

生体分子構造解析学特論

シンクロトロン光研究センター
渡邊 信久

第5回

1

いよいよ5回目です。

前回、DNAの構造予測をすることと関連して、「逆」空間、フーリエ変換とコンボリューション積の話をしました。

今日は、さらに発展させて、かなり実際の「構造解析」の話になります。でも、例によって、出来るだけ数式は使用しません。それが良いのか悪いのか、良く分らないところもありますが、概念をつかむ前に数式で混乱するだけで終るよりは良いのではないかなと思っています。

そういえば、私は事前に全部のスライドを印刷して皆さんの手元に配布しないですが、手元に資料を配布してしまうと、一般に、学生はスクリーンを見るよりも手元の資料の方を解読しようとするからです。ややこしいことは話さないで、下を見てないでスクリーンを見て、話を聞いて欲しいということです。

寝てる場合はどちらでも関係ないので任せます...

講義スケジュール

- 1：混沌の時代から繊維写真の時代
- 2：サイクロール説
- 3：二次構造の解明
- 4：DNAの構造
- 5：結晶構造解析法の発展
- 6：高分解能構造解析の始まり

2

さて、始めましょう。

今日は、ミオグロビンの構造が、どうやって解析されたのかを辿ります。

もしかしたら、全部終らないかも知れません。

蛋白質結晶学の胎動

1926

urease の結晶

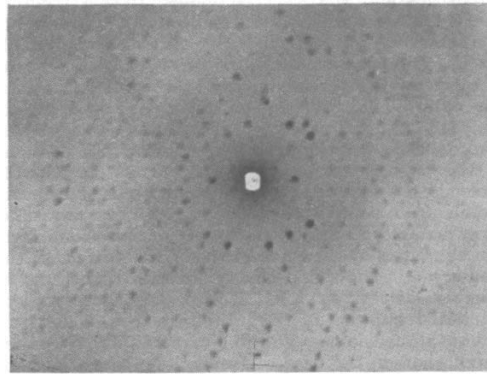
JB Sumner

1930's

消化酵素群 の結晶

J Northrop

ヘモグロビンの結晶の回折写真



Bernal, Fankuchen & Perutz,
Nature (1938) 141, 523

JD Bernal の決断

@ Cavendish

“X線で結晶中の
蛋白質を観察する”

3人の若手

D. Crowfoot (Hodgkin)
Max Perutz
Isidor Fankuchen

ブレークスルー

蛋白質結晶の
キャピラリー封入

3

先々週もちよっと話したように、実は、今日の講義の範囲の前にも「歴史」があります。

1930年代には、既にタンパク質の結晶はあったし、それをバナルが何とかしようと思いついて研究室を作って、ドロシーやマックスらが頑張って仕事をします。

でも、今日は、この「キャピラリー」の話はちょっと出て来ますが、この間のたくさんの仕事は飛び越えて、これらを踏まえた後の具体的な構造解析の話です。 . . .

How to solve a protein structure

history of the **MIR** phasing method

4

さて、どうやってタンパク質の構造を解析するのか、ですが、今日話をするのは、ここに書いてあるMIR法のことです。

どういうものかが分って、原理的に、どうやってミオグロビンの構造が決定出来たのかが理解できれば良いだろう、ということです。

key paper

hemoglobin sagaの
一報目

An X-ray study of horse methaemoglobin. I
BY JOY BOYES-WATSON, EDNA DAVIDSON AND M. F. PERUTZ
Cavendish Laboratory and Moltano Institute, University of Cambridge
(Communicated by Sir Lawrence Bragg, F.R.S.—Received 3 February 1947)

Proc. Roy. Soc. London (1947) A191, 83-132

myoglobin の
3次元構造速報

A THREE-DIMENSIONAL MODEL OF THE MYOGLOBIN MOLECULE
OBTAINED BY X-RAY ANALYSIS

By Drs. J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH and H. WYCKOFF
Medical Research Council Unit for Molecular Biology, Cavendish Laboratory, Cambridge

AND

D. C. PHILLIPS

Davy Faraday Laboratory, The Royal Institution, London

Nature (1958) 181, 662-666

myoglobin の
3次元構造解析

The crystal structure of myoglobin
V. A low-resolution three-dimensional Fourier synthesis
of sperm-whale myoglobin crystals

BY G. BODO, H. M. DINTZIS, J. C. KENDREW AND H. W. WYCKOFF
*Medical Research Council Unit for Molecular Biology, Cavendish Laboratory,
University of Cambridge*

(Communicated by Sir Lawrence Bragg, F.R.S.—Received 22 April 1959)

Proc. Roy. Soc. London (1959) A253, 70-102

5

今日の key paper はこれでした。

これが1947年で、こっちが1958年ですね。

ケンドリューがミオグロビンの構造を発表するのが1958年ですが、その前にペルーツがヘモグロビンで色々な方法を検討しています。

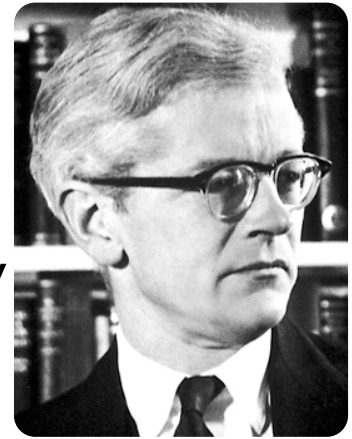
今日の主役はペルーツとケンドリューです。

Perutz and Kendrew



～1938 M. Perutz

hemoglobin @1959



～1947 JC Kendrew

@1957 myoglobin

6

例によって、いくつかの時の写真が良く分らないですが...

「結晶構造解析をするぞ」とキャベンディッシュにバナールが研究室を立ち上げ、ペルーツは1938年からヘモグロビンの結晶構造解析の研究をします。

バナールがロンドンに異動してブラッグ体制になった後もペルーツは残り、前回も話したようにインドで従軍していてバナールに出逢ったケンドリューが、帰国後ブラッグの所に加わりミオグロビンの結晶構造解析の研究を始めます。

@で書いた年が構造解析された年です。20年とか10年ですよ...

the diffraction pattern of a crystal is its Fourier transform

three-dimensional image of the crystal has been broken
down into component sinusoidal waves

7

さて、今日は「結晶構造解析」の話ですので、前回から、さらにちょっとだけ進みます。

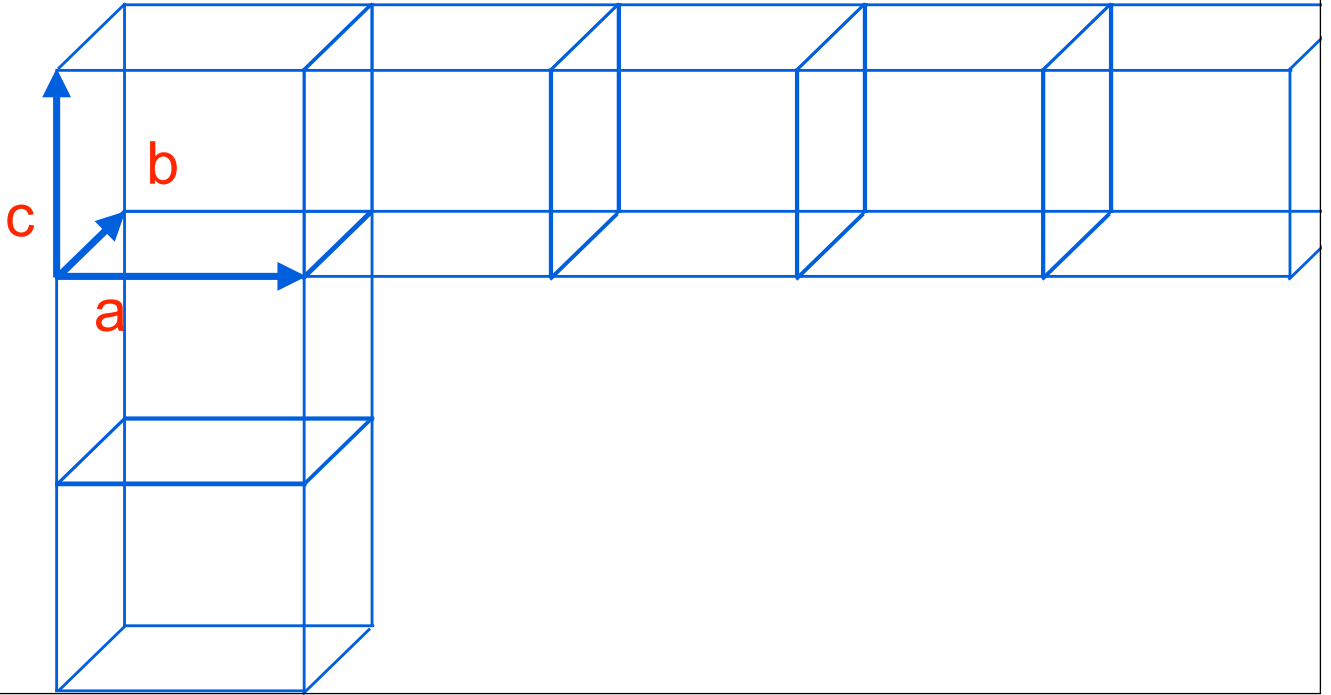
結晶のX線回折パターンは、分子がたくさん規則的に並んだ結晶のフーリエ変換だ、というところまでは、前回の説明で納得することが出来るかと思います。

「フーリエ変換だ」ということの意味は、この下に書いてあることですが、まずはそこから...

