

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6回

1

さて、位相問題の説明で区切りが悪かったけど、最後です。本当は全部で7回でやるのがいいのかな...

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

世界で「最初」の結晶構造解析を実現するということで、1958年にミオグロビンの6Å分解能の構造解析が成されましたが、それは先程見たように「ソーセージ」状な訳で、当然、もっと詳細な構造が知りたいということになります。

特に、先週の課題で読んでもらったように、結晶性が良くないために解析出来ないということではなく、原理的には実施可能で、問題は手間や計算量のことですから、急速に進みます。

High-resolution protein structure analysis

postscript: next 50 years of protein crystallography

3

高分解能の構造解析の歴史が始まりました。その後の50年の始まりです。

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

4

上の論文は、ミオグロビンの2Åの構造解析ですから当然key paperで良いとして、「その後の50年」となるといくらでも話題があります。

ちょっと悩むのですが、key paper はこれにしました。まずは、これまでの続きのミオグロビンからです。

Nature (1960) 185, 422-427

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

ミオグロビンの2Å分解能の構造解析ですが、この論文は1960年です。さっき見て来た6Åの解析の論文が1958年でした。

ということは、この間わずか2年のことです。

PerutzがBarnalのところでヘモグロビンを始めてから21年、Kendrewがミオグロビンを始めてからでも10年です。それと比較したらえらい勢いです。

In the accompanying article⁴ Perutz *et al.* now describe a three-dimensional analysis of the related protein hæmoglobin, at a slightly greater resolution, and show that each of the four sub-units of which this molecule is composed bears a close structural resemblance to myoglobin. It is apparent, therefore, that sperm-whale myoglobin possesses a structure the significance of which extends beyond a particular species and even beyond a particular protein.

We now present the results of a second stage in the analysis of sperm-whale myoglobin; in this the resolution has been increased to 2 Å., that is to say, not far short of atomic resolution. The resulting Fourier synthesis is very complicated, and a detailed study of it will take many months; in the meantime, our preliminary findings may be of interest.

この論文の最初のページですが、実は前の421ページまでがPerutzのヘモグロビンの5.5Åの論文です。で、そのヘモグロビンの構造とミオグロビンの構造を比較して、その間の共通性を指摘しています。

そして、ミオグロビンについては、2Å、つまり高分解能の構造解析という「第二ステージ」に進む訳です。

そうしたら、何が分ったかということ「とても複雑なこと」、そして、そんな構造を詳細に検討するには何ヶ月もかかるだろうということです。

simultaneously. Whereas myoglobin crystals give 400 reflexions having spacings greater than 6 Å., the number of reflexions with spacings greater than 2 Å. is 9,600, each of which has to be measured not only for the unsubstituted protein but also for each of the derivatives. The very much greater number of data posed many problems, both in recording intensities and in computation, and in this stage we relied much more heavily than before on the use of a high-speed computer; it was fortunate that about the time the work began the *Edsac* Mark I computer used viously was superseded by the very much faster more powerful Mark II.

myoglobin 2Å data set



Dickerson, RE, *Protein Science* (1992) 1, 182-186

さて、6Åまでの回折点は400個でした。それが2Åになると9,600になります。

忘れてはいけないのは、MIR法で位相を決めないといけないので、データ数は9,600じゃなくて、その重原子誘導体分もあります。当時としては、それは大変な「データ量」であった訳です。

今時、GBやTBのデータを「見て」いますから、それで「たくさん」だなんてピンと来ないかも知れません。

この写真は、紙テープに打ち出したミオグロビンの回折強度データの一式を計算機センターから「持って」帰っているところです。

(そういえば、私が子供の頃は、駄菓子屋で、こういうデータテープの切れっ端をおもちゃとして売っていました。ウルトラマンごっことか用だったかな...)

The data for each derivative were recorded on twenty-two precession photographs; a separate crystal had to be used for each photograph to keep radiation damage within acceptable limits. The

function of $\sin \theta$. The co-ordinates of the heavy atoms were further refined using correlation functions⁶ computed by means of programmes devised by Dr. M. G. Rossmann, and finally refined again during the process of phase determination itself. The phases were determined by essentially the same method as before, but owing to the very large number of reflexions the determination was carried out on the computer rather than graphically. The 'best' phases and amplitudes⁷ were computed and used in the final Fourier synthesis, to which a moderate degree of sharpening was applied. In all,

あと、これも、今の皆さんにはピンと来ないかも知れません。

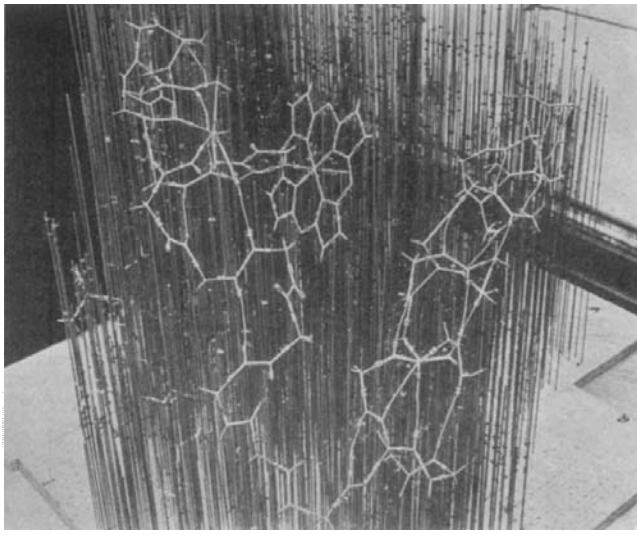
(測定をやったことがある人も、そうでない人もですが...)

