

生物化学序論

シンクロトロン光研究センター

渡邊 信久

シンクロトロン光研究センターの渡邊です。化学生物工学科は兼務していて、「協力講座」という感じです。

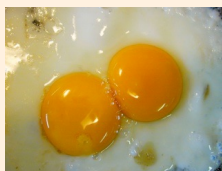
本籍はシンクロトロン光研究センターなので、シンクロトロン放射光の話も沢山したいところですが、今日は「生物化学序論」なので、蛋白質の構造とその応用の話をして、最後に少しだけシンクロトロンの話しもします。

- タンパク質とは？
- タンパク質の形とその意味
- タンパク質の形を観る方法
- タンパク質の形の情報の利用
- 研究紹介
 - シンクロトロン, 高圧構造解析

前半で、そもそも蛋白質とはどういうもので、なぜその「形」を研究するのか、つまり「形」の意味を復習し、では「形」はどうやって観るのか、そして「形」が分かったら、どういう意義があるかを考えます。

後半で、研究室の紹介としてシンクロトロン放射光と、最近私が気に入ってやっている高圧結晶構造解析の紹介をします。

タンパク質って何？



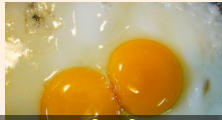
蛋白質
鳥の卵の白み

さて、まずは「タンパク質」ですが、**そもそもタンパク質って何ですか？**漢字で書くとこうです。

「蛋」はなんですか？

鳥の卵ですね。だから、蛋白は卵の白身です。

タンパク質って何？



栄養？



子供が小さい頃なら、「父ちゃんの研究テーマは蛋白質だよ」と言うと、奴等は「栄養」として蛋白質を習っているので、蛋白質の研究は「栄養」の研究？と思います。

でも、皆さんはそうではないですね。 . . .

蛋白質を英語で言うとなんですか？

タンパク質：プロテイン

Protein

proteios 「第一の」

体内で2番目に多い：動物の体重の1/6を占める

- ・生体内のあらゆる場所に存在する
- ・固有の形と機能を有する

タンパク質が生命活動を支えている

蛋白質は英語で言う「プロテイン」ですね。

その意味は何ですか？

Proteinの語源は proteios ですが、それは「第一の」ということです。

実際には体内で「1番」ではないですが、2番目に多く、動物の場合は1/6を占めています。例えば、私の体の中でも、あらゆる場所で生命を支えています。

一番多いのは何？

水ですね。蛋白質も周辺の水分子がとても重要です。最後の高圧力下で

タンパク質の色々

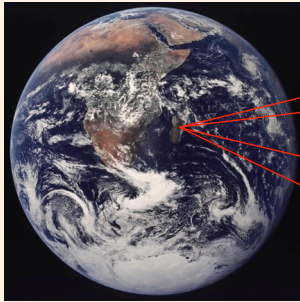
種類	身近な例
構造体	コラーゲン、絹糸
酵素	リゾチーム
物質輸送	ヘモグロビン
ホルモン	インスリン

タンパク質の果たす役割はまさに種々雑多です。

たぶん、皆さんが聞いたことがあるだろうと思うタンパク質を機能と一緒に書いてみましたが、どうでしょうか。

(コラーゲンのこと等、適当に話す...)