フーリエ変換もしくはフーリエ合成ですが、**どこかで習いました？**

crystal & diffraction pattern

unit cell: **a**, **b** and **c**



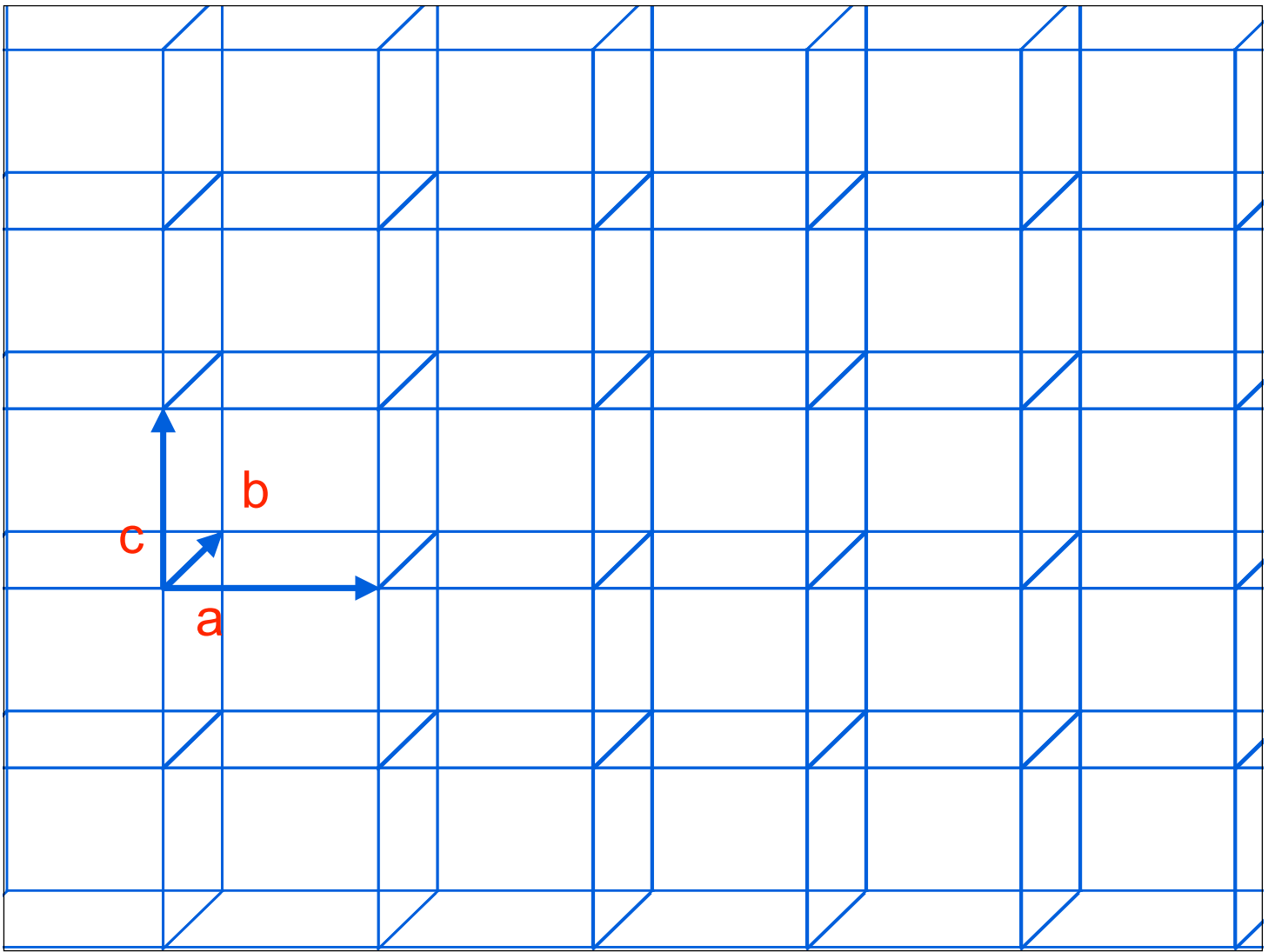
8

まず、ちょっと結晶を復習します。

結晶の場合、結晶の中で、繰り返しの単位となるユニットを考えます。

だから、普通は、このa, b, cはÅオーダーです。

それが、3次元的にずっと規則的に並んでいる。それが結晶というわけです。

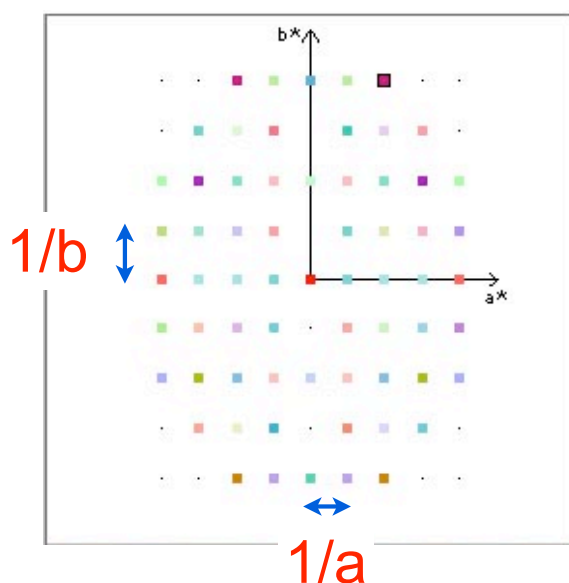
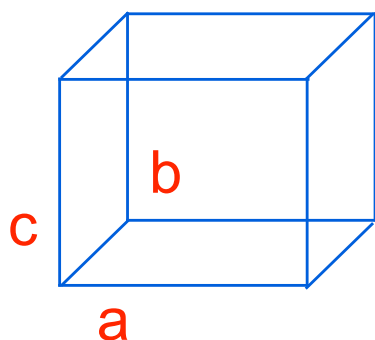


こんなふうです.

で, そうした結晶にX線を当てると回折が起る訳ですが, 前回の「逆」空間, つまり逆数の関係を復習すると,

crystal & diffraction pattern

unit cell: a , b and c



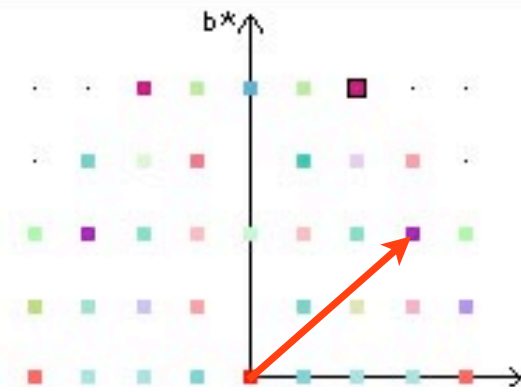
diffraction pattern: $1/a$, $1/b$ and $1/c$

10

結晶の繰り返しの単位となるユニットの大きさ a , b , c と、X線回折写真の回折点の間隔は「逆数」の関係になっています。

つまり、結晶の繰り返し単位の寸法が a だったら、その方向に対応している回折点の間隔は $1/a$ に比例しています。
 b だったら、その方向は $1/b$ に比例です。いいですか。
そして、回折写真上のそれぞれの回折点ですが...

diffraction spots & waves in the Fourier synthesis



vector to the spot \longleftrightarrow direction of the wave

distance to the spot \longleftrightarrow wavelength of the wave

intensity of the spot \longleftrightarrow amplitude of the wave

no information... \longleftrightarrow phase shift of the wave

11

その点までのベクトルの向きはフーリエ成分の「波」の方向,

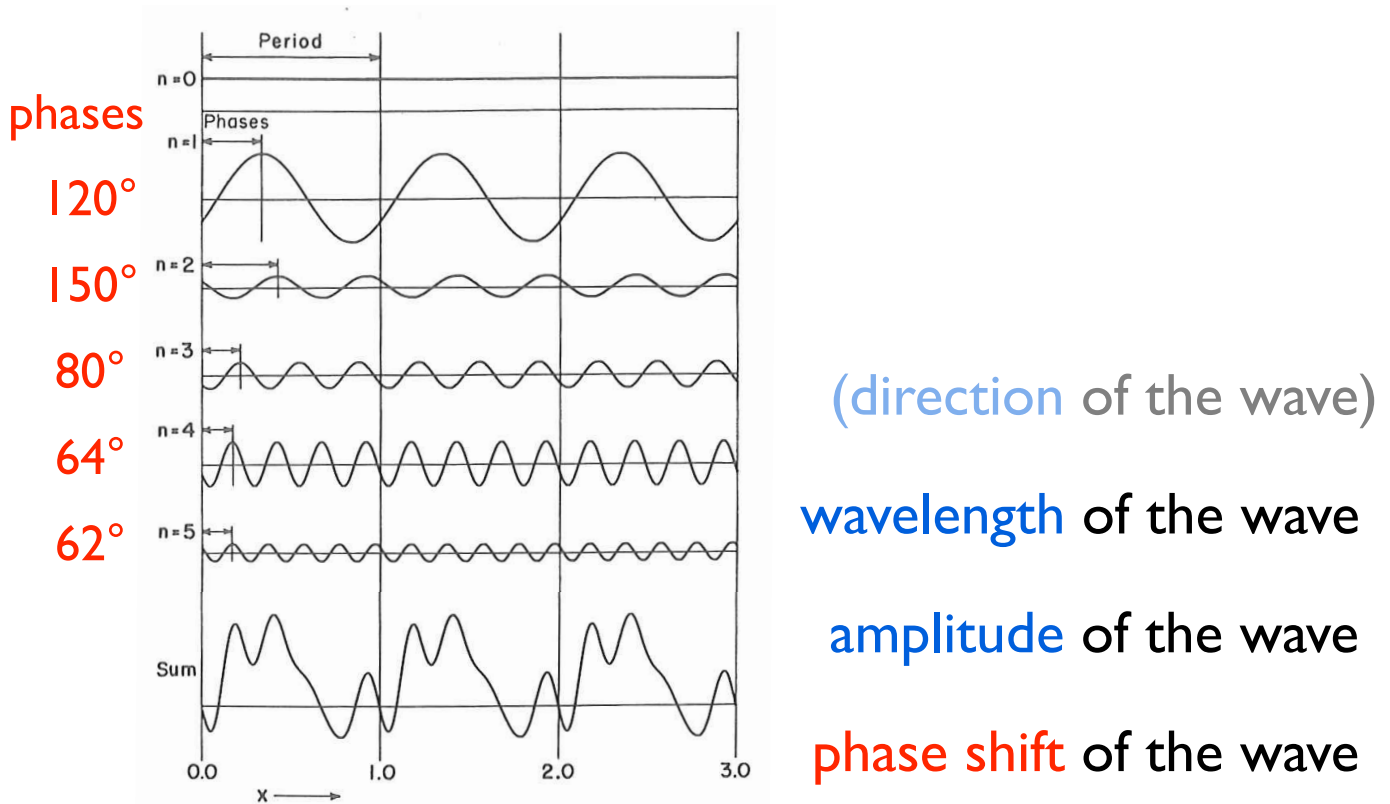
その点までの距離は「波」の波長,

その点の強度は「波」の振幅と対応しています.

問題は、波の位相は、回折点の測定情報では分らない、
ということです.

今「波」っていうのを何も説明しませんでした、それは
どういうことかという、

diffraction spots & waves in the Fourier synthesis



12

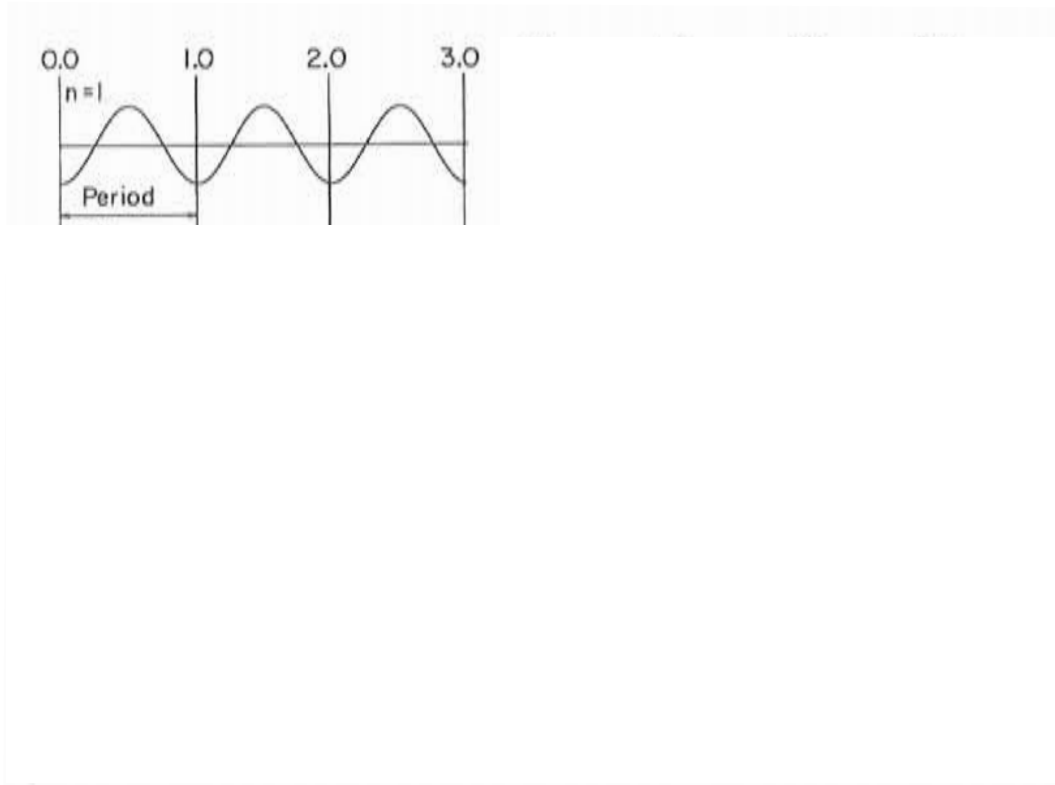
方向(direction)のことは1次元で描けないのでちょっと後回しにすると、波長と振幅はこういうことです。

ここからここまでが基本単位、つまり結晶でいうと単位格子に相当しているとすると、ここにnとありますが、n=0の「波」は無限に続く定数、n=1の波は単位格子が1波長分の波、n=2は、単位格子が2波長分の波...ということになり、振幅はそれぞれの波の山の高さです。

そして観測出来ない位相ですが、波を余弦波だとすれば、この図では、n=1の波は120度、n=2は150度...というふうに位相がずれているということになります。

フーリエ変換ないしフーリエ合成ということは、どういうことかということ、このn=0からn=5までの波を足し合せると、このような波を記述することが出来る、ということです。