この解析のための回折データ収集には、「22枚のプリセッション写真を撮影した」そして「それぞれに1個ずつ結晶を使った」と書いてあります。一個一個ガラスキャピラリーに結晶を封入して、それぞれちゃんと結晶の方向を決めて、回折写真を撮影している訳です。なかなかの忍耐力ですよ。今なら、うまく行けば、たった一個の結晶で、しかも結晶の方向なんか全く意識しないで構造解析してしまうことが可能な場合もあります。

たくさんのデータ量ですから、手でちまちまやっている訳に行かない訳で、計算プログラムも、どんどん発展していく訳です。

(ここに"graphically"って書いてあるのは、「図を描いて」やるんじゃないくて、という意味ですよ...)

("best phase"などの詳細は今回は説明しない...)



p.423

The Fourier Synthesis

The electron density distribution was plotted in the form of 96 sections perpendicular to x^* and spaced $2/3 \text{ \AA}$. apart, the density in each section being represented by a series of contours. For some purposes this method of representation is unsatisfactory, and we have also constructed models of parts of the structure on a scale of $5 \text{ cm.} = 1 \text{ \AA}$., by erecting vertical steel rods parallel to y in an array corresponding to the grid of points in the xz -plane at which densities were calculated, the value of the electron density at points along the rods being indicated by coloured clips. On this scale the whole molecule is about 6 ft. cube, and about 2,500 rods each 6 ft. high are required (see Fig. 4).

9

そうして、 $9600 \times$ 重原子分のデータを処理し、フーリエ計算して電子密度分布を計算しますが、その「結果」を、どうやって使うのかが問題です。つまり、どうやって蛋白質の構造にするかです。これも、やはり今ではピンと来ないかも知れません。

今なら三次元グラフィクス上でモデルを組むのですが、当時はどうしたかという、こうやって棒を立てて電子密度が高いところに印を付け、そこに原子があるということを考えながら、こんなふうにして、 1 \AA が 5 cm となるような大きさで、手で立体モデルを組み立てていった訳です。

Kendrew's wire forest model



$1\text{\AA} = 5\text{ cm}$

John Kendrew with model of
myoglobin in progress

10

実際のモデルの大きさは、これが分り易いでしょう。
Kendrewの大きさが物差しです。

handed. Finally, it will be clear from Fig. 1 that it is possible to determine by inspection the direction in which the C—O group points, and hence to see which is the terminal carboxyl end of each segment.