タンパク質の大きさ



数10ナノメートルくらい



タンパク質の構造研究は、地球の上の
ハムスターの生活を観察している感じ

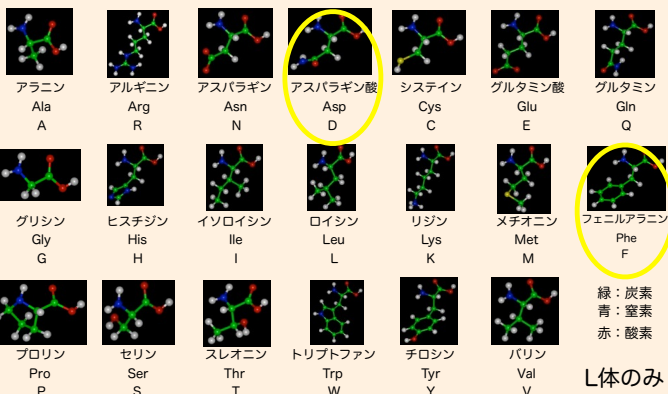
さて、じゃあ、その蛋白質の**大きさ**
はどのくらいでしょうか。

「とても小さい」です。
どのくらい小さいかということですが、
「数10ナノメートル」しかありません。

例えば、私が「地球」くらいの大き
さだったら、それを目安にすると、
蛋白質は、**どのくらいの大きさ**で
しょうか？

蛋白質の研究は、大きさ比で考えると、
地球の上でハムスターが活動し

タンパク質を作る「ブロック」アミノ酸



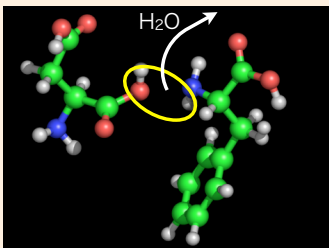
蛋白質は、20個のLアミノ酸で出来
ていますが、これはいいですね。
名前や一文字表記は「テスト」に出
たりしますか？

こうしたアミノ酸が結合して蛋白質
になります。

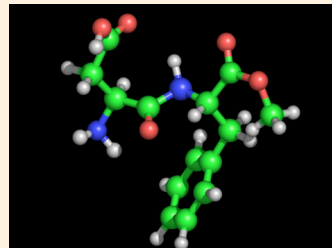
その結合を何と言う？

アスパラギン酸とフェニルアラニン
を例にしますが、

ペプチド結合



アスパラギン酸
Asp
D フェニルアラニン
Phe
F



アスパルテーム
(パルスweet)

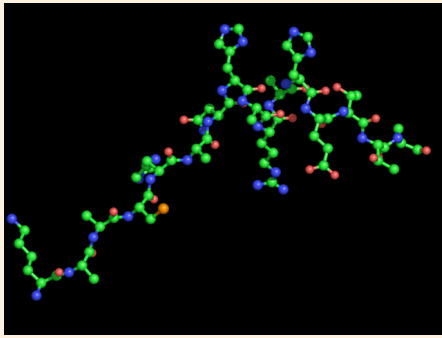
このようにアミノ酸が脱水縮合して
結合していきます。

アスパラギン酸とフェニルアラニン
がペプチド結合している化合物は、
ここがメチル基だとアスパルテーム
ですね。

聞いたことがある人？

人工甘味料ですよ。 コカコーラゼ
ロとかにも使われているはず。

ポリペプチド

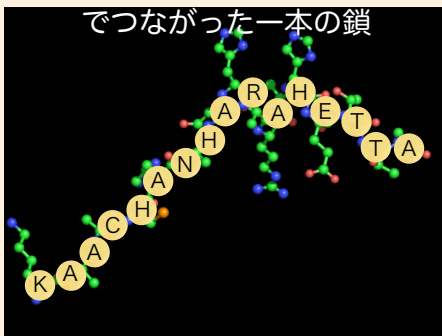


さて、こうしてアミノ酸がどんどん繋って、ポリペプチドとなったものが蛋白質です。
並び順が重要で...

ポリペプチド

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合

でつながった一本の鎖



例えばこれをさっきの一文字表記で書くと、こうです。

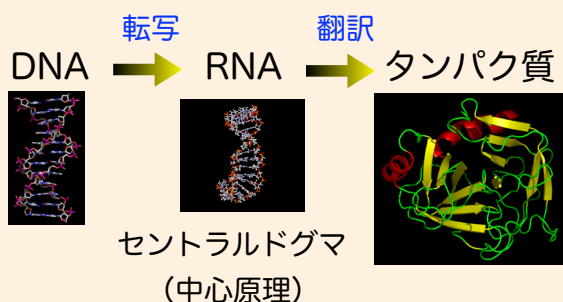
これちょっと読んでみて？（真面目に Lys, Ala...というのを期待）

これは「母ちゃん腹減った」配列です。蛋白質は一本鎖で、この「母ちゃん腹減った」の並び順に意味があるわけです。

ちょっとデータベースを検索した感じでは、残念ながらこの配列は生物には無いようです。検索するにはちょっと短いですし...