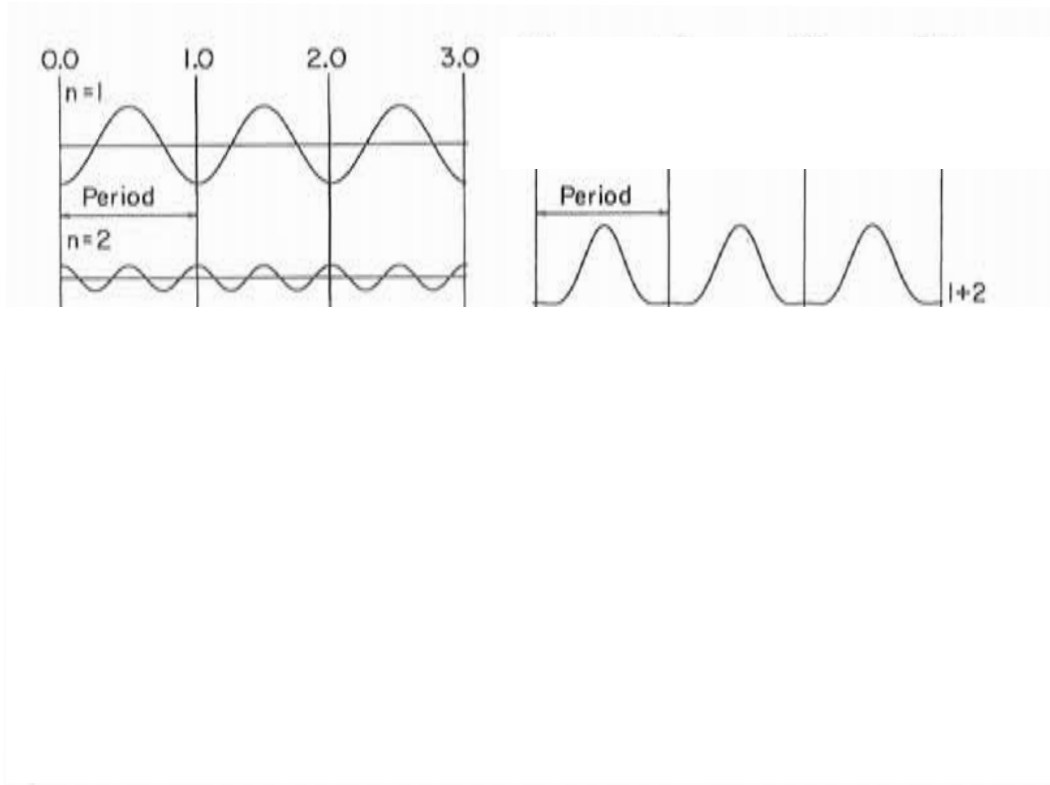
Fourier synthesis & resolution



13

次に、今回のレポート課題にもした「分解能 (resolution)」とフーリエ合成の関係を説明しましょう。まず、 $n=1$ つまり単位格子が1波長分の波になるフーリエ成分がこうだったとして、

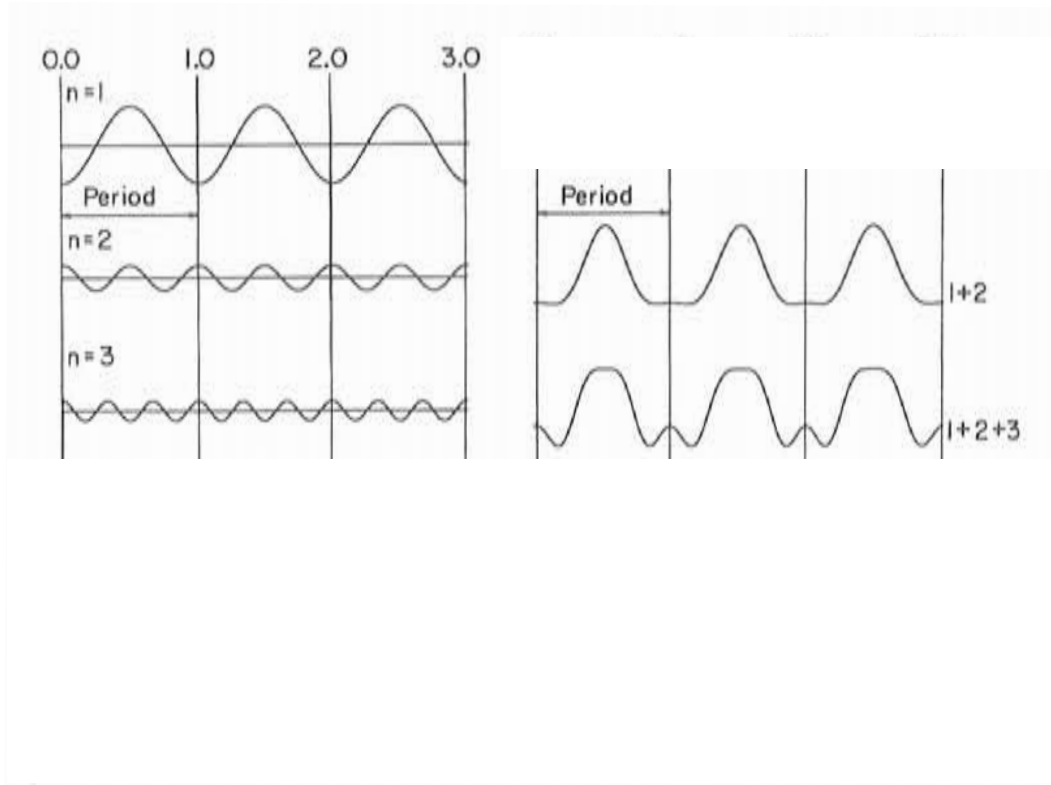
Fourier synthesis & resolution



14

$n=2$, つまり単位格子が2波長分の波になるフーリエ成分がこうだったら, それらを重ね合わせたもの, つまり $n=1$ と $n=2$ の2つの波の合成波は, こうなります. 簡単ですよね...

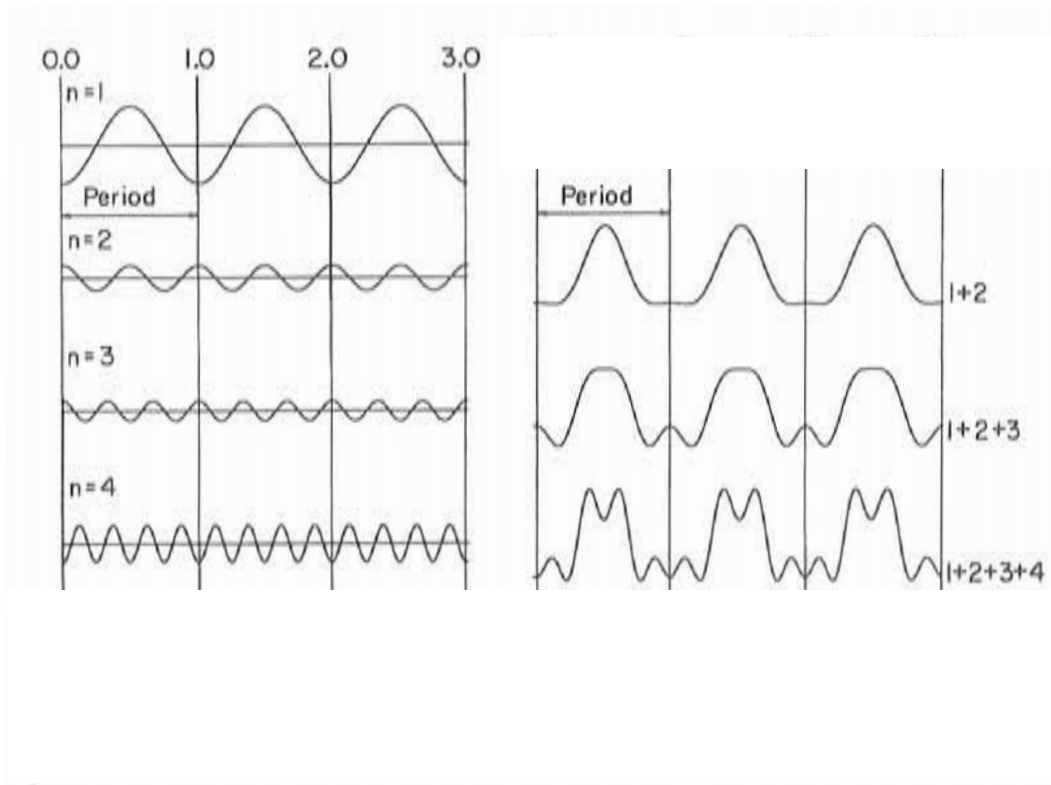
Fourier synthesis & resolution



15

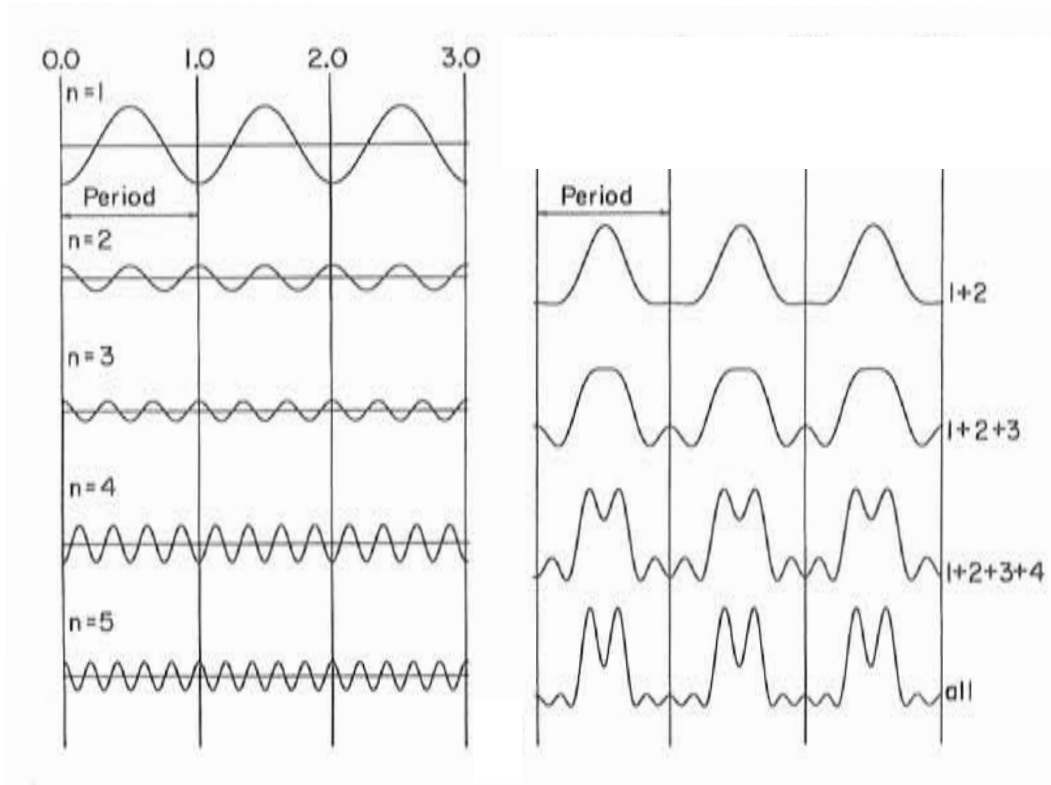
さらに $n=3$ のフーリエ成分がこうだったら、そこまでを重ね合わせると、こうなり、 $1+2$ の時とちょっと違って来ます。

Fourier synthesis & resolution



さらに $n=4$ の成分を重ねると，こうなって...

