

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回の2

「5回目」の残りです.

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

前回、位相の話までをしました。C3Brの例で、小さい分子であれば、重原子のみの情報で近似して、構造解析することが出来るというところまでです。

今日は、その位相をどうやって決めるのかの話です。

for example

myoglobin

Hg

molecular weight: 17,184

1,200 non-hydrogen atoms

more than 9,000 electrons

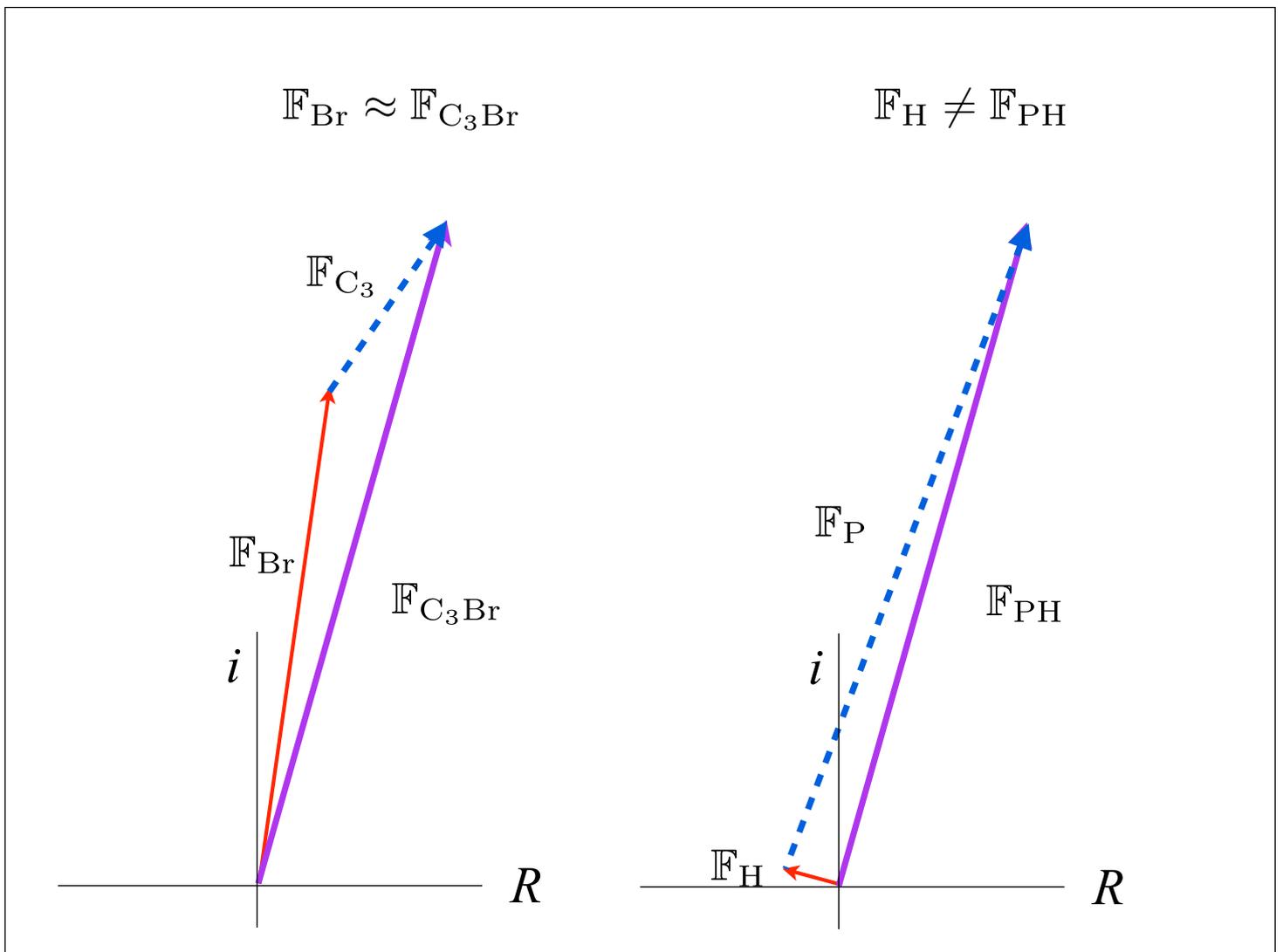
only 80 electrons

3

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

先週の臭化プロパンの例では, 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.



4

これが先週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。

how **m**ultiple **i**somorphous **r**eplacement works

Perutzがhemoglobinで先行させたが、
実際の解析はmyoglobinが先に...

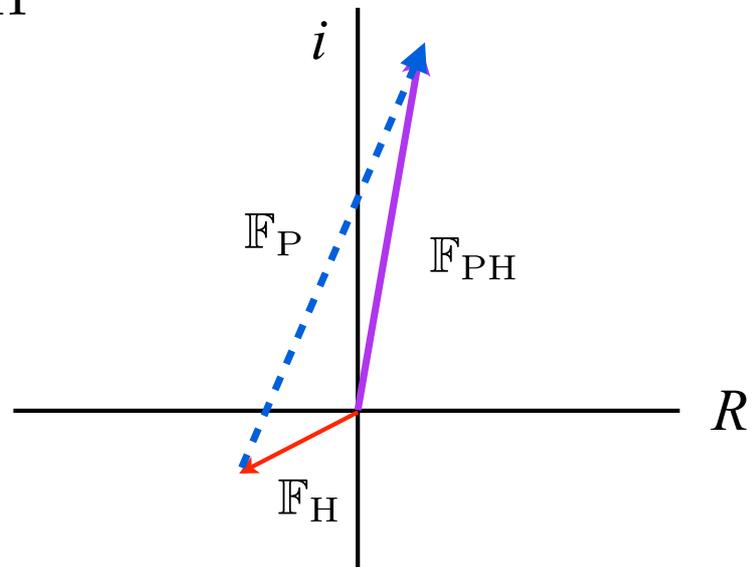
5

そこで、どうするかということで、Perutzが多重同型置換法(MIR法)という方法を開発して発展させます。
しかし、実際の解析はKendrewのmyoglobinが先になってしまいました。

なぜですか？

relationship of the 3 vectors

$$F_{PH} = F_P + F_H$$



6

さて、先程、蛋白質の場合は、 F_H 、つまり水銀などの重原子の寄与が比較的小さいという話をしましたが、大きさの関係はともかくとして、蛋白質部分の散乱能と重原子部分の散乱能の合計が、重原子がくっついた蛋白質の散乱能ですから、この3つのベクトルの間には、こういう足し算が成り立つはずで