こうしたアミノ酸配列の情報は、

アミノ酸の並び方の情報はDNAに書かれている



ご存知のようにDNAに書かれています。DNAから情報が転写、翻訳されて蛋白質になります。

翻訳にかかわる「装置」は何ですか？

少し前のノーベル賞でした。2009年ですね。

あと、余談ですが、親から子に「伝わる」ものは何ですか？

転写や翻訳をしている装置(蛋白質)も生殖細胞にそのまま伝わります。

だから親から子に「伝わる」ものは

タンパク質の構造の階層

一次構造

アミノ酸残基の並び順

二次構造

局所的なポリペプチド鎖の構造

三次構造

タンパク質全体の折りたたみ方

さて、蛋白質の構造には「階層」があります。

これも十分に教わっていると思います。

一次構造

始まり



```
MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGG
WNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGTWGQPH
GGGWGQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGGWGQ
GGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAGAV
VGGLGGYMLGSAMSRPMIHFNDWEDRYR
ENMYRYPNQVYRPPVDQYSNQNNFVHDCVN
ITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVE
QMCVTQYQESQAYYDGRSSSTVLFSSPP
VILLISFLIFLIVG
```

→ 終わり 254個

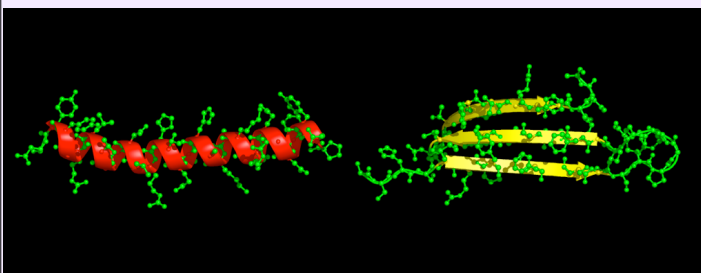
一次構造は、こんな感じのアミノ酸の並び方です。

さっきも見たように、このアミノ酸の並び順、つまり「一次構造」がDNAに書かれている訳です。

二次構造

α ヘリックス

β シート



コラーゲン

絹糸 (フィブロイン)

二次構造も、皆さん良くご存知と思います。

二次構造って何？

α ヘリックスと β シートですよ。これらの形成には水素結合が重要です。

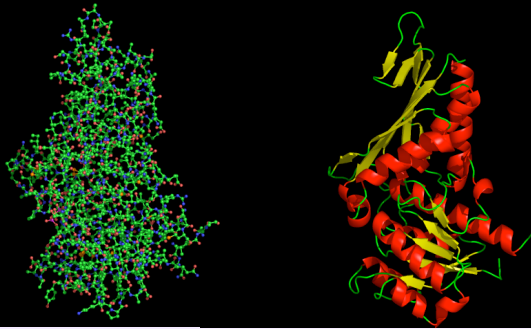
普通は、模式的に、こんなふうに描きます。

(なぜ α , β って言うの?)