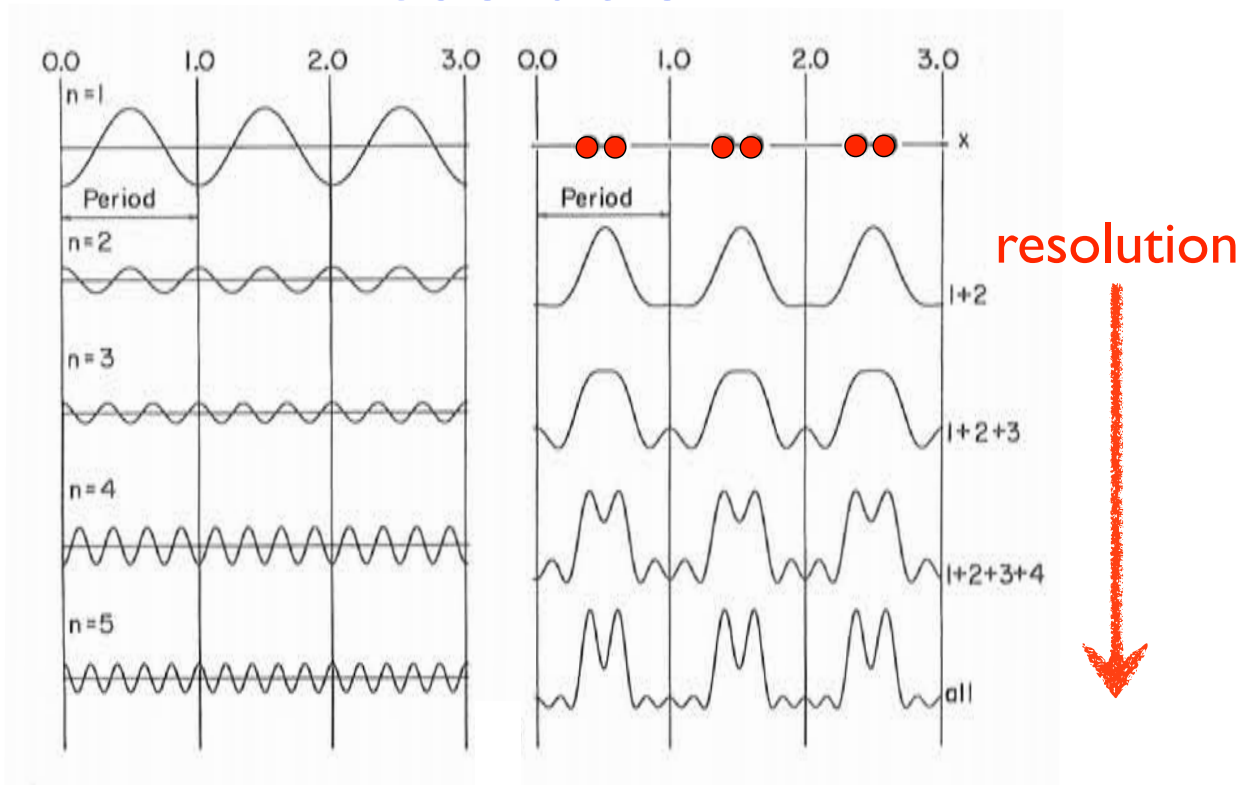
Fourier synthesis & resolution



17

さらに $n=5$ の成分を重ねると、こうなります。
実は、こうしてフーリエ合成で表現した元の「構造」
が...

Fourier synthesis & resolution



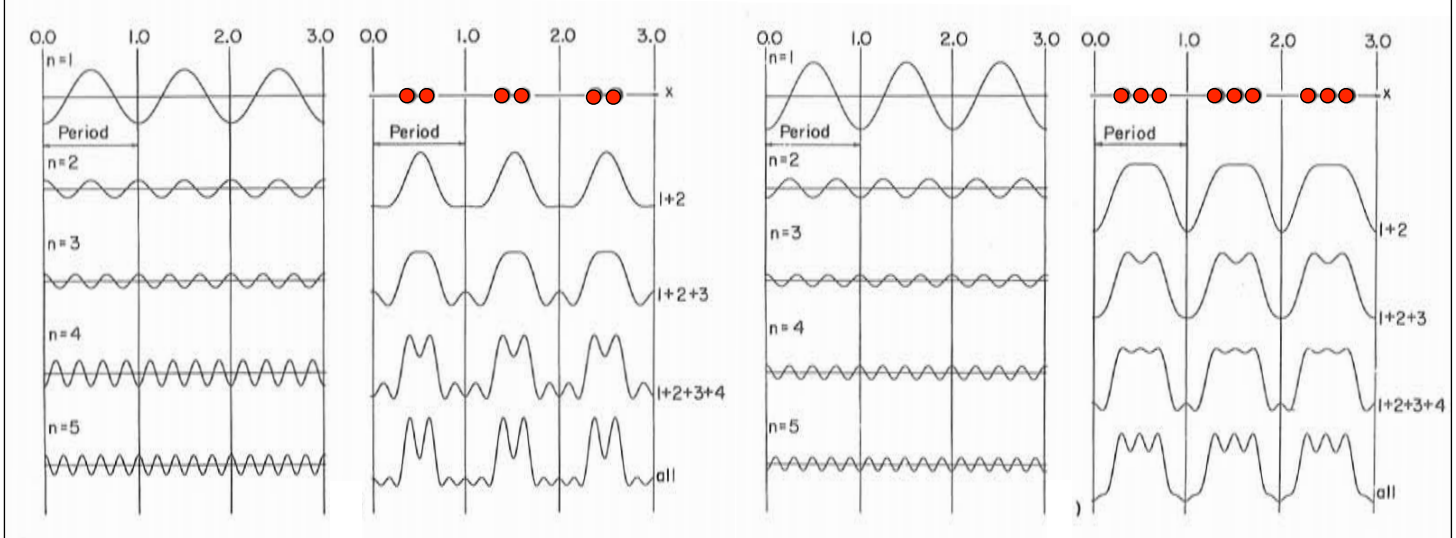
18

こういう「2分子」だったとすると、さっき順に見た、 $n=1$ だけ、 $n=1+2$ 、 $n=1+2+3$ というふうに細かい周期の成分を足し合せていくと、徐々に正解の「2分子」の様子を正確に表現することが出来るようになっていた、ということが分ります。

分解能は、下に行くほど良い(高い)ということになります。

Fourier synthesis

amplitude & phases



19

分解能の次は、フーリエ成分の振幅と位相です。これがさっきの2原子ですが、同じ $n=1$ から $n=5$ までのフーリエ成分でも、このようにちょっとずつ位相と振幅が違っていると、そのフーリエ合成が違います。

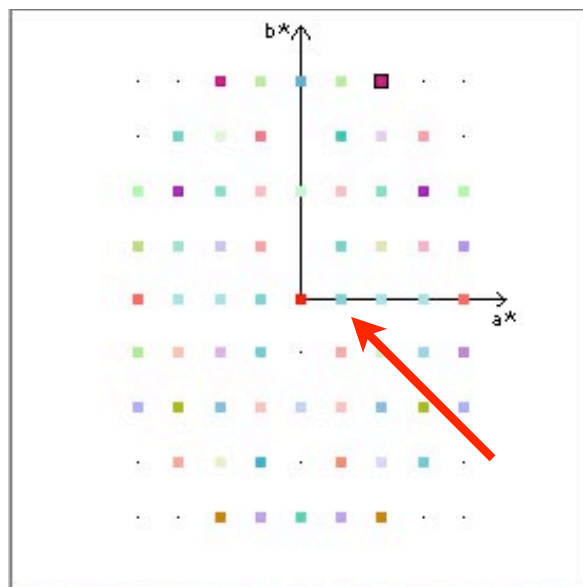
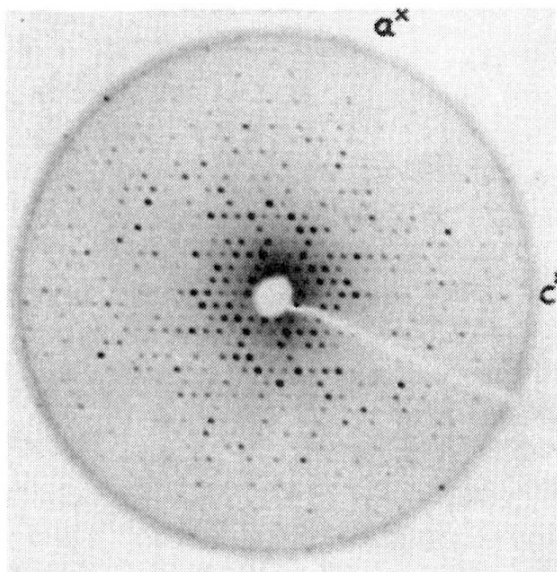
どうなると思います？

実は、こっちは「3原子分子」でした。

これで分るように、フーリエ合成(フーリエ変換)にとっては各フーリエ成分の波の振幅と位相、特に位相(つまりどこに波の山があるか)が重要だということです。

逆に言うと、この位相が分らないと「正しく」フーリエ合成することは出来ないということが納得してもらえるかな...

diffraction pattern & Fourier component



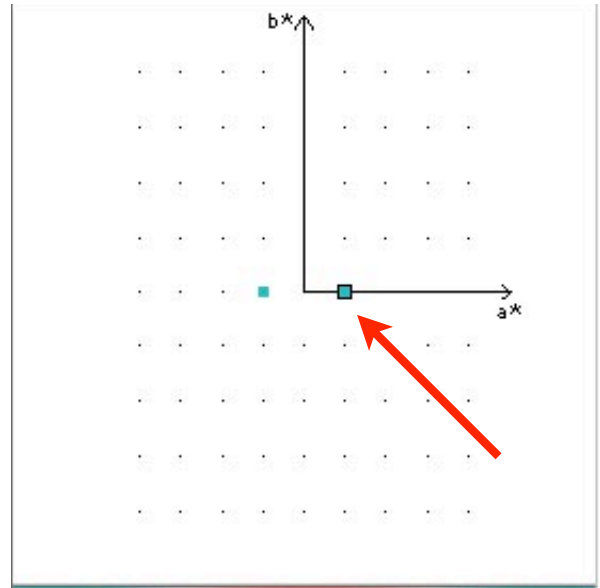
20

さて、残りは、先程後回しにした「方向(direction)のこと」です。

さっき模式的に描いているのは、左のような回折写真です。この写真の上の各回折点が、原点(つまり写真の真ん中)から見てどこにあるかが、どういう意味かということです。

たとえばこの回折点の場合ですが...

diffraction pattern & Fourier component



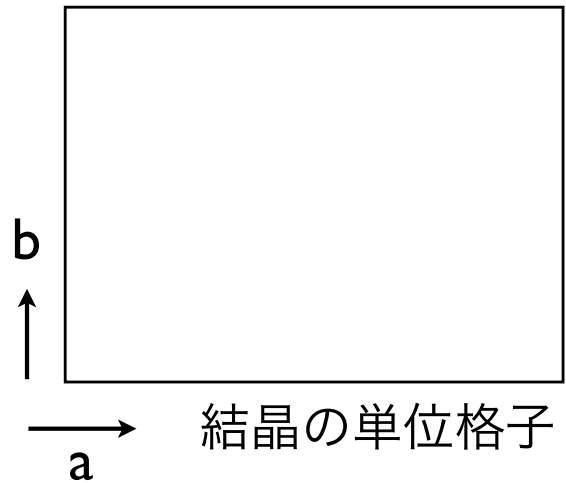
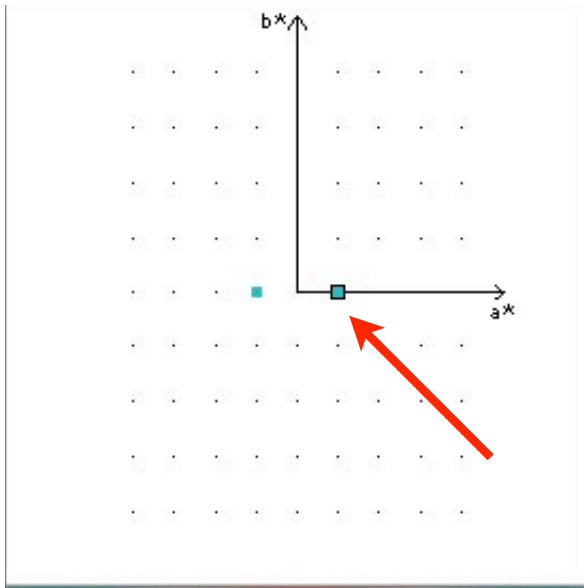
21

この点の意味はというと、

X線は結晶中の何と相互作用するの？

結晶中の電子と相互作用して散乱されて回折していますから、回折写真の回折点の強さは結晶中の電子の状態に関係しています。

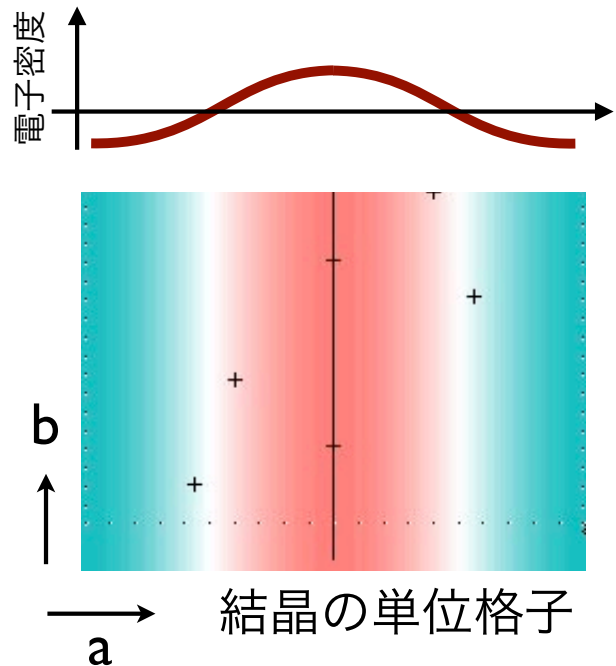
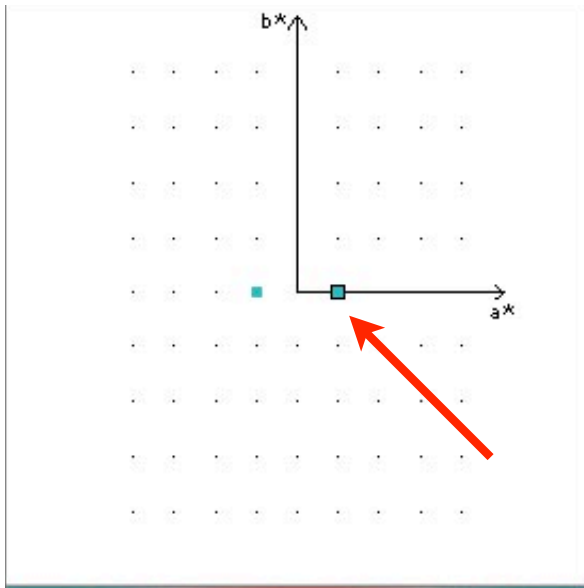
diffraction pattern & Fourier component