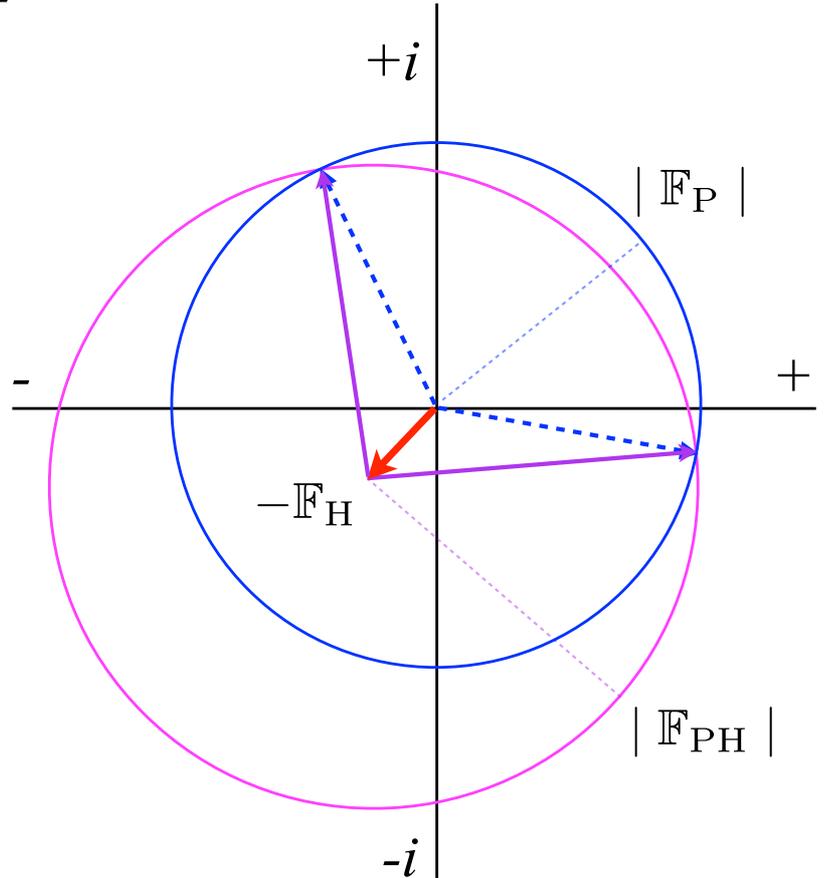
図で描くと、こうです。

この関係を利用したらどうかというのがMIR法です。

single heavy atom derivative

$$F_{PH} = F_P + F_H$$

$$-F_H + F_{PH} = F_P$$



7

最初に、重原子が1個の時を考えてみます。

もしも、その重原子(例えば水銀)の位置が分れば、 F_H を計算することが出来ます。

これはいいですか? 先週説明しました。

もともとの蛋白質の結晶で回折実験をしてやれば F_P の「大きさ」は測定することが出来ますし、水銀のような重原子をくっつけた結晶で回折実験をしてやれば F_{PH} の「大きさ」は測定することが出来ます。

この式は、こう書き変えることが出来ますから、 $-F_H$ の先っぽを中心にして F_{PH} の大きさの円を描いてやると、左辺のベクトル和($-F_H + F_{PH}$)の終端はどこか分からないけど、この円の上に来ることになります。

そして、 F_P の方も、やっぱりベクトルの終端はどこか分からないけど、この円の上に来ることになります。

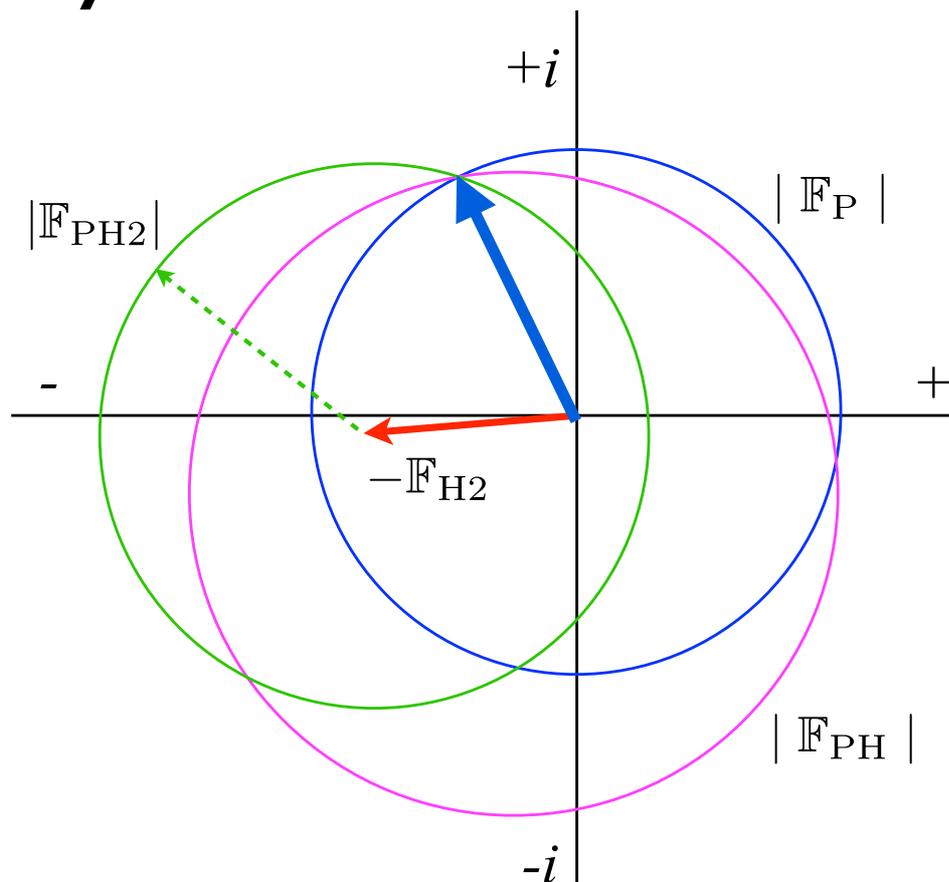
この式が成り立っているのは...どこですか?

ということで、ここが F_P や F_{PH} のベクトルの方向を示す点だということです。

問題がありますね。何ですか?

もう一つ、等価な解があります。そして、どちらが「正解」なのかは、これだけでは分かりません。

two heavy atom derivatives



8

では、そうすればいいかというと、「別の」重原子がくっついた、もう一つの結晶で同じことをやれば良いわけです。こんなふうになると、辻褃が合うのはこっちですから、結局、 F_P の位相は120度くらいだと分ることになります。

今では、この絵で示したような「解析」を高速な計算機でやってしまうことができます。

でも、Kendrewらは、6Åのmyoglobinの構造解析の際、最初の頃は、全部の反射について定規とコンパス、色鉛筆を使って、この図を「手」で描いて、 F_P の位相を決めて行ったのです。

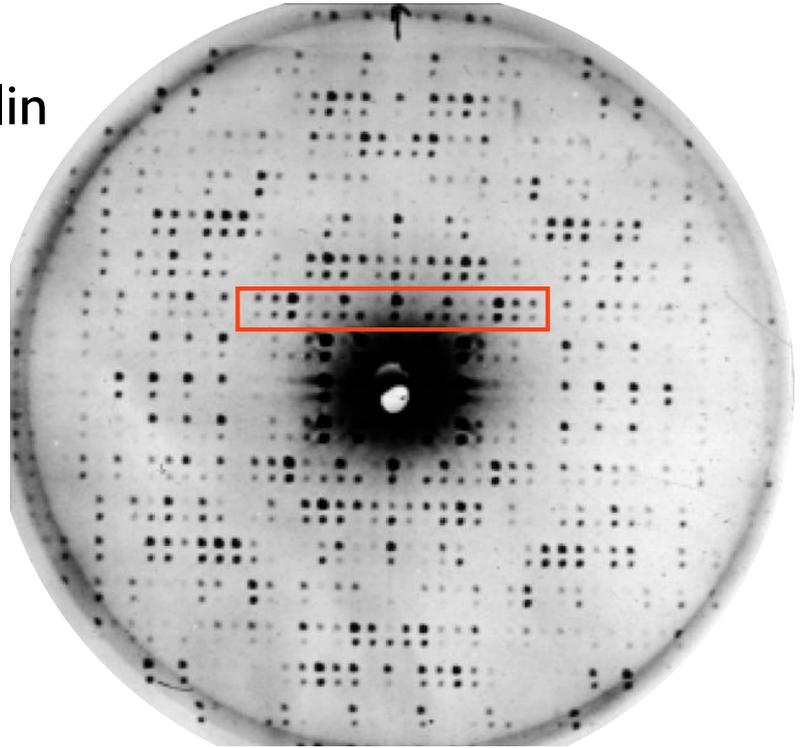
前回の課題は「解析の分解能をどうやって決めたのか」でしたが、そういうことです...

