

単結晶X線構造解析 基礎講座

第13回 タンパク質構造解析における位相決定

山野 昭人*

1. はじめに

無機・有機・タンパク質にかかわらず、単結晶X線構造解析の原理は同一である。したがって構造解析のステップも同一であるが、低分子構造解析とタンパク質構造解析では、各ステップの実行方法に大きな差異がある。単結晶X線構造解析の中心問題とされる、位相問題を解決する位相決定法も大きく異なっているステップの1つである。

低分子構造解析における主な位相決定法は、回折強度の統計処理により位相を推定する直接法である。一方タンパク質構造解析では、直接法による位相決定が困難であるため、実験的に位相を決定する。直接法は回折強度の強弱を手掛かりとする位相関係式を用いて、おおまかに割り当てた位相を改良していく方法である。したがって比較的大きな格子を持ち、原子種や結晶内での電子分布の偏りが限定されるタンパク質結晶では、回折強度の強弱が低分子結晶と比較して少なくなるので、原理的に直接法を適用しにくいためとも説明できる。

タンパク質構造解析における実験的な位相決定法として、考え方の基礎となるのは重原子多重同型置換法(MIR法: Multiple Isomorphous Replacement method)である。MIR法は重原子を導入することにより生じたわずかな位相のずれを利用して、目的とするタンパク質(Native)の位相を導出する方法である。本稿では重原子多重同型置換法と、異常分散の波長依存性を利用する、多波長異常分散法(MAD法: Multiple Anomalous Dispersion method)について解説する。

2. 重原子誘導体の作成

2.1. ソーキング

実験的な位相決定の第1段階は重原子誘導体結晶の作成である。重原子誘導体の古典的な作成方法は、Nativeタンパク質の結晶を重原子溶液に浸すソーキン

グと呼ばれる方法である。ソーキングの手続き自体は簡単であるが(図1(a)), 重原子の種類, 濃度, ソーキング時間など, 変更すべきパラメーターは多数あり, 多大な労力が必要となる。重原子が導入されたか否かは実際にデータを測定して評価する必要がある, 1つの誘導体の取得に最低でも数回, 運の悪い時には数十回もソーキングから測定・評価までを繰り返さなければならない場合が多いためである。

重原子誘導体の作成の変法として, 気化ヨウ素を用いる方法がある⁽¹⁾。特に固体のヨウ素を使用する方法は極めて簡便である。ヨウ素の断片を顕微鏡下で適当な大きさに切断し, 結晶化ドロップの近辺にグリース等で貼り付け再封するだけである(図1b)。ヨウ素溶液やヨウ素とヨウ化カリウムの混合溶液を用いてもよ

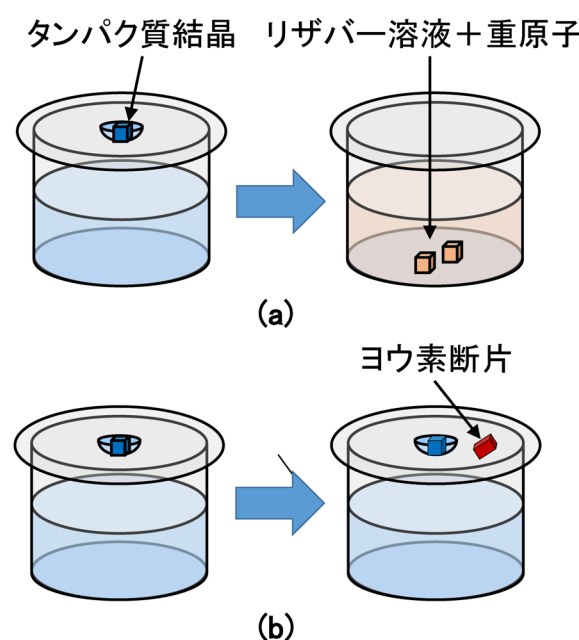


図1. 重原子誘導体の作成手順の模式図。(a) 通常重原子誘導体の作成方法。(b) 気化ヨウ素を用いた重原子誘導体の作成方法。ヨウ素片をグリース等でカバーガラスに貼り付け封じる。ヨウ素片の代わりにヨウ素溶液やヨウ素+KI溶液を用いることもある。

*株式会社リガク 応用技術センター

い。気化ヨウ素を用いた重原子誘導体の作成方法は、他の方法にはない利点を持っている。

- ・導入が進行するに従い結晶が黄変するため進捗の確認が容易
- ・いつでもソーキングを停止・再開することができる
- ・溶媒に露出したチロシン残基のみがヨウ素化される
- ・同形性がよい
- ・位相決定の際にヨウ素の高い電子密度と大きな異常分散を利用することができる