22

つまり、これが結晶中の単位格子だとすると、この回折点は、結晶の単位格子中の電子密度分布をいろんな波の重ね合せの成分に分けたとき (フーリエ展開したとき) に...

diffraction pattern & Fourier component

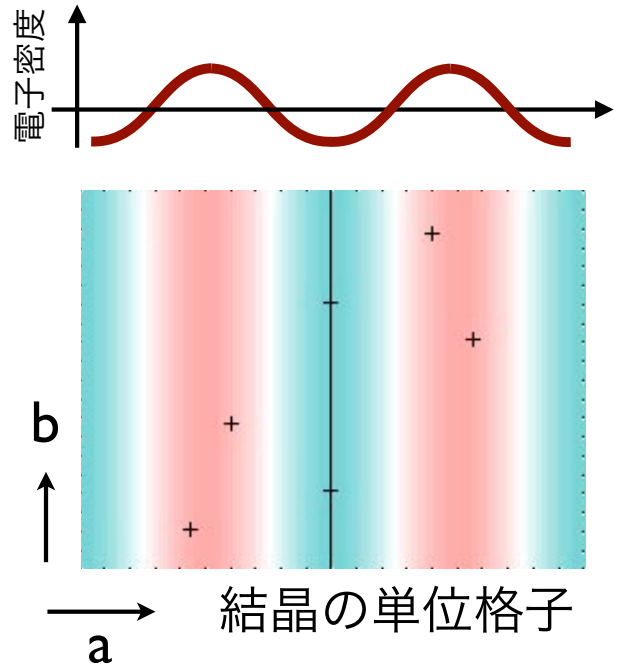
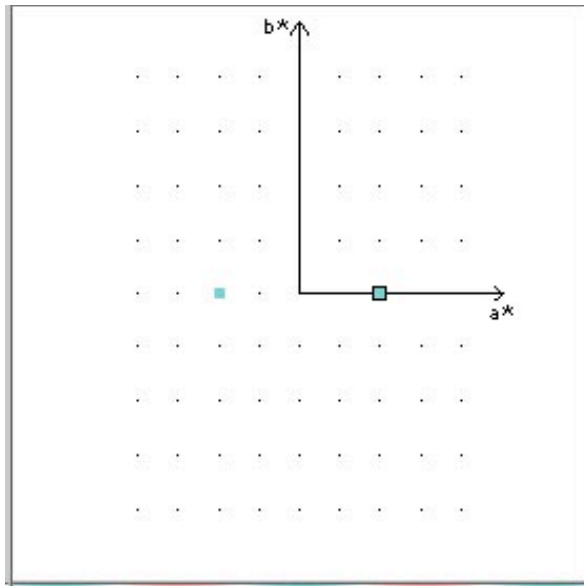


23

こういうふうに，こっち向きに「周期が1の波」に対応しています。

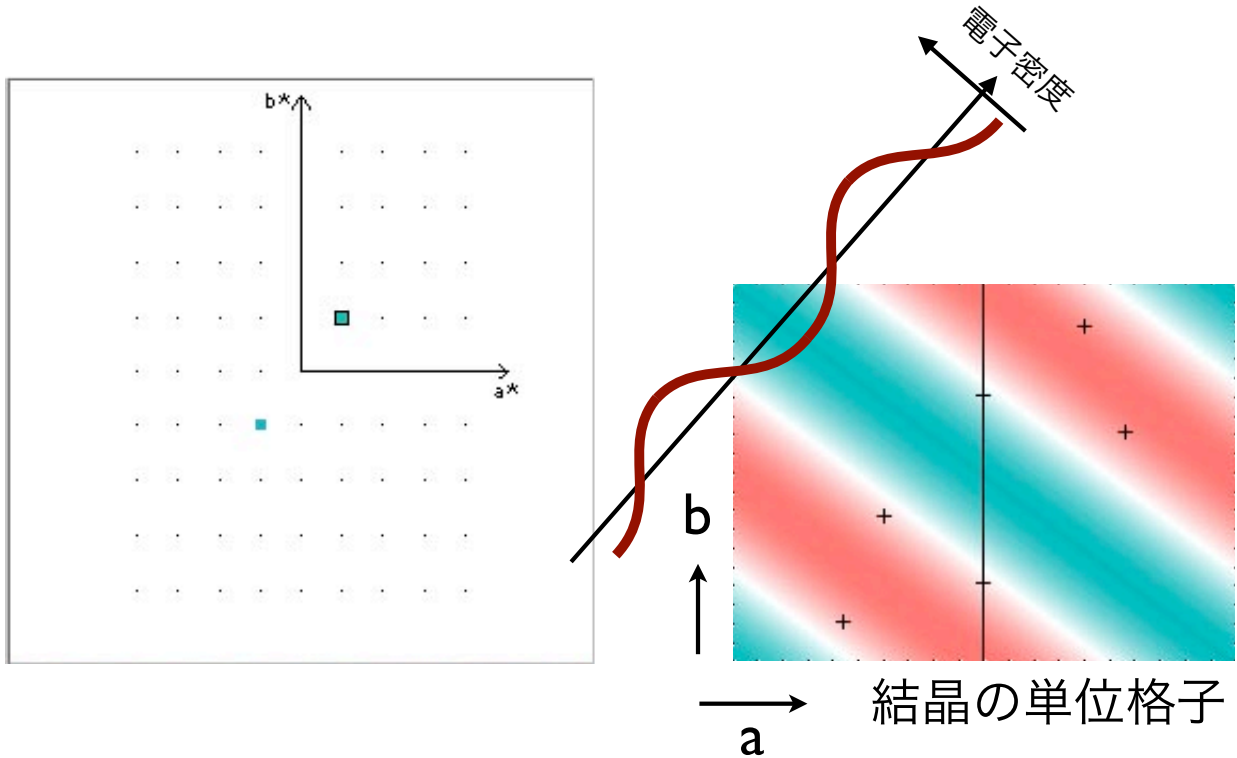
この図で示すように「周期が1の波」の成分で見たときに，赤いところに電子が沢山あって，青いところには電子が少ないという意味です。

diffraction pattern & Fourier component



その隣りの点は、「周期が2の波」の成分に対応しています。

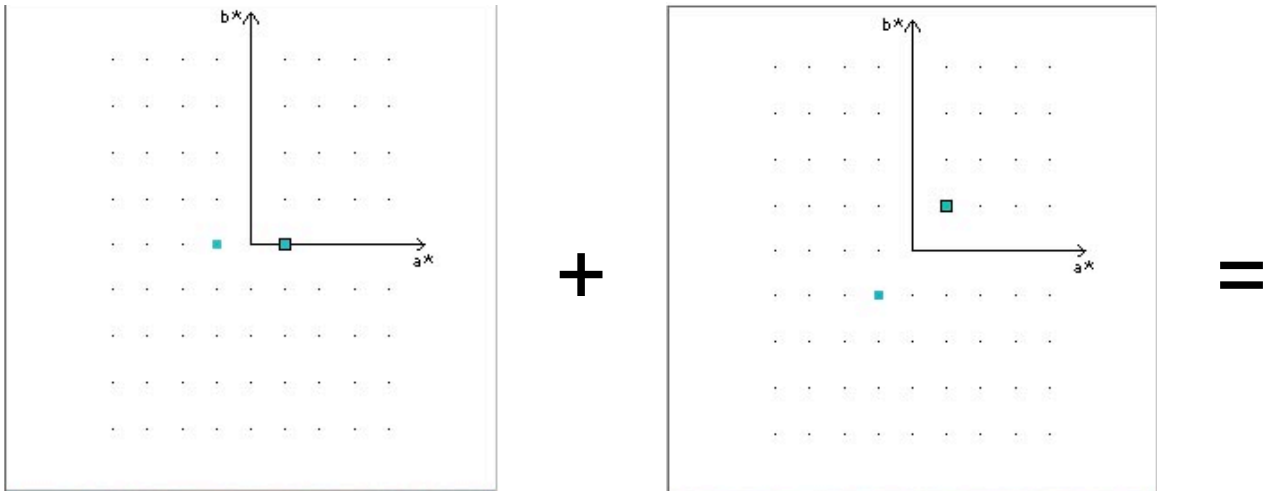
diffraction pattern & Fourier component



25

同じように，こんな斜めの点は，こんなふうな「斜めの波」の成分に対応しています。

Fourier synthesis

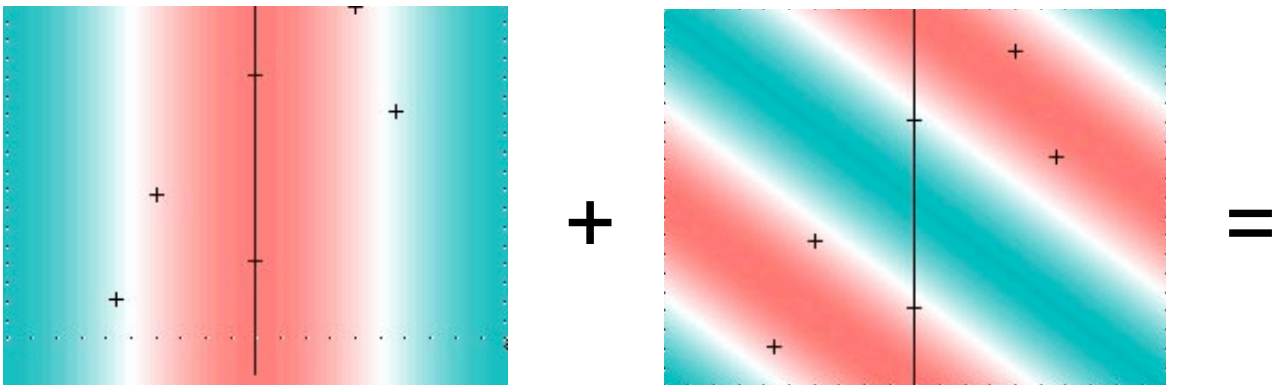


26

さっきまでは1次元で見ましたが，こんどはそれが2次元になっているだけです．さらに，実際の構造解析の場合は3次元になります．

X線結晶構造解析は，回折実験をして，それぞれの回折点の強さを測定してやって，その情報をどんどん足し合せていきます．つまりフーリエ合成をするわけです．感覚的にはこういう計算をする感じです．そういう計算をすると，結晶格子のイメージでは，