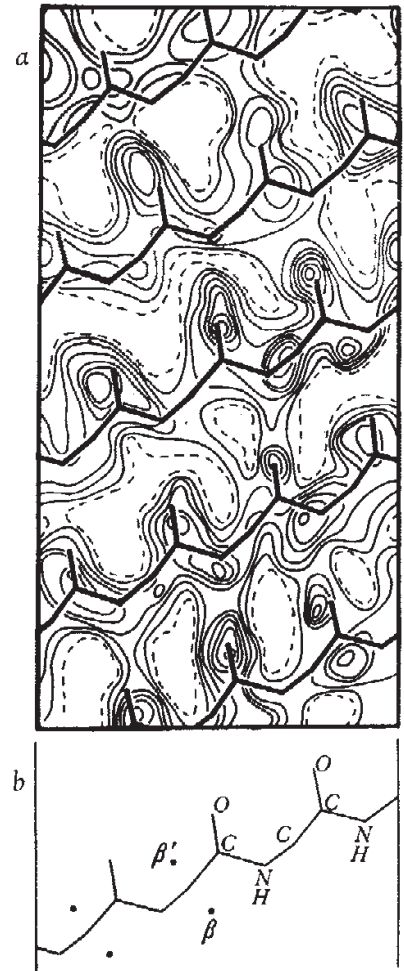
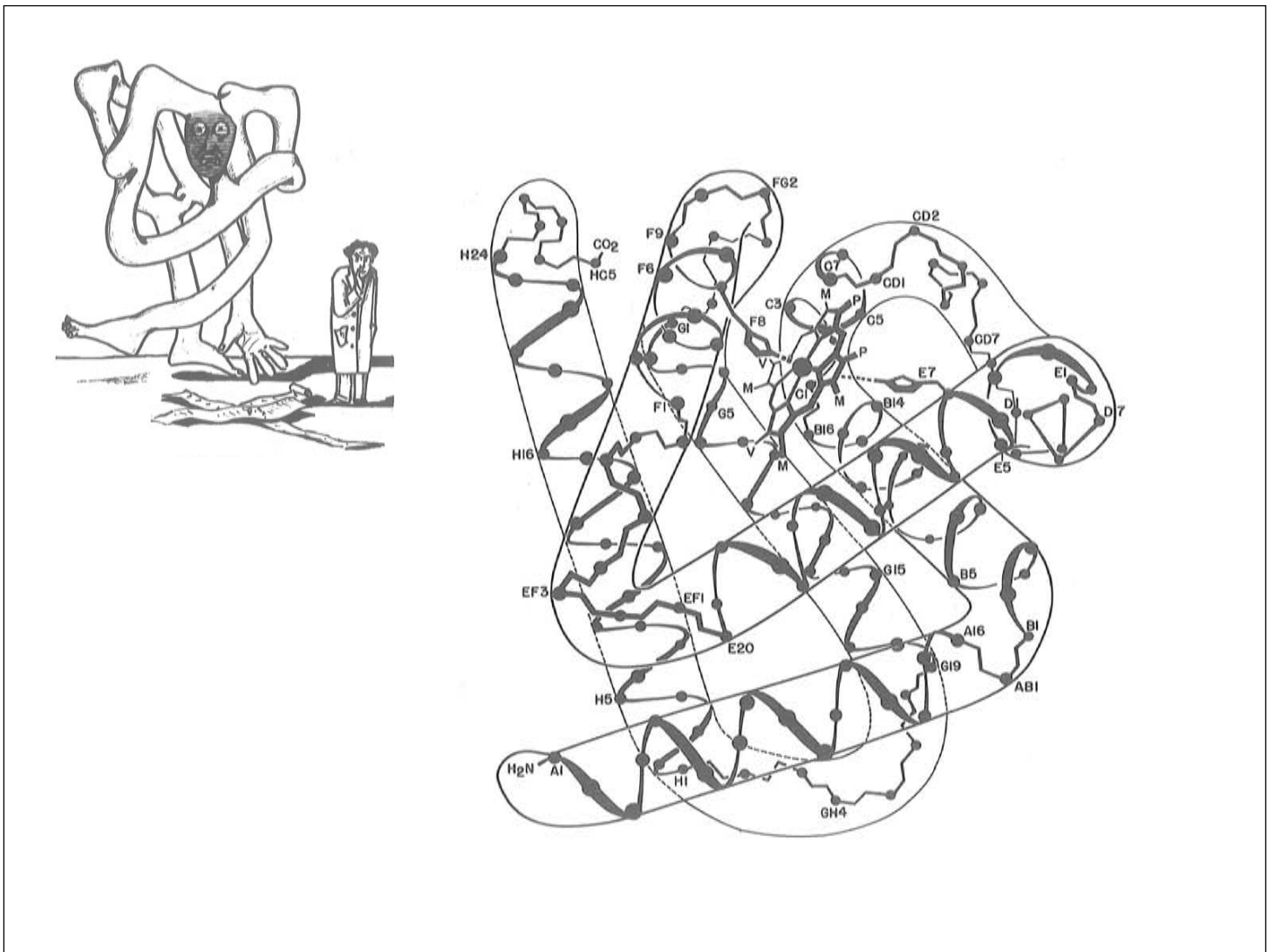


Fig. 1. (a) Cylindrical projection of a helical segment of polypeptide chain, with the α -helix structure superposed: for explanation see text. (b) Key to the atomic arrangement in the α -helix. The points marked β and β' are the two alternative projected positions of C _{β} ; β is the position in a right-handed and β' that in a left-handed helix of L-amino-acids

さて、さっき見たように、詳細な検討はまだ時間がかかるので先のこととして、こうして6Åから2Åの高分解能の構造解析になって、いったい何が可能になったかを見ています。

この図はヘリックス部分の電子密度分布を円筒状に投影したものです。主鎖の流れと、そこから枝状に電子密度が伸びている、つまり主鎖カルボニルの酸素が見て取れます。これでヘリックスの方向が分る。ポーリングの α ヘリックスの時にOHPシートでヘリックスを巻いてみましたが、あれを持っていたら見てみて下さい。6Å分解能のソーセージモデルでは、そんなことは決して出来なかった訳です。



こんなふうにして、 6\AA では「ソーセージモデル」だったものが、 2\AA の解析では、ちゃんと原子位置が特定された「分子モデル」が構築できた。こうして、1960年、いよいよ「高分解能」の構造解析が可能な時代が始まりました。

Earliest Primary Reports of Macromolecular Structures

1958: Myoglobin	6 Å	Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC. <i>Nature</i> 181 , 662-6.
1960: Hemoglobin	5.5 Å	Perutz MF, FRS, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. <i>Nature</i> 185 , 416-22.
1965: Lysozyme	6 Å	Johnson LN, Phillips DC. <i>Nature</i> 206 , 761-3.
1967: Ribonuclease	3.5 Å	Wyckoff HW, Hardman KD, Allewell NM, Inagami T, Johnson LN, Richards FM. <i>J. Biol Chem.</i> 242 , 3984-8.
1968: Papain	2.8 Å	Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R, Swen HM, and Wolthers BG. <i>Nature</i> 218 , 929-32.
1971: Insulin	2.8 Å	Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, Hodgkin DC, Mercola DA, Vijayan M. <i>Nature</i> 231 , 506-11.

1971: Protein Data Bank established at Brookhaven National Laboratory

13

こうして高分解能の構造解析が「可能になった」訳です。その後、構造解析に成功した初期の蛋白質には、こんなのがあります。後でいくつか、これらの論文の図をざっと見てみますが、いわゆる構造解析の「結果」としては、現在とそれほど変わらない状況が急速に発展しているように思えます。ただし、勘違いするといけませんが、実際の構造解析の手間は、今とは較べものになりません。結晶が出てから構造になるまでに、数年を費すような時代がしばらく続きます。

こうした中、1971年には、解かれた構造をデータベースにして活用するPDBが設置されています。

1968: Papain

Drenth J, *et al. Nature* **218**: 929-32.