$|F_P|$ and $|F_{PH}|$

example:

bovine β -lactoglobulin

native
and
Hg derivative



Taylor, GL., *Acta Cryst.* D66, 325-338 (2010)

9

さて、ちょっと前に蛋白質では、 F_H が F_{PH} の近似にならないと話しました。だからMIR法だと。

じゃあ、実際問題として重原子がくっついた蛋白質と、元の蛋白質で差はどのくらいあるかということを見てみます。

これはウシの β ラクトグロブリンに、水銀をくっつけたときの回折強度を、元々の β ラクトグロブリンのと較べた写真です。

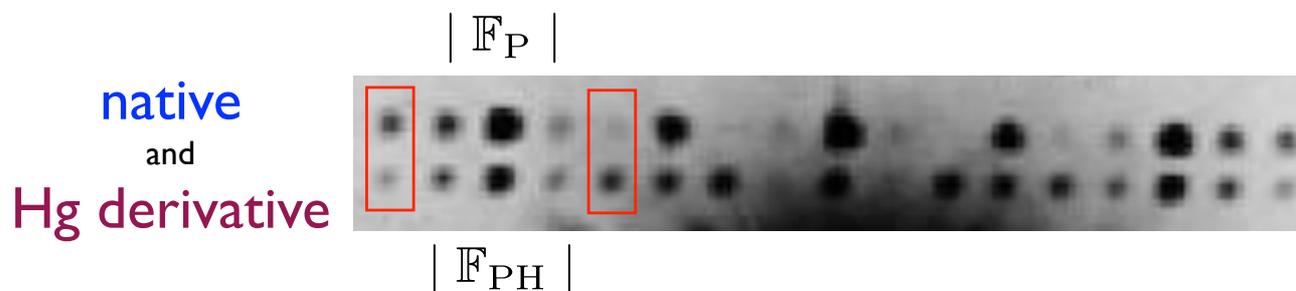
元々の β ラクトグロブリンと、水銀をくっつけた時の結晶の回折写真を、フィルムを縦にずらして露光してあります。

ぼんやり見ても良く分らないので、この赤四角部分を拡大してみます。

$|F_P|$ and $|F_{PH}|$

example:

bovine β -lactoglobulin



$$F_H = F_{PH} - F_P$$

Taylor, GL., *Acta Cryst.* D66, 325-338 (2010)

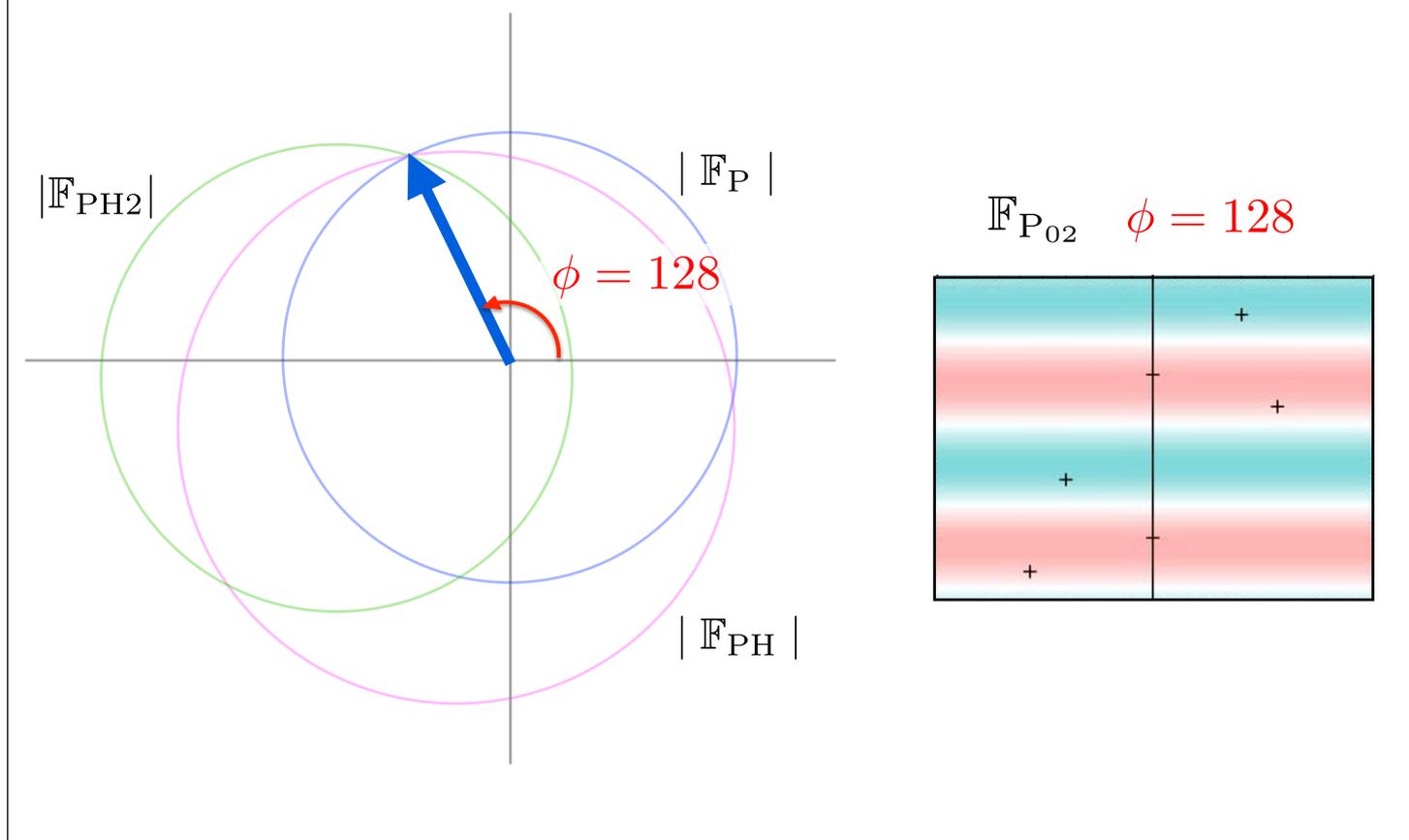
10

例えば、これとこれを見て下さい。

こっちでは、水銀をくっつけたら回折強度が減少していますが、こっちでは逆に増加しています。

この差が、水銀の寄与分、つまり F_H ですが、蛋白質の場合でも、それはちゃんと測定できる差だということです。

位相が決まるということ...



11

位相問題を解決するためにPerutzが発展させた多重同型置換法(MIR法)の説明はここまでです。

先週からの続きで説明が長くなって、そもそも何が問題だったか分らなくなっているかも知れません. . .

今、見てきたように蛋白質の場合でも多重同型置換法(MIR法)で、ある回折点の位相、つまりフーリエ成分の波の山の場所が分る。

例えば、(2次元ですが)こんな感じ。

そうしたら、後は同じことを、測定した全部の回折点についてやってやって、波を足し合わせていけば良い、ということです。

the Hemoglobin Saga

12

さて、「歴史」に戻りましょう。

まずは、ヘモグロビンの構造解析を目指したPerutzの
「長い」話から...

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

An X-ray study of horse methaemoglobin. I

By JOY BOYES-WATSON, EDNA DAVIDSON AND M. F. PERUTZ

Cavendish Laboratory and Molteno Institute, University of Cambridge

(Communicated by Sir Lawrence Bragg, F.R.S.—Received 3 February 1947)

II: 1948

III, IV, V, VI: 1954

VII: 1958

VIII: 1961

IX: 1962

最初のkey paperはこれです。

ここに「I」とあるように、これは、Perutzがヘモグロビンの構造解析を目指して、次々に報告する一連の論文の最初の一報目です。

IIが1948年、IIIからVIが1954年、VIIが1958年と続き、5.5Åの「構造」を報告したIXが1962年のことでした。

Horse methaemoglobin crystallizes in the monoclinic space group $C2$ with two molecules of weight 66,700 per unit cell. In addition, the wet crystals contain liquid of crystallization which fills 52.4% of the unit cell volume. Deliberate variations in the amount and composition of the liquid of crystallization, and the study of the effects of such variations on the X-ray diffraction pattern, form the basis of the entire analysis.