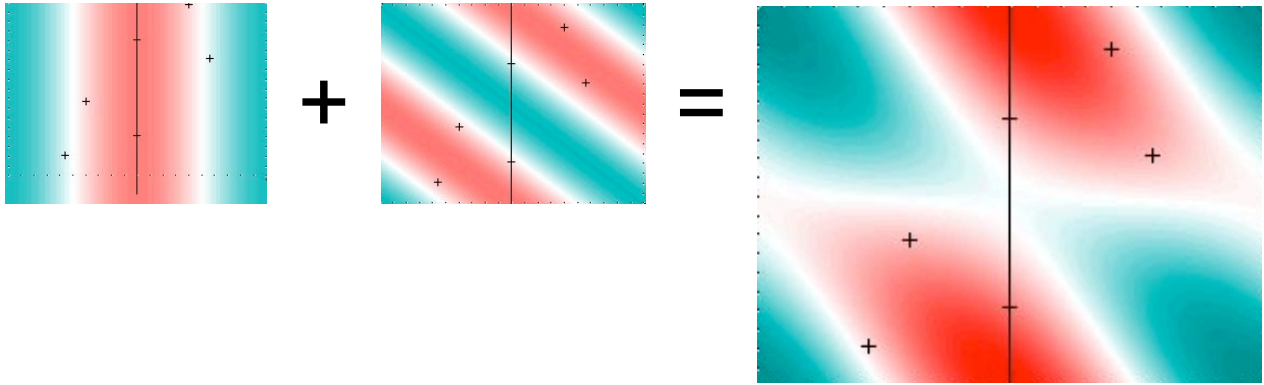
Fourier synthesis



電子密度分布の周期成分の足し算

こういう「波の成分」の足し合せをどんどんしていることになります。

Fourier synthesis



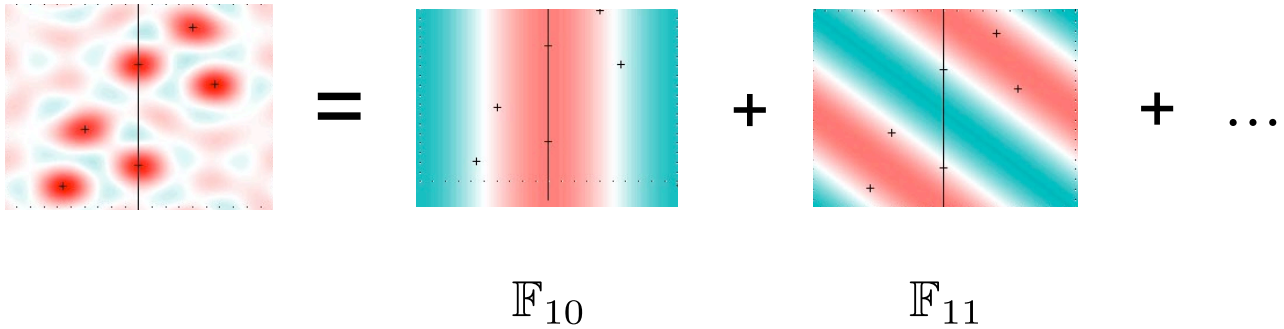
28

例えば、この二つの波を足すと、こういう模様になります。

それをずっと全部足し合わせていくと構造解析になる訳です。

Fourier synthesis

$$\rho(x, y, z) = \sum_h \sum_k \sum_l \mathbb{F}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

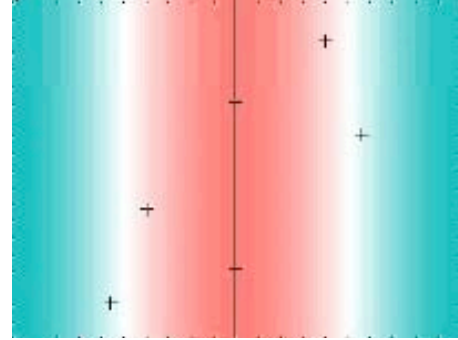
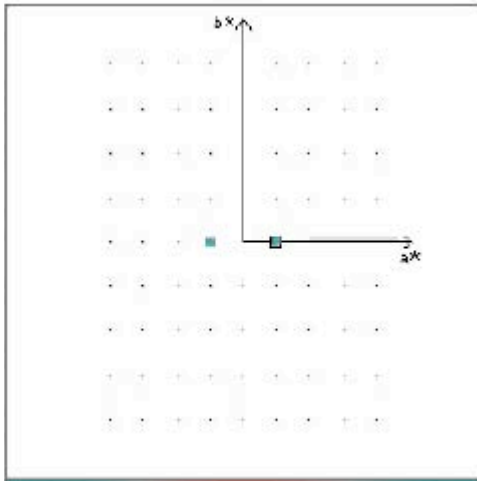


29

式で書くとこうです.

つまり, 回折写真の各回折点が持っている「波の成分」(\mathbb{F}_{10} とか \mathbb{F}_{11})をフーリエ合成すると, ある点(x, y, z)での電子密度を求めることが出来るということです.

Fourier synthesis



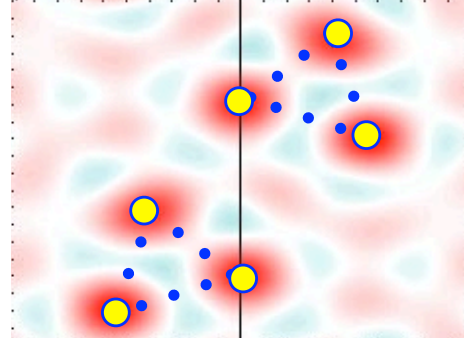
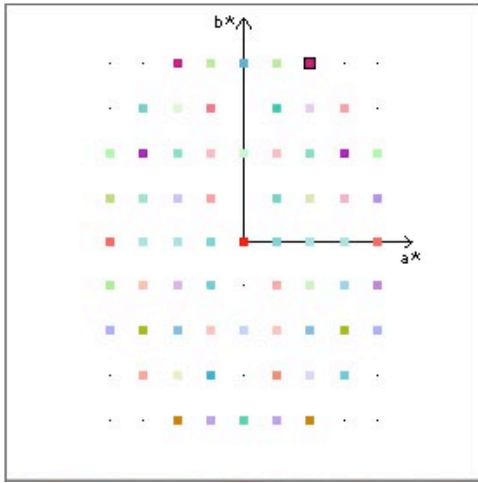
30

2次元の例を見てみます.

結晶格子中の電子密度分布がだんだんくっきりと分るようになり, 最終的には原子位置に対応した電子密度分布図を得ることができます.

(実際はこのスライドはGIFアニメになっていて, フーリエ合成の様子が見える)

Fourier synthesis

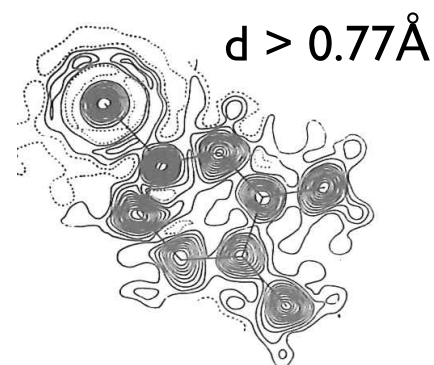
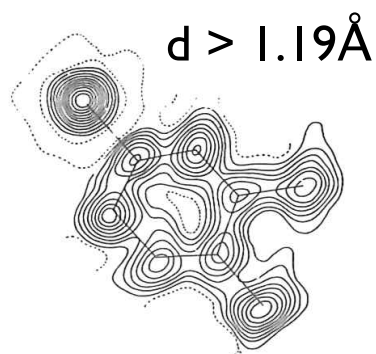
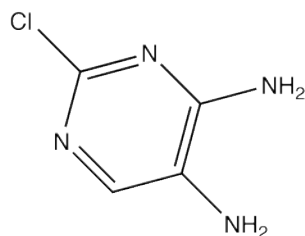
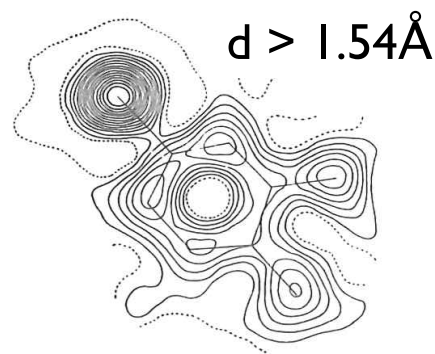
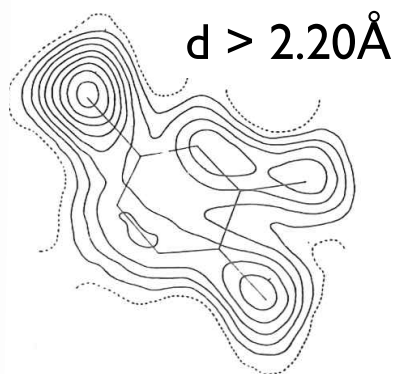
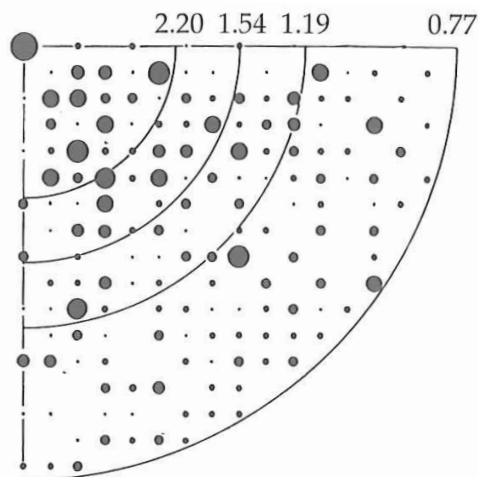


31

そうした解析の結果, つまり「構造」が分るということです.

この例の場合には, 結晶格子中にはこんな三角形の「分子」が二つあったのだ, ということになります.

resolution & electron density map



4,5-diamino-2-chloropyrimidine

32

さて、この足し算つまりフーリエ合成ですが、1次元の説明でも話したし、今の合成の過程でも分ったかも知れませんが、回折写真の回折点を中心からどれだけ離れたものまで使うかで、最終的にフーリエ合成されて出来た電子密度分布図が変わって来ます。

こんな感じです。

問題は、この左の回折写真の模式図で分るように、分解能の高い、つまり細かいところまで見えるようなフーリエ合成をしようとするすると、計算に組み込まないといけない回折点の数がどんどん増えていくということです。今は高速の計算機があるので、あまり関係ないけど、Kendrewらの時代は、そうはいかなかったので「分解能」をどこまでにするかが問題だったということです。

phase problem

the phase angle of each Fourier wave is lost in the diffraction pattern

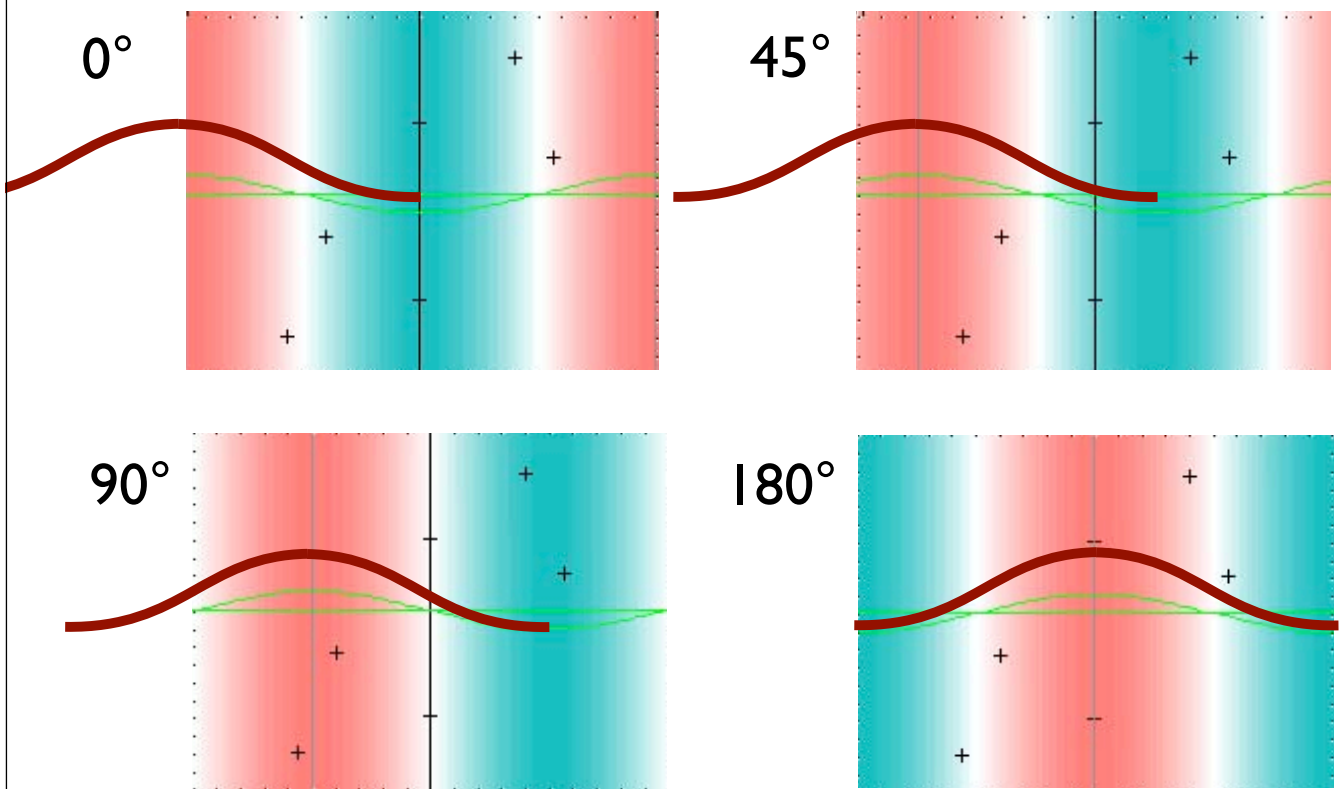
33

さて、「位相」の問題が残っています。

「位相」情報は回折点の強度測定では実験的に決めることが出来ません。

2次元の例で「位相」の意味をもう一度確認しておく...