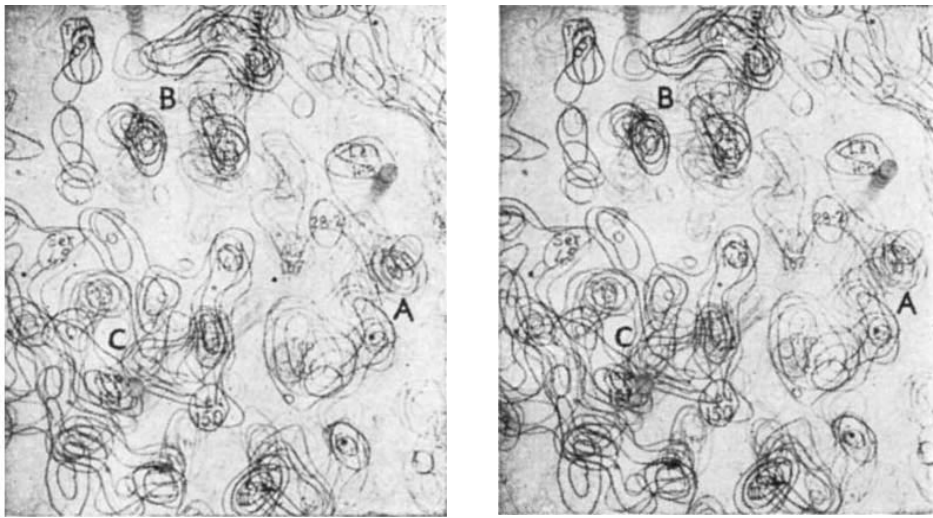


Fig. 1. Pair of stereoscopic photographs of the electron density map.

14

これはDrenthが主著者の1968年のパピインの論文にあるミニマップの写真です。

2.8Åの解析です。

論文の図は平行法になっていますが、このスライドは交差法の配置にしてあります。

ちゃんと立体的に見えますか？

1968: Papain

Drenth J, *et al. Nature* **218**: 929-32.

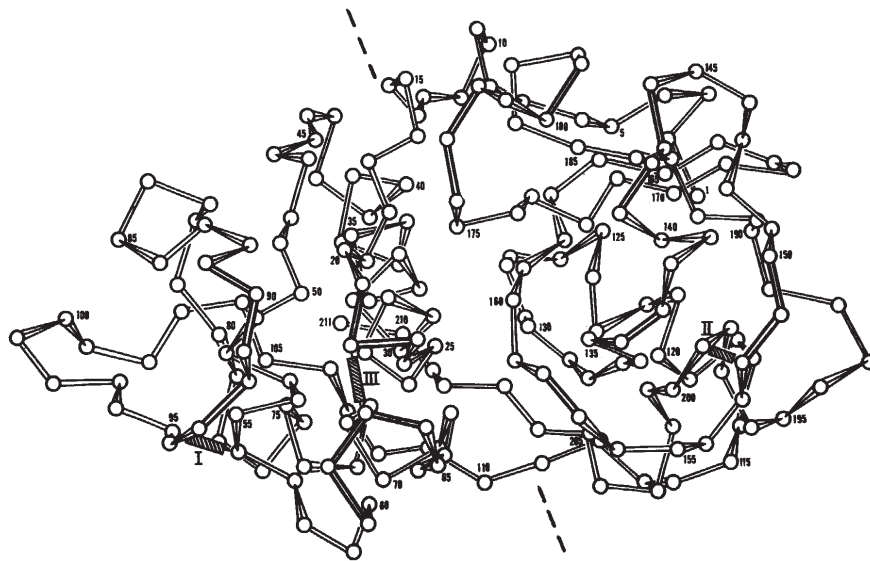


Fig. 4. Perspective drawing of the main chain conformation.

15

これが、その論文にあるパピンの主鎖の構造の図です。

現在の構造解析の論文の絵と、そんなに違いは無いでしょう。

1971: Insulin

Blundell TL, *et al.* Nature 231(5304):506-11.

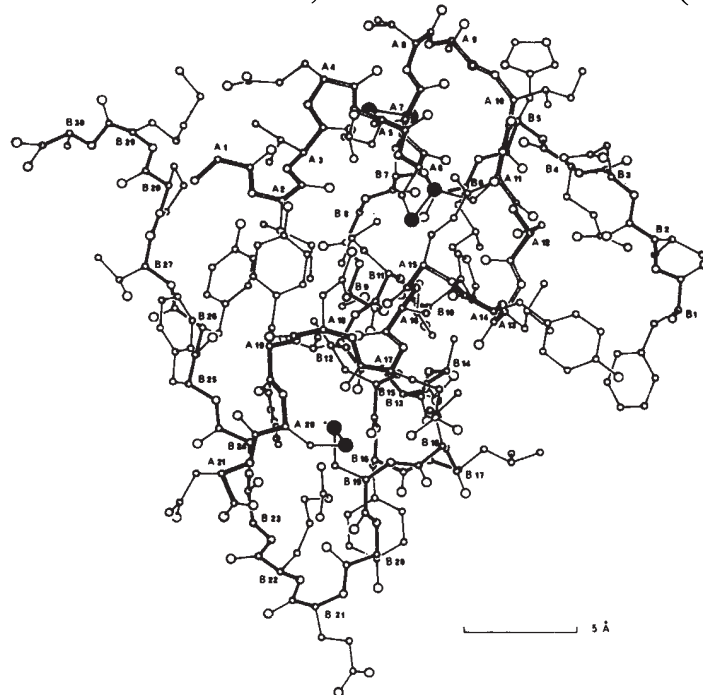


Fig. 3. The atomic position in the insulin molecules.

