

タンパク質結晶化講習会

2007年3月16日(金)

九州シンクロtron光研究センター

主催：日本生物工学会九州支部,

共催：九州シンクロtron生体分子構造研究会

協賛：日本農芸化学会西日本支部, 日本薬学会九州支部

協力：株式会社リガク, フリューダイトム株式会社

講習会プログラム

- 10:00 開会の挨拶 (芳本)
- 10:00-10:30 生化学系研究室での解析事例 (渡邊、伊藤)
- 10:30-11:00 酵素の発現, 精製, 濃縮 (伊藤)
- 休憩
- 11:15-12:00 X線結晶解析の基礎 (本島)
結晶化法と実習説明 (中嶋)
- 12:00-12:30 ランチョンセミナー (フリータイム株式会社)
- 休憩
- 13:00-15:30 結晶化実習 (伊藤、本島、中嶋)
(13:30-14:30 フリータイム(株), (株)リガクのブースで説明)
- 休憩
- 15:30-16:00 施設の説明と見学 (渡邊)
- 16:00頃 閉会の挨拶 (芳本)

目次

- (1) 生化学系研究室での解析有用性
- (2) いくつかの解析事例と結晶化サンプルの調製について
- (3) タンパク質X線結晶解析
 - 1. X線結晶解析の基礎
 - 2. X線回折測定
 - 3. 構造解析
- (4) タンパク質の結晶化
 - 1. 結晶化とは
 - 2. タンパク質の結晶
 - 3. 結晶化法
 - 4. 結晶化の実際

ご挨拶

最近の生化学や生理の教科書を見ると、タンパク質の立体構造図が載せられ、機能の理解が容易となっている。特に酵素のように立体特異的に作用する機構の解明には必須の手法であり、医療分野ではエイズ治療薬やインフルエンザ治療薬が酵素の立体構造を基に阻害剤がデザインされ、有効な治療薬として臨床の場で使われている。他の殆どの生命科学の分野においても、タンパク質の立体構造情報が研究に役立っている。

しかし、直接生体からタンパク質を精製したり、遺伝子を発現させタンパク質を得て、その立体構造の情報があれば更に発展できると思いながら X 線結晶解析法に大きな障壁を感じている研究者が多いのではなかろうか。筆者らは生化学を専門とするが、10年ほど前から X 線結晶解析法の導入を行ってきた。素人ゆえの失敗も多かったが、装置やソフトの進歩もあり、結晶解析の専門家でなくとも充分成果が得られることを実証して来たつもりである。その過程で、結晶化がボトルネックであることを実感してきた。

今回の企画は、X 線結晶解析法の知識のない生化学者が研究の対象とし、タンパク質の結晶化を実際に体験して、タンパク質の結晶化を日頃の研究手法の1つとして組み込むことにより、専門家との共同研究または自身が X 線結晶解析に入る導入とするものである。幸い、九州シンクロトロン光センターが鳥栖に完成しその施設で講習会を開くことは、結晶化の後 X 線結晶解析を身近かに感じさせるものと思われ、施設見学と解析法の基礎も講習会に組込んだ。生物工学会会員のみならず、一人でも多くの生命科学研究者が構造生物学を研究の1つに取り込まれることを期待したい。

2007年3月16日

日本生物工学会九州支部長

芳本 忠

(1) 生化学研究室でのX線結晶構造解析

佐賀大学農学部 渡邊啓一

1. はじめに

1980年代までは多くの生化学者にとって、研究対象としているタンパク質の立体構造はのどから手が出るほどにほしいものであっても、専門家に構造解析を委ねるか、他の研究室からの構造の報告を待たねばならなかった。しかし、近年のX線結晶構造解析技術の進歩は著しく、タンパク質の立体構造データベース (PDB) に登録された構造件数は1988年100件程度であったが、1994年1,000件、2000年には10,000件を超え、2006年に約35,000件と指数関数的に増加している。

このX線結晶構造解析の飛躍的な発展の要因としては、①タンパク質調製や結晶化技術の向上、②電子シンクロトロンからの指向性が高く高輝度で波長改変可能なX線 (放射光) の利用、③極低温 (100 K) での結晶へのX線照射、④検出器の高感度、高精度、高速化 (イメージングプレートやCCD検出器)、⑤コンピュータ計算の高速化やデータ処理・構造解析プログラムの改善などが挙げられる。これらの結晶構造解析技術の進歩により、より単位胞の大きな結晶や、微小結晶の構造解析が可能となり、また、回折データ収集から構造解析までの時間が大幅に短縮された。実際、筆者らも、大型放射光施設 SPring-8 で構造未知のタンパク質結晶の回折データを収集し、その日のうちに多波長異常分散法 (MAD法) により構造を解いて持ち帰った経験がある。

今日において、結晶構造解析の律速段階はタンパク質の調製と結晶化にある。すなわち、精製タンパク質を調製して溶液中での機能解析や分光学的解析を行なっている多くの生化学者は、そのタンパク質の構造に最も近い存在だといえる。生化学者が結晶構造解析を一つの研究手法として取り入れ、自ら結晶化を試みる時代になったといえる。ここでは、本結晶化講習会の導入部として、タンパク質の調製と結晶化から構造解析までの一連のながれを把握していただくために、一つの解析例を紹介する。

2. タンパク質の調製

対象としたタンパク質は、好冷細菌が生産する subtilisin 様のセリンプロテアーゼ Apa1 である。Apa1 は 441 アミノ酸残基からなり (分子量 45.1 kDa)、その配列は subtilisin と類似しているが、 β ストランド 8 と 9 の間に 148 残基からなる構造未知のペプチドが挿入されていた。Apa1 は中温酵素 subtilisin BPN' と比較して低温で高いプロテアーゼ活性を示し、熱安定性は低いという低温適応酵素の特徴を有する。筆者らはどのような構造の違いが低温活性を高めているのかという疑問に答えるために、構造解析を試みた。

結晶化を試みるためには、通常 mg オーダーの精製酵素が必要であるが、Apa1 は自己消化しやすく熱に不安定であるため、調製は容易ではなかった。当初、pET システムを用いて大腸菌での発現系を構築することを試みたが、成熟酵素を得ることはできなかつ

た。おそらく、N末端プロ領域とC末端プロ領域を有する前駆体構造、低い熱安定性や自己消化などが原因と思われた。そこで、もとの好冷細菌を5°Cで大量に培養し、この培養液上澄みについて Bacitracin カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行ない、得られた粗酵素画分を共有結合阻害剤 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) で処理し、Apa1 を失活させた。さらに Mono-Q カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを行い、mg オーダーの PMS-Apa1 を精製した。純水に対する PMS-Apa1 の溶解度が高かったため、遠心濃縮により溶媒を水に置き換え、濃度を 24 mg/ml とし、小分けして-80°Cで保存した。

3. 結晶化

初期結晶化条件のスクリーニングは、Hampton Research 社の結晶化スクリーニングキットを用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法で25°Cと5°Cで行なった。1 μ l のタンパク質溶液と等量の沈殿剤溶液を混合し、300 μ l の沈殿剤溶液に対して平衡化した。25°Cで10日間後、30% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 4000, 0.2 M Na acetate, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 を沈殿剤溶液とした場合に、多数の結晶が融合したものが得られた。この条件をもとにして、pH、PEG や塩の種類や濃度を変化させ結晶化条件の最適化を行った。その結果、最終的に、30% PEG5kMME, 0.1 M Na₂SO₄, 1 mM CaCl₂, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 を沈殿剤溶液として用い 25°Cでのハンギングドロップ法で、1日後に板状の単結晶が現れ、1週間後に 0.5 x 0.2 x 0.03 mm の大きさに成長した (図1)。

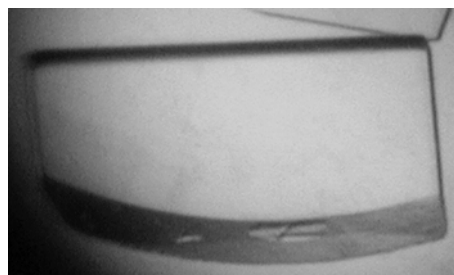


図1. Apa1 の結晶

4. X線回折データの収集とデータ処理

SPring-8 ビームライン BL40B2 で波長を 1.000 Åとして、Apa1 結晶は分解能 1.78 Åの回折データ与えた (図2)。結晶を凍結保護剤としての 40% (w/v) PEG5kMME に浸した後、ループにマウントし、100 K の窒素を吹きつけながらX線ビームを当て回折測定を行なった。ADSC Quantum 4R CCD 検出器を用い、結晶と検出器の距離は 150 mm とし、振動角 1.0°、

