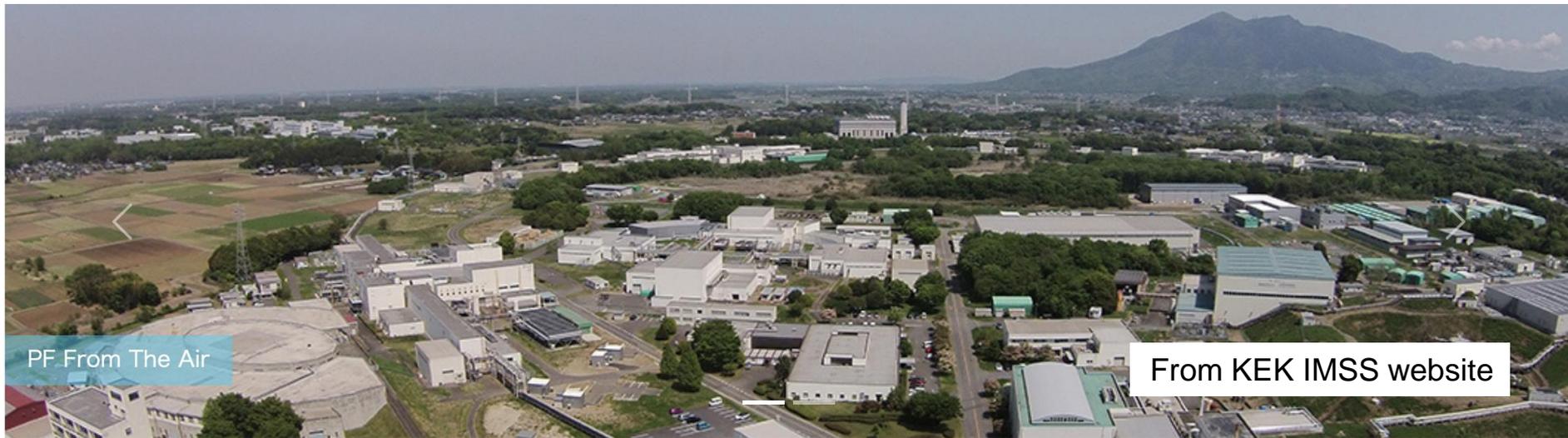


タンパク質結晶構造解析

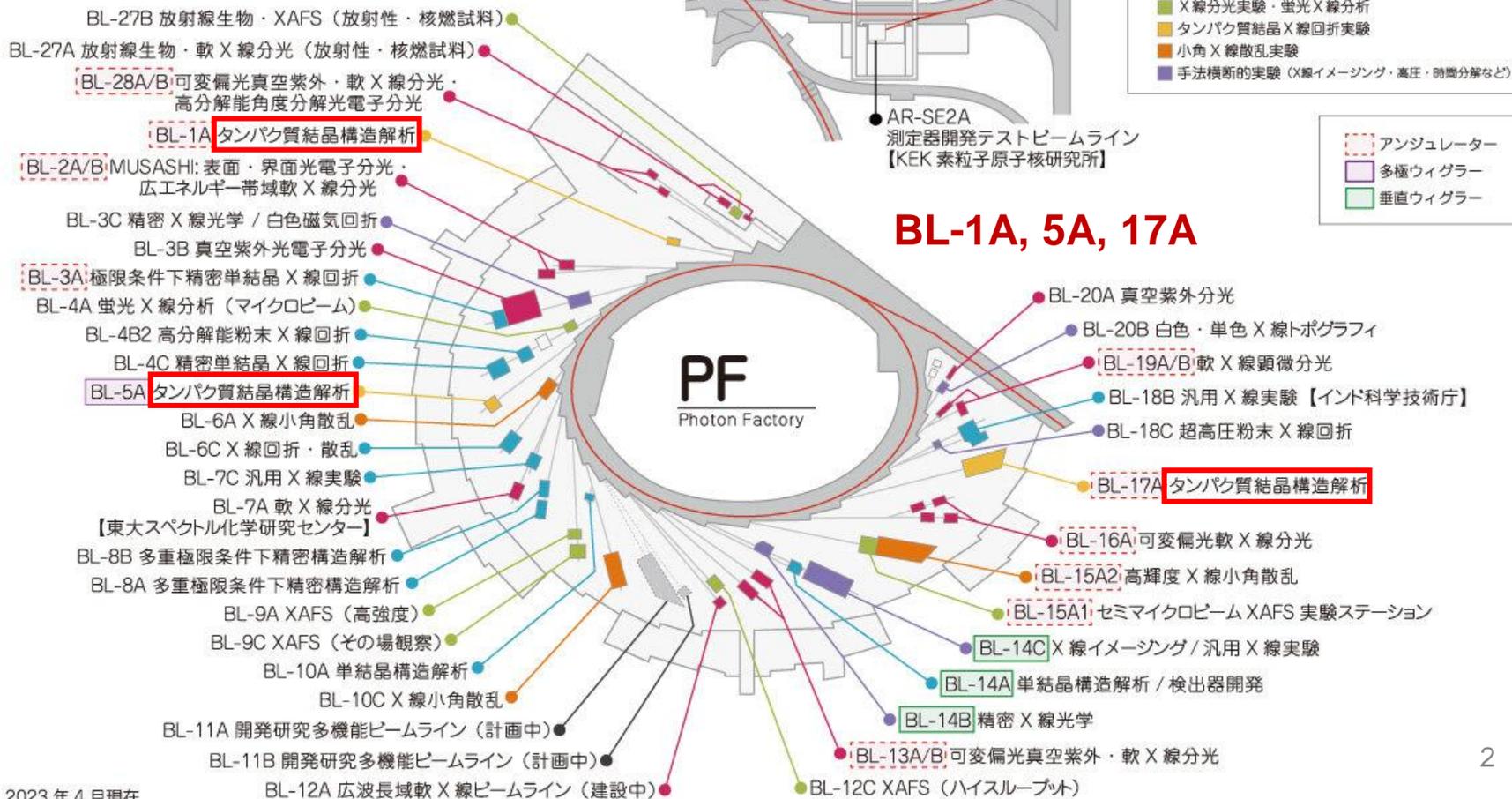


海野 昌喜
(茨城大学 大学院理工学研究科)

Photon Factoryの多彩なビームライン

<https://www2.kek.jp/imss/pf/apparatus/bl/>

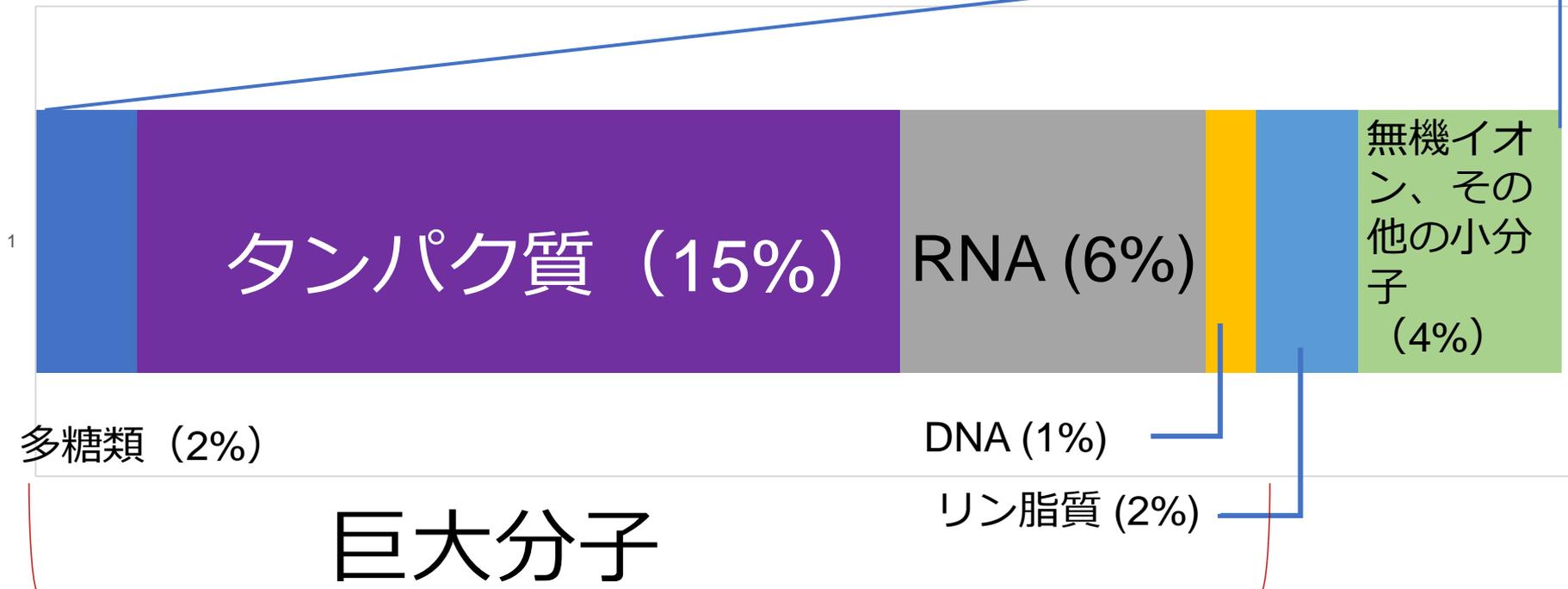
タンパク質結晶用BL 5本



なぜタンパク質を研究するの？ ～細胞を構成する成分～

水 70%

化合物 30%



巨大分子
(生体高分子)

(参考：医学書院 基礎 生物学より)

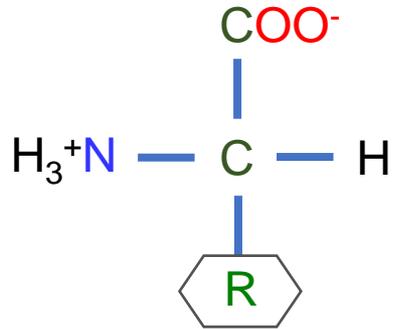
タンパク質と一言で言っても・・・

- 運動（筋肉、細胞）
• 皮膚・骨・腱
 - 爪・毛髪
 - 生体内の化学反応
 - 物質の運搬
 - 生体防御
 - 生体内情報伝達
- 例：コラーゲン
- 例：ケラチン
- 様々な酵素
- 例：ヘモグロビン
- 抗体, 毒
- ホルモン

- 非常時にはエネルギー源にもなる

いろいろな役割を持ったものが、多種類ある

タンパク質は20種類の「アミノ酸」がたくさんつながってできている



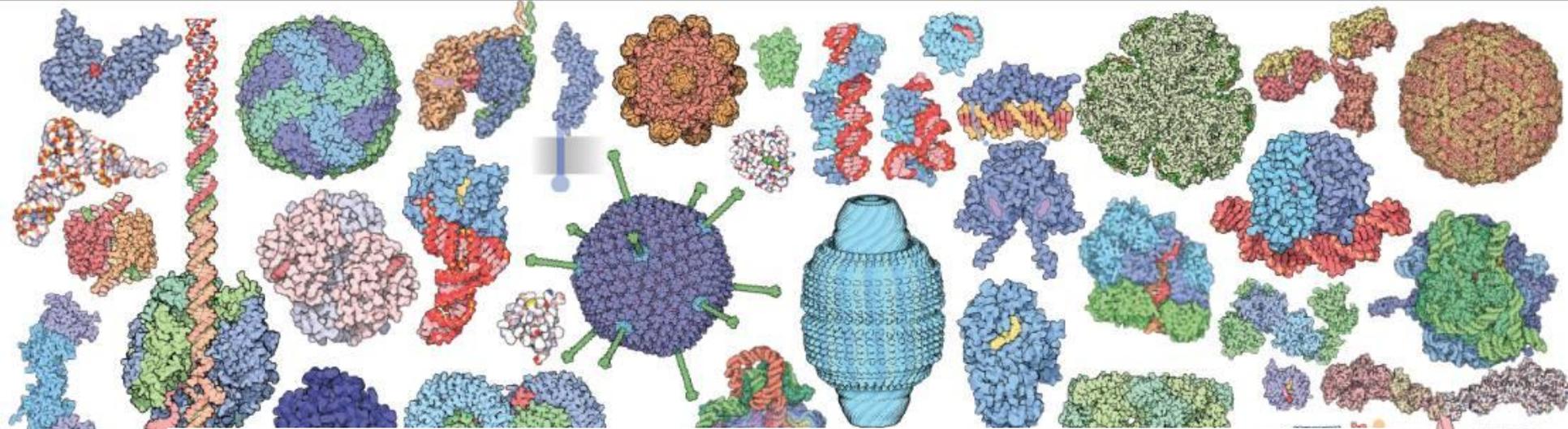
20種類 (様々な構造)