The composition of the liquid of crystallization can be varied by allowing heavy ions to diffuse into the crystals. This increases the scattering contribution of the liquid relative to that of the protein molecules and renders it possible to distinguish the one from the other. The method is analogous to that of isomorphous replacement commonly used in X-ray analysis. It yielded valuable information on the shape and character of the haemoglobin molecules and also led to the determination of the phase angles of certain reflexions.

hemoglobin crystal
contains 52% liquid

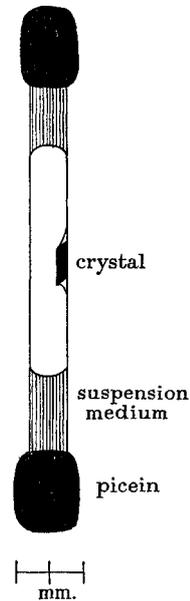
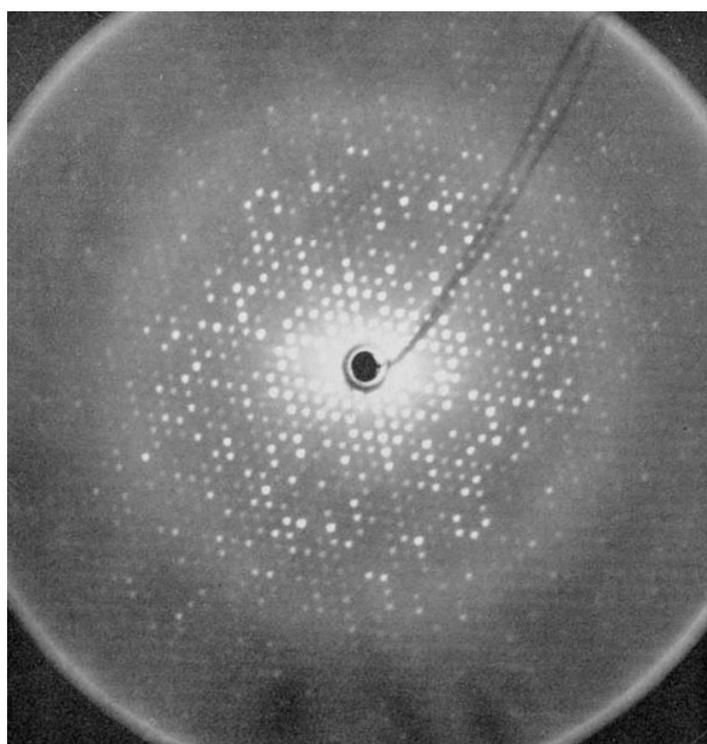
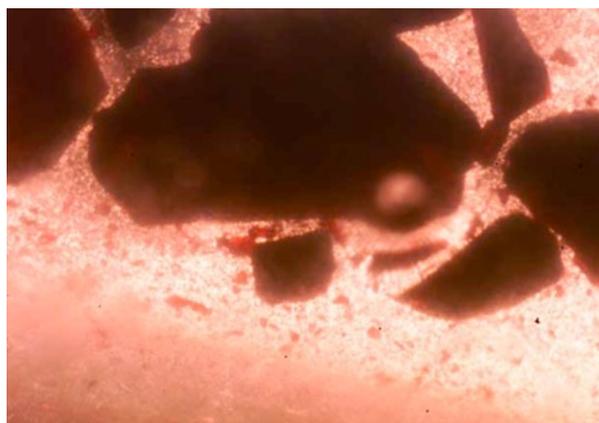


FIGURE 1. Wet protein crystal mounted for X-ray diffraction work.

この最初の論文では、蛋白質の結晶は体積の52%の水を含んでいること、そして、そのために、結晶中に重原子を拡散させることが出来ると言っています。また、こうすることで、同時に、結晶をちゃんと保持しておいてX線を照射するということが可能にしました。

Haemoglobin crystals and diffraction photo



(@1960's)

<http://www.wellcomecollection.org/>

15

これは、イギリスのウェルカムトラストのホームページにある、Perutzが撮影したhemoglobinの結晶とX線回折写真です。1960年代の写真のようです。

このような結晶を、さっきのようにキャピラリーの中に封じ込め、乾燥しない状態でX線を照射すると良いという技術が確立され、このような回折写真が撮影できるようになったのです。

crystal packing of hemoglobin

hemoglobin crystal
contains 52% liquid

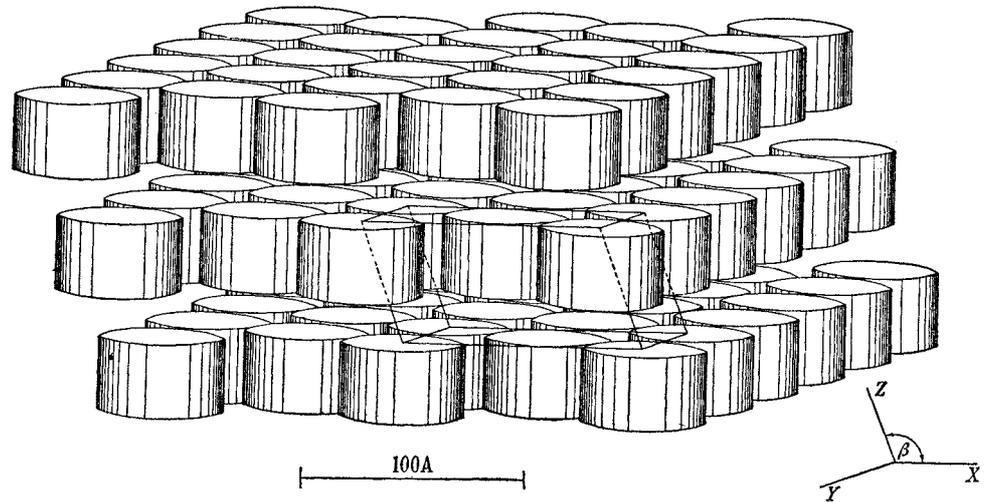


FIGURE 13. Packing of haemoglobin molecules in the crystal structure, showing layers of close-packed molecules separated by liquid. One unit cell is shown in the foreground on the right.

16

この最初の論文「I」では、**結晶が体積で52%の水を含んでいる**ことに対応する、結晶中でのヘモグロビン分子のパッキングのモデルを提唱しています。

既に、結晶を穏和に乾燥させたり戻したりしたら結晶の格子の大きさは変化するけれどもヘモグロビン分子はそのままだということが分っており、そのことを説明するには、こんなふうなヘモグロビン分子がシート状に規則正しく並んでいて、乾燥させたり戻したりしたら、隣のシートとの間にある水が出て行ったり、また戻ったりするのだろうと推論しています。

でも実際の「構造解析」は、はるか先のことでした...

key paper にしなかったが...

Proc. Roy. Soc. London (1949) A195, 474-499

An X-ray study of horse methaemoglobin. II

BY M. F. PERUTZ

Cavendish Laboratory and Moltano Institute, University of Cambridge

*(Communicated by Sir Lawrence Bragg, F.R.S.—Received 8 June 1948—
Read 16 December 1948)*

Key paperとして指定はしませんでしたでしたが、2年後の1949年にPerutzの2報目が出ています。

(a) Preparation of relative intensity data

The diffraction pattern of wet haemoglobin crystals extends to a spacing of 2.5 \AA , but indexing was not carried beyond 2.8 \AA spacing, since only isolated weak reflexions occurred beyond this range. Even so the limiting sphere contained 62,700 reciprocal lattice points which symmetry reduces to 7840 reflexions relevant for analysis. The photographing, indexing, measuring, correcting and correlating of some 7000 reflexions was a task whose length and tediousness it will be better not to describe. In the indexing and measuring the writer was helped by Miss Joy Boyes-Watson and Dr Edna Davidson, who each did one-third of the work.

Arguing purely from considerations of packing there should be twenty such chains in the haemoglobin molecule. Porter & Sanger (1948), on the other hand, have shown the horse haemoglobin molecule to contain only six terminal α -amino groups. Hence the twenty chains cannot be independent, but must be combined into six bigger chains folded backwards and forwards through the molecule in long zigzags. Alternatively, there might be six open chains together with a number of closed rings.

ここに書かれているように、この論文が書かれた1949年には、既に 2.8 \AA 分解能の良質な結晶を得ています。ここは、この論文の「実験」のセクションですが、7000もの回折点の強度を測定したことについては飽き飽きするような仕事だから記述しない方が良く、としています。面白いですね。

この論文ではPatterson合成法(この講義では省略します)で、結晶内の「規則的」な構造(原子間ベクトルですが)を探そうとしています。でも、そうした努力は実際にはまるで見込の無いことでした。ここではPorterとSangerがヘモグロビン分子は「6つ」のアミノ末端を持っていると示していると書いてありますね。

そうですか？

ヘモグロビンの場合、only four (4つ)が正解ですね。

“hat box” model...