代表的な蛋白質は、コラーゲンやフィブロインです。

さっきの「かあちゃん腹減った」配

三次構造



Ball-and-Stick

Ribbon

アセトアルデヒド脱水素酵素

さらに、それが「三次構造」を形成します。

いわゆる「構造」は、これです。この例はアセトアルデヒド脱水素酵素です。

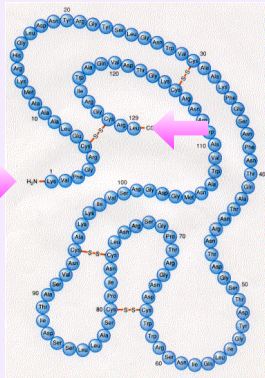
これ何をする酵素？

一年生はこの酵素蛋白質にはまだお世話になってはいけないですが、私にとっては重要な酵素ですね。

形の複雑さ

リゾチーム

N末端



C末端

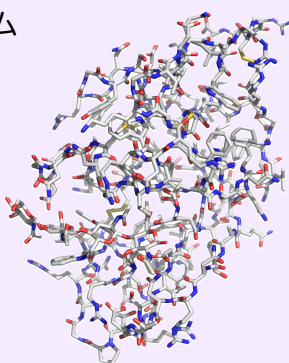
一本の鎖

さて、では、蛋白質の「形」の複雑さですが、比較的小型の蛋白質「リゾチーム」を例に見てみましょう。これがリゾチームの一次構造です。N末からC末まで129残基の「一本の鎖」ですが、4箇所のS-S結合があります。

S-S結合って大丈夫？

形の複雑さ

リゾチーム



炭素 613

窒素 193

酸素 185

硫黄 10

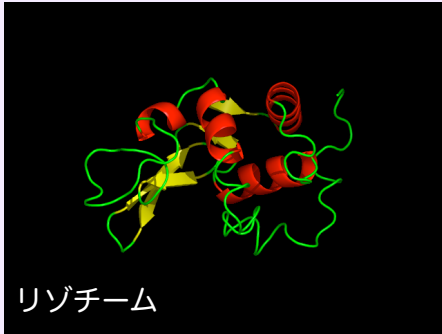
水素 971

タンパク質は数千以上の原子からなる巨大分子

原子数で言うと、こうです。

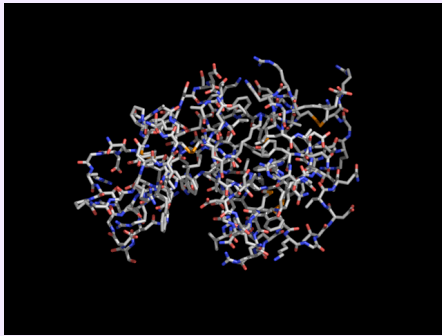
リゾチームは「比較的小型の蛋白質」ですが、それでも数千原子からなる巨大分子です。

形には意味がある



さて、ではそんな「巨大分子」が、
なぜそういう構造、つまり「形」な
のかということになります。
これでは分かりにくいので...