アミノ酸



- アミノ酸の並び方と長さによって、タンパク質の「**立体構造**」が決まる。
- アミノ酸の並び方と長さの情報はDNAに詰まっている。

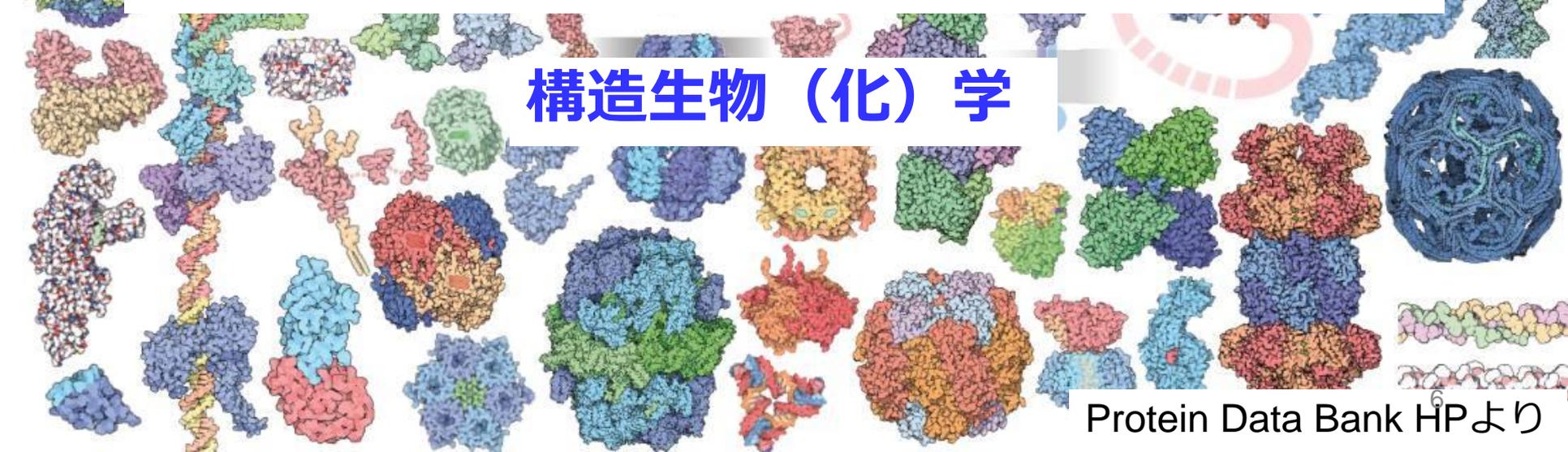
通常、タンパク質は決まった立体構造をとる。



生体内ではたらくタンパク質はその役割に適した**立体構造**
(= **原子の立体的な配置**) をしている。

→ タンパク質の機能を詳しく知るには、その**立体構造**
を出来るだけ**高い分解能**（解像度）で知る必要がある。

構造生物（化）学



大きさの概念

水素原子
0.1 nm
= 1 Å

肉眼

光学顕微鏡

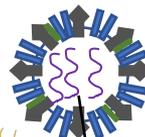
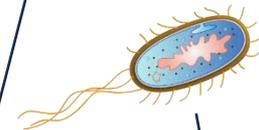
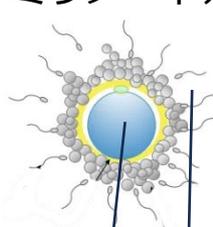
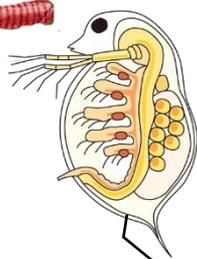
電子顕微鏡

1m
メートル

1 mm
ミリメートル

1 μm
マイクロメートル

1 nm
ナノメートル



ダチョウの卵

十数
cm

ヒト筋繊維の長さ
50 mm

ミジンコ
1~2 mm

ヒトの卵

140 μm

ヒトの精子

60 μm

ヒトの赤血球

7~8 μm

大腸菌

1.5×3 μm

ヒト免疫不全
ウイルス

100 nm

ヘモグロビン分子

6 nm

細胞膜の幅

4 nm

DNA
分子の幅
2 nm

2017年ノーベル化学賞

毎日新聞



Jacques Dubochet



Joachim Frank



Richard Henderson

クライオ電子顕微鏡の開発

タンパク質試料の凍らせ方を確立した人

1982

イメージングのアルゴリズムを開発した人。
単粒子再構成法

1987

世界で初めて「膜タンパク質」であるバクテリオロドプシンを原子分解能で構造解析した人

1990

タンパク質の立体構造をどうやって観るの？

主な手法

- **X線結晶構造解析**

一番正確に構造を解析できる。分子の大きさの制限があまりない。結晶が必要

- **クライオ電子顕微鏡解析**

大きな分子や結晶になりにくい分子の解析に適している。
(小さな分子は観えにくい。)

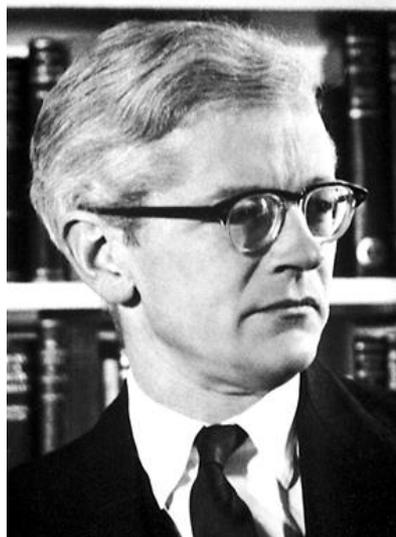
- **NMR (核磁気共鳴) 解析**

溶液中 (細胞内に近い状態) のタンパク質の構造を知ることができる。
(大きな分子の構造はわからない。)

- **立体構造予測**

人工知能 (AI) の力を借りて、タンパク質のアミノ酸配列から、その3次元構造を予測する。速いし、汎用性がある。あくまで「予測」。

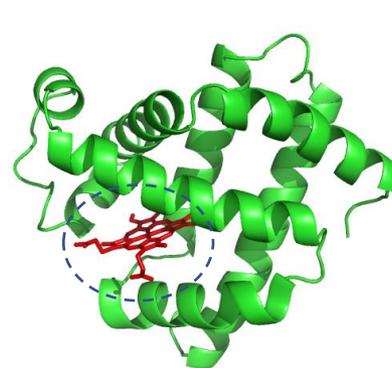
1962年 ノーベル化学賞 「タンパク質の構造解析」



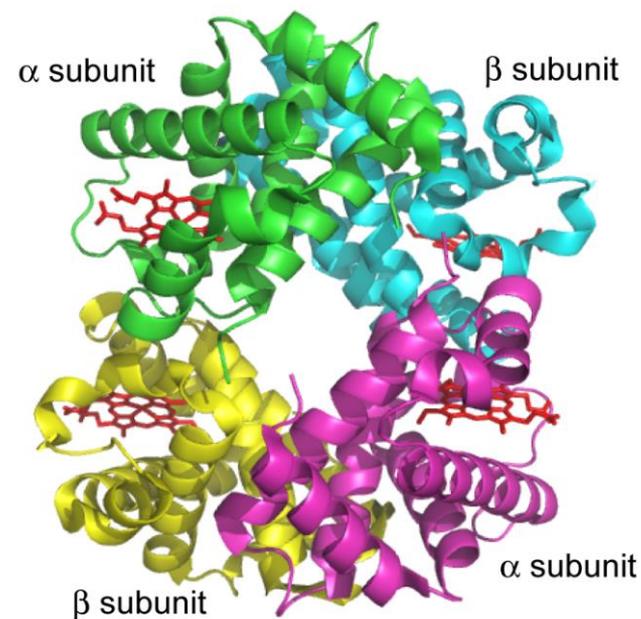
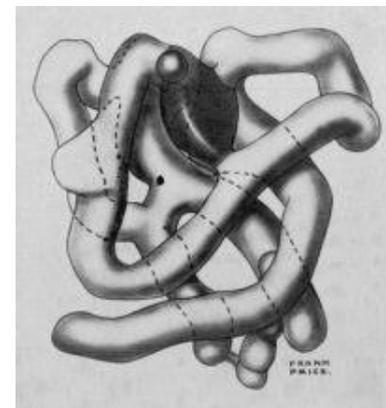
ジョン・ケンドリュー
(写真はWikipediaより。)



マックス・ペルーツ



ミオグロビン



ヘモグロビン

- 世界で初めて、タンパク質の立体構造を可視化した。
- 「重原子同型置換法」(後述) というX線結晶構造解析法を開発した。

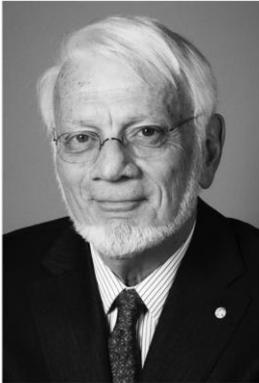
リボソームの立体構造決定にはPFが貢献している

The Nobel Prize in Chemistry
2009

「リボソームの構造と機能の解明」



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Venkatraman Ramakrishnan
Prize share: 1/3



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Thomas A. Steitz
Prize share: 1/3



© The Nobel Foundation. Photo: U. Montan
Ada E. Yonath
Prize share: 1/3



KEK-PF BL-6A

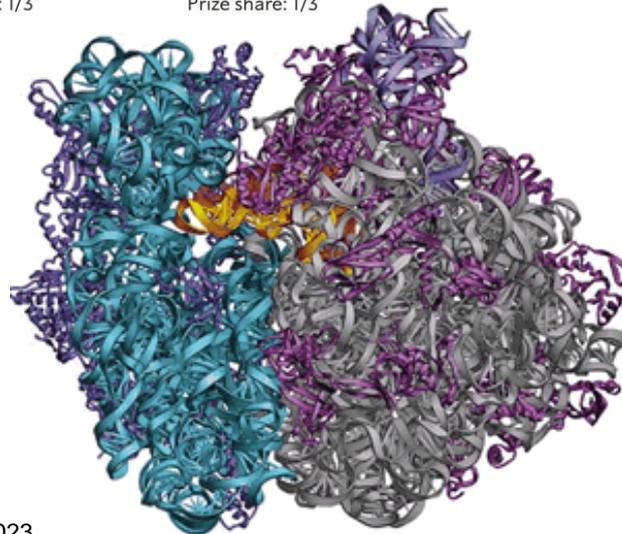
ワイセンベルクカメラ

News@KEKより

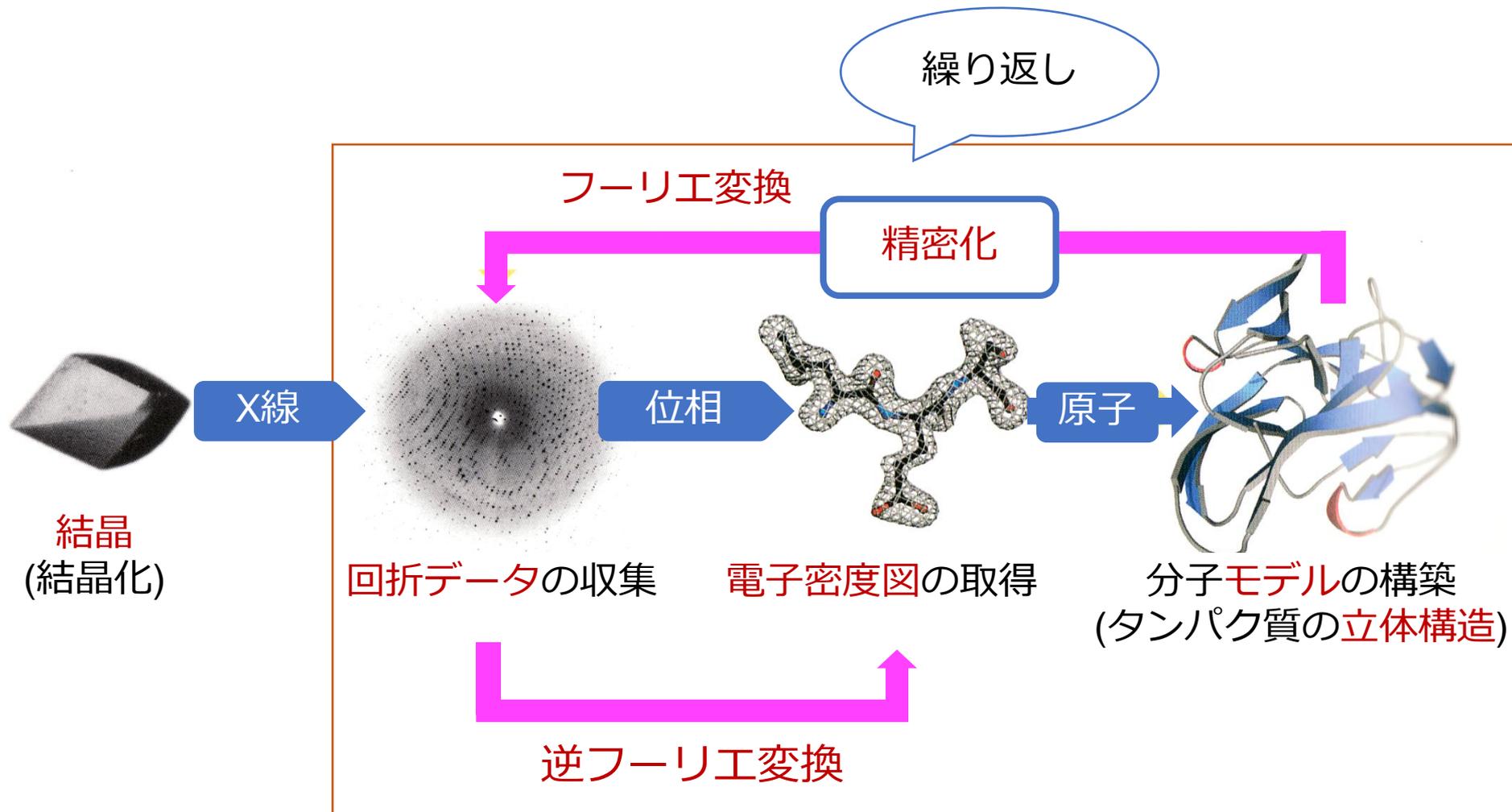
タンパク質の製造工場

(これもタンパク質の一種←タンパク質をつくるタンパク質)