16

これはBlundellのインスリンの構造解析です。

2.8Åの構造解析ですから、各アミノ酸の構成原子の位置が決まって、こういう絵が描けることが分ります。

皆さんが、日常見ている論文の絵と同じレベルの解析が出来るようになってきていることが分ってもらえれば良いでしょうか。

ただ、繰り返しになりますが、まだこうした一つの構造解析に何年もかかった、そういう時代がしばらく続きます。

その後の蛋白質結晶学

17

さて、最後に、その後の展開を見てお仕舞いにしましょう。

＊ より大きいもの

- ウイルス粒子

＊ より複雑なもの

- リボソーム

＊ より重要なもの

- 膜蛋白質, 疾病関連蛋白質

＊ より精密な解析

- プロトン伝達, 電子伝達

その後の蛋白質結晶学の展開の方向は、大きくみて、こんな感じの方向だったのではないのでしょうか。

ウィルスの構造解析

19

一つだけ例を見ておきます。この講義のスタイルで見るので、「歴史」としての見方ですが...

Nature (1956) 177, 476-477

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.

これを最後のkey paperにしました。

1956年に、やはり Cavendish に居た Casper が、X線回折写真からトマト矮化病ウィルスの構造を推測した論文です。

All the evidence indicates that the virus has the point-group symmetry 532, which implies that it is built up of sixty structurally identical asymmetric units. The molecular weight of bushy stunt virus is about 9 million⁴, of which about 17 per cent is ribonucleic acid⁵; therefore, the molecular weight of the protein part of the asymmetric unit is about 125,000.

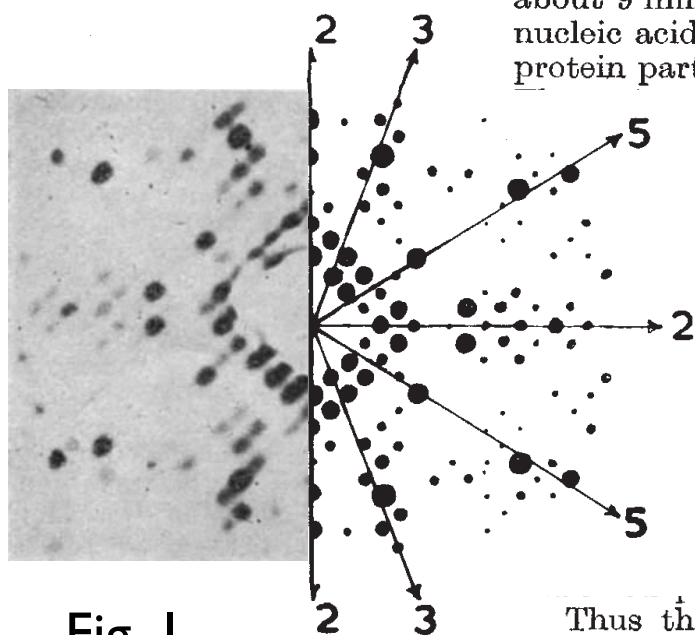


Fig. 1

Thus the X-ray evidence shows that bushy stunt virus possesses sub-units. The number of sub-units is certainly a multiple of twelve and very probably a multiple of sixty. The chemical data suggest that the actual number may be as high as three hundred.

I gratefully acknowledge the advice and assistance of Drs. J. D. Watson and F. H. C. Crick.

もちろん構造解析が出来ていた訳ではありません。

こんなふうに、回折写真の「パターン」を解釈して、ウィルス粒子が点群532の対称性を持っていることを推測しています。

そしてウィルス粒子のコートタンパクの数は12の倍数、あるいは60の倍数だろう、たぶん300以上だろうと推測しています。

1956年というのは、どういう時代ですか？

まだ、やっとミオグロビンの構造がなんとかかなりそうな時代に、もうウィルスの構造解析を目指して研究がされていたんだ、ということを見ておいて下さい。どうですか？(それが私の今回の講義の主題ですが...)

Tomato bushy stunt virus at 5.5-Å resolution

F. K. Winkler, C. E. Schutt & S. C. Harrison*

Gibbs Laboratory, Harvard University, 12 Oxford St., Cambridge, Massachusetts 02138