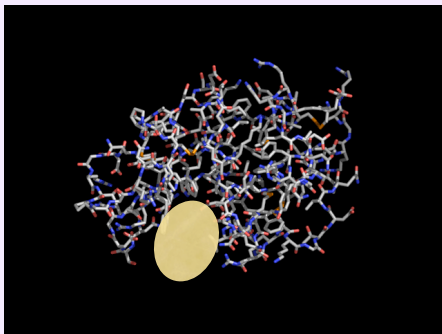
形には意味がある



こうして見ると、

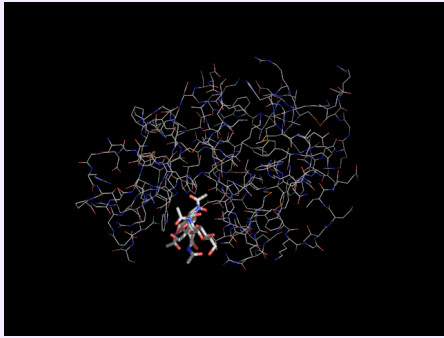
何か気がつくことは？

形には意味がある



ここに「窪み」がありますね。

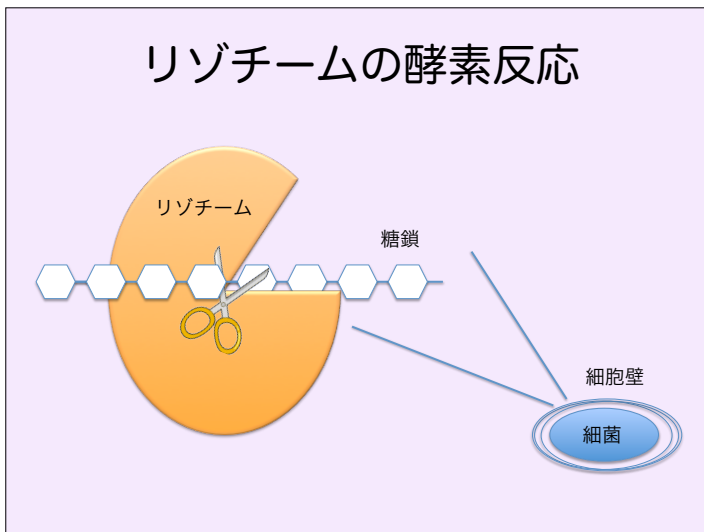
形には意味がある



実は、ここにこんなふうに「基質」が結合します。

基質って大丈夫？

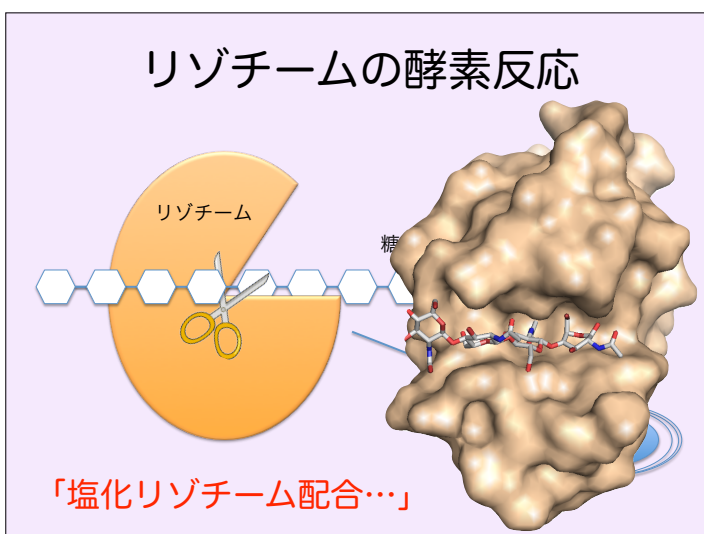
リゾチームの酵素反応



(リゾチームの復習)

糖鎖を加水分解で切断する酵素なので、細菌の細胞壁を壊す働きが期待出来る。

リゾチームの酵素反応



こんなふうに、リゾチームの「形」つまりこの場合は「くぼみ」の部分は、基質である糖鎖をそこに捕らえて、切断するというリゾチームの機能にとって重要な意味があるわけです。

以前は風邪薬にも「その効果」も期待してリゾチームが使われていて、「塩化リゾチーム配合」って聞いたことがあるはず。

(しかし、一昨年から厚労省もその機能を期待しての使用は中止させている。)

形を決めるもの

アンフィンセンのドグマ

タンパク質の形（三次構造）は、アミノ酸の並び順（一次構造）が決まれば一義的に決まる(1973)

(1972：ノーベル化学賞)

それはそうだが、そう単純でもない...