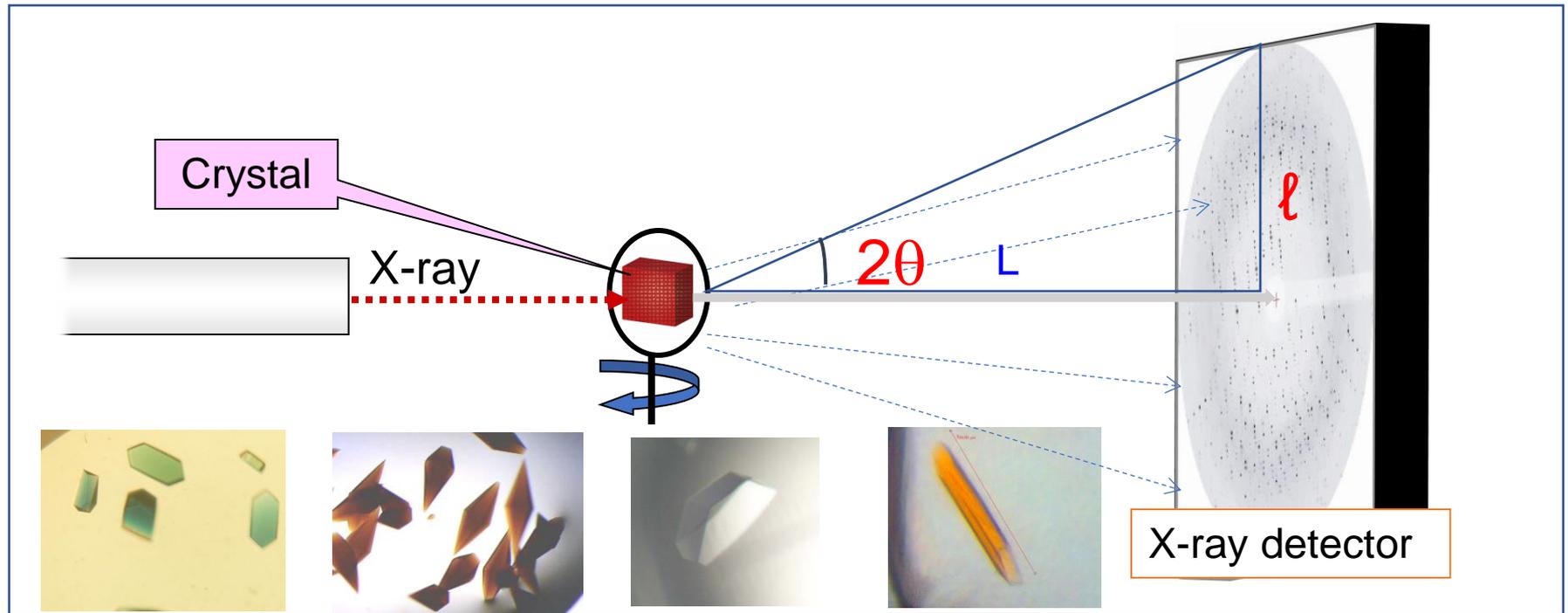
Ribosome



タンパク質のX線結晶構造解析の概略



結晶にX線を当てると「回折」し、像が得られる



$$\tan 2\theta = \ell / L$$

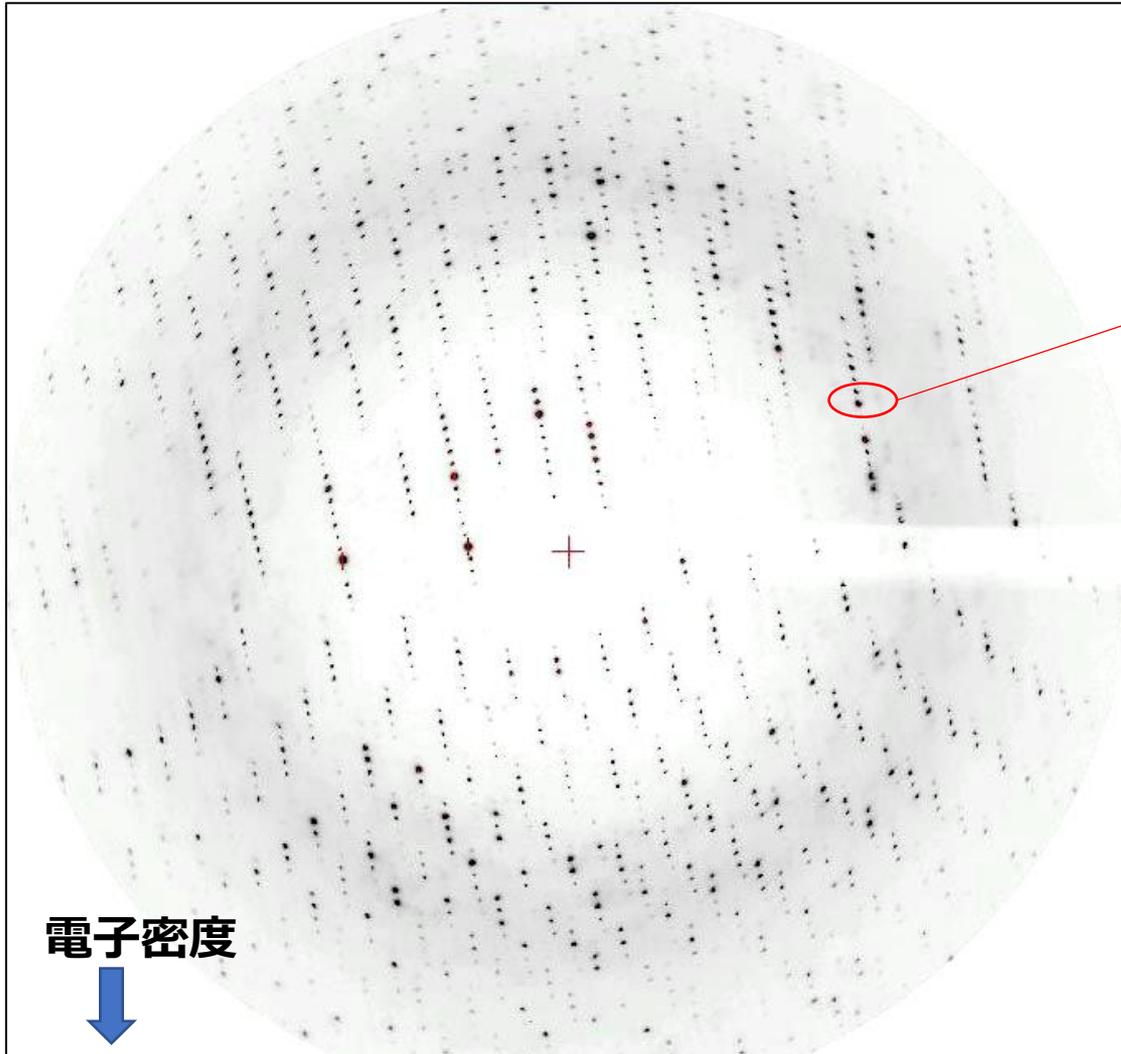
$$2d \cdot \sin\theta = \lambda \quad \text{ブラッグの法則}$$

↑
分解能
(解像度)

(数値が小さいほど、分解能は高い、と表現する。)

分解能が高い = 2θ が大きい

位相の決定→電子密度の計算



X線回折強度データ収集
(最低限集める領域はspace groupによる)



指数 $(h k l)$ と
回折強度 Intensity (I)
 $I(h k l)$



これらの回折点 (反射) の
位相 $[\alpha(h k l)]$ の情報を得る



Inverse Fourier Transform



x, y, z の位置の **電子密度**
 $[\rho(x y z)]$ が得られる

電子密度



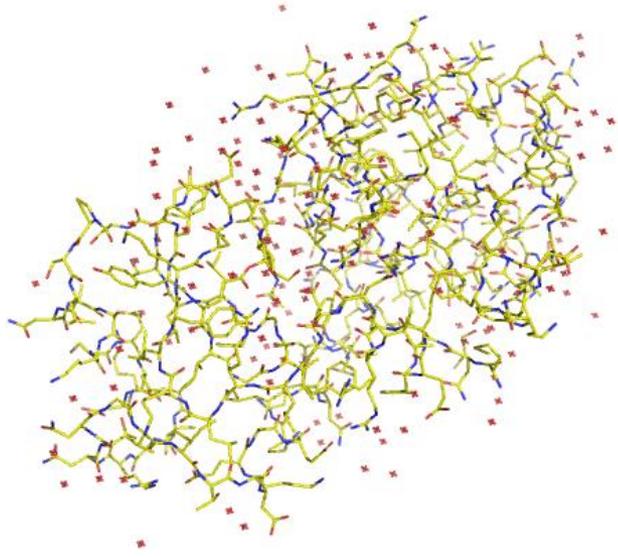
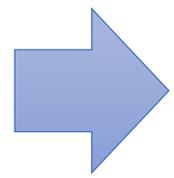
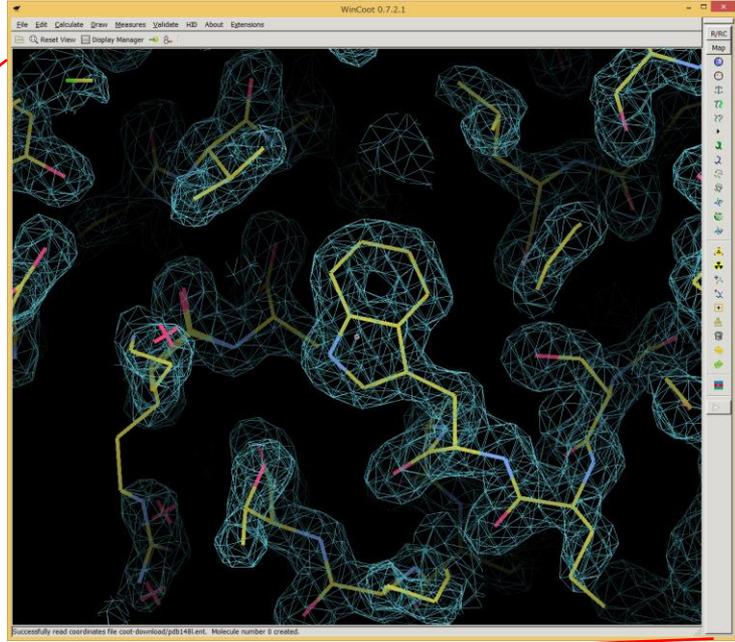
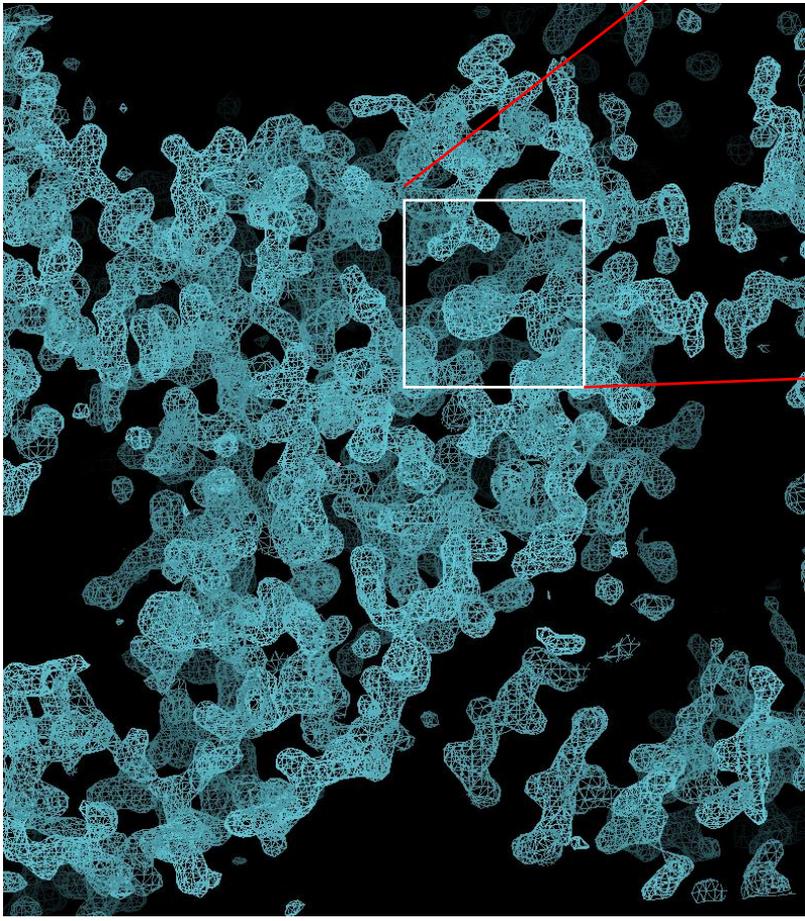
$$\rho(x y z) = (1/V) \sum_h \sum_k \sum_l |F(h k l)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(h k l)]$$

x, y, z の電子密度

Structure factor
構造因子

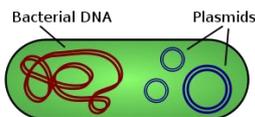
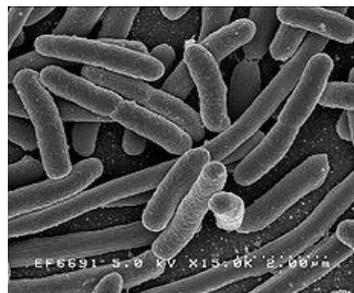
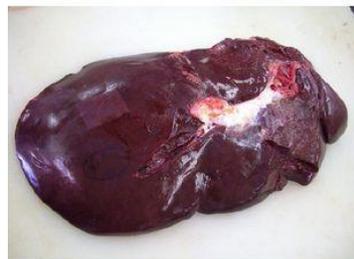
$$|F(h k l)|^2 \propto I(h k l)$$