同形性がよい理由として考えられるのは、重原子溶液を直接結晶化ドロップに加えないため、浸透圧などの結晶周りの環境の変化が少ないことや、溶媒に露出したチロシン残基のオルト位もしくはメタ位のみがヨウ素化されるので、タンパク質分子自体の構造変化に起因する直接間接の分子間接触への影響が少ないためと推定される。ヨウ素が存在するところがチロシンであるため、モデルの構築の手掛かりともなる。気化ヨウ素を用いる方法の欠点は、PEGを沈殿剤としている場合、および溶媒に露出したチロシン残基が不在の場合に用いることができない点である。PEGを含む結晶化ドロップに吸収された気化ヨウ素は、ドロップ内で結晶化してしまう。

MAD法による位相決定では、通常セレンメチオニンを経験工学的に導入するため、重原子のソーキングは不要である。データ測定の際にも依存するが、150アミノ酸残基ごとに1個程度のセレンが存在すれば、位相決定が可能であるとの報告がなされている⁽²⁾。

2.2. 蛍光 X 線測定による重原子導入の可否判定

2.1 節で重原子誘導体作成の困難さの1つとして、導入の可否は実際にデータを測定して評価する必要があると述べた。これを回避する方法として、蛍光 X 線 (XRF: X-ray Fluorescence) を測定する方法がある。単結晶用の蛍光 X 線測定アタッチメント (図2(a)) は、既

設の単結晶 X 線構造解析用装置に取り付けることができる。データ測定を行いながら XRF を測定することができる。結晶マウントの際には、重原子溶液部分からの XRF シグナルの混入の可能性を排除するため、事前に重原子誘導体結晶を重原子を含まない溶液に浸す、バックソーキングを行う必要がある。上記の気化ヨウ素を用いて作成された誘導体はこの点でも有利である。導入されたヨウ素はチロシン残基側鎖の特定部位に共有結合しているため、通常のソーキング方法で得られた誘導体でしばしば問題となる、バックソーキング時に重原子が除去されてしまうという問題が発生しにくいからである。

導入した原子種に相当する XRF が得られていれば、結晶中に重原子が存在することになる (図2(b))。位相決定に寄与する重原子誘導体は、重原子が存在するだけでは十分ではなく、結晶全体にわたって特定のサイトに規則正しく結合している必要がある。占有率も重要である。しかしながら XRF のシグナルが存在しない場合は、重原子が結晶中に存在していないことになるため、データ測定を待たずに棄却することができる。XRF アタッチメントを用いることにより、大幅な省力化が可能となる。

3. 位相決定の原理

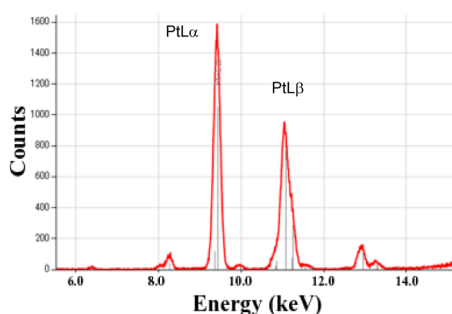
3.1. MIR 法

重原子多重同形置換法は、その名の通り、重原子を含まないいわゆる Native 結晶と、Native 結晶を重原子を含む溶液に浸して重原子を導入した誘導体結晶を作成し、その位相のずれから Native 結晶の位相を導き出す方法である。

図3にMIR法による位相決定の原理を示す。構造因子は波として考えることができるので、複素平面上で考えると便利である。青色で表したのがNative結晶からの情報である。Native結晶の回折強度はデータ測定により測定することができるが、位相は測定すること



(a)



(b)

図2. (a) 単結晶 X 線構造解析装置用 XRF アタッチメント. (b) Native 結晶を 10 mM の K_2PtCl_4 溶液に 10 min ソーキングした後 (a) にて測定した結果.