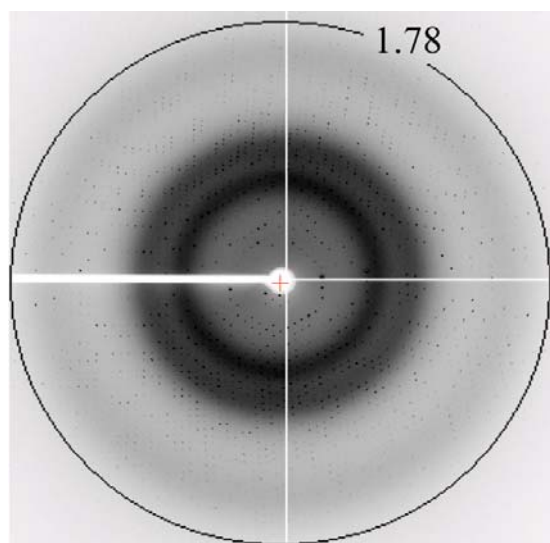


図2. Apa1 結晶の回折像

1 フレーム当たり 10 秒間露出として 360° の測定を行なった。回折データの処理は解析ソフト HKL2000 を用いて行なった。格子定数は $a=122.9 \text{ \AA}$ 、 $b=138.5 \text{ \AA}$ 、 $c=64.8 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\gamma=90^\circ$ 、 $\beta=97.5^\circ$ 、空間群は $C2$ 、非対称単位中の分子数は 2 個であった。分解能 1.78 \AA までの測定反射数 752927、独立反射数 101031、 $I/\sigma(I)$ 14.3、完全性 98.2%、R-merge 7.7% であり、良質の回折データが得られた。

4. 構造解析

プログラム CNS を使い、既知のサチライシン構造を利用して分子置換法で初期移相を求め、精密化の結果、分解能 1.8 \AA の構造が得られた (図 3)。Apa1 分子全体は、subtilisin によく似た構造をしている触媒ドメイン (残基 1-212 及び 361-441 の 293 残基) と新規構造の挿入ドメイン (残基 213-360 の 148 残基) からなっていた。挿入ドメインは subtilisin の $\beta 8-9$ ストランド間に位置しており、 α -ヘリックス 2 本と β -ストランド 11 本を含んでいた。興味深いことに、挿入ドメインの主鎖原子の温度因子は、触媒ドメインより顕著に高く、挿入ドメインがよりゆらいだ構造をしていることが明らかになった。さらに、非対称単位中の 2 分子の構造を比較した結果、触媒ドメインと挿入ドメインの間にねじれが生じることが明らかになった。一方、中温酵素 subtilisin Carlsberg の $\beta 8-9$ ストランド間は PTN 配列を有し安定な β ターン構造をとっている。これらの結果より、Apa1 の挿入ドメインのゆらぎやドメイン間のねじれが低温での触媒活性に必要な構造の動きに関与している可能性が考えられた。

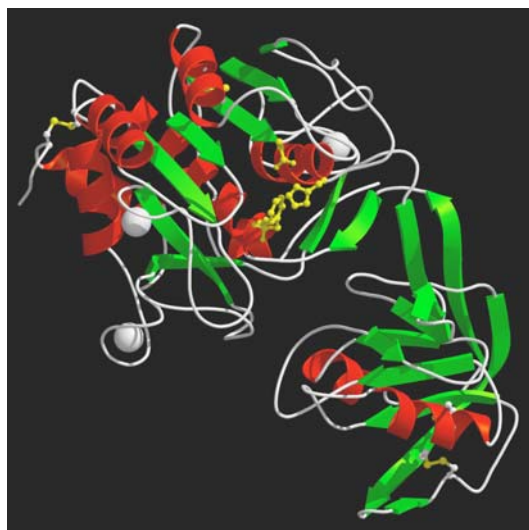


図 3. Apa1 の立体構造。
左上は触媒ドメイン、右下は挿入ドメイン。
触媒基 Asp30、His65、Ser369-PMS を黄色で示す。
白球は Ca イオンを示す。(PDB ID 1V6C)

5. 構造解析からタンパク質工学へ

Apa1 の構造解析結果に基づき、中温酵素 subtilisin の $\beta 8-9$ ストランド間の柔軟性を高めるように変異を導入した結果、低温活性の高い変異体を作成することに成功した。これらの変異体の解析結果より、活性部位から離れた位置にある $\beta 8-9$ ストランド間ループの柔軟性が低温での高い触媒活性に寄与していることが証明された。

(2) いくつかの解析事例と結晶化サンプルの調製について

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系)

伊藤 潔

はじめに

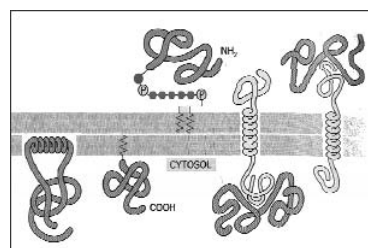
タンパク質の結晶化は職人芸ともいわれ、結晶構造解析が遠い存在だったのもそれほど遠い昔ではないが、最近の生化学系学会においては、立体構造のきれいな図を目にしないセッションの方が珍しい状況である。本講習会は構造解析に興味を持つ初心者を対象としたものであるので、実際の解析例をうまくいかなかったことも含めて紹介してみたいが、成功した解析例の詳細は参考文献を参照していただくこととして、結晶化を行なうためのサンプルタンパク質の調製、すなわち発現と精製に重点をおいてまとめてみた。非常に一般的な発現系での結果であるので拍子抜けしてしまうかもしれないが、結晶化、構造決定までできたもの、試行錯誤中の具体例が初心者の疑問の解消に少しでも参考になれば幸いである。

紹介する酵素は、プロリン特異性アミノペプチダーゼとして、*Serratia marcescens* 由来のプロリルアミノペプチダーゼ (PAP)、*Porphyromonas gingivalis* 由来のプロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ (PTP)、及び *Escherichia coli* 中で N 末端のプロリン残基遊離に関わるアミノペプチダーゼ N (APN) を用いた。また、短鎖型アルコール脱水素酵素 (SDR) ファミリーの酵素として、D-3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (HBDH)、ある糖の生合成に関わる還元酵素 (SDR-X) を、さらにもう一つ別の酵素としてメチオニン- γ -リアーゼ (MGL) を用いた。各酵素の詳細については省略しているので参考文献を参照していただきたい。

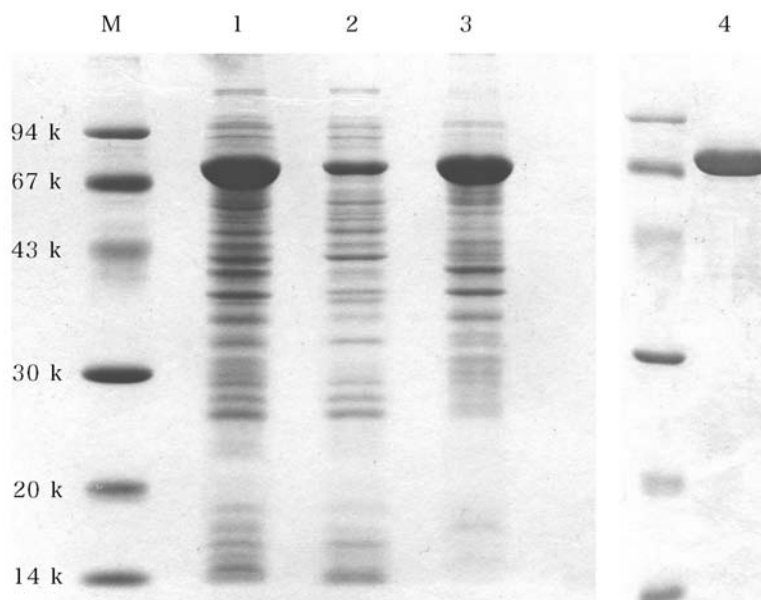
発現系

まず、日和見感染菌の一つである *S. marcescens* 由来の PAP は、クローニングした DNA 断片から全構造遺伝子を含む HincII-EcoRI 断片を pUC18 に連結したプラスミド pSPAP-HE を用い、大腸菌 DH1 株で過剰発現させることができた。ベクター上の lacUV5 プロモーターによって駆動されていると考えられ、pBR322 をベクターとして最初に得たクローン (pSPAP1 : 6 kb 断片を含む) の活性の 120 倍の高活性であった (1)。精製も比較的簡単で、硫酸分画後、Toyopearl HW65C を用いた疎水相互作用クロマトグラフィーと DEAT-Toyopearl のイオン交換クロマトグラフィーで精製した標品から得た結晶で解析に成功している (2-4)。

N 末端から 3 番目にプロリン残基がある時に、そのカルボキシル基側を加水分解してトリペプチドを遊離させる PTP は、歯周病の主要な原因菌である *P. gingivalis* に見出されたユニークな酵素である。この酵素は N 末端側の疎水性領域がアンカーとして細胞膜内に埋め込まれたタ



イブの膜タンパク質であったので、N末端側の38アミノ酸残基を欠失させた構造遺伝子をPCRで増幅して、pQE30 (Qiagen) に挿入した発現プラスミド (pQE-ptp39) を構築した。このベクターはヒスチジンタグ配列がN末端に付加されるように設計されており、非常に強力なT5由来のプロモーターによって高発現が期待できるが、経験的に組換えタンパク質がインクルージョンボディとなって不溶化してしまうことも多かった。プロモーター部位にはlacのオペレーターも挿入されているので、lacレプレッサーの過剰発現プラスミドであるpREP4をもつM15株で発現させたところ、運良く酵素活性を保持した酵素 (PTP Δ 39) を得ることに成功した。膜タンパク質には右図のようにいろいろな種類があるが、アンカー型のケースでは、基本的に同様の手法で発現できるはずであるが、それ以外では研究者の腕の見せ所というしかない。