phase

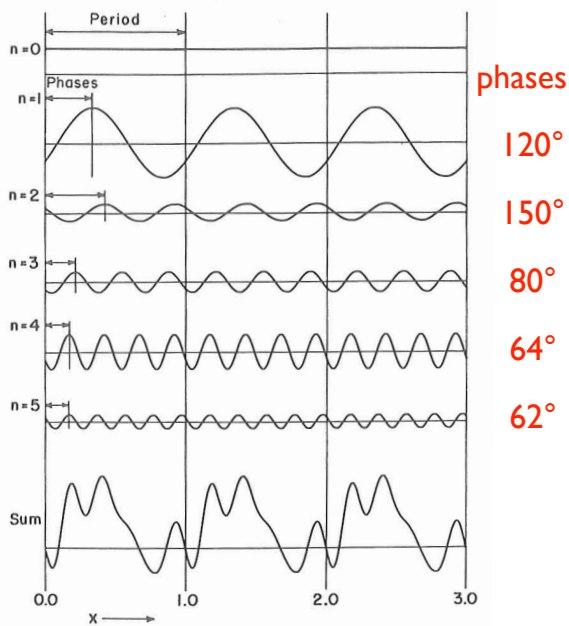


34

「一周期の波」の成分の例ですが、「位相」が違ふと、こんなふうには、フーリエ成分の波の山がどこにあるのかが違ってしまふということになります。位相が0度と45度、90度、180度で、このように全然違つた分布になつてしまひます。さっき見たように、こうした波をどんどん重ねていくのがフーリエ合成ですから、それぞれの波の山の位置がでたらめだと、そんなものを重ね合せても何も見えて来ないということになります。

回折写真が撮影されても、最初のみオグロビンの構造が解けるまでに20年もかかったのは、強度測定で各フーリエ成分の「山」の高さは分るけれども、「位相」をちゃんと決める方法が無かつたため、ちゃんと重ね合わせる事が出来なかつたということになります。

phase diagram



$$\mathbb{F} = Fe^{-i\phi}$$
$$= F(\cos\phi + i\sin\phi)$$

35

さて、「位相」のことを議論するには、「位相」を分り易く記述する方法が必要です。そのためには、phase diagram(位相図)の説明をしないといけません。

この図は、さきほど、1次元でフーリエ合成を最初に説明した図です。ここに各成分の位相が数字(角度)で書いてあります。これを、分り易く、扱い易く表現するには、どうしたら良いかです。

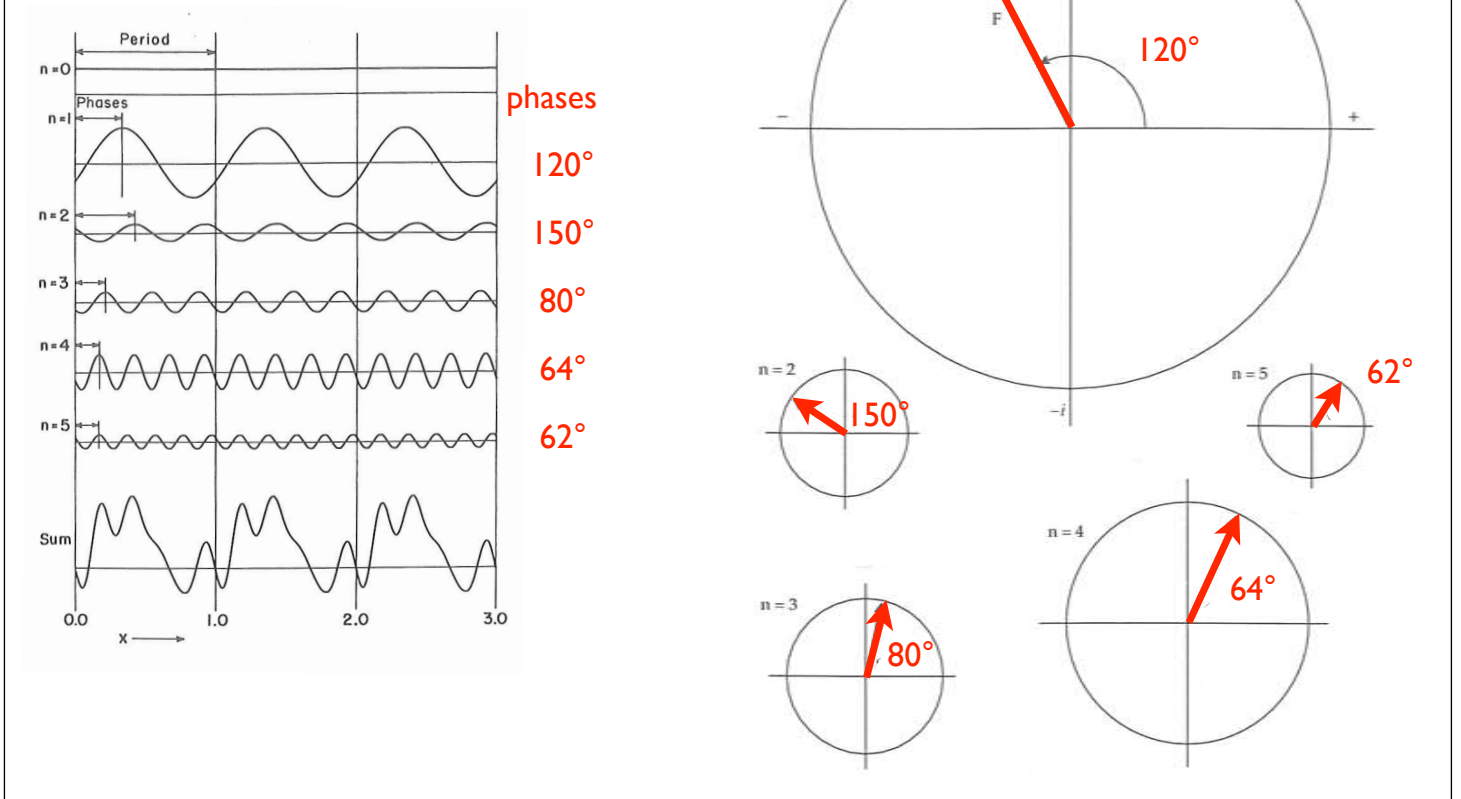
そのためには、このように、波の成分を複素数表現します。

Fが振幅で、指数関数もしくは三角関数部分が、その波の複素平面上での方向、つまり位相を示すということです。

これを「構造因子」とよびます。

ごちゃごちゃ説明するより、図を見た方が理解できますね。

phase diagram



36

それぞれのフーリエ成分の波，つまり構造因子を，複素平面で図示するとこのように描かれます。横軸が実軸，縦軸が虚数軸ですが，この円の大きさが，それぞれの波の振幅を表わし，そして，波の位相，つまり波の位置をこの矢印の方向で表わします。

n=1の波は，このように振幅が大きいので，円は大きい。そして，位相が120度ということは，矢印の向きはこっちということになります。

他のも同じです。n=2の波は振幅が小さいので円も小さい。そして位相は150度なので，矢印の向きはこうです。以下同様にこう表現することが出来ます。

大きさと向きを持った複素ベクトルとしての矢印が構造因子に対応しています。

electron density

$$\begin{aligned}\rho(x, y, z) &= \sum_h \sum_k \sum_l \mathbb{F}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \\ &= \sum_h \sum_k \sum_l (F_{hkl} e^{-i\phi}) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}\end{aligned}$$

↑
phase angle

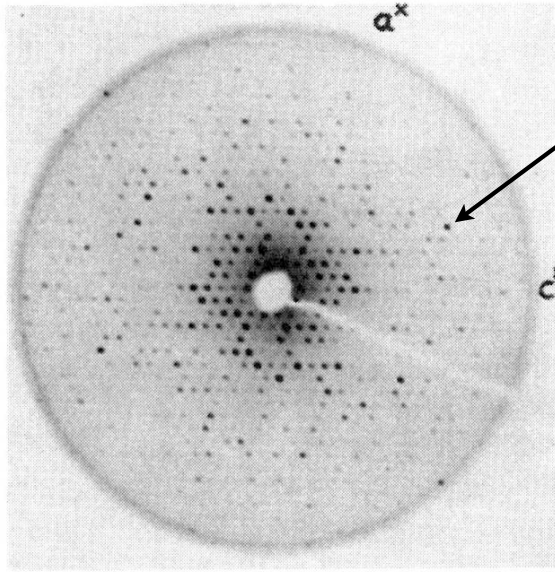
37

さて、電子密度分布のフーリエ合成ですが、実際にはこの構造因子Fをさっきのように複素数表現するとうこうです。

これが、hklで表現される波の成分で、それぞれの波が、ある位相だけずれている訳です。

そして、この位相の情報は回折強度測定では分りません。位相情報も分っていれば、この式のようにhklで足し算してフーリエ合成すれば、ある点(x,y,z)の電子密度ρが求まる、でも位相情報が分らないので、ちゃんと足し算することが出来ないということになります。

phase problem



$$I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$$

$$= F_{hkl}e^{-i\phi} \times F_{hkl}e^{+i\phi}$$

$$= F_{hkl}^2$$

38

位相情報が分らないということですが、ということか
という、回折写真で測定できるのは、各回折点の「強
度」で、それは F_{hkl} の絶対値の2乗に比例していて、複
素数の絶対値の2乗は、こうですから、後の位相の部分は
消えてしまっているという訳です。

このように、測定した情報からは分らない訳ですが...

phase problem

$$F_{hkl} = F_{hkl} e^{-i\phi}$$

$$= \sum_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

f_j : the scattering power of atom j

depends on the positions of atoms (x_j, y_j, z_j)

39

実は構造因子は、結晶中にある各原子の散乱(回折)能の合計なので、 f_j を j 番目の原子の散乱能とすると、このように各構成原子からの寄与を全部足し合わせたもの、ということになります。

f_j は原子が持っている電子の数に比例していて、原子の種類に固有なので、この式にあるように j 番目の原子の座標(x_j, y_j, z_j)が分っていれば、 F は計算することが出来る量です。

しかし、問題(phase problem)は、これから構造解析をしようとしているくらいですから、各構成原子の位置が分っていない、だからこんな計算は出来ないということになります。 . . .

how to solve...

for smaller molecules

(a) Guess & trial-and-error

(b) heavy atom phasing

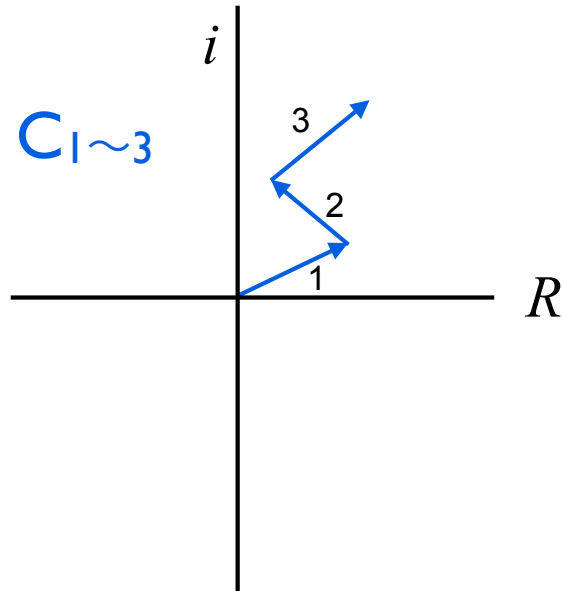
40

さて、では、どうやって「位相問題」を解決したのか、
ということです。

今ではそんなことはしませんが、昔は、小さな分子の場合には、
試行錯誤で推測していくか、重原子を利用することがされていました。

example: C_3Br molecule

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^3 f_C e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} + f_{Br} e^{2\pi i(hx_{Br} + ky_{Br} + lz_{Br})}$$



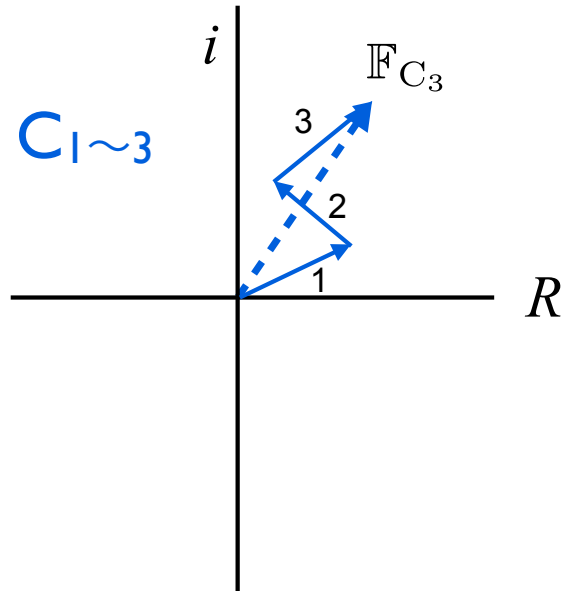
41

例えば、ブロモプロパン(C_3Br)分子を例に考えてみましょう。
X線は水素とは、ほとんど相互作用をしないので省略します。
なぜ?

