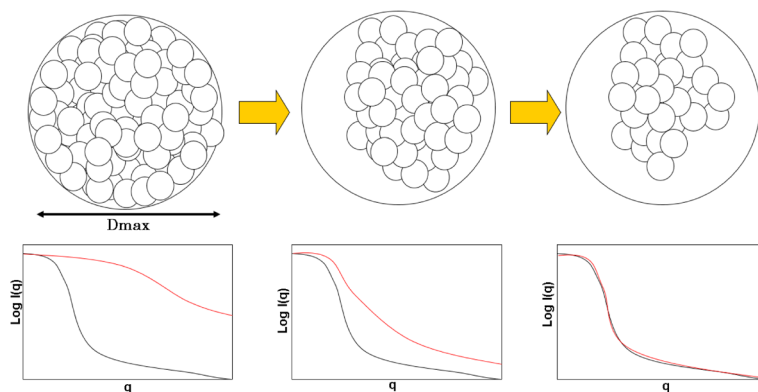


図4. ダミー原子法の原理を示す模式図.

球体に詰められた球の位置や数を変更し、最も散乱曲線を良く説明できるところを収束点、すなわちタンパク質の溶液構造とする。

化に適した溶液状態と言うことはできない。

5. X線小角散乱により得られるその他の情報

X線小角散乱では、ギニエプロットによる分子間の相互作用の情報に加え、主に2種類の情報を得ることができる。

一つは低分解能ではあるが、比較的精度良くタンパク質の外形を決定することができる点である。単結晶X線構造解析には、対称となる物質の単結晶が必須である。しかしながらたとえば創薬のターゲットとなるタンパク質は人間由来のタンパク質であり、一般的に結晶化が困難か、結晶化に成功しても単結晶X線構造解析に必要な分解能が得られない場合もある。X線小角散乱実験は溶液状態でできるため、必ず何らかの結果が得られることも魅力である。以前はX線小角散乱法によるタンパク質の構造決定は、ともすれば信憑性に欠けるとして嫌厭される向きもあったが、ダミー原子法による客観性を持った構造決定法が実用化されたことにより、近年目覚ましい発展を遂げている。ダミー原子法では、距離分布関数により得られた直径を持つ球体の内部に球を詰め込み、それらの球の位置や数を変化させ、X線散乱曲線が最も良く説明できるような球の配置がタンパク質の形状を表しているとする(図4)。低分解能という制限はあるが、構造既知のタンパク質やタンパク質複合体の特徴的な構造が*ab-initio*に再現されることを見れば、その信憑性に疑問を呈するのは困難であろう。創薬の初期段階における化合物探索という観点でも、BioSAXSを利用できる場合も多く存在すると推定できる。化合物が結合した際にタンパク質の慣性半径や外形に十分な変化が起こる場合には、BioSAXSによって化合物の結合の可否を判断できる可能性がある⁽⁷⁾。また結晶化状態では見ることができない、溶液中での構造の示唆を得られることもある。図5にBioSAXSにより得られたタンパク質分子の外形と、単結晶X線構造解析で得られた

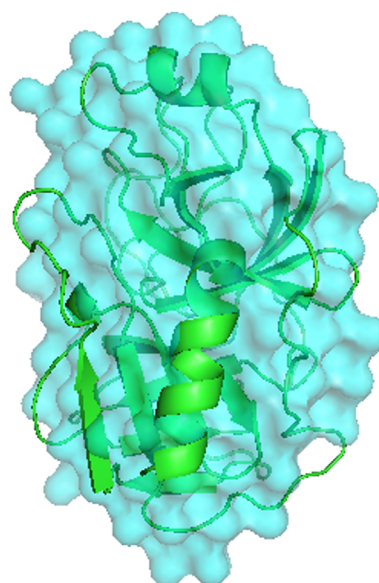


図5. ダミー原子法により決定された低分解能のタンパク質分子(トリプシン)の外形と、単結晶X線構造解析により得られた高分解能のリボンモデルとの重ね描き。

高分解能のリボンモデルを示す。

もう一つはタンパク質のフォールディングに関する情報である。図3のクラツキ領域から得られるクラツキプロットは、 $I(q)q^2$ を q に対してプロットしたものである(図6)。比較的低い q 値領域にピークがあればタンパク質は正しくフォールディングしており、逆にピークがない場合にはランダムコイル状であることを示すとされている^{(8), (9)}。結晶化が成功するためには、溶液中のほとんどのタンパク質が正しいフォールディングをしていることが必須であることをかんがみれば、クラツキプロットのみでも結晶化に進むべきか否かを決定する、貴重な情報が得られることになる。