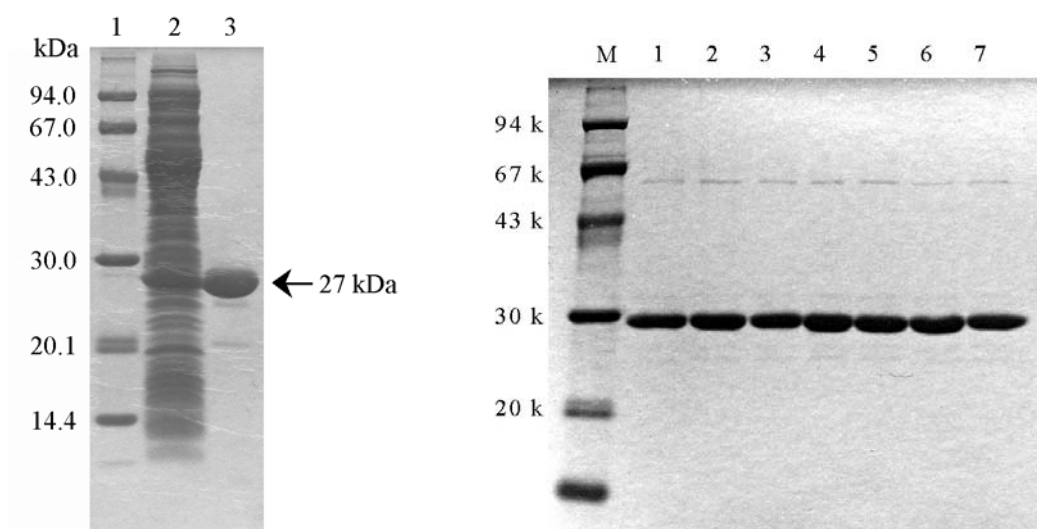
PTPの精製。1. 粗抽出物、2. プロタミン処理後、3. 硫酸分画、4. 最終精製標品。

PTP Δ 39の精製には少し落ちもついていた。というのは、精製を簡略化するために付加したヒスチジンタグが期待通りに機能せず、金属キレートリングカラムにうまく吸着せず、結局のところ硫酸分画と一般的なカラムクロマトグラフィーによって精製した。結晶化も成功し、決定した構造にはタグ配列を含めたN末端の18残基の領域がない(5, 6)。これは、上の図からも想像できるように、N末端領域がいわゆるフラフラした構造の部分であるため、一般的にN末端やC末端に付加したHis x 6のようなタグ配列は結晶構造解析の大きな妨げにはならないと考えられているが、そうでないこともありそのようなことは他の例で述べる。

大腸菌のAPNは分子量99 kDaの大きなモノマー酵素であるが、pBluescriptをベクターとしたプラスミド (pAN14) を用いて、*S. marcescens* PAPと同様に比較的簡単に精製することができ、興味深い構造を明らかにすることができた(7, 8)。同様の酵素はヒトにも存在しているが、こちらは*P. gingivalis* PTPと同様にN末端が1回膜を貫通したタ

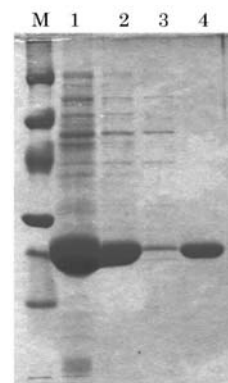
タイプの酵素で、これを除いた組換え酵素の発現を大腸菌で試みたが、いずれもインクルージョンボディとなってしまう、構造解析のためにはさらに工夫が必要である。

次はSDRファミリーの酵素の例を示そう。最近構造解析に成功した細菌由来のHBDHは、pKK223-3 (旧 Pharmacia 製) という tac プロモーターをもつベクターを用いて過剰発現系を構築した。pBR322 を基にプロモーターとターミネーターとを加えたシンプルなベクターで、タグ配列等はいっさいなく、SD 配列の下流の EcoRI 部位に開始コドン以下の構造遺伝子を組み込むことで野生型の酵素を発現させるのによく利用している。マイナーバンドのコンタミを除くのにやや苦勞したが、一般的なクロマトグラフィーによって精製することができ、結晶化、構造解析へと進めることができた (7, 8)。



精製した野生型 HBDH (左) と His-tag 付加 HBDH の 6 種類の変異体 (右)

構造解析ができると部位特異的変異体を作製してさらに詳細を調べたいのだが、どの残基をどのアミノ酸に置換するかに悩むことになり、いくつかの変異体を作製することになる。このような時には人工的タグ配列が威力を発揮する。示している図は、大学院博士課程学生の指導の下、学部4年の学生が1ヶ月ほどで精製した変異体の SDS-PAGE 像である。だが問題もないわけではない。ヒスチジンタグはあまり結晶化の妨げにはならないと述べたが、実は HBDH の場合には pQE30 をベクターとして発現させた His x 6 のタグ付酵素と pKK223-3 で発現させた野生型酵素の結晶性に少し違いのあることがわかった。余計なタグはないに越したことはないようであるが、データ収集と解析はこれからである。

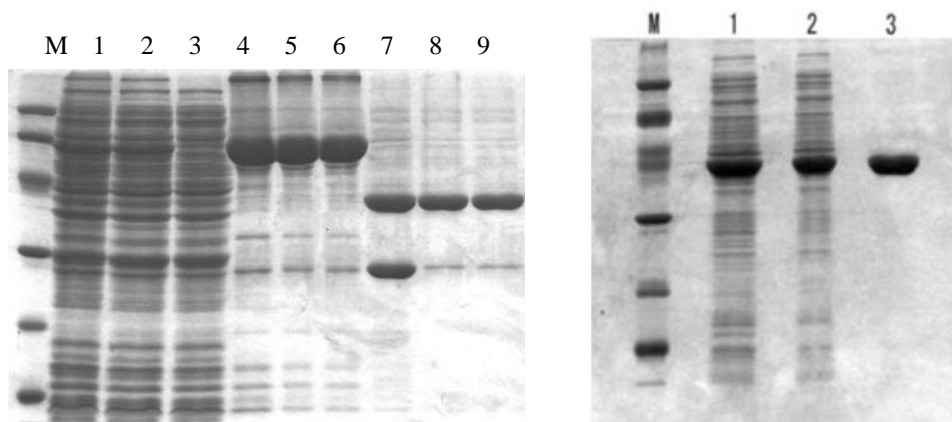


Hi Trap Blue HP カラムで精製した SDR 酵素

もう一つ紹介する SDR 酵素については結晶化に成功していない。NAD⁺-依存の酵素であるので色素を利用したアフィニ

ティークロマトグラフィーで高度に精製することができたが (Hi Trap Blue HP の図)、市販キットの約 300 条件を試したが、結晶は全く得られなかった。

最後の例は *P. gingivalis* 由来の MGL であるが、これも結晶化には苦勞している。まず試したのは pGEX ベクター (旧 Pharmacia 製) を用いたグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質としての発現で、下図のように精製することができたが結晶は得られなかった。インクルージョンボディ形成を避けるため GST との融合発現を試みたのではあるが、pQE30 を使って発現させてみるとあっけないほど簡単に過剰発現させることができた。タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーで図のようにきれいに精製することができ、結晶化を試みたが全く結晶は得られなかった。



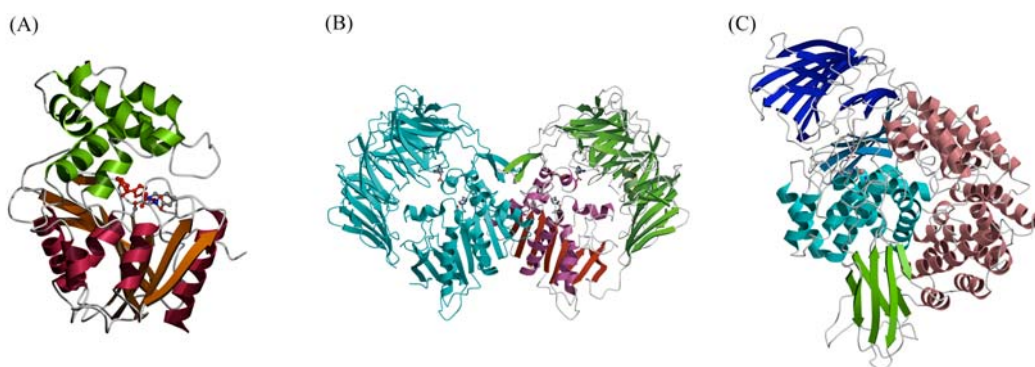
MGL の精製。左は GST との融合タンパク質で、1. 粗抽出物、2. 硫酸分画、3. GSH-Sepharose 4B の素通り画分、4-6. GSH で溶出した GST-MGL 融合タンパク質、7. Precision protease 分解物、8-9. 7をさらに GST-Sepharose 4B にかけて GST を除いたもの。右は His-tag 付加 MGL で、1. 粗抽出物、2. 硫酸分画、3. Ni²⁺-キレートカラムで精製したもの。