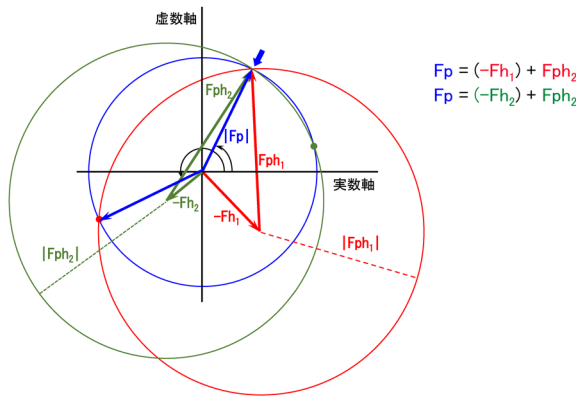


図3. MIR法の原理図 (Argand diagram). 特定の回折点についての理想的な位相関係を示している. F_p : Native タンパク質の構造因子, F_{ph1} : 1つ目の重原子誘導体の構造因子, F_{ph2} : 2つ目の重原子誘導体の構造因子, F_{h1} : 1つ目の重原子誘導体の重原子のみの構造因子, F_{h2} : 2つ目の重原子誘導体の重原子のみの構造因子. $|F_p|$, $|F_{ph1}|$, $|F_{ph2}|$ はそれぞれNative タンパク質, 1つ目の重原子誘導体, 2つ目の重原子誘導体の構造因子の振幅で, 回折強度測定により測定することができる.

ができない. この状況は本来ベクトルである構造因子の矢印の長さはわかるが, その終点の位置がわからないということに相当する. ここで重原子誘導体の出番となる.

重原子の位置がわかると, 重原子分の構造因子を計算することができる. 構造因子はベクトルとしてあらわされるので, 図3中 F_{h1} のように書き込むことができる. ただし重原子誘導体の重原子以外の部分については, その回折強度しかわからないので, 重原子の構造因子の終点を中心とする構造因子の振幅を半径とする円を描く (図3の赤円). 誘導体とNative 結晶に由来する赤円と青円の交点は, 重原子誘導体とNative 結晶, 重原子のみの構造因子のベクトル演算が満たされている. しかしながら交点は2つ存在あり, 位相角の可能性は2つあることになる. そこで2つ目の重原子誘導体を用意し, 同様な作業を繰り返す. 2つめの誘導体についても, 重原子の位置を決め重原子分の構造因子を計算する (図3の F_{h2}). F_{h2} の終点を中心とする, 重原子誘導体の振幅を半径とする円を描くと, 今回も2つの交点ができるが, 1つめの誘導体で得られた2つの交点と矛盾しないのは1つの交点のみとなる (図3の太い矢印). これで2つの位相角の可能性が1つに決定できたことになり, したがってタンパク質結晶の位相が決まったことになる.

3.2. MAD法

MAD法はMIR法よりも新しい手法であるとの印象を受けるが, 理論自体はMIR法と同時期に構築されていた^{(3), (4)}. MAD法は異なる波長での測定が必要であるため, 実用にはタンパク質構造解析用の放射光ビームラインの出現が必須であったからである.

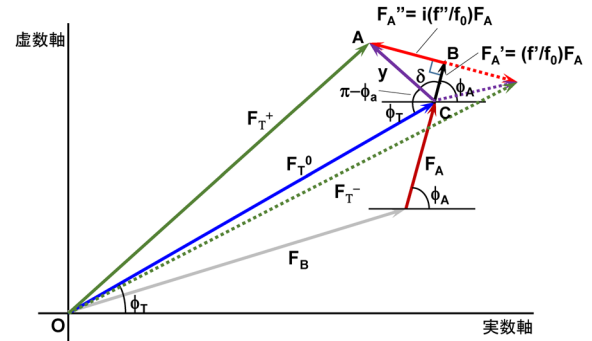


図4. MAD法の原理図 (Argand diagram). 特定の回折点についての理想的な位相関係を示している. F_B : 異常分散を持たない全原子の構造因子, F_A : 異常分散を持つ全原子の異常分散に寄与しない部分の構造因子, F_A' : 異常分散を持つ全原子の異常分散に寄与する部分の構造因子のうち, 異常分散に寄与しない部分と同じ位相を持つ部分の構造因子, F_A'' : 異常分散を持つ全原子の異常分散に寄与する部分の構造因子のうち, 異常分散に寄与しない部分と90度位相が異なる部分の構造因子.

MIR法では原子種の違いや結合部位, 占有率の違いにより構造因子が変化するのを利用するのに対し, MAD法では異なる波長に対する異常分散が異なることにより構造因子が変化するのを利用する.