複雑な計算を経て
見えるのは電子の固まっている場所
→ 電子密度図

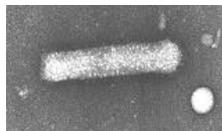
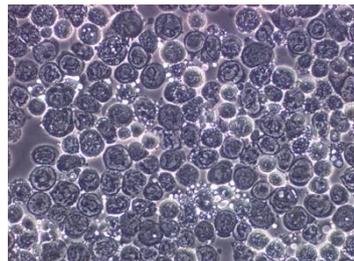


$$\rho(x y z) = (1/V) \sum_h \sum_k \sum_l |F(h k l)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(h k l)]$$

まずやること；目的タンパク質の精製



遺伝子組み換え



バキュロウイルス



大量発現

細胞破碎

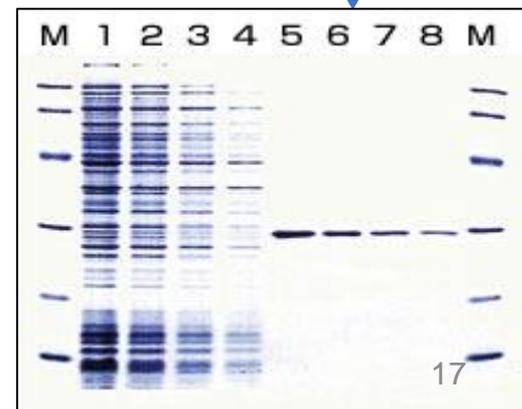
電荷

大きさ

親和性

疎水度

など

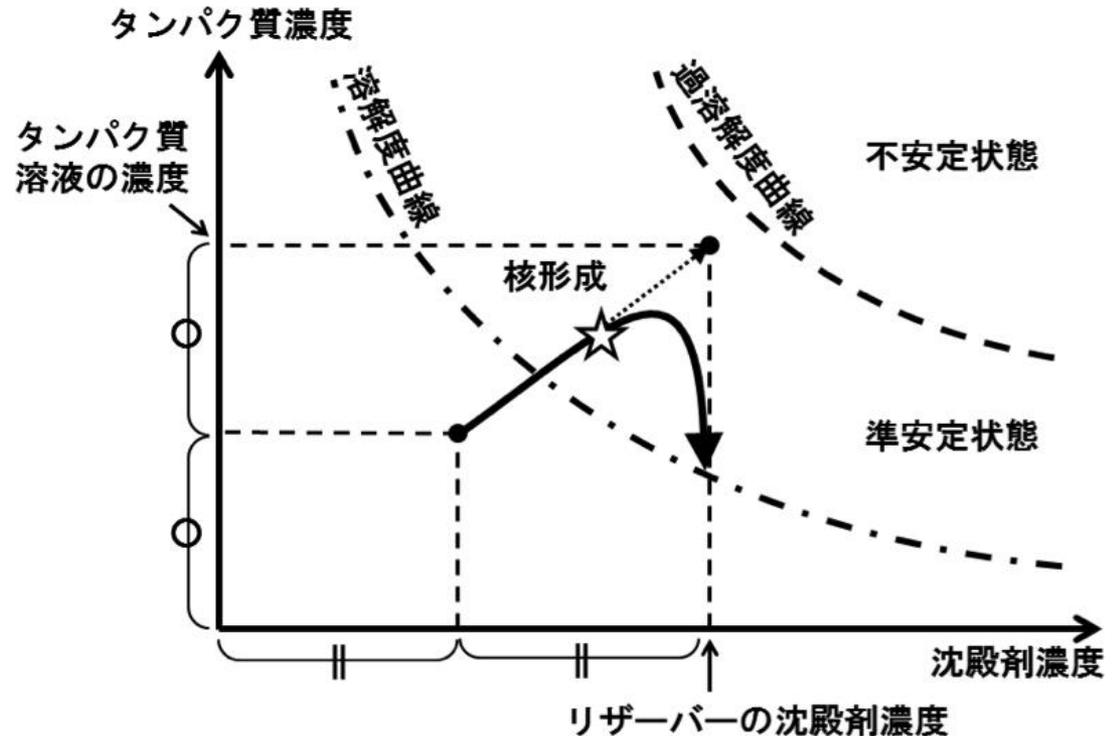
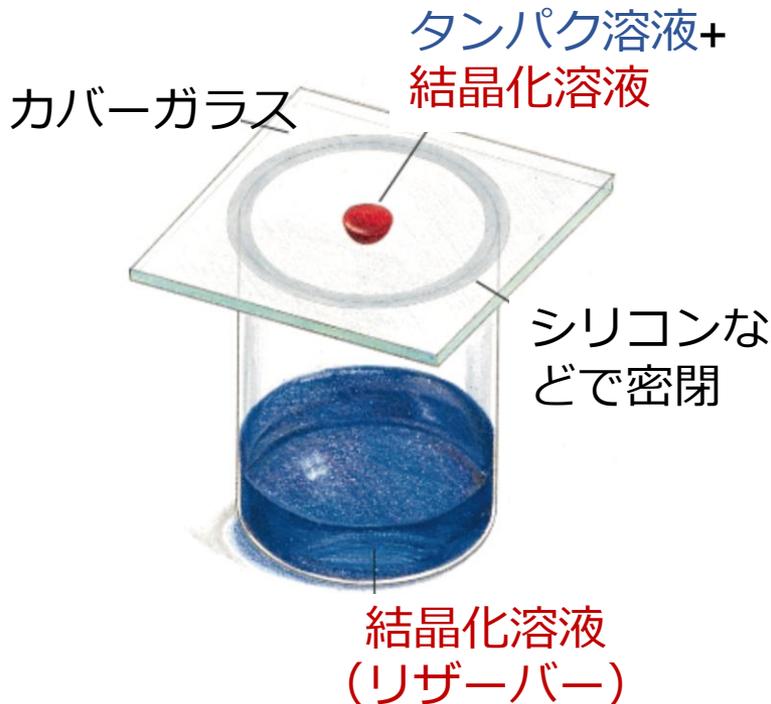


17

タンパク質の結晶化

- **タンパク質の単結晶を作る必要がある**
- タンパク質の溶解度を ゆっくり 下げる
- 水溶液中で 沈殿剤 の濃度を徐々に上げる
- 沈殿剤：硫酸アンモニウム、NaCl (塩析)、ポリエチレングリコール、アルコールなど
- 手法：蒸気拡散法、counter diffusion法(微小重力)など

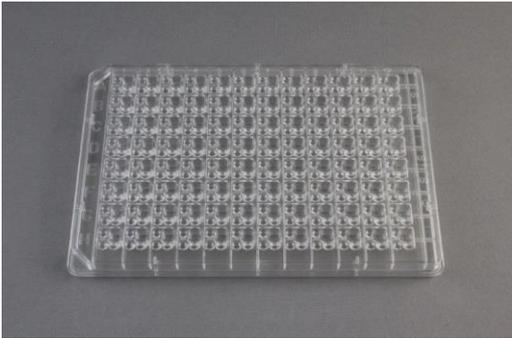
例：蒸気拡散法
(hanging drop vapor diffusion)



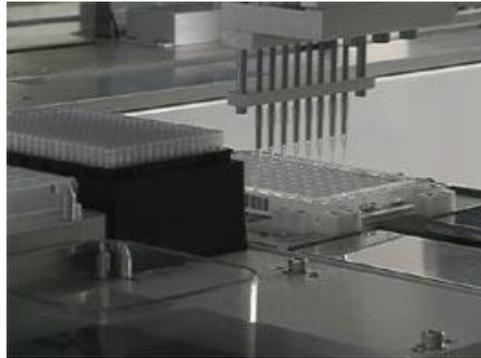
蒸気拡散法における濃度変化 (相図)

結晶化スクリーニング

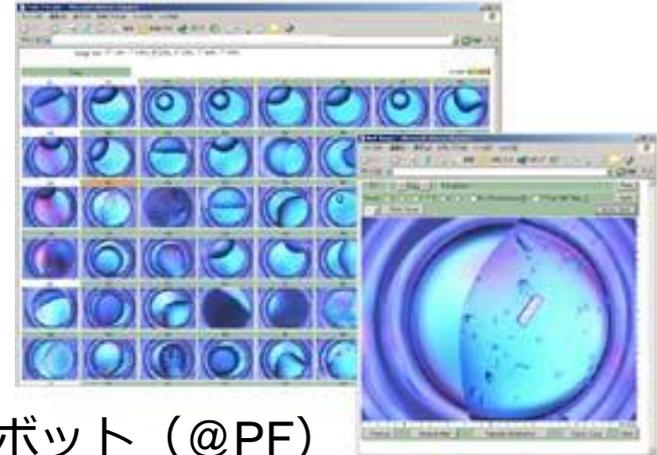
- 基本的に、タンパク質(ソフトマター)は**結晶化しにくい**。
- それぞれのタンパク質が結晶化する**条件は違う**。→ 結晶化条件を**見つける**。
- **アミノ酸が1つ**違うだけでも結晶化条件が異なることがよくある。



結晶化プレート(96 wells)



自動結晶化ロボット (@PF)



光学顕微鏡で観察する



スクリーニングキットの例

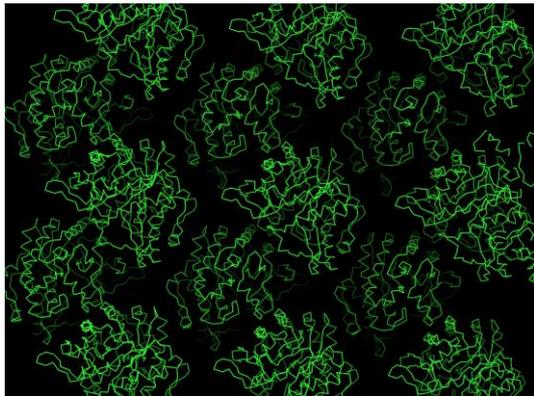
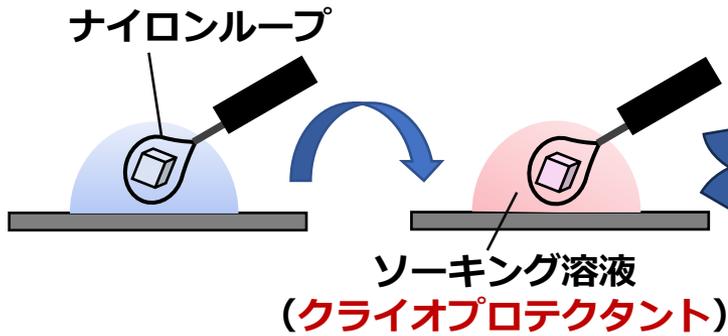
これらのチューブの一本ごとに異なる組成の溶液が入っている。

- 例 Crystal Screen (Hampton Research)