さて、構造因子ですが、もしも全部の原子の座標が分っていたら、さっきの式で、こんなふうに計算することができます。そのことを、複素平面で図示するとこういうことになります。ベクトル量ですので、まず、3つの炭素について順に足すと...

example: C_3Br molecule

$$\mathbb{F}_{hkl} = \sum_{j=1}^3 f_{Cj} e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} + f_{Br} e^{2\pi i(hx_{Br} + ky_{Br} + lz_{Br})}$$

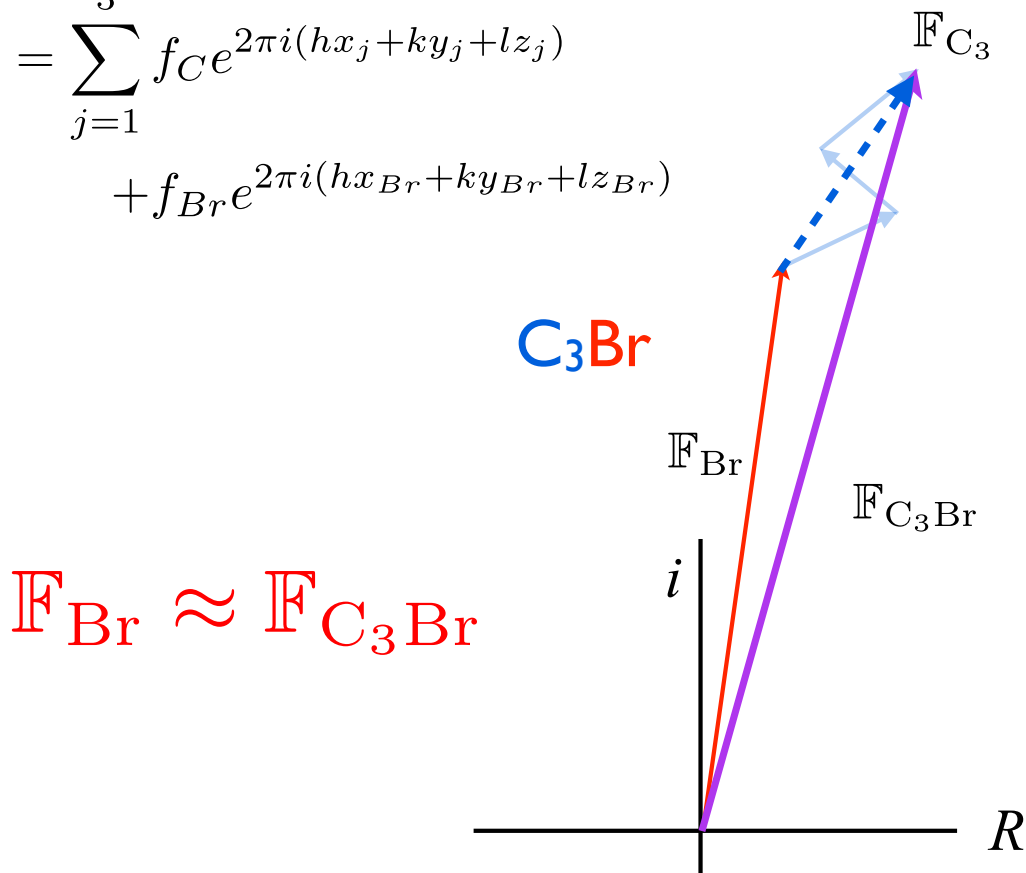


42

炭素の部分の構造因子は、このように F_{C_3} になります。
残りは臭素ですが、

example: C_3Br molecule

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^3 f_C e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)} + f_{Br} e^{2\pi i(hx_{Br} + ky_{Br} + lz_{Br})}$$



43

臭素の分 F_{Br} も臭素原子の位置が分っていれば計算できますから、例えば、こんなふうになるはずですが、
 従って、炭素も臭素も全部足し算した C_3Br の構造因子は、この紫のベクトルになることが分ります。さっきも
 話したように、原子のX線散乱能は原子が持っている電子の数に比例しています。

炭素の電子数はいくつ？

6

臭素は？

35ですから、 C_3Br の場合は、ベクトルとして考えると、 F_{Br} の寄与は、 F_{C_3} の寄与よりずっと大きく、
 F_{C_3Br} とほぼ等しいはずなので、 C_3Br 分子という「複雑」な構造が分らなくても、1個の原子、つまりBrの
 位置だけを何とかして決めることが出来れば、その構造因子 F_{Br} を計算してやる事が出来る。それは
 F_{C_3Br} に近いはずなので、 F_{C_3Br} の代りに初期値としてフーリエ合成すると構造解析を行なうことが出来る
 ということになります。

D HodgikinのビタミンB12も、このやり方で、炭素骨格以外のCoとSeの位置を用いて1954年に解析されてい
 ます。

but... our target is
a protein molecule

44

しかし...

KendrewやPerutz, そして我々の解析したいのは蛋白質
の分子です.

解析したいのが蛋白質の分子だと, 何が問題ですか?

for example

myoglobin

Hg

molecular weight: 17,184

1,200 non-hydrogen atoms

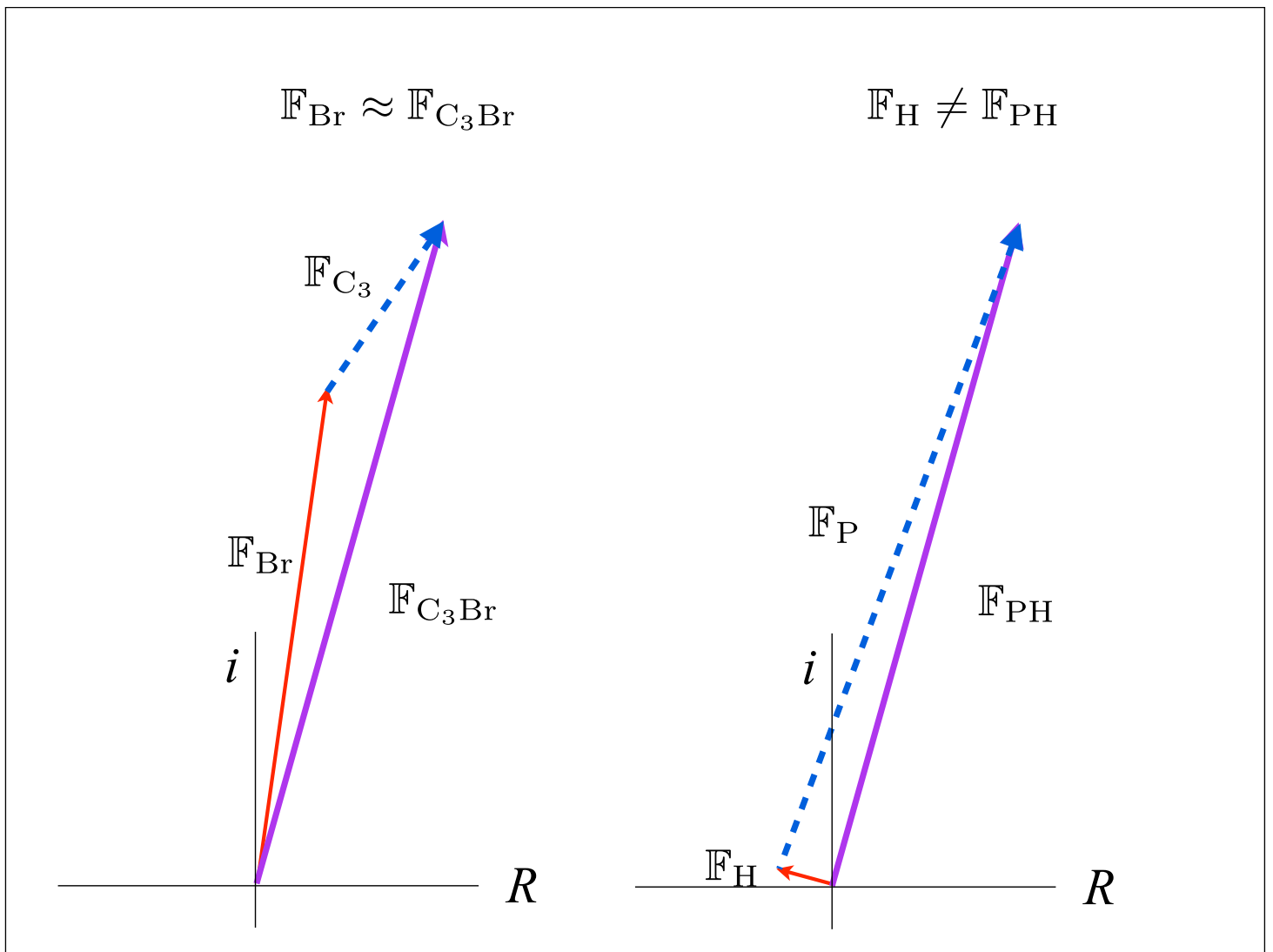
more than 9,000 electrons

only 80 electrons

45

さっきの臭化プロパンの説明では、炭素原子のプロパン部分と臭素の比較で、臭素の部分の寄与が圧倒的でしたが、蛋白質ではそうはいきません...

例えば、Kendrewのミオグロビンの場合、80電子もあるような重たい水銀原子を使ったとしても、ミオグロビン分子には9000以上の電子があるので、水銀の寄与は精々1/100くらいしかないということになります。



これが先程説明した臭化プロパンの図で、 F_{Br} を F_{C_3Br} の代りにすることが出来るということでしたが、蛋白質の場合には、重原子の寄与は1/100くらいしかないので...

こういうことになる訳です。 F_P がプロテインで蛋白質部分の構造因子、 F_H が heavy atomで水銀(重原子)部分の構造因子、そして F_{PH} が全体の構造因子です。

つまり、もしも水銀原子のような重原子の位置が特定出来ても、蛋白質の場合は $F_H = F_{PH}$ とならないので、 F_H で F_P を近似することは出来ないことになります。

key paper

myoglobin の
2Åの構造解析

STRUCTURE OF MYOGLOBIN
A THREE-DIMENSIONAL FOURIER SYNTHESIS AT 2 Å. RESOLUTION
By Drs. J. C. KENDREW, R. E. DICKERSON, B. E. STRANDBERG, R. G. HART
and D. R. DAVIES*
Medical Research Council Unit for Molecular Biology, Cavendish Laboratory, Cambridge
AND
D. C. PHILLIPS and V. C. SHORE
Davy Faraday Laboratory, The Royal Institution, London

Nature (1960) 185, 422-427

Virus の構造予測

Structure of Bushy Stunt Virus
D. L. D. CASPAR*
Medical Research Council Unit for the
Study of the Molecular Structure of
Biological Systems,
Cavendish Laboratory,
Cambridge.
Jan. 23.

Nature (1956) 177, 476-477

次週の key paper はこれです。

次回が最後のレポートですが，上の論文を読んで，分解能が6Åから2Åになって，何が変ったと主張しているか簡単に書け，にします。

ここで時間切れ...

MIR法の説明以降は次週