図4は異常分散源がある場合の, 1回折点についての位相関係を示している. この図からMAD法の位相決定の原理⁽⁵⁾を導いてみる. 異常分散源となる重原子はすべて同一の元素であるとし, 重原子全体の構造因子を F_H , 異常分散に寄与しない部分を F_A , F_A' と同じ位相を持ち異常分散に寄与する波長依存部分を F_A' , F_A'' と90度位相が異なる異常分散に寄与する波長依存部分を F_A'' とすると,

$$F_H = F_A + F_A' + F_A'' = F_A + \frac{f'}{f_0} F_A + \frac{if''}{f_0} F_A$$

$$\therefore |F_A'| = \frac{f'}{f_0} |F_A|, |F_A''| = \frac{f''}{f_0} |F_A| \quad (1)$$

なぜなら,

$$F_H = \sum_j f_0 \exp\{2\pi i (h_j \cdot r_j)\} + \sum_j f' \exp 2\pi i \{2\pi i (h_j \cdot r_j)\}$$

$$+ \sum_j if'' \exp 2\pi i \{2\pi i (h_j \cdot r_j)\}$$

$$= F_A + \frac{f'}{f_0} \sum_j f_0 \exp\{2\pi i (h_j \cdot r_j)\}$$

$$+ i \frac{f''}{f_0} \sum_j f_0 \exp\{2\pi i (h_j \cdot r_j)\}$$

$$= F_A + \frac{f'}{f_0} F_A + i \frac{f''}{f_0} F_A$$

△ABCは直角三角形なので, 3平方の定理を適用し (1)式を代入すると,

$$y^2 = |F_A'|^2 + |F_A''|^2 = \left(\frac{f'^2 + f''^2}{f_0^2} \right) |F_A|^2 \quad (2)$$

また直角三角形△ABC と (1) 式より

$$y \cos \delta = |F_A'| = \frac{f'}{f_0} |F_A|, \quad y \sin \delta = |F_A''| = \frac{f''}{f_0} |F_A| \quad (3)$$

ここで△OAB に余弦定理を適用すると、

$$|F_T^+|^2 = |F_T^o|^2 + y^2 - 2|F_T^o|y \cos\{(\pi - \phi_a) + \phi_T\}$$

$(\pi - \phi_a) + \delta + \phi_a = \pi$ すなわち $\phi_a = \phi_A + \delta$ であり、
 $\cos(\pi - \alpha) = -\cos \alpha$, $\cos(\alpha \mp \beta) = \cos \alpha \cos \beta \pm \sin \alpha \sin \beta$
 であるので、

$$\begin{aligned} &= |F_T^o|^2 + y^2 + 2|F_T^o|y \cos\{(\phi_T - \phi_A) - \delta\} \\ &= |F_T^o|^2 + y^2 + 2|F_T^o|y \cos \delta \cos(\phi_T - \phi_A) \\ &\quad + 2|F_T^o|y \sin \delta \sin(\phi_T - \phi_A) \end{aligned}$$

(2) 式と (3) 式を代入すると、

$$\begin{aligned} |F_T^+|^2 &= |F_T^o|^2 + ((f'^2 + f''^2)/(f_0^2)) |F_A|^2 \\ &\quad + 2(f'/f_0) |F_T^o| |F_A| \cos(\phi_T - \phi_A) \\ &\quad + 2(f''/f_0) |F_T^o| |F_A| \sin(\phi_T - \phi_A) \end{aligned}$$

F_T^- についても同様に計算し、 $a(\lambda) = (f'^2 + f''^2)/(f_0^2)$,
 $b(\lambda) = 2(f'/f_0)$, $c(\lambda) = 2(f''/f_0)$ とすると、

$$\begin{aligned} |F_T^+|^2 &= |F_T^o|^2 + a(\lambda) |F_A|^2 + b(\lambda) |F_T^o| |F_A| \cos(\phi_T - \phi_A) \\ &\quad \pm c(\lambda) |F_T^o| |F_A| \sin(\phi_T - \phi_A) \end{aligned} \quad (4)$$

(4) 式において、特定の波長に対する $a(\lambda)$, $b(\lambda)$, $c(\lambda)$ は吸収スペクトルから求めることができるため、波長に依存する未知数は F_T^o , F_A , $(\phi_T - \phi_A)$ の 3 つである。したがって 2 つ以上の異なる波長についてフリーデル対が測定できれば、3 つの未知数に対して 4 つあるいはそれ以上の方程式が得られるため、 F_T^o , F_A , $(\phi_T - \phi_A)$ を決定することができる。回折強度の最も大きな変化は吸収端付近で起こるため、通常吸収端の直前 (Edge) と直後 (Peak)、吸収端から遠い (Remote) の 3 つの波長で測定する。