G. Bricogne

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

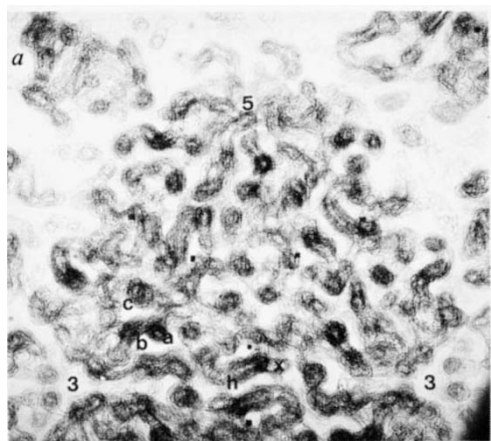
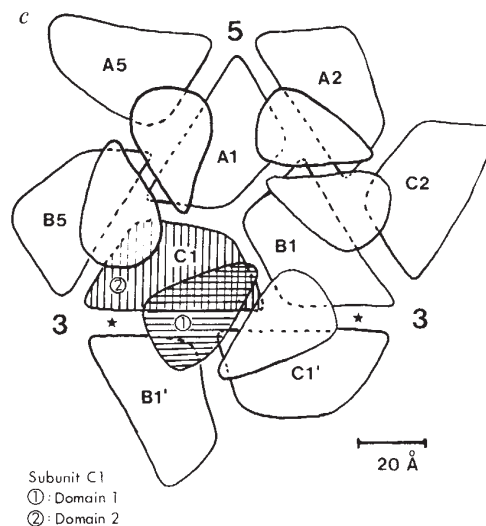


Fig. 2



その後、1977年には、5.5Å分解能のこんな電子密度図が得られ、コート蛋白質の配置が推測されています。さっきの論文で532対称が推測されていましたが、ここに5回軸が、ここに3回軸がありますね。

Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution

S. C. Harrison, A. J. Olson, C. E. Schutt* & F. K. Winkler†

Gibbs Laboratory, Harvard University, 12 Oxford Street, Cambridge, Massachusetts 02138

G. Bricogne

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK

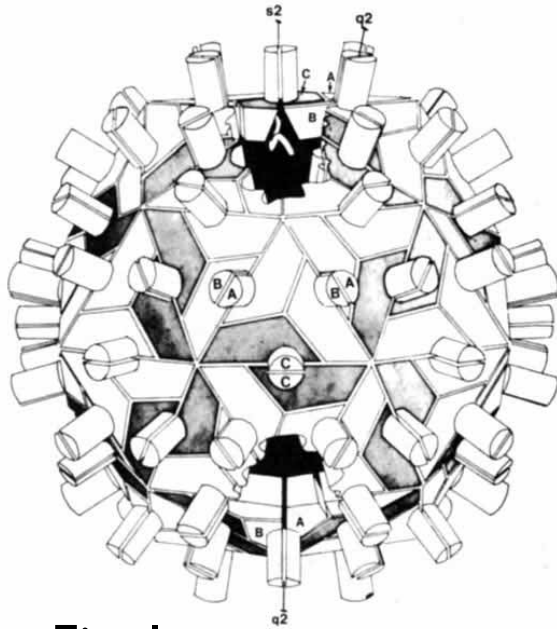


Fig. 1

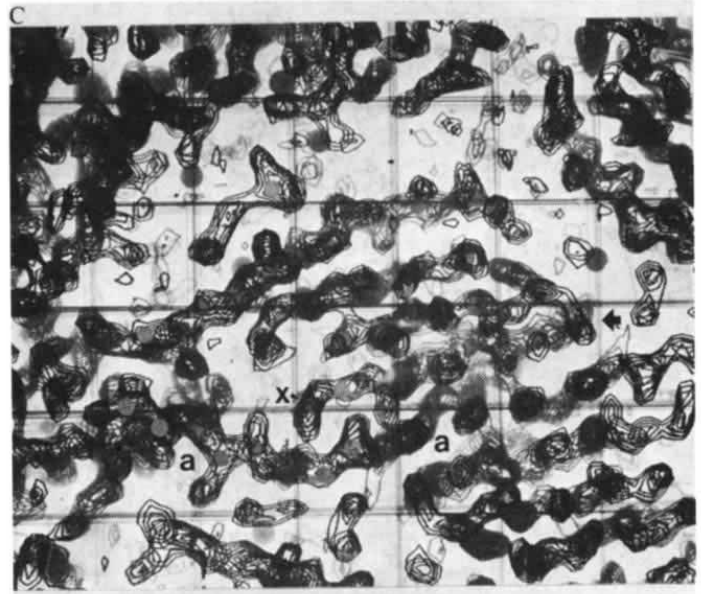


Fig. 2

そして、1978年には、2.9Åの電子密度分布図が得られ、

Tomato bushy stunt virus at 2.9 Å resolution

S. C. Harrison, A. J. Olson, C. E. Schutt* & F. K. Winkler†

Gibbs Laboratory, Harvard University, 12 Oxford Street, Cambridge, Massachusetts 02138