ここ数年の中では最も高純度に精製することができたタンパク質であると思っているが、純度と濃度が高くてもうまく結晶化しなかった。しばらく手が無い状態でしたが、興味深い基質特異性を詳しく調べるため、新しく加わってくれた留学生に同様の精製をしてもらい、再度結晶化をトライしてもらったところ、可能性が出てきた。現在さらに条件検討を進めている。諦めないことが重要か。

以上、実際の解析に用いたタンパク質の発現と精製について並べてみた。簡便さ、発現量、コストの面から考えると大腸菌発現系の右に出るものはないが、インクルージョンボディになってしまうものをどのように扱うかがカギで、酵母やカイコ、動物の培養細胞、小麦胚無細胞系などの系も利用されているのは周知のことである。しかしながら結晶化と結晶解析にはある程度の量も必要で、大腸菌系がダメな場合決め手がないともいえる状況である。

おわりに

結晶がなければX線結晶構造解析は始まらないわけで、越えなければならない最初のハードルである。数社から販売されている結晶化条件スクリーニングキットは非常に有用で、多くのタンパク質の結晶化に貢献している。これからは、結晶化用のタンパク質サンプルをいかにして発現し、精製するかがカギでありブレイクスルーも登場するに違いない。ここで示した発現系の例は極めて一般的なものである。また、ここでは示さなかったが、pET system に代表される T7 RNA polymerase を利用する系ももちろん大変有効である。結晶化するに当たり、タンパク質の純度は極めて重要なファクターであるが、一般的(?) 生化学者が構造解析に触れてみて感じたのは、実例として示したように SDS-PAGE 上で多少のマイナーバンドが見えても X線解析に十分な結晶が得られる場合も少なくないことである。また、逆に非常に高純度に精製できたと思ったサンプルで何の結晶も得られないというもどかしさも感じた。条件を整えさえすれば結晶化する可能性があるのはわかるが、この「条件を整えれば」は、未だ職人芸の領域なのかもしれない。ここでの職人とは、結晶解析の専門家よりも、そのターゲットタンパク質を発現・精製した先生方であろう。最後に、我々が明らかにした愛すべき酵素達のリボン図と参考文献をあげさせていただく。この講習会を通して結晶化に挑戦していただき、興味深いタンパク質を新たに結晶化して、美しい立体構造に日の目を見せてあげてください。



3種類のプロリン特異性アミノペプチダーゼの結晶構造のリボンモデル。(A) PAP, (B) PTP, and (C) APN

参考文献

1. Kabashima, T., et al., (1997) *J. Biochem.*, **122**, 601-605
2. Yoshimoto, T., et al., (1999) *J. Biochem.*, **126**, 559-565
3. Inoue, T., et al., (2003) *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 147-154
4. Nakajima, Y., et al., (2006) *J. Bacteriol.*, **188**, 1599-1606
5. Nakajima, Y., et al., (2005) *Acta Cryst.* **F61**, 1046-1048
6. Ito, K., et al., (2006) *J. Mol. Biol.*, **362**, 228-240
7. Onohara, Y., et al., (2006) *Acta Cryst.* **F62**, 699-702
8. Ito, K., et al., (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33664-33676
9. Nakajima, Y., et al., (2005) *Acta Cryst.* **F61**, 36-38
10. Ito, K., et al., (2006) *J. Mol. Biol.*, **355**, 722-733



HBDH モノマーのリボン図

(3) タンパク質X線結晶解析

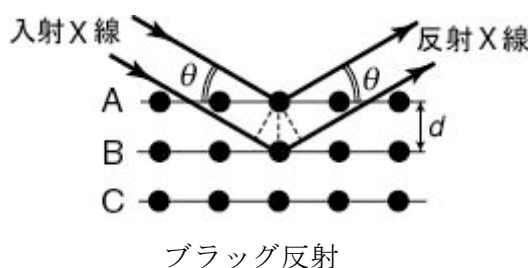
佐賀大学 農学部 本島浩之

1. X線結晶解析の基礎

① X線回折とX線解析の違いとは？

X線回折とはX線が結晶格子によって回折される現象のことで、1912年にマックス・フォン・ラウエがこの現象を発見し、X線の正体が波長の短い電磁波であることを明らかにした。

逆にこの現象を利用して物質の結晶構造を調べることが可能である。このようにX線の回折の結果を解析して結晶内部で原子がどのように配列しているかを決定する手法をX線結晶構造解析という。しばしばこれをX線解析と略して呼ぶ。



$$2d\sin\theta = \lambda \quad (d \text{ 光路差または分解能、}\lambda \text{ X線の波長})$$

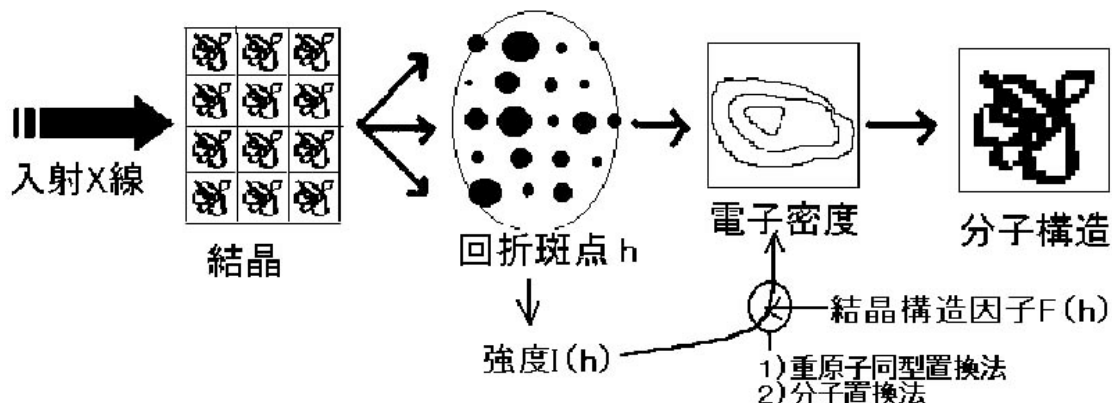
② 粉末X線解析と単結晶X線解析の違いとは？

粉末X線解析とは粉末のように多数の単結晶の集合と考えられる試料のX線回折を測定することをいう。通常、未知試料を同定するために行われる。粉末X線回折で得られる回折X線強度はさまざまな方向をランダムに向いた単結晶からの回折の総和となる。既知の物質については入射角と回折強度がデータベース化されており、これと照合することで未知試料の同定を行うことができる。

単結晶X線解析は通常、電子密度から未知試料の分子構造を決定するために行われる。X線の散乱強度からは結晶構造因子の絶対値は求まるが、その位相については知ることができない。

単結晶X線解析の位相問題を解決するには？

単結晶X線解析をするためには位相を何らかの方法で決定する必要がある。1つは重原子同型置換法で、未知試料を重原子の塩などに誘導体に変換してから単結晶X線回折を測定する方法である。重原子の電子密度が大きいため結晶構造因子は重原子の原子散乱因子を含む項だけで近似できることを用いる。ほかに分子置換法で既に解析されていた相同性の高い構造がある場合に用いる方法がある。最近ではタンパク質分子中に存在する硫黄の異常分散を用いる方法もある (S-SAD)。



タンパク質のX線結晶解析の流れ

セレノメチオニンを用いた重原子同型置換法について

重原子同型置換法は様々な金属化合物を試し、金属原子が結合しない、あるいは結合したために結晶構造が変わったり、結晶が壊れたりと非常に骨の折れる大変な方法です。しかし 1990 年ごろから、タンパク質を構成するメチオニンの代わりにセレノメチオニンに置き換えたタンパク質を大腸菌等で発現させ、最初から重原子 (Se) が入ったタンパク質の結晶を作製する。さらに放射光を用いて複数波長のデータを取ることで、1つの結晶の回折データで位相を決定することが可能です (多波長異常分散法 Multiwavelength Anomalous Diffraction (MAD)法)。現在多くのタンパク質がこの方法で解析されています。

⑤硫黄の異常分散を用いる方法 (硫黄単波長異常分散法 (S-SAD))

CrK α の 2.29Å と通常 (1 Å 前後) 使用するより長い波長を用いて単波長でデータを取り、硫黄の異常分散を用いて解析を行う。この解析を行うには、硫黄の異常分散が非常に弱いので、X線吸収を抑え、非常に精度の良い測定が要求される。