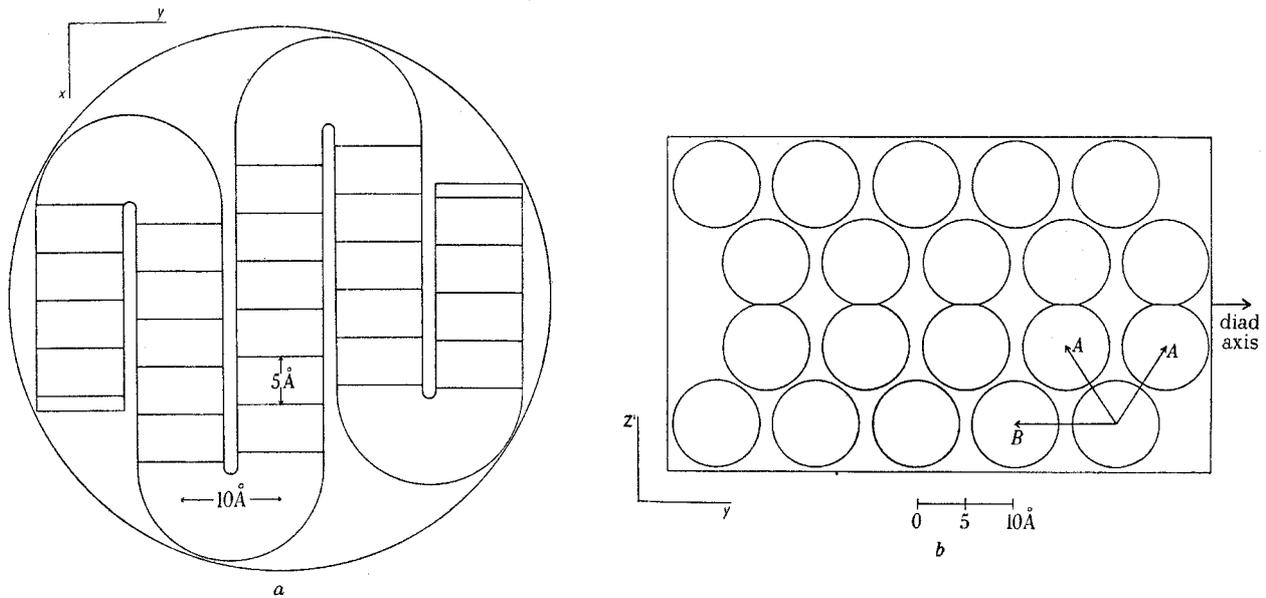


FIGURE 23. Idealized picture of type of haemoglobin structure compatible with the Patterson synthesis. (a) shows a basal section through the cylindrical molecule with one poly-peptide chain folded in a plane and a pattern repeating at intervals of 5\AA along the chain direction. As nothing is known about the geometry of this pattern its existence is indicated merely by a series of lines normal to the chain length. (b) represents a vertical section through the cylinder normal to X with the chains seen end-on.

19

ヘモグロビン分子には幾何学的な「規則性」があるはずだ、ということを当時のPerutzは信じていました。(サイクロールほどではないですが...)

パターン図の解釈から、Perutzが提唱した“hat box”モデルと呼ばれたモデルを上から見た図(a)と横から見た図(b)です。

この「 5\AA 」の周期構造はヘリックスではないかとも考えられたようですが、そういうことではありません。このモデルは1950年にクリックによって粉碎されます...Patterson合成で蛋白質の複雑な3次元構造を解析しようという試みは失敗に終わります。

この後、3次元の格子を一軸方向に投影した「2次元の投影」での解析の試みが続きます。しかし、複雑な蛋白質の構造を一軸方向に投影した解析では、結局何も明らかにすることは出来ませんでした。

===== 以下補足 =====

Perutzのヘモグロビン結晶は C_2 だったので、(h0l)投影は中心対称を持つため位相問題が実軸上の正負のみになり位相決定は「容易」になります(実際はそれでも大変です。この時点では重原子ではなく結晶の脱水による格子定数の変化を利用しています)。

Dr. Frankendrew's Monster

Myoglobin structure solved by the MIR method using
Ag, Hg & Au derivatives

20

さて、こうしてPerutzが開発した多重同形置換法(MIR法)ですが、Kendrewが、銀、水銀、そして金をくっつけたミオグロビンの結晶構造解析として、ヘモグロビンよりも先に解析を実現します。

3次元結晶の構造解析に多重同形置換法(MIR法)が使用された最初の例です。

Nature (1958) 181, 662-666

662

NATURE

March 8, 1958 VOL. 181

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

1958年にNatureに報告しています。

examples. Secondary structure has been assigned in broad outline to a number of fibrous proteins such as silk, keratin and collagen ; but we are ignorant of the nature of the secondary structure of any globular protein. True, there is suggestive evidence, though as yet no proof, that α -helices occur in globular proteins, to an extent which is difficult to gauge quantitatively in any particular case. The tertiary

The present article describes the application, at low resolution, of the isomorphous replacement method in three dimensions to type A crystals of sperm whale myoglobin⁵. The result is a three-dimensional Fourier, or electron-density, map of the unit cell, which for the first time reveals the general nature of the tertiary structure of a protein molecule.

これも最初のページの記述ですが、繊維写真の解析から α ヘリックスの構造が解明されていた訳ですが、このミオグロビンのX線結晶構造解析がされて、実際の蛋白質の立体構造が明かにされるまでは、球状蛋白質にも本当に α ヘリックスという二次構造があるのか、ということは証明はされていなかった訳です。

この論文は、先週のレポートで書いてもらったように、6Åと低分解能ですが、結晶構造解析で、蛋白質の立体構造が解析された最初の例だ、ということです。

Isomorphous Replacement in Myoglobin

globin could not be employed. Eventually, we were able to attach several heavy atoms to the myoglobin molecule at different specific sites by crystallizing it with a variety of heavy ions chosen because they might be expected, on general chemical grounds, to possess affinity for protein side-chains. X-ray, rather than chemical, methods were used to determine whether combination had taken place, and, if so, whether the ligand was situated predominantly at a single site on the surface of the molecule. Among others, the following ligands were found to combine in a way suitable for the present purpose : (i) potassium mercuri-iodide and auri-iodide; (ii) silver nitrate, potassium auri-chloride; (iii) p-chloro-mercuri-benzene sulphonate; (iv) mercury diammine ($\text{Hg}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, prepared by dissolving mercuric oxide in hot strong ammonium sulphate), *p*-chloro-aniline; (v) *p*-iodo-phenylhydroxylamine. Each group of ligands combined specifically at a particular site, five distinct sites being found in all. The substituted

Hg Au Ag

さて、解析には、さっき説明したMIR法が使用されていますが、5箇所の独立な結合部位に、水銀、金、銀という重原子化合物を結合させ、それを利用しました。

この「別のサイト」という意味はいいですか？

例えば水銀と金が違ってても、同じ場所にくっ付いていたのではダメなんです。

Methods of X-ray Analysis

the accuracy of phase determination. In the present stage of the analysis the most urgent objective was an electron-density map detailed enough to show the general layout of the molecule—in other words, its tertiary structure. If the α -helix, or something like it, forms the basis of the structure, we need only work to a resolution sufficient to show up a helical chain as a rod of high electron density. For this purpose we require only reflexions with spacings greater than about 6 Å.; in all there are some 400 of these, of which about 100 are $h0l$'s already investigated in the two-dimensional study. The Fourier synthesis described here is computed from these 400 reflexions only, and is in consequence blurred; besides this, it is distorted by an unknown amount of experimental error, believed to be small but at the moment difficult to estimate. Thus while the general features of the synthesis are undoubtedly correct, there may be some spurious detail which will require correction at a later stage.

さて、実際の解析ですが、先週のレポートの「答え」はここですね。

これは、球状蛋白質の世界で「初めて」の構造解析です。今、我々が日常的に経験するような、「ある新規の蛋白質の初めての構造解析」とは事情が随分違います。その時、解析の分解能はどのくらいにして、実施するのが良いだろうか、ということです。まずは球状蛋白質の「一般的な配置」が分るのに十分な電子密度分布図が得られれば良い。

そして、それは、球状蛋白質内部のヘリックスが、電子密度の高い領域として「棒状」に見えればいだろう。それに必要なのは、6Åだ。

それなら、高々400個の回折点のフーリエ合成で済む。よしやってやろう！
という訳です。

The Three-dimensional Fourier Synthesis

The synthesis was computed in 70 min. on the EDSAC Mark I electronic computer at Cambridge (as a check, parts of the computation were repeated on DEUCE at the National Physical Laboratory). It is in the form of sixteen sections perpendicular to y and spaced nearly 2 Å. apart; these must be piled on top of one another to represent the electron density throughout the cell, containing two myoglobin molecules together with associated mother liquor (which amounts to nearly half the whole). Unfortunately, the synthesis cannot be so represented within the two-dimensional pages of a journal; furthermore, if the sections are displayed side by side, they give no useful idea of the structure they represent. The examples reproduced in Fig. 1 illustrate some of the more striking features.