結晶の冷却と抗凍結剤

- X線照射による結晶のダメージを抑える。
→ しかし、氷の成長による結晶の破壊を防がなければならない。

➤ **抗凍結剤**：グリセロール、トレハロース(糖)、低分子量PEG、アルコール類など。

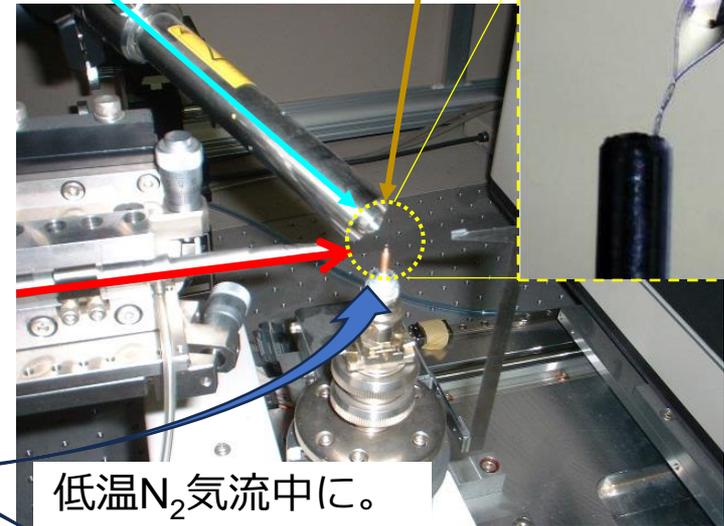


結晶中のタンパク質分子パッキング
間隙が水溶液で満たされている
溶媒含量 25 ~ 75% (平均値は~45%)

冷却N₂ガス

タンパク質
結晶

X線



北大・姚研

液体窒素に。



From KEK IMSS SBRC website



Uni-puck



BLへ

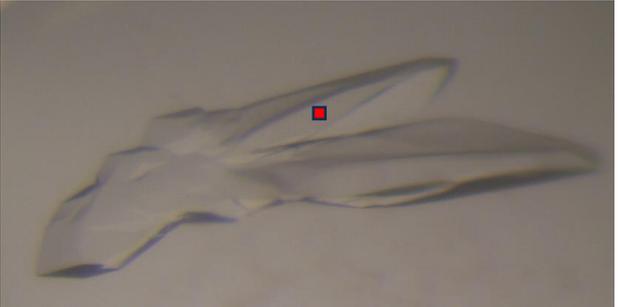
- 分解能の向上
- 酵素反応中間体の捕捉etc

SBRCビームラインの高度化と自動化

微小ビーム

BL-1A: 0.013 x 0.013 mm

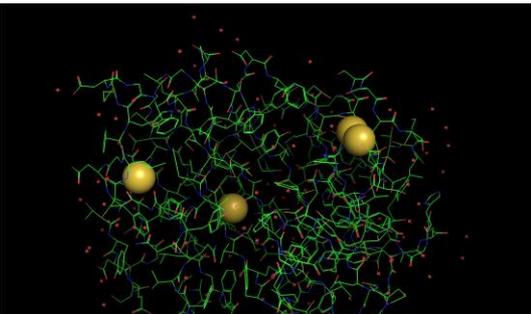
BL-17A: 0.02-0.04 x 0.016 mm



微小結晶や
Polycrystalでもデータ測定できる

長波長X線の利用

BL-1A: 2.7 - 3.3 Å; BL-17A: - 2.1 Å



S, Feなどの原子の異常分散

- 位相決定
- 原子位置の特定

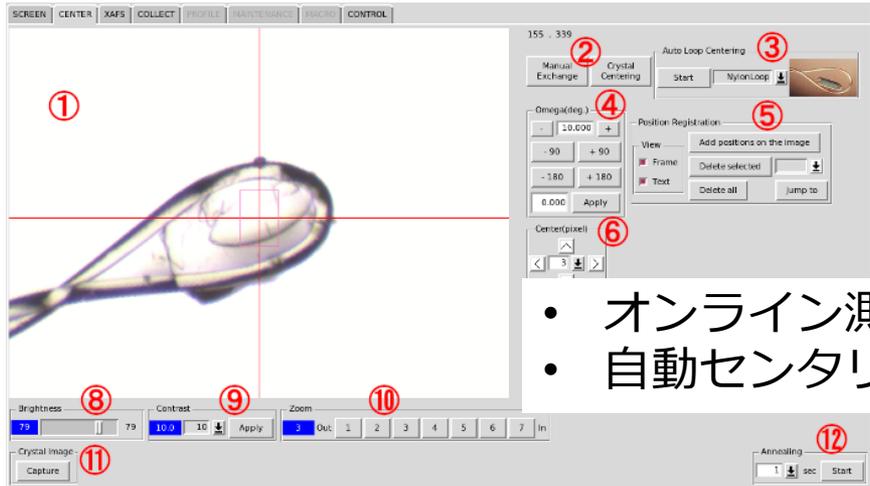
自動化：全自動測定システム

結晶交換ロボット PAM



- 全自動測定
 - リモート測定
 - 現地測定
- いずれか選べる

データ測定システムPReMo



- オンライン測定対応
- 自動センタリングも可能

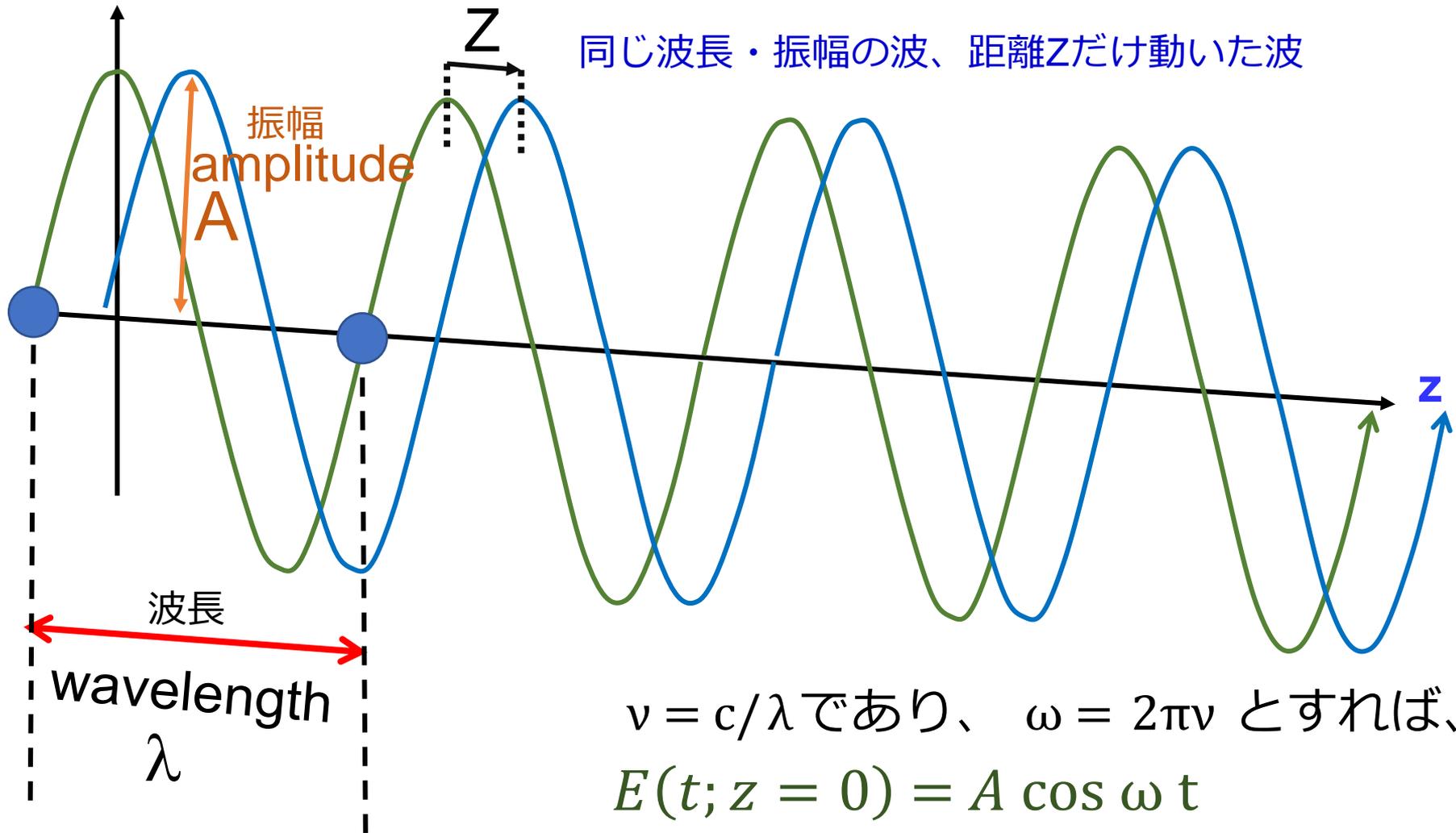
From KEK IMSS SBRC website

ハード・ソフトともに充実している

位相問題について

X線は電磁波 (←波)

Electric field



同じ波長・振幅の波、距離Zだけ動いた波

$v = c/\lambda$ であり、 $\omega = 2\pi v$ とすれば、

$$E(t; z = 0) = A \cos \omega t$$

$$E_{new}(t; z = 0) = A \cos (\omega t + \alpha)$$

$$(Z/\lambda) \times 2\pi = \alpha \quad \text{位相 (差)}$$

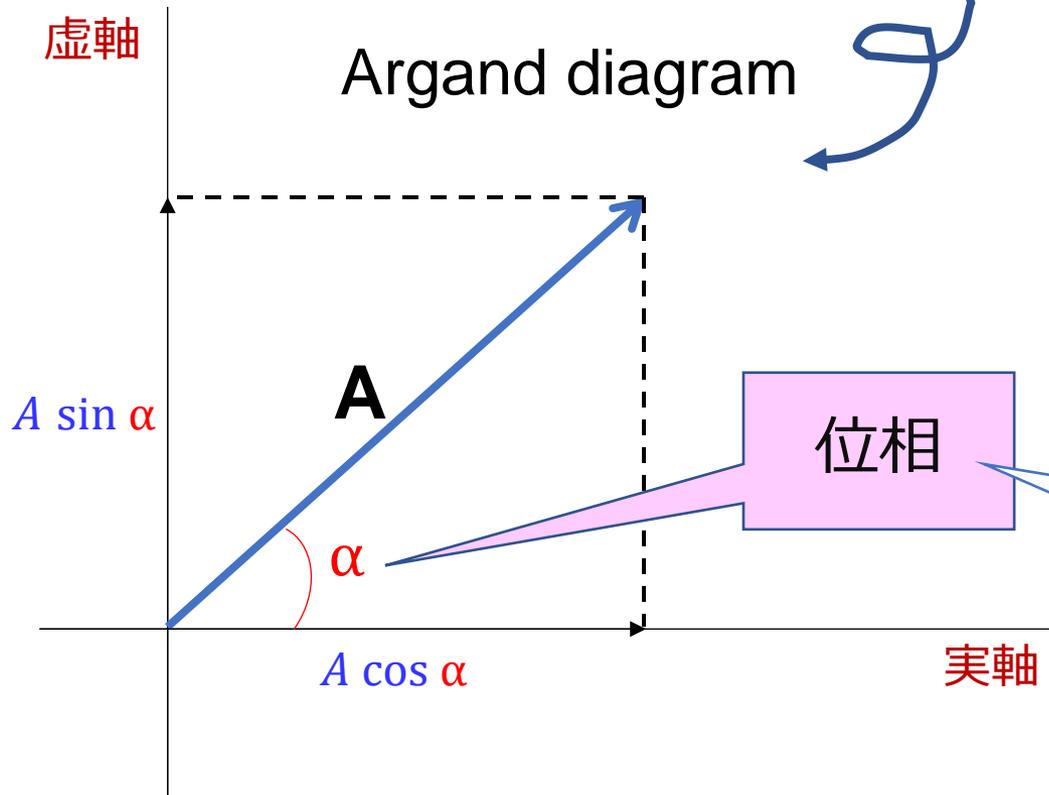
一般的な光（電磁波）

$$E_{new}(t; z = 0) = A \cos(\omega t + \alpha)$$

$$\begin{aligned} A \cos(\omega t + \alpha) &= A \cos \alpha \cos \omega t + A \sin \alpha \sin \omega t \\ &= A \cos \alpha \cos \omega t + A \sin \alpha \cos(\omega t + 90^\circ) \end{aligned}$$

図で表すと・・・

Argand diagram



$$\begin{aligned} &= A \cos \alpha + i A \sin \alpha \\ &= A \exp[i\alpha] \end{aligned}$$