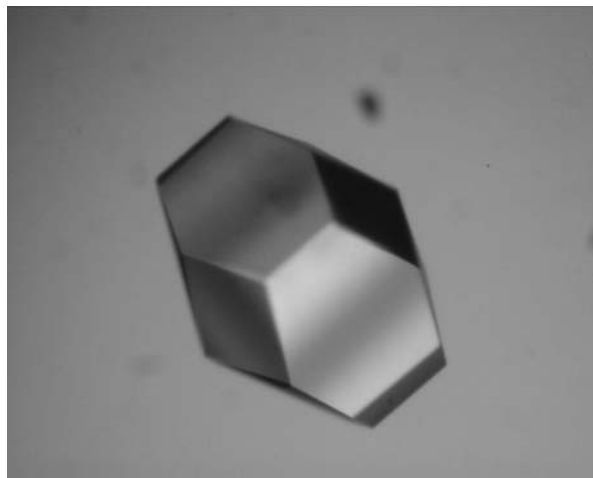
2. X線回折測定

①放射光と実験室レベルの装置のX線の違い

実験室レベルの装置でよく用いられる CuK α は特性X線なので、1.54 Å の固定波長測定しか行えないが、放射光のビームラインでは波長範囲の制限はあるが、可変可能なX線である。MAD法に適している。

②結晶選び方

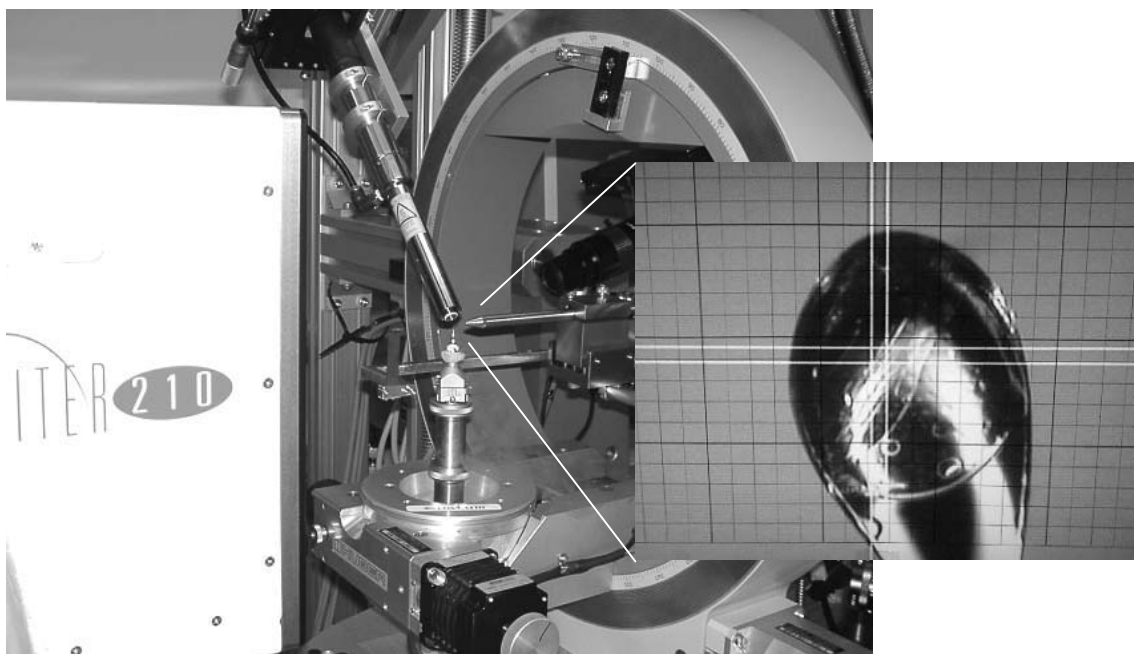
タンパク質の構造を得るためには、まず構造解析に適した結晶が必要である。構造解析に適した結晶とは、構造解析に適した回折点（反射データ）を与える結晶であり、回折測定しやすい結晶が構造解析に適した結晶とは限りません。しかし、実験者にとって扱いやすい結晶から実験に用いるのがよいと思います。扱いやすい結晶とは壊れにくく、0.3mm角で厚みのある単結晶です（結晶があまりにも壊れにくく場合、塩の可能性もあります）。



ニワトリ卵白リゾチームの結晶

③クライオとは

最近ではタンパク質のX線回折測定を行う場合、放射光だけでなく実験室レベルX線を用いる場合も窒素吹き付け装置を用いた低温（クライオ 100K程度）測定が一般的です。低温で測定することより、結晶の劣化も抑え、良い反射データを得ることができる。しかし、その低温測定を行うためにはグリセロールのような凍結保護剤の入った溶液へ移す必要がある場合が非常に多く、その際に結晶がダメージを受けてしまうことがあり、凍結保護溶液の条件検討が非常に大事になります。

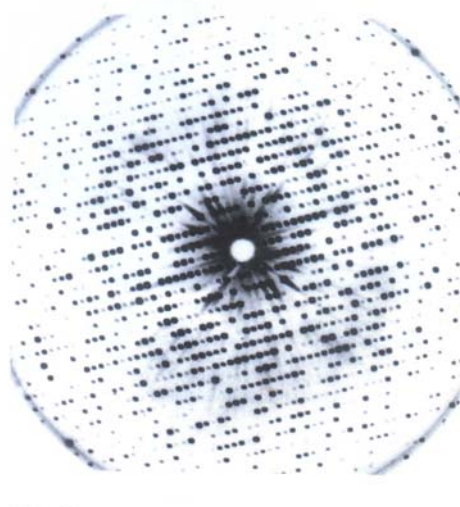


ループにマウントした結晶に100Kの窒素を吹き付けている様子

以前のように結晶を石英キャピラリーに封管し、室温にて実験室レベルX線を用いて回折測定を行い、その結果を見極めるのもひとつの方法だと考えられます。

④予備実験

まず、結晶にX線を当てみる。反射点がえられるか、ひきずったような形をしていないか、割れていないか、調べる。もし、反射点がえられない場合やひきずったような形をしている場合はクライオの再検討。反射点が割れている場合は結晶化割れていないか、小さい結晶が引っ付いていない調べる必要があります。



X線による反射画像

⑤Native 結晶の回折測定

Native 結晶とは位相決定のために重原子を導入していない結晶のことです。低分解能の反射が取れるようなカメラ距離で 180 もしくは 360°測定を行い、その結晶の空間群をある程度絞り込む。データ収集は装置に付属しているソフトを用いて行います。まず、数枚反射画像を撮影し、その画像に写る強度の強い反射点だけを用いて指数付けを行い、結晶系と格子定数を決定する。本測定を行うために必要なカメラ距離、スキャン角、露光時間、測定角等の値を決定し、本測定を行う。

⑥反射データ解析

解析によく用いられているソフトは HKL2000 や CrystalClear などです。撮影した画像の反射点を一枚ずつ処理し、処理されたデータをマージし、消滅側等を用いて空間群をある程度絞り込み、最終的に独立した反射データを作成する。

H	K	L	I	sigma I
0	0	12	125.9	23
0	0	16	14501.4	520.2
0	0	24	61652.3	2552.8
0	0	28	334.2	37.8
0	0	36	87094.5	3181.7

反射データのファイル形式

H,K,L で規定される反射点の反射強度 (I) とその分散 (sigma I)

例) ニワトリ卵白リゾチームの空間群 $P 4_3 2_1 2$ (96) の結晶を実験に用いた場合、数枚反射画像を撮影し、その画像に写る強度の強い反射点だけを用いて指数付けを行い、結晶系 Primitive Tetragonal, 格子定数 $a=b=79.8\text{\AA}$ $c=37.8\text{\AA}$ $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ と決定する。さらにラウエ群 $4/mmm$ まで決定できることもある。本測定後、解析した結果、消滅則より空間群は $P 4_1 2_1 2$ (92) もしくは $P 4_3 2_1 2$ (96) に絞られる。2.0 \AA 分解能で約一万点の独立の反射点のデータは得られる。

結晶系	ラウエ群	空間群 (番号)	空間群 (名称)	らせん軸での 消滅則	Z
Primitive Tetragonal	4/m	75	$P 4$		4
		76	$P 4_1$	$(0, 0, 4n)^*$	
		77	$P 4_2$	$(0, 0, 2n)$	
		78	$P 4_3$	$(0, 0, 4n)^*$	
	4/mmm	89	$P 4 2 2$		8
		90	$P 4 2_1 2$	$(0, 2n, 0)$	
		91	$P 4_1 2 2$	$(0, 0, 4n)^*$	
		95	$P 4_3 2 2$	$(0, 0, 4n)^*$	
		93	$P 4_2 2 2$	$(0, 0, 2n)$	
		94	$P 4_2 2_1 2$	$(0, 0, 2n),$ $(0, 2n, 0)$	
		92	$P 4_1 2_1 2$	$(0, 0, 4n),$ $(0, 2n, 0)^{**}$	
	96	$P 4_3 2_1 2$	$(0, 0, 4n),$ $(0, 2n, 0)^{**}$		

注 : * または **のついた空間群は、scaling/merging しただけでは区別できない。

⑦重原子等を含む結晶の回折測定及び反射データ解析

測定は⑤と同様。データの解析を行う場合、異常分散のデータとして処理するため、native 結晶のデータを処理した時の倍の反射数となる。

H	K	L	I(+)	sigma I(+)	I(-)	sigma I(-)
3	-1	1	6415	138.5	8697.9	215.2
3	-1	2	7752	113.9	10197.2	145.9
3	-1	3	5161.3	78.8	7453.2	110.2