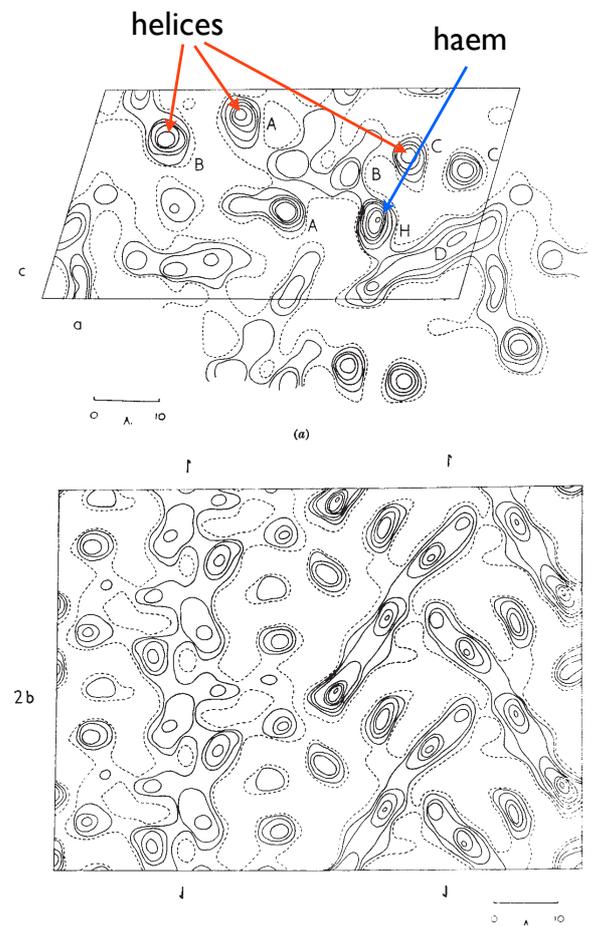


Fig. 1. (a) Section of three-dimensional Fourier synthesis of type A myoglobin at $y = -1/8 b$. A-D, polypeptide chains; H, hæm group. (b) Section parallel to $[20\bar{1}]$ at $x = 0$, showing polypeptide chain A (on the right)

25

この時、フーリエ合成の計算は、ケンブリッジにあったEDSAC Mark Iという電子計算機が使用できています。それで、400個の回折点のフーリエ合成の計算に70分かかっていた。

そういう意味では、歴史ってそういうものなのかも知れませんが、蛋白質結晶学が次第に進歩していくのに合せて、それに使用可能な計算機も進歩して来ていた訳です。最初にバナルが「やってやろう」と思った時に、そんなことは予測していたのかな。

実際にフーリエ合成の計算をして、3次元の電子密度分布を求める訳ですが、当時、3次元の情報を表示して見たりするような方法(コンピュータ・グラフィクス)は、もちろん在りません。

どうするかというと、こんなふうに、どこかの面で輪切りにした2次元の図を描きます。この輪切りの電子密度分布図でも、このように電子密度が高い領域は、そこにヘリックスがあると分ります。そして、それを順に積み重ねて「3次元」にする訳です。

余談になるかも知れませんが、この2次元の輪切りの電子密度の等高線図は、どうやって描いたと思います？

Fourier drawing, @1957



<http://www.wellcomecollection.org/>

26

フーリエ合成の計算は、さっき話したように計算機を使用することが出来る時代になっていましたから、計算機で2次元の格子状に電子密度を計算して、紙に出力して、その上に透明な板を載せて、上から手で等高線を描く訳です。

これも、ウェルカムトラストのホームページにありました。1957年の写真だということです。

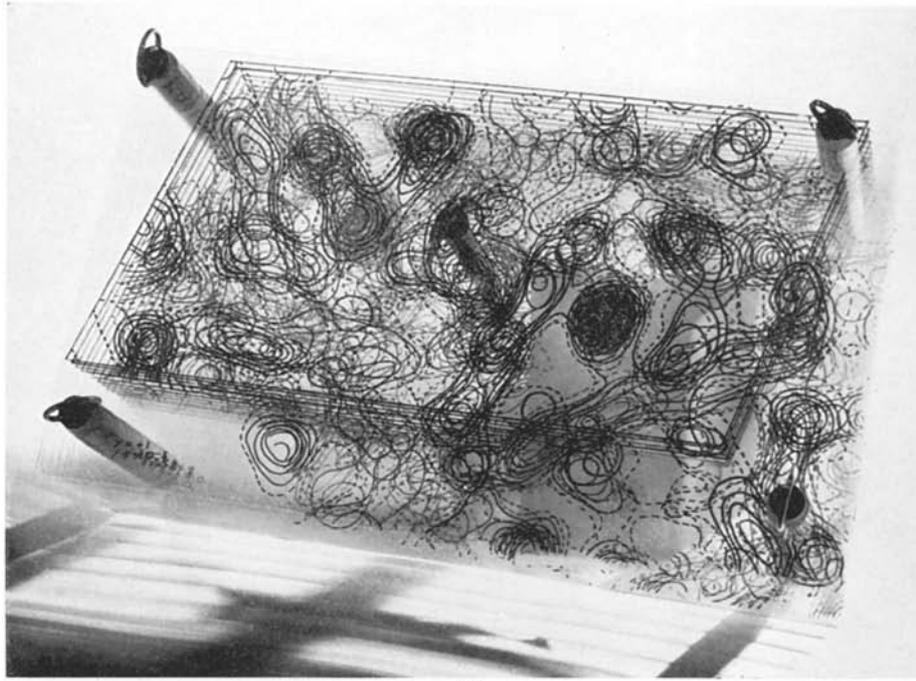


FIGURE 19. Photographs of the three-dimensional Fourier synthesis of myoglobin, constructed from the sections illustrated in figure 18.

(Facing p. 93)

それを、こんなふうに、この場合は2Å間隔で、重ね合せてやると、全体としては3次元の「立体」的な電子密度分布図になる訳です。ミニマップと呼んでいました。どうですか？

このkey paperにあった、2次元の輪切りの電子密度分布図を、OHP用紙にコピーして、作った「ミニマップ」を回しますので、ちょっと見てみて下さい。

一番、グリグリした電子密度がある所がヘム場所です。3次元的に見えるでしょう...

実は、こうした方法は、私が学生の頃までやられていました。私が最初に結晶構造解析した蛋白質の、こんな感じのミニマップは、筑波大学(高エネ研)の時の仕事ですが、北大博物館にあります。

The Myoglobin Molecule

We are now in a position to study the tertiary structure of a single myoglobin molecule separated from its neighbours. Fig. 2 illustrates various views of a three-dimensional model constructed to show the regions of high electron density in the isolated molecule. Several points must be noticed. First,

Perhaps the most remarkable features of the molecule are its complexity and its lack of symmetry. The arrangement seems to be almost totally lacking in the kind of regularities which one instinctively anticipates, and it is more complicated than has been predicated by any theory of protein structure. Though the detailed principles of construction do not yet emerge, we may hope that they will do so at a later stage of the analysis. We are at present engaged in extending the resolution to 3 Å., which should show us something of the secondary structure; we

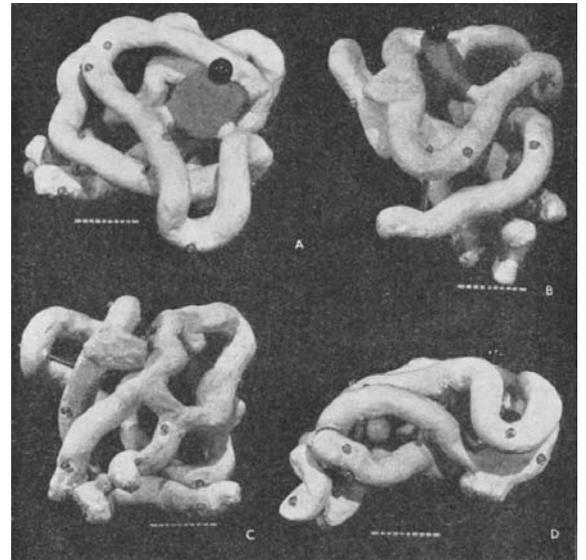


Fig. 2. Photographs of a model of the myoglobin molecule. Polypeptide chains are white; the grey disk is the h em group. The three spheres show positions at which heavy atoms were attached to the molecule (black: Hg of *p*-chloro-mercuri-benzene-sulphonate; dark grey: Hg of mercury diammine; light grey: Au of auri-chloride). The marks on the scale are 1 Å. apart