これを決定する！

電磁波は複素平面にベクトルとして描くことができる！！

位相決定には主に3つの方法がある

- 重原子同型置換法

タンパク質結晶に重原子（重金属）イオンを結合させた“重原子誘導体”結晶を作製する。

重原子が結合していない“ネイティブ体”結晶と“重原子誘導体”結晶の両方から回折データを測定し、構造振幅 F の差から位相 α を決定する。

- 異常分散法（異常散乱法）

重原子イオンやセレン原子などが示す異常分散効果を利用し、位相を決定する。

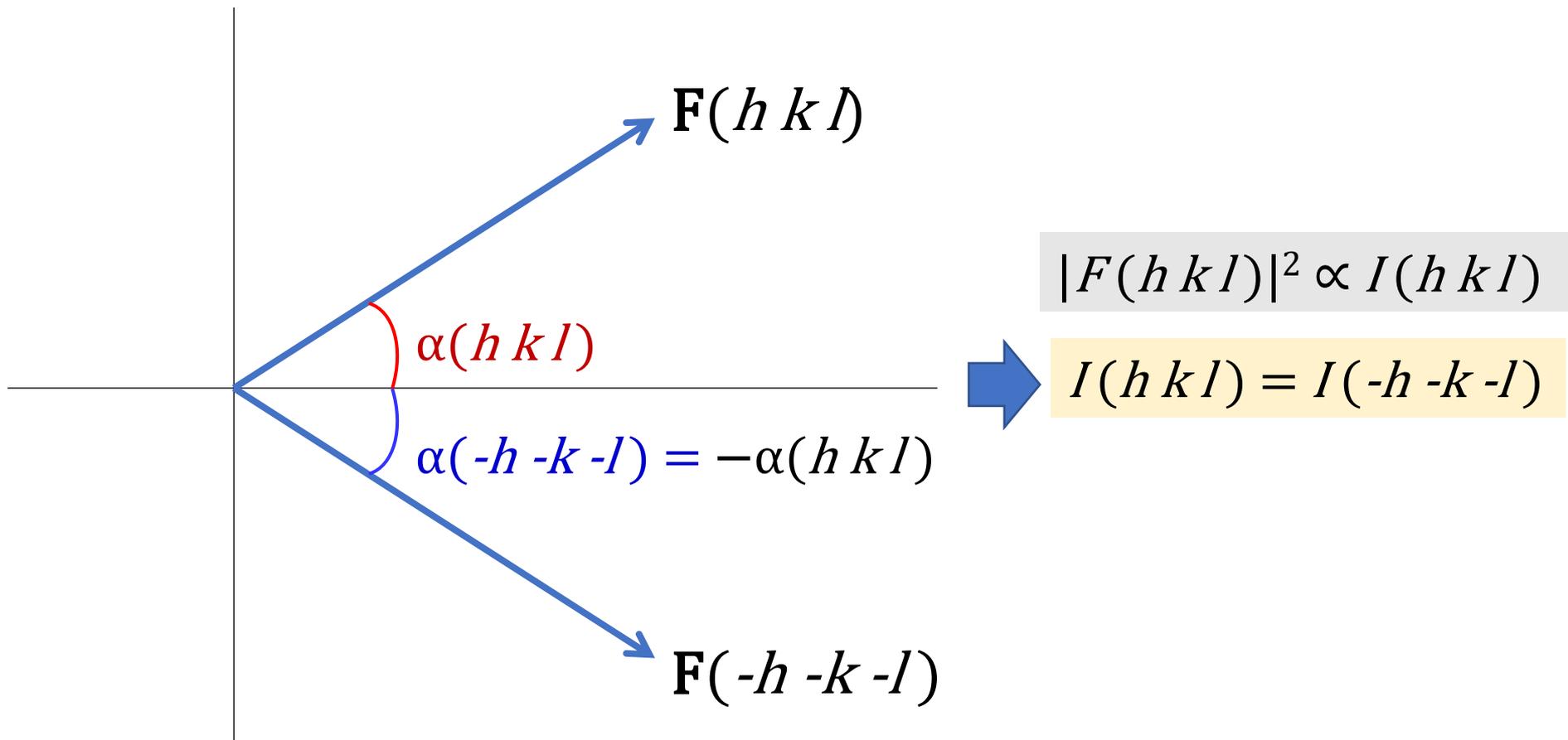
異常分散効果が現れる波長でデータ測定を行う。

- 分子置換法

立体構造がよく似ていると予想されるタンパク質（相同蛋白質など）の構造がすでに決定されている場合に適用する。

相同タンパク質の構造を結晶格子の中に当てはめてフーリエ変換することで、位相を計算する。

$F(h\ k\ l)$ と $F(-h\ -k\ -l)$ の比較

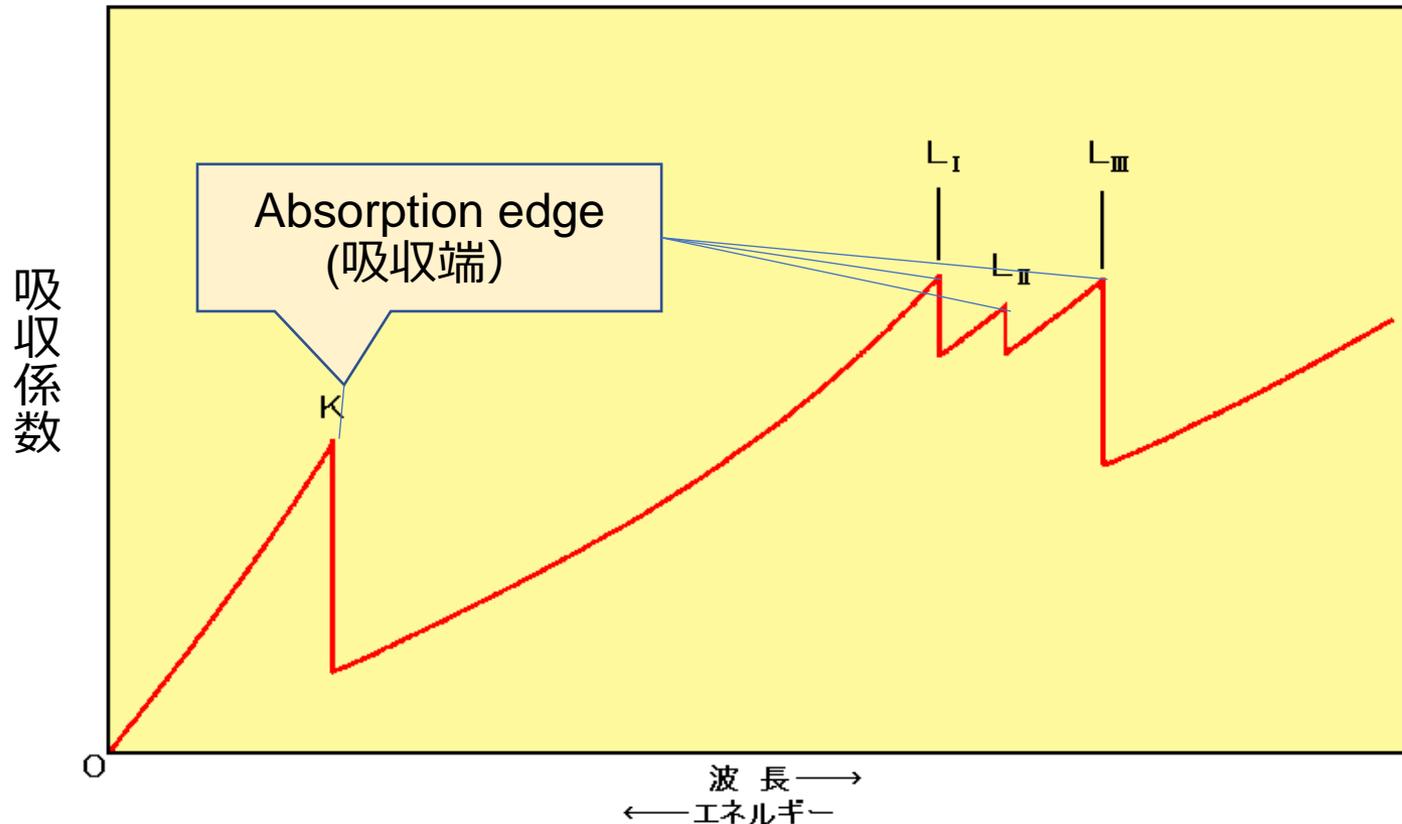


ベクトル $F(h\ k\ l)$ と $F(-h\ -k\ -l)$ は同じ長さをもつが、位相は反対 (α と $-\alpha$)

フリーデルの法則

異常散乱（異常分散）

横軸に波長（エネルギー）、縦軸にある元素によるX線の吸収をプロットすると



X線吸収スペクトルの模式図

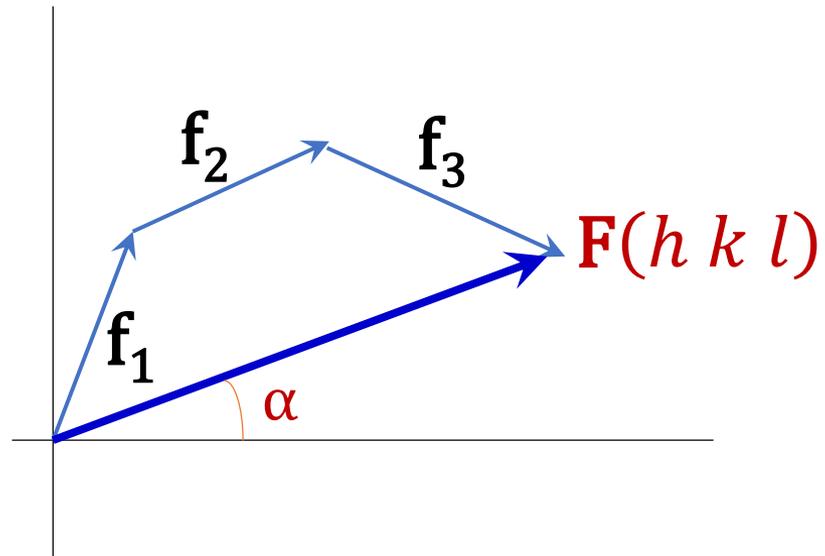
https://atomica.jaea.go.jp/data/fig/fig_pict_08-04-01-26-02.html

吸収端では、X線の光子エネルギーによって（その殻の）電子がより高いエネルギーの空軌道に弾き飛ばされる

構造因子と原子散乱因子の関係

どんな原子が単位格子中のどこにあるかを反映しているのが**構造因子**

(単位格子中に分離した原子を考えた場合)