G. Bricogne

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK



Fig. 3

コート蛋白質のサブユニットの構造も分って来ました。ステレオ図ですが、このスライドも論文のを「交差法」のステレオに修正してあります。

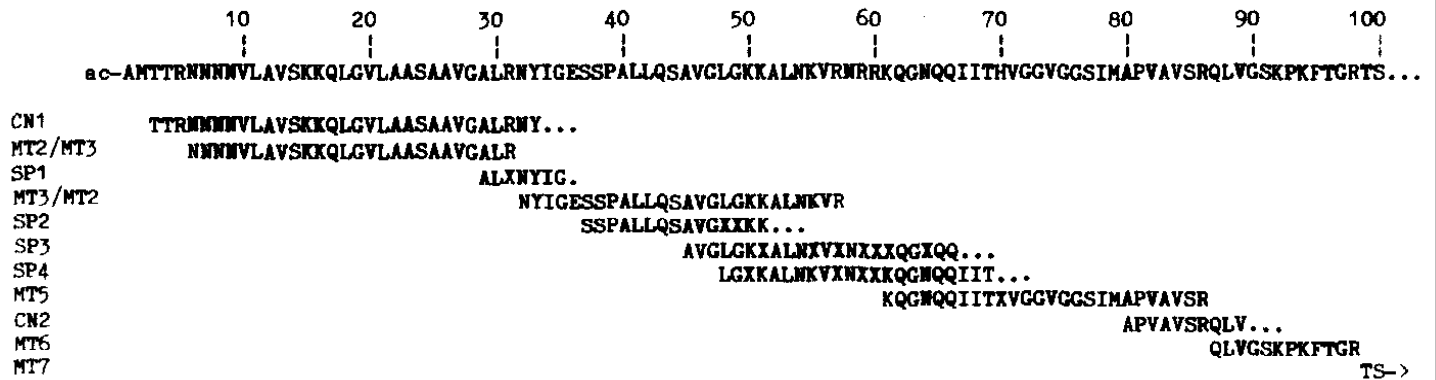
Structure of Tomato Bushy Stunt Virus

V.† Coat Protein Sequence Determination and its Structural Implications

P. HOPPER¹‡, S. C. HARRISON² AND R. T. SAUER¹

AMINO ACID SEQUENCE OF TBSV

705



25

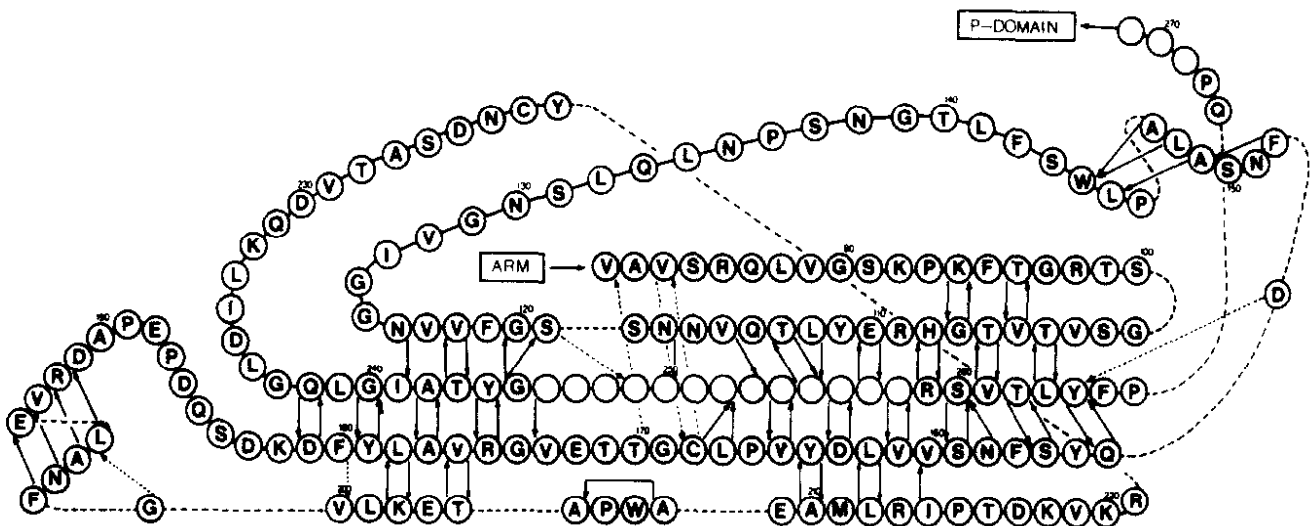
ちょっと補足しておかないといけないと思うのは、実はこのコート蛋白質のアミノ酸配列情報は、1984年のこの時までありません。

現在のように、いろいろな生物の遺伝子が解読されていて、アミノ酸配列は既知である、というのとは随分と状況が違います。

Structure of Tomato Bushy Stunt Virus

V.† Coat Protein Sequence Determination and its Structural Implications

Hopper, P., Harrison, S. C., Sauer, R. T., *J Mol Biol* 177 (1984) 701-713



こうして、こんなふうに、アミノ酸配列も含めて「構造」が解析され、

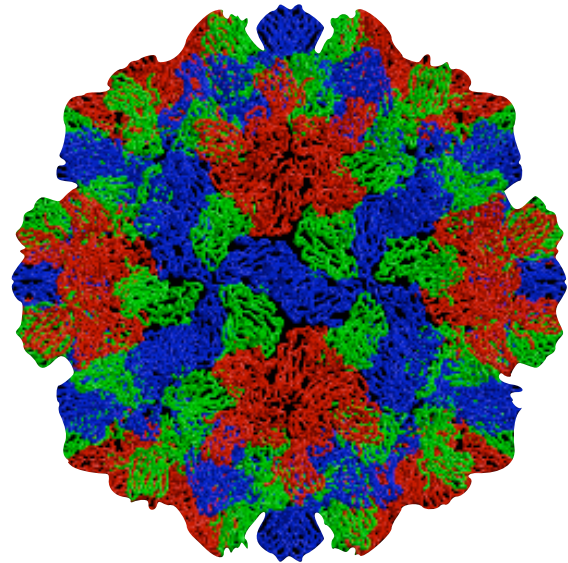
Structure of Tomato Bushy Stunt Virus

V.† Coat Protein Sequence Determination and its Structural Implications

Hopper, P., Harrison, S. C., Sauer, R. T., *J Mol Biol* 177 (1984) 701-713

Resolution : 2.9Å

PDB ID: 2TBV



M.W. of major capsid protein : 40,527 Da (180 copies)