重原子誘導体の反射データのファイル形式

3. 構造解析

①ソフトに関して

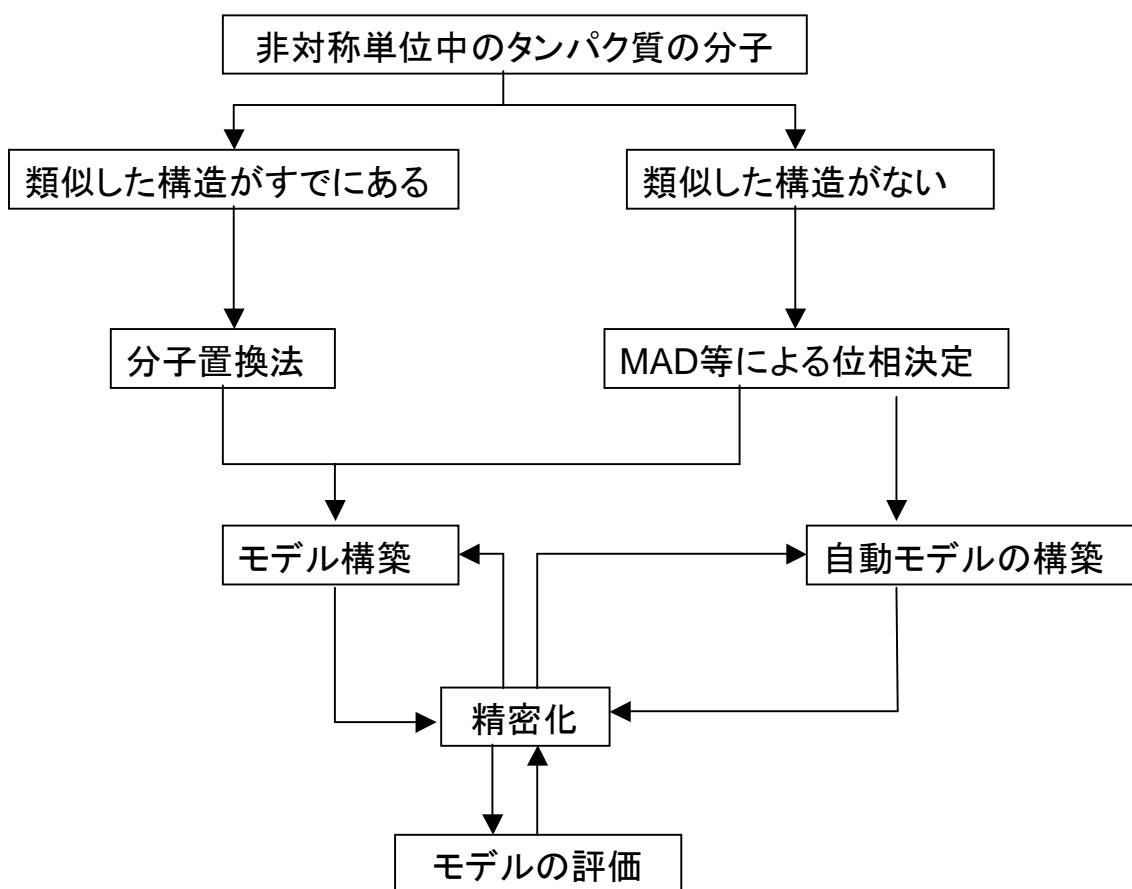
反射データさえ得られれば、コンピュータのみを用いて構造解析することができる。非常に大きなタンパク質、もしくは高分解能のように非常に大量な反射データを解析しない限り、パソコンレベルのコンピュータで解析することができる。もともと構造解析は大型コンピュータやワークステーションを用いておこなわれていたため、UNIX等のOS用に開発されていた。10年程前からLINUXに移植され、最近ではWindowsにもかなり移植されている。

種類	ソフト名	対応 OS
統合ソフト(位相決定、分子置換法、精密化、グラフィック)	CCP4i	Linux, Windows, MacOS
反射データ処理	HKL2000	Linux, MacOS
	MOSFLM	Linux, MacOS
	CrystaClear	Windows
分子置換法	CCP4i (AMORE)	Linux, Windows, MacOS
	CNS	Linux, Windows
	EPMR	Linux, Windows, MacOS
位相決定	CCP4i (MLPHARE, DM)	Linux, Windows, MacOS
	SHARP	UNIX
	CNS	Linux, Windows
精密化	CCP4i (REFMAC)	Linux, Windows, MacOS
	CNS	Linux, Windows
グラフィック	O	Linux, Windows, MacOS
	XtalView	Linux, Windows, MacOS
	MiFit	Linux, Windows, MacOS
	TurboFrodo	Linux, Windows, MacOS
自動モデル構築	ARP/wARP	Linux
	solve/resolve	Linux
	Lafire	Linux

主な解析ソフト

自動モデル構築ソフトが対応しているLinux OSを選択した方がよい。

②構造解析の流れ



③非対称単位中のタンパク質の分子数

Matthews は 116 個の蛋白結晶の水の割合 (Solvent Content) を解析する。蛋白質結晶中の水の割合は平均で 43% であり通常は 27% から 65% までの割合をとる。非対称単位中の蛋白分子の数は Matthews によって提唱された以下の式によって見積もることが出来る。

Matthews の値 $V_m = \text{Cell Volume} / (\text{分子量} \times \text{ユニットセル中の非対称単位数} \times \text{非対称単位中の分子数})$ 水の割合 : $V_{\text{solv}} = 1 - 1.23/V_m$

④分子置換法

分子置換法は既に解析されていた相同性の高い構造を基にして解析する初期モデル作成する。また作成する際に相同性の高い構造の全体、側鎖の削除、相同性の高い部分のみなどさまざまな初期モデルを試行錯誤する必要な場合もある。これらの初期モデルと Native 結晶の反射データを用いて種々のパラメーターを考慮しつつ、分子置換法のソフトを用いて行う。EPMR のように非常に入力の簡単なものもある。

⑤位相決定

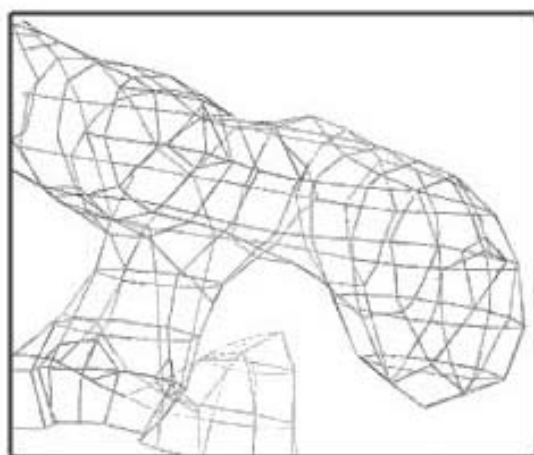
MAD 法による位相決定の場合、波長の異なる反射データセットと重原子の異常分散のパラメーターを用いて位相決定を行う。位相決定後の反射データには強度(I)から換算

される振幅 F ($I = F \times F$)、 FOM は信頼度、 PHI は位相角の3つの値が得られる。

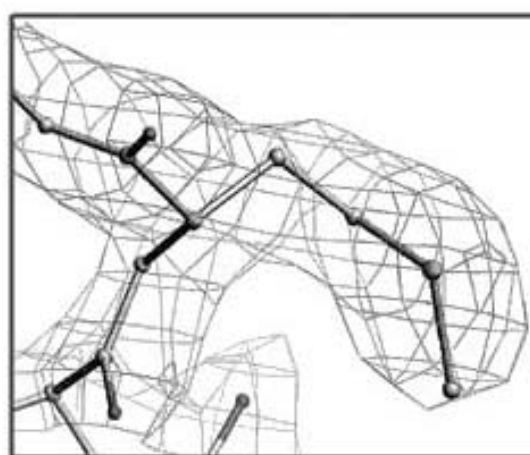
H	K	L	F	FOM	PHI
4	1	1	277.88	0.96	34.61
5	1	1	263.67	0.79	231.45
6	1	1	630.59	0.93	23.11
7	1	1	710.54	0.95	114.21

位相決定後の反射データのファイル形式

振幅 F と位相角 PHI から電子密度図 (F_o) が作製できる。



電子密度マップ (F_o)



立体構造決定した電子密度マップ ($2F_o - F_c$)

⑥モデルの構築 (精密化、グラフィック及び自動モデル構築)