$$F(h k l) = \sum_j f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)]$$

↑
原子散乱因子

i番目の原子がどこにあるのか

=構造

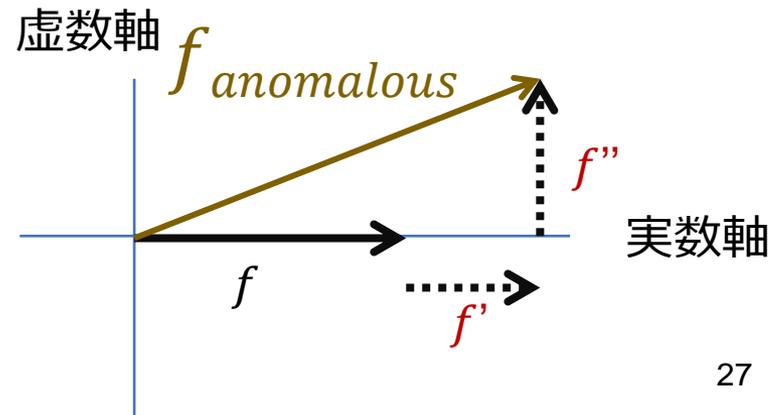
異常散乱がある場合

$$f_{\text{anomalous}} = f + f' + if''$$

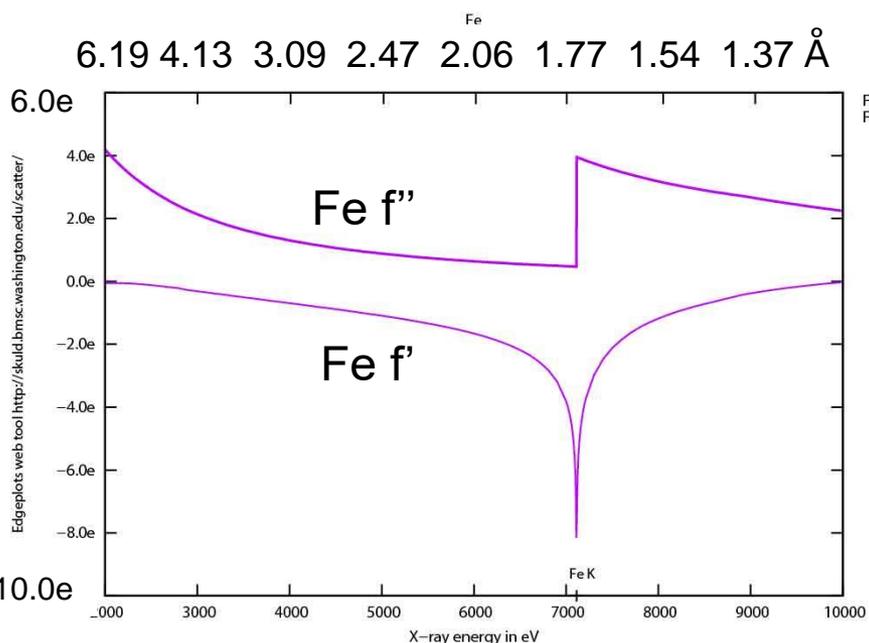
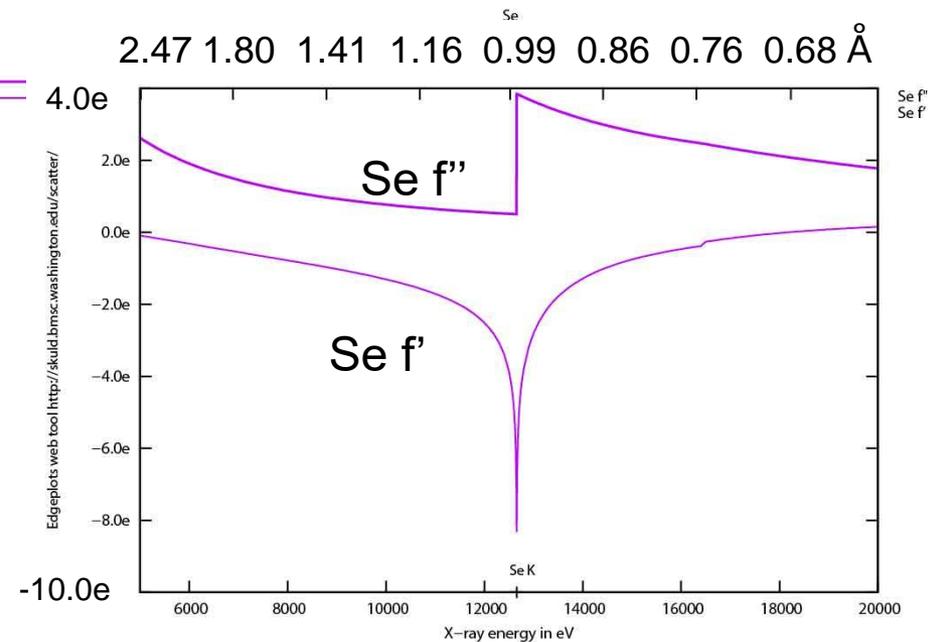
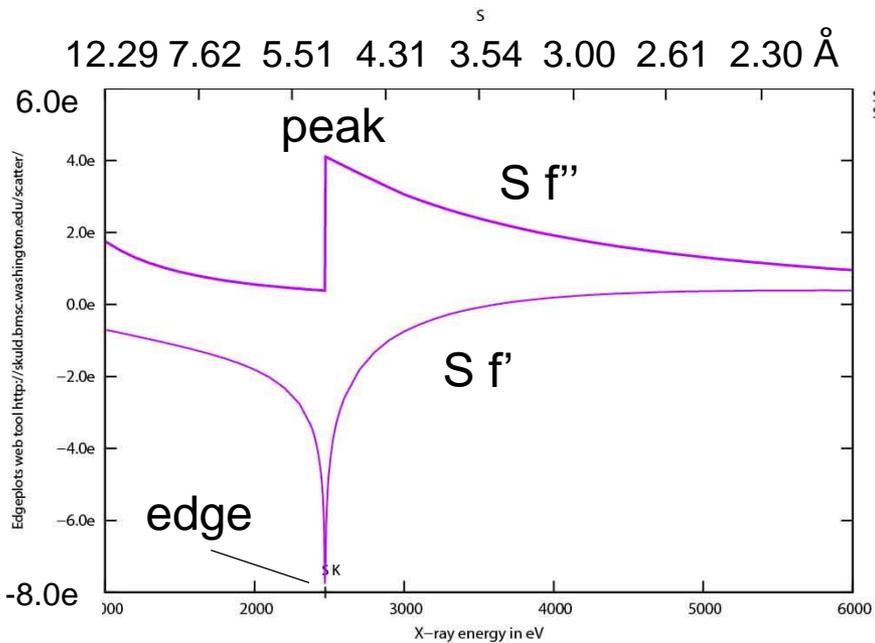
$$|F(h k l)| \neq |F(-h -k -l)|$$

波長に依存

$$\alpha(-h -k -l) \neq -\alpha(h k l)$$



吸収端付近における、原子散乱因子の実数項 f' ・虚数項 f'' の変化の例

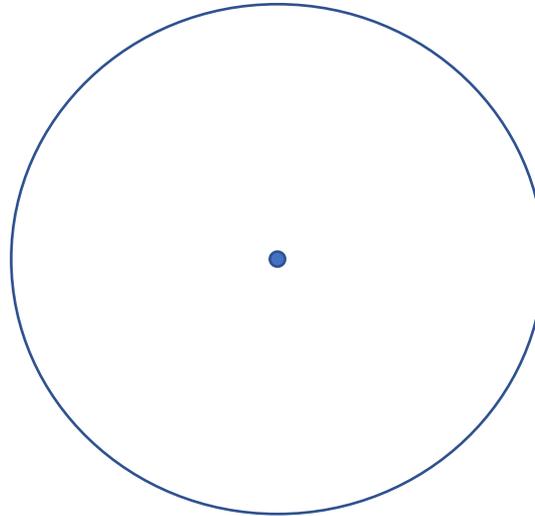
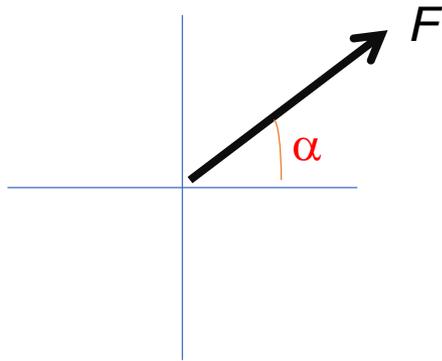


| K-edge in Å | | |
|-------------|--------|--------|
| Fe | Se | S |
| 1.7436 | 0.9796 | 5.0155 |

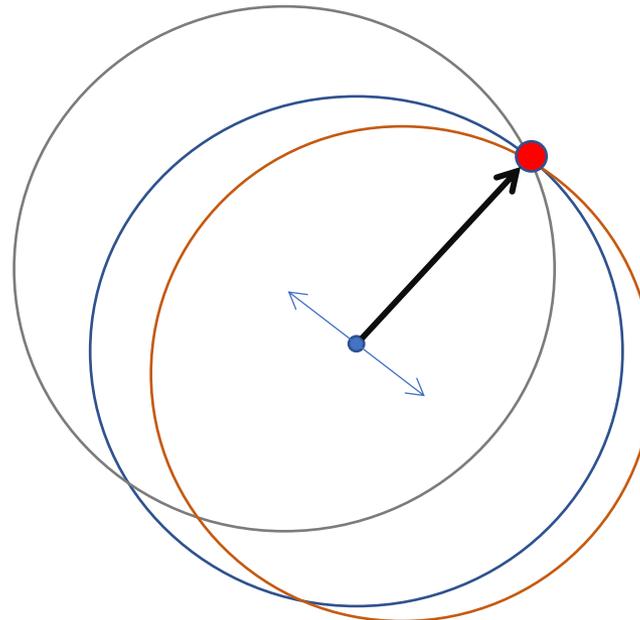
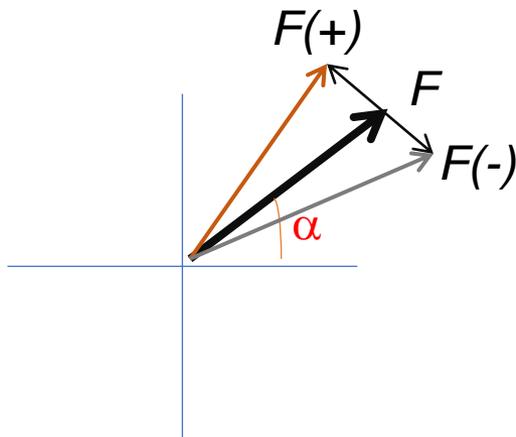
<http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/>

異常散乱法

PFのようなシンクロトロン放射光は、**波長を**
変えられる。 → 吸収端で測定



通常、**Fの大きさだけ**が
わかり、どこを向いている
かわからない。

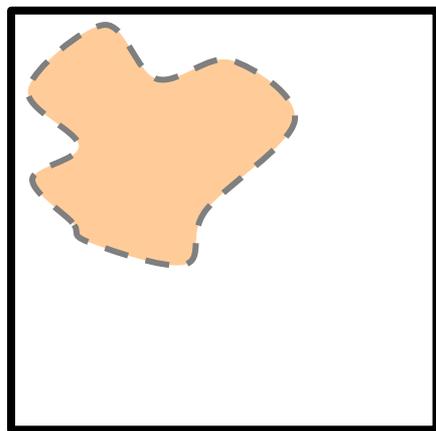


異常散乱の影響があ
ると、
F(+) と **F(-)** は **等価で**
はなくなる。

$$|F(hkl)| \neq |F(-h-k-l)|$$
$$\alpha(-h-k-l) \neq -\alpha(hkl)$$

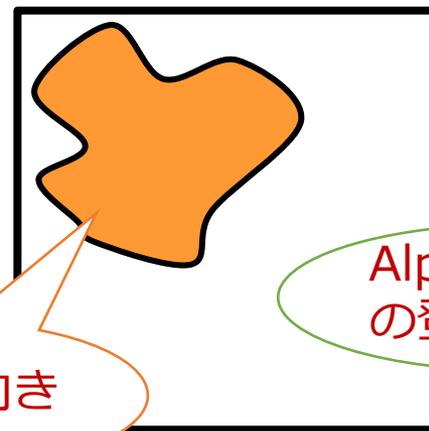
分子置換法による位相決定の流れ

構造を解こうとしている結晶



回折実験によって構造振幅
 $|F_{obs}|$ のみが決まる

同じ大きさの結晶に**相同タンパク質**の構造を当てはめたもの



位置・向き

AlphaFold2
の登場!!

フーリエ変換によって構造振幅
 $|F_{calc}|$ と位相 α_{calc} が決まる

$|F_{obs}|$, α_{calc} の値を利用することで**逆フーリエ**
逆変換を行い、電子密度を計算する。

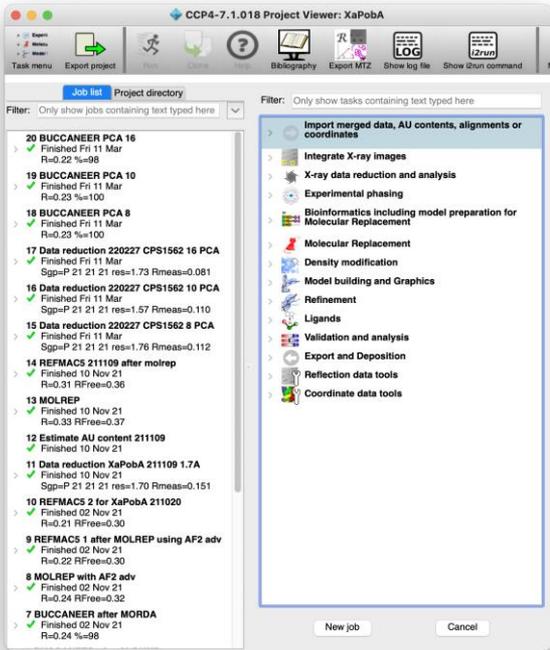
タンパク質の結晶構造解析 データ処理と構造決定

回折像から強度、構造因子を計算する : XDS, DIALS, HKL-2000/3000, iMosflm etc.

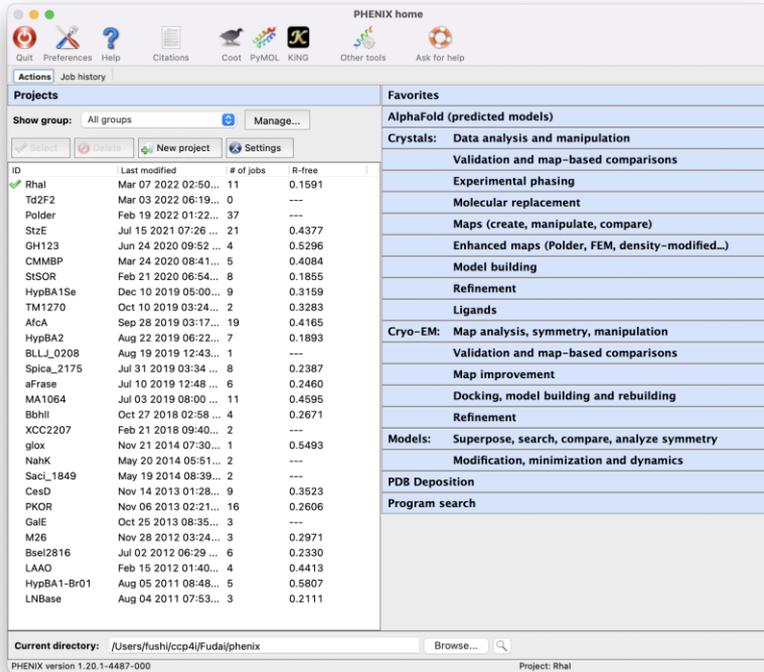
位相決定、モデル構築、精密化など最後まで : PHENIX, CCP4 (aimless, (SHELX), CRANK2, Refmac5, Coot etc.),

構造表示 : PyMOL, Chimera(X) etc.