6. おわりに

BioSAXS-2000 (リガク) はタンパク質専用のX線小角散乱装置で、既存の微小焦点X線発生装置と組み

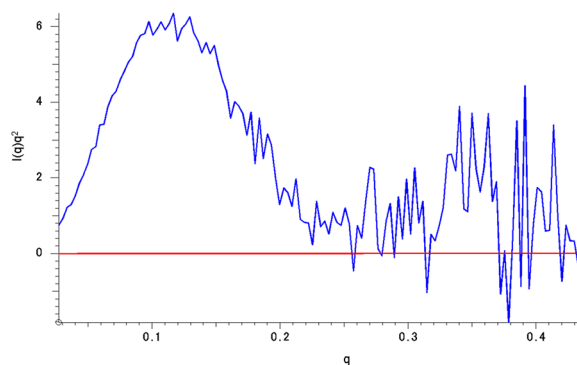


図 6. 正常なフォールディングをしているタンパク質のクラツキプロット。 $q=0.12$ 付近を中心とするピークが存在している。ランダムコイル構造に近づくにつれ、ピーク高が減少する。



図 7. BioSAXS-2000 の設置例。
MicroMax007 や FR-X などの微小焦点型 X 線発生装置と組み合わせることができる。

合わせた回折装置の、対向側の空きポートに設置することができる (図 7)。BioSAXS-2000 は、BioSAXS 専用装置として数々の特長を備えている。

- ① 緩衝液と試料が同一試料セルの同一部分に X 線を照射できる。
- ② 検出器面に集光点を持つ光学系とクラツキブロックの組み合わせにより、試料にはライン状の X 線を照射して強度を稼ぎながらも、スミアリングの問題を回避できる。
- ③ ノイズの少ない半導体検出器を採用しているため、長時間露光にも耐えることができる。
- ④ 要なタンパク質の溶液量も $20 \mu\text{l}$ 程度と非常に少

ない。

- ⑤ 温度調節機能を組み込むことができる。
- ⑥ サンプルチェンジャーとの組み合わせが可能。

BioSAXS はギニエプロットやクラツキプロットにより、結晶化に有用な情報が得られるのに加え、低分解能ながらも溶液中のタンパク質の構造情報も得られる。タンパク質の大きさや濃度にも依存するが、通常数時間の測定で構造決定に十分なデータを取得することができる。溶液中の構造は往々にして結晶中の構造と異なることもあり、単結晶 X 線構造解析のみでは得られない知見も取得することができるし、結晶化が不要なため測定さえ行えば、確実に何らかの結果を得ることができる。単結晶 X 線構造解析との併用が理想的である。

参考文献

- (1) A. Yonath, J. Mussig, B. Tesche, S. Lorenz, V. A. Erdmann, H. G. Wittmann: *Biochem. Int.*, **1** (1980), 428–435.
- (2) (独) 日本学術振興会回折構造生物学第 169 委員会：タンパク質の結晶化，坂部知平監修，相原茂夫編著，京都大学学術出版会，(2005)，179–192.
- (3) A. R. Ferre-D'Amare and S. K. Burley: *Structure*, **2** (1994), 357–359.
- (4) B. L. Neal, D. Asthagiri, O. D. Velev, A. M. Lenhoff and E. W. Kaler: *Jour. Cryst. Growth*, **196** (1999) 377–387.
- (5) W. W. Wilson and L. J. DeLucas: *Acta Cryst.*, **F70** (2014), 543–554.
- (6) D. A. Jacques and J. Trewhella: *Protein Sci.*, **19** (2010), 642–657.
- (7) T. Matsumoto, T. Kinoshita, Y. Kirii, T. Tada and A. Yamano: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425** (2012), 195–200.
- (8) S. Cinelli, F. Spinozzi, R. Itri, S. Finet, F. Carsughi, G. Onori and P. Mariani: *Biophys. J.*, **81** (6) (2001), 3522–3533.
- (9) T. Takekiyo, K. Yamazaki, E. Yamaguchi, H. Abe and Y. Yoshimura: *J. Phys. Chem. B*, **116** (2012), 11092–11097.