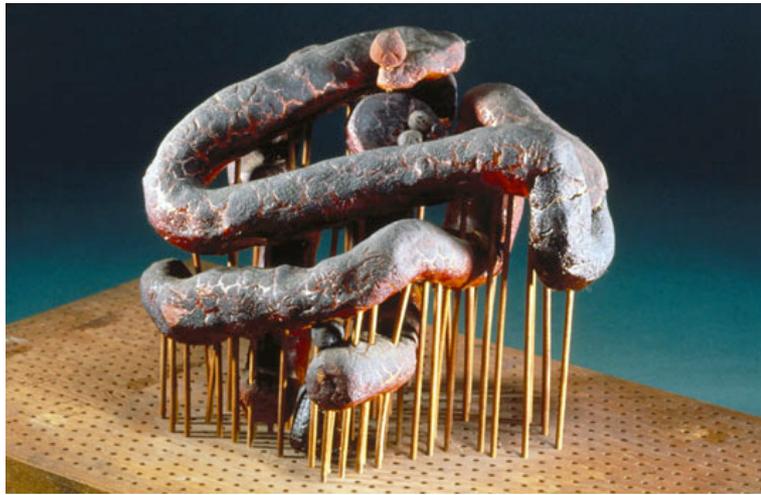
さて、論文に戻ります。

何回目かにアストベリーが1つの分子の構造解析の必要性を言い、ポーリングは無理だ、と考えていた話をしましたが、覚えていますかね。分解能は6Åですが、構造解析に成功し、「我々は、ついに、ミオグロビン分子の三次元構造を研究することが出来る位置に立った」。いいですねえ。こんな論文を書いてみたい...

で、構造解析をしてみたら、期待に反して、蛋白質の構造には対称性や規則性のようなものは全然なくて、とても複雑だった...ということが分ります。

このFig 2のモデルは...

ミオグロビンの「ソーセージモデル」



<http://www.sciencemuseum.org.uk/>

これですね. 「ソーセージモデル」と言われました.

フランケンドリュウ・モンスター



30

この当時の反響を知るのに、こんなのはどうでしょうか。

このマンガは1958年にアメリカのUCバークレーのある研究室で誰かが描いたものだそうです。

このミオグロビンの構造解析で、タンパク質分子には単純な「美しい」対称性がないことが分かりました。このことは当時としては結構なショックだったようです。

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

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)

さて、Natureは「結果」の構造しか書いてありませんが、構造解析法の詳細は、この論文に書かれています。MIR法の実際ということで、ちょっとだけ見ておきます。

We adopted the working hypothesis that a considerable proportion of the polypeptide chain has a configuration similar to the α -helix of Pauling, Corey & Branson (1951). There is no proof that this is the case, but there is some direct evidence of it in haemoglobin (Perutz 1951), as well as indirect evidence in myoglobin from studies of optical rotation (P. M. Doty, unpublished) and of rates of deuterium exchange (E. E. Benson & K. Linderstrøm-Lang, unpublished). At low resolution the α -helix would appear as a solid rod with axial electron density about $1.0 \text{ electrons}/\text{\AA}^3$, embedded in a matrix of side chains of mean electron density about $0.3 \text{ electron}/\text{\AA}^3$ (the mean overall electron density of the myoglobin molecule is about $0.4 \text{ electron}/\text{\AA}^3$, and in type A crystals the electron density of the liquid regions has about the same value). Neighbouring α -helices would pack together with axial separations of 9 to 10 \AA . We reached the conclusion that helices, if indeed they exist in myoglobin, would be clearly resolved if the Fourier synthesis included all terms having $d > 6 \text{ \AA}$; they should appear in such a synthesis as solid rods, since the region of reciprocal space being scanned includes only the first maximum of the Fourier transform of an α -helix. In fact there are about 400 reflexions having $d > 6 \text{ \AA}$, of which about 100 are $h0l$ reflexions with real phases which had already been determined in the two-dimensional work.

さっきのNatureの論文にも議論されていましたが、どの分解能までの計算をするかについては、ポーリングの α ヘリックスが、ミオグロビンにもあることを「仮定」し、それが見えるためには、どのくらいの分解能なら良いか検討した、ということですね。その証拠はないけど、ヘリックスが含まれているだろうという状況証拠はあった訳です。

で、 6 \AA 分解能なら、ヘリックスがあればちゃんと見えるはずだ。

6 \AA なら反射数は400個で、そのうちの100個は既に「2次元投影」の時に計算している。

「2次元投影」の話は、今回の講義では飛したのですが、3次元の解析は計算量が大変なので、2次元に投影した計算で、なんとか構造解析が出来ないと、やっていた時代があったのです。でも、「投影」なので、蛋白質分子が複雑すぎて無理でした。

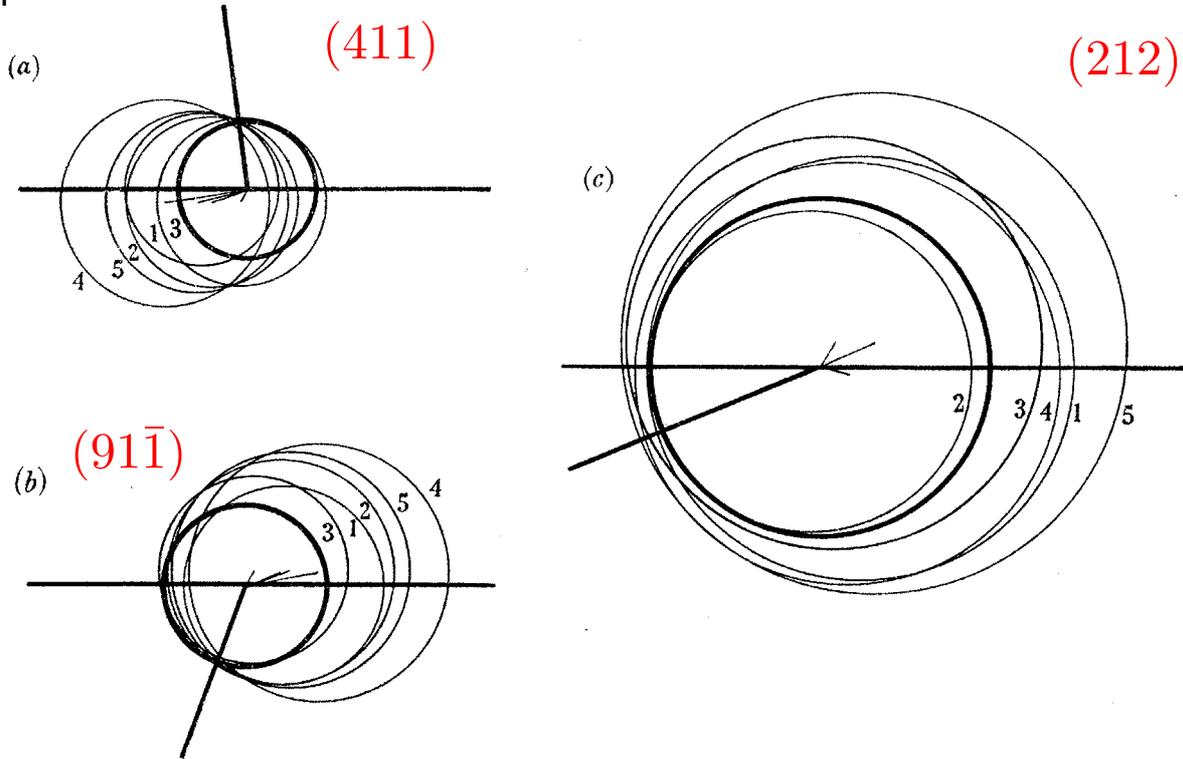


FIGURE 17. Examples of phase determination. The heavy circle represents the amplitude of the reflexion from unsubstituted protein, and the light circles those from the derivatives. 1, PCMBS; 2, HgAm₂; 3, Au; 4, PCMBS/HgAm₂; 5, PCMBS/Au. The short lines from the centres are the heavy-atom vectors; the heavy line indicates the phase angle eventually selected. (a) (411), (b) (911), (c) (212).