CCP4i2

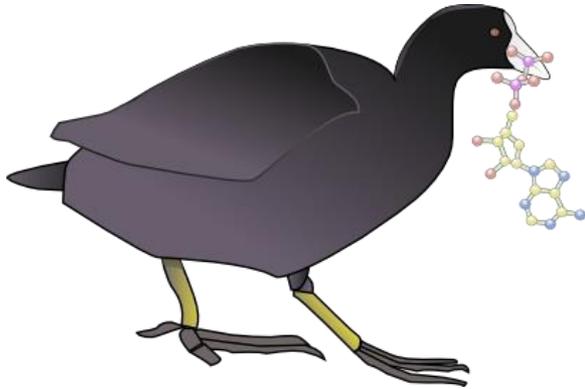


PHENIX

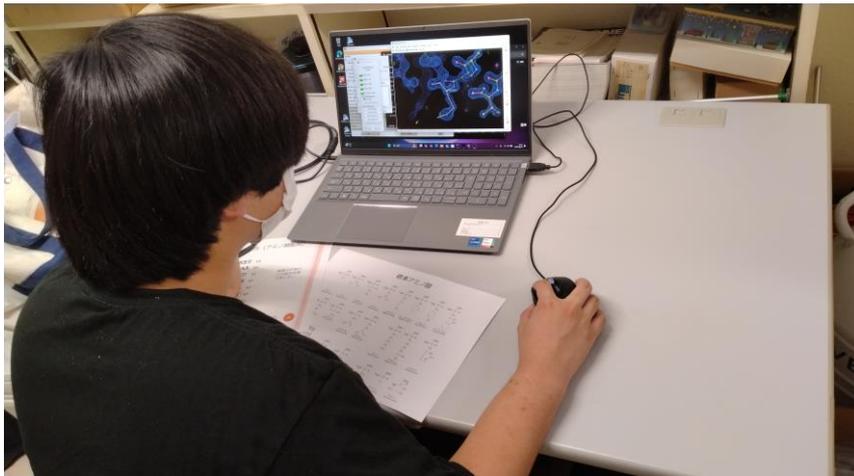
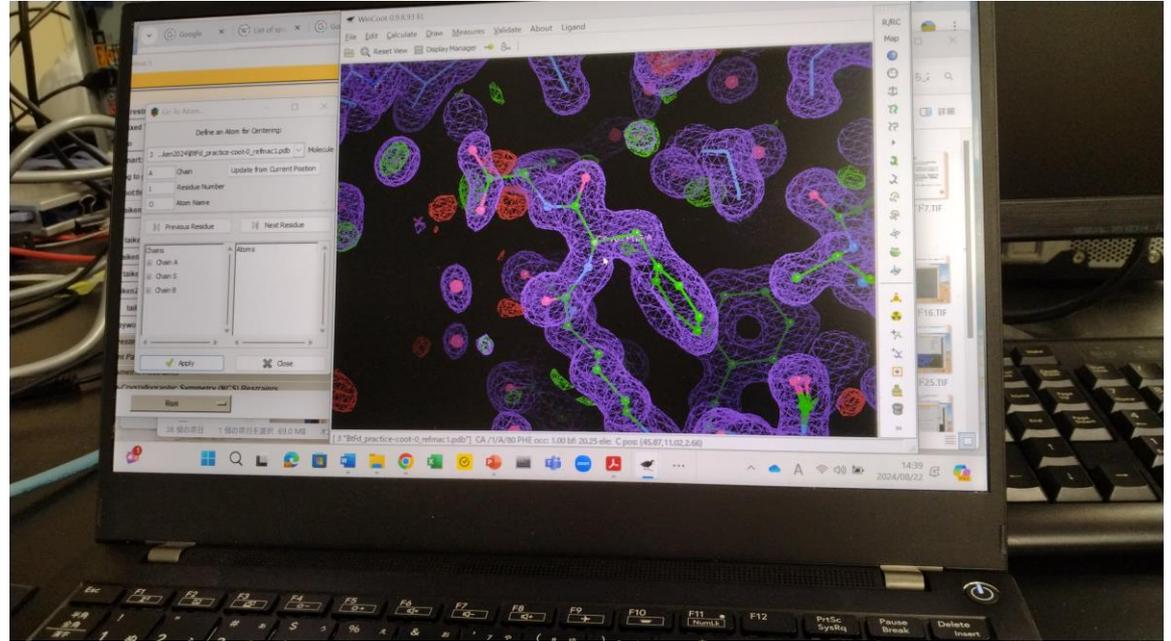


GUIも充実している

タンパク質モデル構築・修正

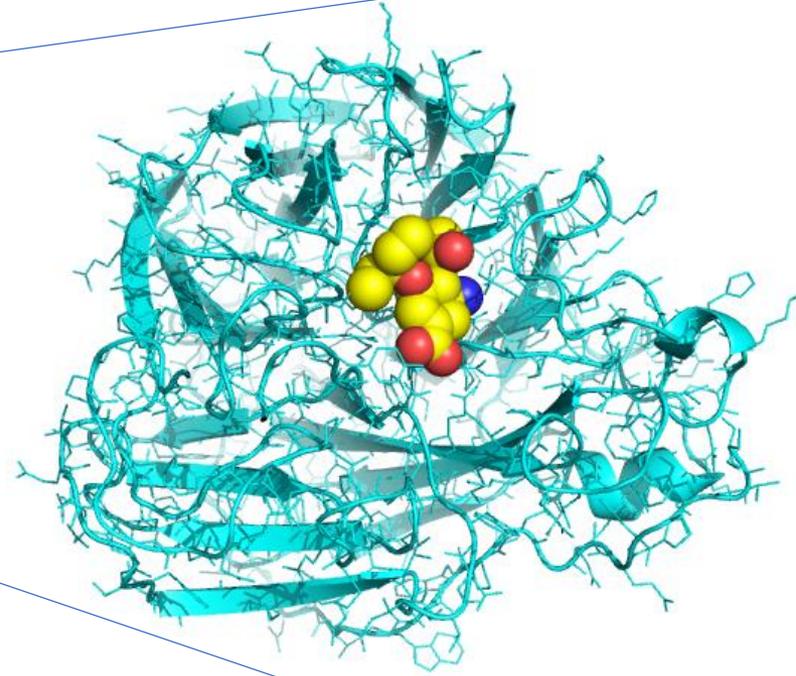
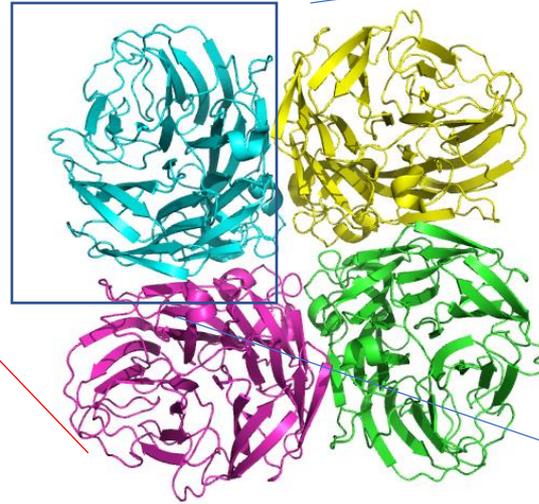
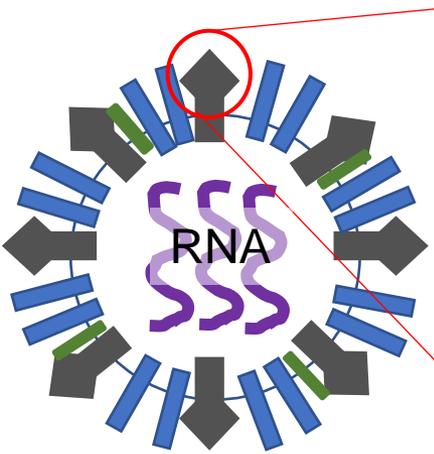


<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>



コンピューターグラフィックソフト
Coot

(X線結晶学による) 構造生物学は社会に貢献する

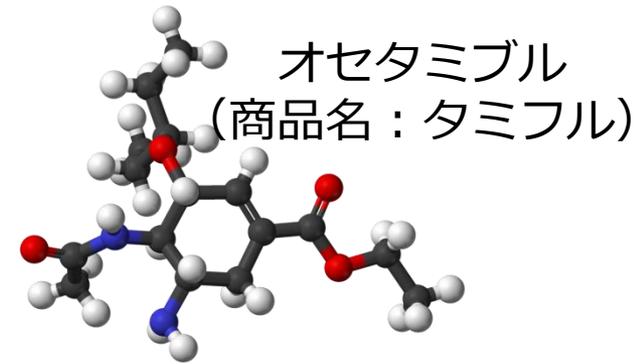


A型インフルエンザ
ウイルス

ノイラミニダーゼ
(酵素)

- 細胞表面の糖鎖を切断
- (ウイルスが) 細胞膜から離脱
⇒別の細胞に感染

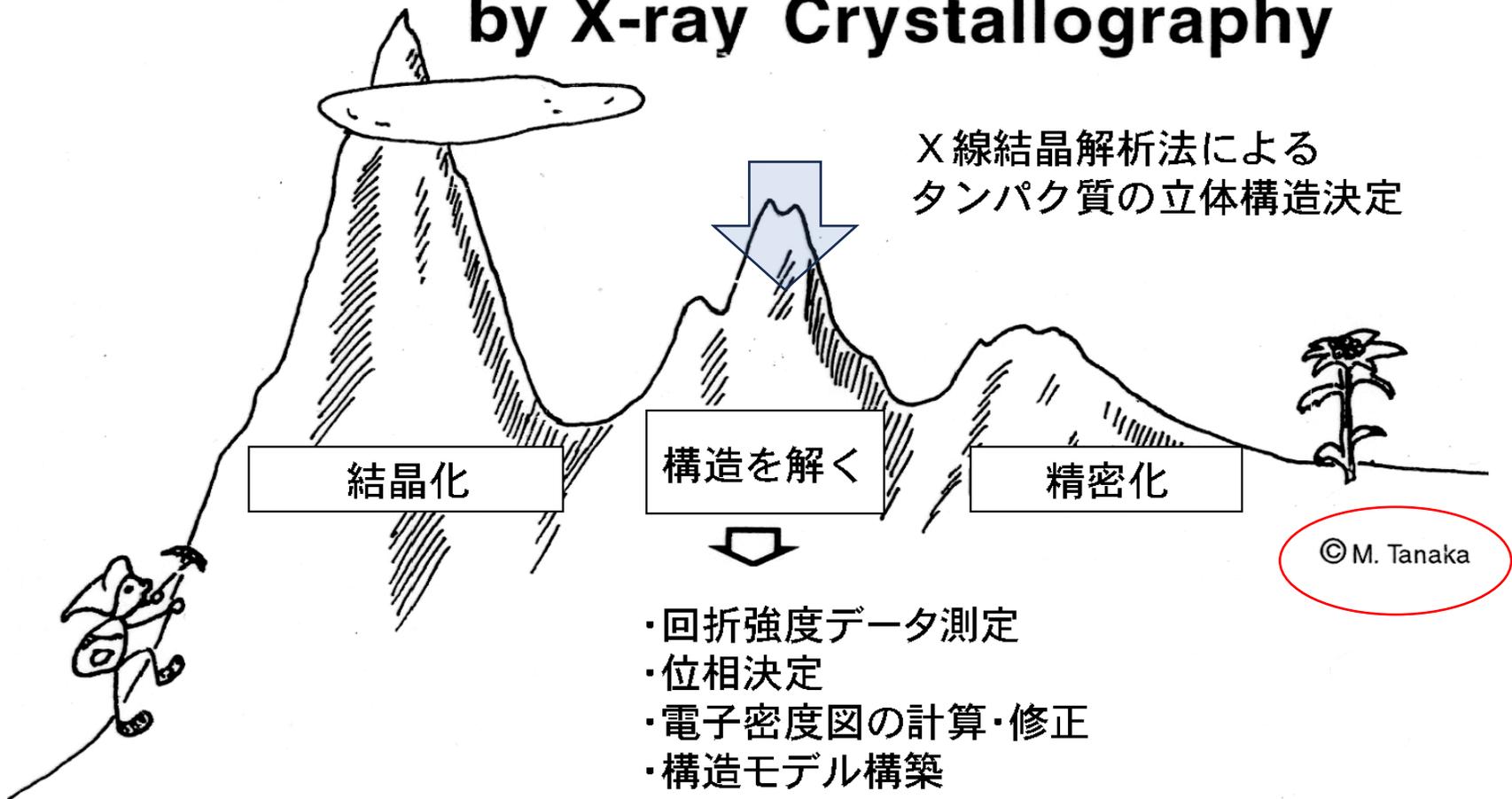
最近では、新型コロナウイルス
(SARS-Cov-2) のタンパク質の構造
についても続々とわかってきている



オセタミブル
(商品名：タミフル)

クライオ電顕の利用が盛ん

Protein Structure Determination by X-ray Crystallography





まとめ

- Photon Factoryの構造生物学ビームラインは約40年の年月を経て高度に整備され、自動化も進んでおり、分野外の人にも使いやすくなっています。（SPring-8も使いやすくて強力です。）
- **結晶化**というハードルさえ乗り越えれば、解析ソフトウェアも充実していますので、あとはすんなり行くことが多いです。
- 結晶化しやすいタンパク質も結構あり、やってみないと分からないです。スクリーニング試薬なども豊富。
- 構造生物学ではクライオ電顕が主流になりつつありますが、結晶構造解析でないと難しいこともまだ多いです。
- 国内に優秀なタンパク質結晶構造解析の専門家が多数いますし、**BINDS**による支援もありますので、ぜひチャレンジしてみてください。

謝辞・ 伏信進矢先生（東京大学）
（スライド一部提供）