Total capsid protein : 7294.86 K Da

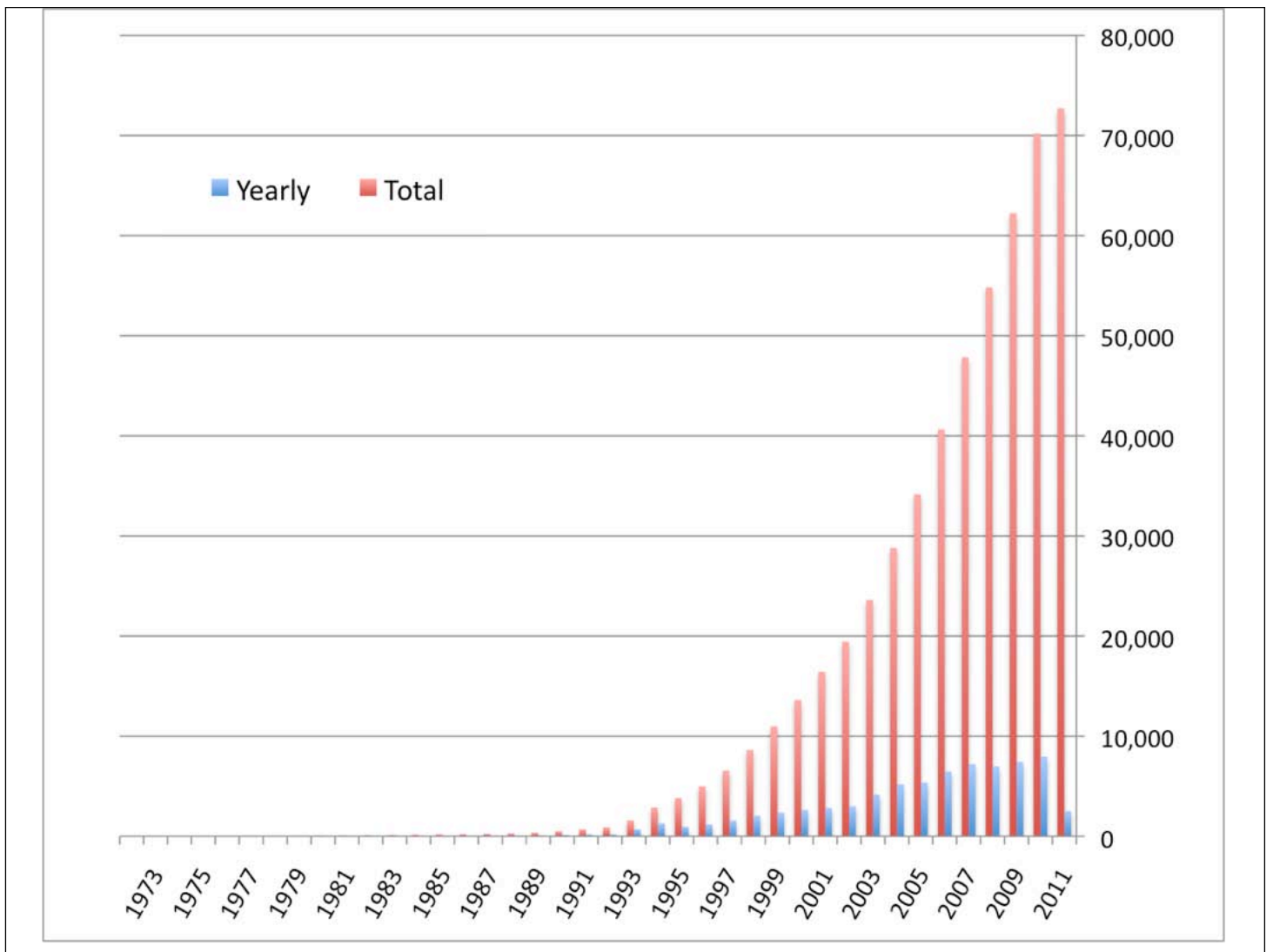
310 Å



27

2.9Åの構造がなされました...PDBにもこのIDで登録されています。興味があったら見てみて下さい。そういえばキャスパーが対称性からサブユニット数を300以上と予測していましたが、実際には180でした。

余談ですが、たぶん、山根さんもRosmannの所に留学していた時にはウィルスをやっていたはず...



これで6回の講義を終わります。

こうして、蛋白質の構造解析が、どんどん進展して来ました。このグラフは、1971年にPDBが設立されてからのPDBの登録数です。途中でも言いましたが、1990年ごろまでは、構造解析はかなり手間でしたが、放射光利用、実験装置、アルゴリズムやソフトの発展があり、今ではこんな時代です。

放射光のこと、実験装置のこと、最近の解析法の話は話しませんでした。

一応、後半で構造解析の「原理」も説明し、そして蛋白質結晶学が成立して行く課程の論文を読みながら、こうした研究がどういう経緯をたどったかをみたくつもりです。

研究とは、学問とは、という雰囲気も、ちょっとは感じてもらおう、というつもりでしたが、どうでしたでしょうか。...