この論文で見せたかったのは、これです。MIR法での位相決定の例です。MIR法の原理は、今日の前半で説明しました。

ミオグロビンの場合、5つの重原子結合型のデータを使いましたから、何も結合していない蛋白質と合せて、全部で6つの円が描かれます。誤差とか無ければ、それらが、全部交わったところが、正解の位相を示す訳ですが、実際にはこんな感じということです。

(91-1)なんかは、比較的良く交わっているようですが、(212)はこんなですね。いずれにせよ、こんなふうには、5つの重原子結合型結晶を作製し、それを用いて「位相」を決め、フーリエ合成して、電子密度分布図を計算し、解析した、ということですね。

Proc. Roy. Soc. London (1962) A265, 161-187

The structure of haemoglobin

IX. A three-dimensional Fourier synthesis at
5.5 Å resolution: description of the structure

BY ANN F. CULLIS, HILARY MUIRHEAD, M. F. PERUTZ, F.R.S.
AND M. G. ROSSMANN

*Medical Research Council Unit for Molecular Biology, Cavendish Laboratory,
University of Cambridge*

AND A. C. T. NORTH

*Medical Research Council External Staff, Davy Faraday Laboratory,
Royal Institution, London W. 1*

さて、これは key paper にしませんでしたでしたが、Perutzの方のヘモグロビンの構造解析です。Iから始まっていた一連の論文最終盤にあたる論文がこれです。

後で見るミオグロビンの2Åの Nature の論文が1960年ですが、そのミオグロビンの論文と同じ号にヘモグロビンの5.5Åの構造解析の結果だけは既に報告されています。この論文は1962年。重原子同形置換法(MIR法)で位相決定を行なった5.5Åの低分解能の3次元のヘモグロビンの構造解析の手法の詳細の論文です。

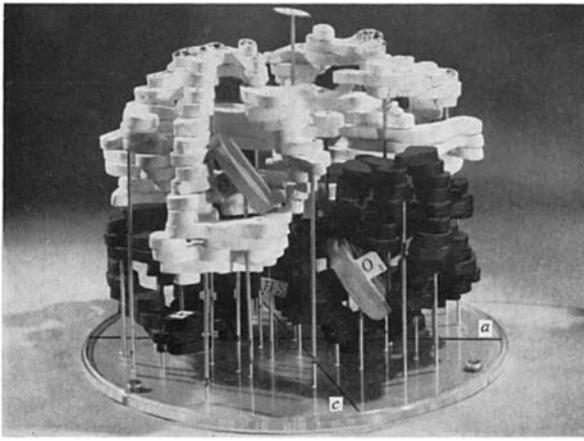


FIGURE 10. Complete haemoglobin model viewed normal to a . The haem groups are indicated by grey disks.

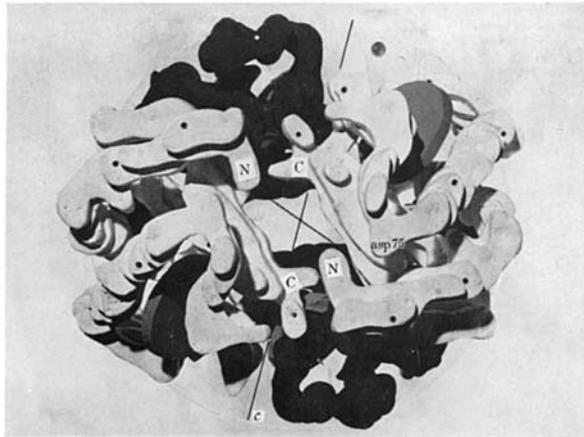


FIGURE 13. A view down the b axis. Note the proximity of the N- and C-terminal ends which could serve to form links between the two white chains.

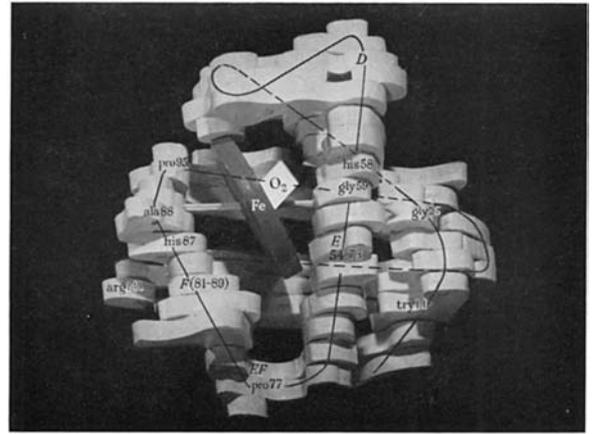


FIGURE 19

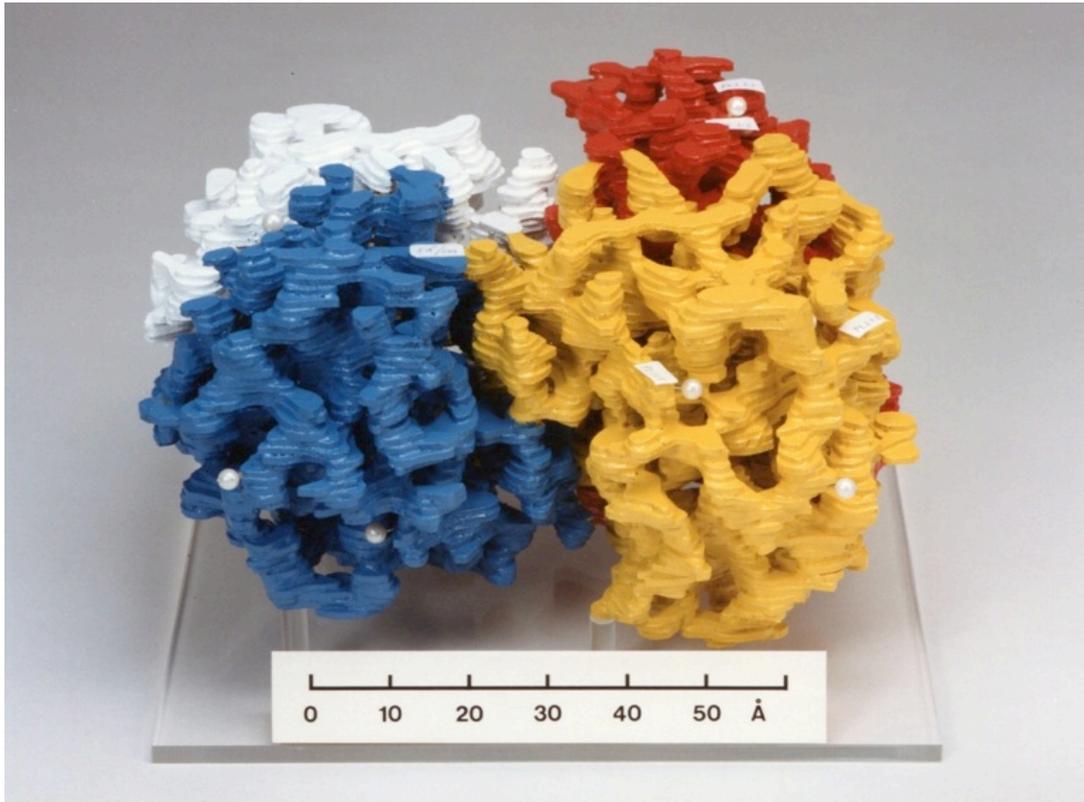
FIGURES 17 to 19. Three views of the white chain showing the probable positions of various residues in human haemoglobin.

ヘモグロビンはこのような構造だということが解析されています。

4量体の構造も分り、ヘムが結合している様子も解析されています。

ところで、このモデルは、薄い木の板を電子密度分布に沿って切り出して、重ね合せて立体構造にしたものです。「ウッドモデル」と呼んでいました。

1988年...



ω -amino acid : pyruvate aminotransferase

36

このやり方は、私の学生時代には、まだ使ってました。
これは1988年に、私の学位論文で解析した蛋白質の構造モデルを作ったものです。



37

さて、MIR法を発展させたPerutz、構造解析そのものの成功ではKendrewが先になりましたが、2人は1962年に「球状蛋白質の構造研究」で同時にノーベル化学賞を受賞しています。