4. 重原子位置の導出

MIR 法での Native タンパク質の位相計算には、重原子分の構造因子が必要となる。また MAD 法で得られる位相は $\phi_T - \phi_A$ であるため、 ϕ_T を計算するには ϕ_A を差し引かなければならない。すなわち MIR 法にせよ MAD 法にせよ、何らかの方法で重原子位置などの重原子パラメーターを決定しなければならない。これは重原子のみのサブ構造を決定することに相当する。

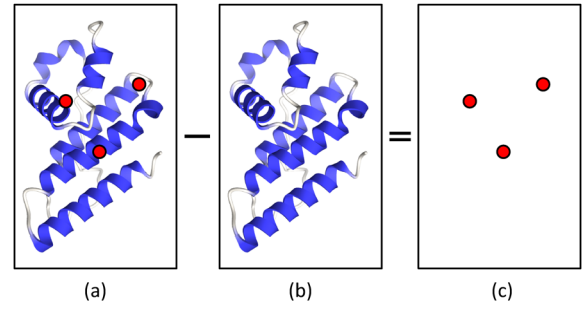


図5. (a) 重原子誘導体に対する構造, (b) Native 結晶に対する構造, (c) 重原子のみの構造。

MIR 法での重原子位置の決定には、重原子誘導体結晶の回折強度から Native 結晶の回折強度を引いた $|F_{ph}| - |F_p|$ を利用する。重原子誘導体の同型性が十分高い場合、 $|F_{ph}| - |F_p|$ は重原子分からの寄与のみを含むため、導出された構造は重原子のみの構造に相当するからである。これは実空間で考えるとわかりやすい。Native タンパク質の構造も重原子誘導体の構造も、タンパク質部分を含むため位相を直接計算することは困難である。ところが重原子誘導体の構造から Native タンパク質の構造を差し引いたものは、重原子のみの構造となり劇的に単純になる (図5)。これであれば何とかして構造を決めることができそうだ。

1990 年ころまでは重原子位置の決定は、重原子間ベクトルの重ね合わせであるパターン関数を計算し手計算により行っていた。対象とする構造が単純であるうちはよかったが、対象とするタンパク質分子が巨大化するにつれ、重原子が結合するサイトの数も増えてきているため、手計算では対応しきれない。現在では SOLVE, SHELXD, SHARP, CRANK⁽⁶⁾ など、パターン関数を自動で解析するソフトウェアや直接法を用いるのが一般的になっている。

5. まとめ

MIR 法は、Native 結晶と 2 種類の異なる重原子誘導体結晶の回折データが測定できれば、位相を決定することができる。しかしながら位相決定に寄与する 1 つの重原子誘導体の作成も、条件の検索や複数回にわたる測定・評価が必要であり最も労力がかかる段階である。測定装置が進歩した現在でもこの状況は変わらない。しかしながら現在では、1 つの重原子誘導体を得られれば、SIR 法 (Single Isomorphous Replacement method) や SIR 法と異常分散を組み合わせた SIRAS 法、SAD 法 (Single-wavelength Anomalous Dispersion method) による位相決定も可能となっている。特にタンパク質中の S-S 結合や、メチオニンの側鎖に含まれる硫黄の異常分散を利用した SAD 法が適用できる場合は、Native 結晶のみで位相決定が可能となる。

MAD 法は異なる波長での複数回のデータ測定が必

要であるものの、必要な重原子誘導体結晶は1つでよいという利点を持つ。したがってMAD法は、Native結晶の取得が原理上もしくは技術上困難であるためMIR法が適用できない場合や、もともとタンパク質に金属が含まれる場合などにも有効である。またMAD法は原理上、同形性の良否の影響を受けないため、位相の質はすなわちデータの質である。一般的には計数率の大きい放射光での測定は、信頼度の高いデータを測定することができるため、MAD法で決定した位相は質が高く、構造解析の次のステップであるモデルの構築も容易となる傾向がある。

参考文献

- (1) H. Miyatake, T. Hasegawa and A. Yamano: *Acta Cryst.*, **D62** (2006), 280–289.
- (2) W. Hendrickson, J. Horton and D. LeMaster: *EMBO J.*, **9** (1990), 1665–1672.
- (3) J. Karle: *Int. J. Quant. Chem. Symp.*, **7** (1980), 357–367.
- (4) W. Hendrickson: *J. Synchrotron Rad.*, **6** (1999), 845–851.
- (5) たとえば J. Drenth: *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer-Verlag, New York, (1994), 207–212.
- (6) S. R. Ness, R. A. G. de Graaff, J. P. Abrahams and N. S. Pannu: *Structure*, **12** (2004), 1753–1761.