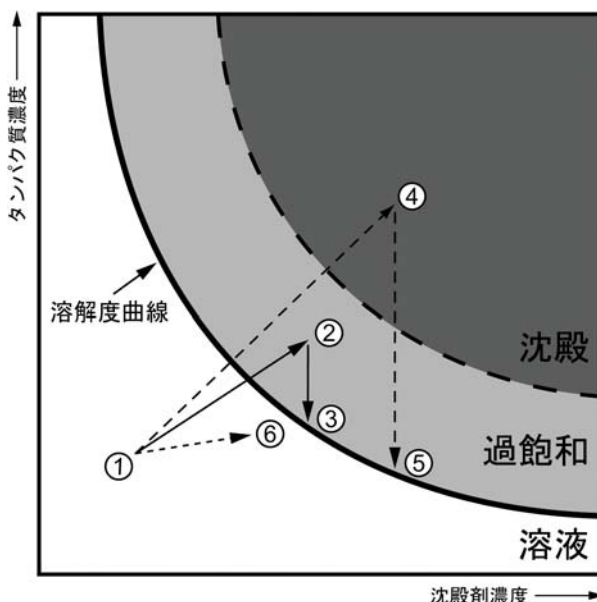
モデルのエネルギー最小化、水分子の追加などのモデルの変更を行うサイクルを経て、最終的な立体構造決定する。最近では高分解能で、よい位相のついた反射データであれば、`solve/resolve` などの自動モデル構築ソフトを用いて非常に楽に構造解析ができるようになった。

(4) タンパク質の結晶化

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (薬学系) 中嶋 義隆

1. 結晶化とは

タンパク質の立体構造をX線結晶構造解析から明らかにするためには、タンパク質の結晶、それも“単結晶”が必要である。溶液からの単結晶の晶出は、物質の溶解度の変化を利用して行われる。物質の溶解度は、温度上昇にともなって高くなるので、塩などの低分子では温度による溶解度の変化を利用した結晶化法がよく用いられる。しかしながら、タンパク質は熱変性の可能性等から、このような方法はめったに行われない。タンパク質の結晶化では、一定温度に保った溶液中の塩や有機溶媒といった沈殿剤 (結晶化剤) の濃度を変化させることによって、タンパク質の溶解度を低下させて、結晶の析出を待つのが一般的である。物質はその溶解度を超えた濃度で液相 (溶液) から固相 (結晶核) へと転移する。液相と固相の間には準安定な過飽和領域が存在し、結晶核はこの過飽和領域で形成される。また結晶の成長も同様に、相平衡より少し高い過飽和領域で進行する。タンパク質の結晶化では沈殿剤の濃度上昇をコントロールすることで、過飽和な状態を制御し、形成される核の数と結晶成長の条件を最適にすることが望まれる。



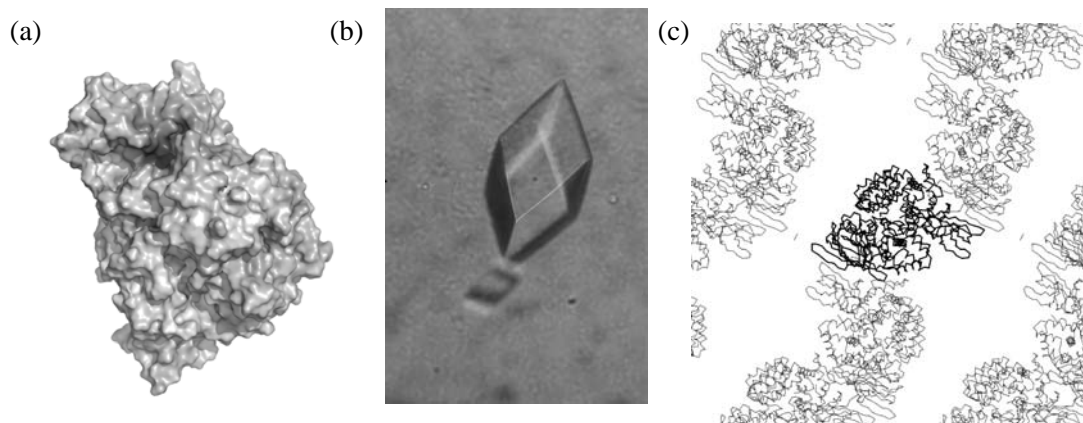
タンパク質濃度と沈殿剤濃度の関係を模式的に示した図

- ①タンパク質は溶液に溶解している。
- ②過飽和領域で結晶核形成が起こる。
- ③結晶成長とともに溶液中のタンパク質濃度が減少し、平衡状態で結晶成長が止まる。
- ④過飽和度が高いと無数の核形成が生じる。
- ⑤タンパク質は非晶質の沈殿として析出する。
- ⑥溶解度曲線を超える濃度でなければ、結晶は析出しない。

2. タンパク質の結晶

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合した1本の鎖状分子が、単分子ないし複数分子(二量体や三量体など)で働く巨大分子である、生体内では水分子に囲まれており、 α -ヘリックスや β -ストランドの二次構造を組み合わせることで三次構造、さらに高次の構造を形成している。タンパク質の形状は様々であり、その構造はいくぶん自由度をもち溶液中で熱ゆらぎをしながら、それぞれの機能を発揮している。可溶タンパク質の表面は主に親水性の残基で覆われているが、その表面電荷の分布は一様ではない、さらにこの電荷の分布は溶液のpHなどで変化する。したがって、その分子サイズの大きさの制限もあって、タンパク質はわずかな分子表面間の接触での分子間相互作用によって結晶化していることが多く、その結合力は弱い。またタンパク質結晶は、タンパク質分子だけでなく、その体積の27-65%を溶媒(溶液)が占めていることも特徴的である。1968年にMatthewsは多くのタンパク質結晶の単位胞の体積と分子量の比(V_M)が $1.68-3.5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ の間にあり、最も多いのは $2.15 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ 付近であることを発見した。2003年にKantardjieffとRuppによって、これまで報告されたタンパク質結晶から最頻値が $2.34 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ であり、47%程度の溶媒含有量を持つものが多いことが報告されている。

分子同士の結合力が弱く、溶媒を含有するタンパク質の結晶は塩の結晶などに比べて、非常にもろく壊れやすいので取り扱いには注意が必要である。



大腸菌アミノペプチダーゼ N

(a) アミノペプチダーゼ N のタンパク質表面図 (b) アミノペプチダーゼ N の結晶 (c) 結晶中のアミノペプチダーゼ N の配向。アミノペプチダーゼ N は主鎖を線図で示している。タンパク質分子以外の空間は溶媒領域である。

3. 結晶化法

タンパク質の結晶化の手法として、さまざまな方法が開発されてきた。ここでは、一般的に用いられる方法を紹介する。

a) バッチ法

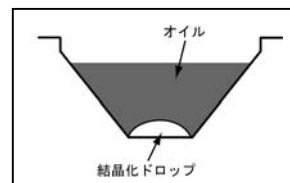
必要な用具：密閉できる容器（試験管、ガラスキャピラリーなど）

方法：タンパク質が沈殿を起こさないぎりぎりの濃度まで沈殿剤を添加し、密閉容器に入れて恒温で静置する。

b) マイクロバッチ法

必要な用具：10 μl 程度分注できるくぼみのついたプレート（96穴プレートがよく用いられる）、シリコンオイル、パラフィンオイル

方法：タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合したドロップの上からオイルを重層し、恒温にて静置する。重層するオイルとして、比較的水蒸気を通しやすいシリコンオイルと水蒸気を通しにくいパラフィンオイルがよく用いられる。パラフィンオイルのみを重層した場合、a)のバッチ法に近い状態が得られる。パラフィンオイルとシリコンオイルを混合したオイルを用いることで、緩やかに結晶化ドロップからの水の蒸発を促し、ドロップ溶液を濃縮することができる。濃縮のスピードは、2つのオイルの混合比を変えることで、制御できる。

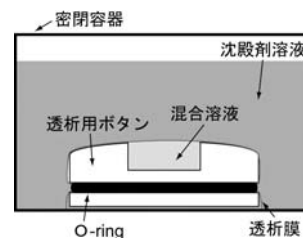


マイクロバッチ法

c) 透析法（ボタン法）

必要な用具：微量透析容器、O-ring、透析膜、密閉できる容器

方法：タンパク質溶液と沈殿剤溶液を半透膜で隔てて設置し、透析によりタンパク質溶液中の沈殿剤濃度をゆっくりと上昇させる。この時、タンパク質溶液の体積変化があまりないので、タンパク質の濃度変化が起きにくいのが特徴である。また、容易に沈殿剤溶液を実験途中に変えることができる。透析チューブを用いた方法が行われてきたが、この方法では多量のタンパク質溶液を必要とするため、現在ではアクリル樹脂製の容器を用いたボタン法がよく使われている。5-350 μl 程度の容積の穴を持つものが市販されている。この穴にタンパク質溶液または沈殿剤との混合溶液を入れ、透析膜で穴をふさぎ O-ring でこれを留める。このボタンを沈殿剤溶液に浸す。



d) 蒸気拡散法

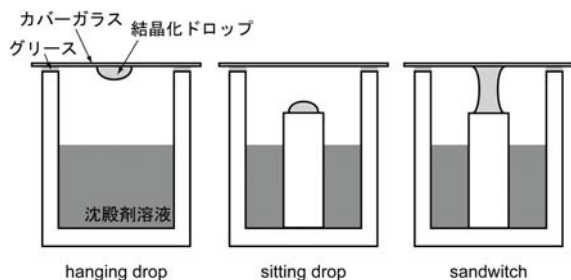
方法：蒸気拡散法は、タンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合したドロップを作製し、このドロップ溶液より高い濃度で十分多い量の沈殿剤溶液を同じ密閉空間に共存させる。この時、結晶化を試みる温度での水の蒸気圧が平衡となるまでドロップ溶液から水が蒸発するので、ドロップ溶液の沈殿剤濃度とタンパク質濃度が徐々に上昇する。やがて飽和に達すると結晶が析出する。

タンパク質溶液と沈殿剤溶液を 1:1 で混合したドロップ溶液をその沈殿剤溶液に対して平衡化する条件が初期の検索としてよく用いられる。もちろん、結晶化の最適条件の検索には混合比率を変えることも行われる。蒸気拡散法ではハンギングドロップ、シッティングドロップ、サンドウィッチ法が用いられるが、ここでは、ハンギングドロップ法とシッティングドロップ法について解説する。

(1) ハンギングドロップ法

必要な用具：結晶化用プレート (18mm または 22mm 径の 24 穴プレートなど; VDX プレート)、シリコン処理したカバーガラス、真空グリース

方法：プレートのウェルの縁に真空グリースを塗布し、沈殿剤溶液を分注(500-1000 μ l 程度がよく使われる)しておく。カバーガラスは事前にシリコン処理しておく。シリコン処理したカバーガラスも市販されているが、Hampton Research 社の Aqua Sil などがシリコン処理の溶剤としてよく使われている。シリコン処理したカバーガラス上でタンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合しドロップ(1-10 μ l 程度)を作る。ドロップがウェルの内側になるよう、カバーガラスで蓋をする。このとき、ウェルが完全に密封されている必要がある。プレートを恒温で静置することで、蒸気拡散によりドロップ溶液が濃縮され、やがて結晶が析出する。ハンギングドロップ法ではドロップ溶液が吊り下げられているので、結晶はガラス表面よりむしろ溶液表面にできることが多いので、後の操作が簡便である。しかしながら、観察時に外気の温度の影響を受けやすく、ガラス表面に霜がつくなどするので注意が必要である。



蒸気拡散法で用いられる結晶化法

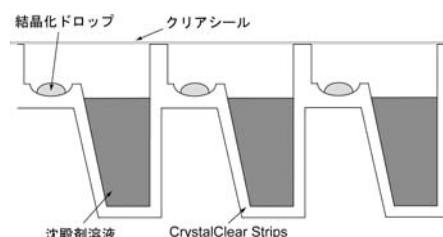
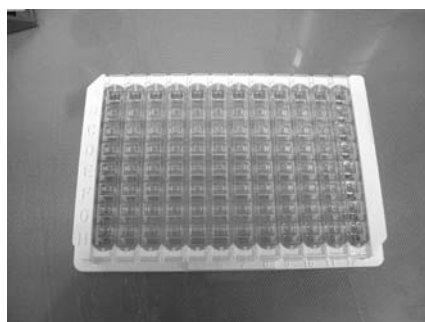


VDX プレート

(2) シットティングドロップ法

必要な用具：結晶化用プレート (VDX プレートと Micro bridge; 96 穴の ClystalClear Strips など)、カバーガラスと真空グリースあるいはシーリングテープ

方法：シットティングドロップ法で使われる結晶化プレートは、様々な種類のものが市販されている。24 穴の VDX プレートを使用する際には、マイクロブリッジなどをウェル内にセットし、沈殿剤溶液を分注、マイクロブリッジ上にタンパク質溶液と沈殿剤溶液を混合したドロップを作る。ハンギングドロップ法で用いたように真空グリースを用いてカバーガラスでウェルを密封するか、クリアシールで密封する。また 96 穴の ClystalClear Strips などよく用いられる。このプレートには 100 μ l の沈殿剤溶液を注ぐ容器と 1-2 μ l 程度のドロップをのせることができる台が一つのウェルに作られている。このような結晶化プレートは比較的高価であるが、タンパク質溶液と沈殿剤溶液の量を少なくできる利点がある。



CrystalClear Strips を用いたシットティングドロップ蒸気拡散法



Micro Bridge



シーリングテープ

4. 結晶化の実際

a) 初期条件の検索

タンパク質溶液に対し、タンパク質を沈殿させる作用のある試薬の濃度をゆっくりと上昇させ、タンパク質の溶解度を低下させることで沈殿ではなく結晶として析出させる方法が用いられている。タンパク質の溶解度の変化をコントロールするために、沈殿剤濃度の上昇をうまくコントロールできるような装置や方法が用いられている。しかしながら、沈殿剤の濃度上昇の過程には物理的、化学的要因が非常に複雑に関与することが多く、タンパク質の結晶化条件を見つけ出すことを困難にしている。

結晶化条件のパラメータとしては、(1)タンパク質濃度、(2)緩衝剤の種類とその pH、(3)沈殿剤の種類と濃度、(4)温度、(5)添加剤の種類と濃度(塩、有機化合物、還元剤など)、(6)結晶化法が挙げられるが、どのパラメータも重要な項目であり、またお互い関与するので結晶化条件の決定のためには、膨大な数の条件での結晶化の試みを作業的に行うことが必要である。最近では、結晶化ロボットや分注器を用いてこれらが行われているが、手作業で行うには非常に労力を要するので、まずいくつかのパラメータを固定し、条件検索を行った後、ヒットした条件近くの沈殿剤濃度や緩衝液の pH などを変化させて、条件の最適化を行うのが一般的である。

結晶化の試みが始められた当初は、塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの塩、またポリエチレングリコール(PEG)や 2-メチル-2,4-ペンタンジオール(MPD)などの有機溶媒といった沈殿剤の濃度をシンプルに変化させた条件で、結晶化条件の検索が行われてきた。しかしながら、タンパク質は個々に特有な性質を有しており、ただアミノ酸1個が置換された変異体でも野生型タンパク質の結晶化条件とは異なる条件になることは多々ある。現在では、Jancarik J.と Kim S.-H.が1991年に提唱した Sparse matrix sampling に基づいて作製された市販のキット(Hampton Research 社, Crystal Screen etc; Jena Bioscience 社, JBScreen, Wizard Screen etc; Molecular Dimensions 社, Structure Screen etc; QIAGEN 社, Screening Suites など)を沈殿剤溶液として用いる方法がよく使われる。

初期条件の検索では、タンパク質濃度が 10-20 mg/ml 程度、温度は 20°C と 5°C がよく用いられる。結晶化法としては、これまでハンギングドロップ蒸気拡散法がよく用いられてきたが、最近ではサンプル量や沈殿剤として用いるリザーバ溶液の量を少なくできること、分注器やロボットを使うなどの目的で、シッティングドロップ蒸気拡散法やマイクロバッチ法がしばしば用いられている。

初期検索で結晶が得られれば、目的とする大きさの結晶が得られる条件をさらにスクリーニングして絞り込めばよい。しかしながら、たくさんの結晶化条件を用いたスクリーニングでも結晶が得られないことは間々ある。このような時には、タンパク質の濃度を変えるなど、固定していたパラメータを変更してスクリーニングすることが必要となる。どのような条件でタンパク質が沈殿するのか、あるいはしないのかといった情報は

次の検索条件を決定する際に有益な情報になるので、結晶化条件のスクリーニングでは、ドロップの様子を経時的に観察し記録することが重要である。

b) 結晶化条件の最適化

初期検索の結果、微結晶やクラスタ状の結晶、あるいは単結晶が得られた場合、X線回折強度実験に適した結晶が得られる条件を検索する。X線回折実験に適した結晶とは、単結晶で、X線結晶構造解析を行うに必要な回折強度データが収集できる結晶である。得られた結晶から回折強度データを収集できるかどうかは、実際に結晶にX線を照射してみるまでわからないが、X線回折の強度は結晶の体積に比例するので、大きなサイズの単結晶が得られるような結晶化条件を検索する。SPring-8 BL41XU ビームラインのような強力な線源はもちろん、PF BL17Aのような小さい結晶に適した線源を用いたデータ測定実験から 0.01-0.05 mm 大のサイズの結晶でも十分な回折強度が得られることがあるが、一般的には 0.1-0.2 mm あるいはそれ以上の大きさの結晶が得られる条件を探すことが望ましい。

沈殿剤濃度、添加剤の濃度、緩衝液の種類と pH を結晶が得られた条件の周辺で変化させることによって、実験に最適な結晶が得られる条件をスクリーニングする。また結晶化の方法によっても、得られる結晶のサイズやその品質は変化することがある。結晶の品質は、結晶を急激に成長させるよりもゆっくりと成長させた方が改善される場合がある。蒸気拡散法の場合、ドロップ溶液とリザーバ溶液の比率を変更する、また沈殿剤溶液の上に水を通しにくいオイルを重層して蒸気拡散のスピードを抑制するなどの手法もある。また一般的に蒸気拡散法よりもマイクロバッチ法の方が、結晶化溶液の濃縮が遅くなるので、質の高い結晶が得られる場合がある。微結晶やクラスタ状の結晶は得られるものの、沈殿剤溶液の組成を変えても目的の単結晶が得られない場合には、シーディング法（マクロシーディング法、マイクロシーディング法）を組み合わせた結晶化で改善されることも多いので、これらを試すことも必要である。