1982：ブルジナー

「プリオンの発見」

1997：ノーベル生理学・医学賞

さて、では蛋白質の「形」を決めているのは何でしょう。

リボヌクレアーゼAという酵素タンパク質は、尿素で変性させたり、元に戻したり出来たので、アミノ酸の配列(一次構造)が決まれば、「形」は決まるという考えがあります。

しかし、実際にはそう簡単ではありません。たぶん、皆さんも具体的に納得出来るのは、これではないでしょうか。

プリオンの一次構造

始まり



```
MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGG  
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGTWGQPH  
GGWGWQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGGWGQ  
GGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAGAV  
VGGLGGYMLGSAMSRPMIHFNDWEDRYR  
ENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNFVHDCVN  
ITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVE  
QMCVTQYQESQAYYDGRSSSTVLFSSPP  
VILLISFLIFLIVG
```

254個

→ 終わり

この一次構造は、さっきも見せましたが、実はこの配列はプリオンの一次構造でした。

この蛋白質の三次構造はどうかというと、

プリオンの三次構造

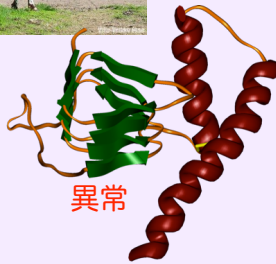
狂牛病



正常



異常



実はプリオン蛋白質の三次構造は「唯一」ではありません。

左の構造が「正常」ですが、これが「異常」な右の構造になり、このベータシート構造でどんどん集まってしまってもアミロイドを形成してしまう。これが狂牛病の原因です。

このプリオン(狂牛病)のため、90年代にイギリスとかなに行った人は、随分長い間献血が出来ませんでした。

百聞は一見にしかず…

タンパク質の形を観る方法

X線結晶構造解析

NMR（核磁気共鳴）

中性子結晶構造解析 **大きい結晶が必要**

電子顕微鏡 **分解能が悪い**

というわけで、構造屋の私達にとっては幸いなことに…

蛋白質の構造は「実際に見てみないと」いけないということになります。これまでは、原子レベルの構造解析をするには、一般的にはX線とNMRでした。

中性子は非常に大きい結晶が必要でしたが、茨城にJ-PARKも出来て、少し小さい結晶でもなんとかなるようになって来ています。

実は電子顕微鏡もここ数年でどんど

百聞は一見にしかず…

タンパク質の形を**精密**に観る方法

NMR

X線結晶構造解析

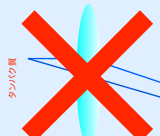
1万 10万 100万 分子量

蛋白質の形を精密に観る方法としては、一般的にはX線とNMRですが、この2つでは、NMRは解析出来る分子の大きさに制限があり、まあ非常に頑張って分子量4万くらいまでです。これに対して、X線結晶構造解析は原理的には「結晶になりさえすれば」大きさに制限はありません。「結晶」の話はあとでします。

さて、一般に小さいものの構造を見るには、

百聞は一見にしかず…

とは言うものの…


X線には**レンズ**が無い！

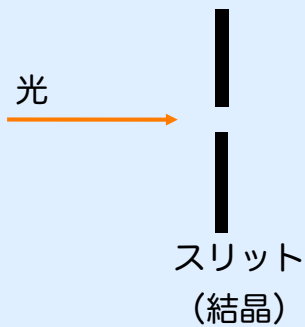
タンパク質

拡大してやれば良いわけです。

しかし、X線も光ですが、X線領域では使用可能なレンズがありません。

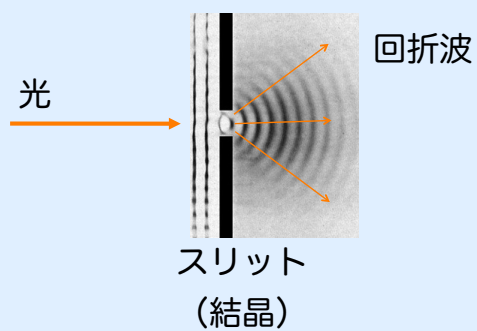
で、どうやるのかですが、
知っていますか？

「回折」を利用する



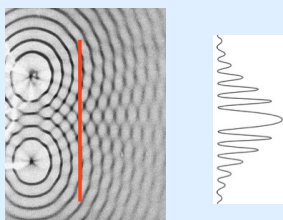
適当なレンズが無いので、回折現象を使って構造回折をします。
回折とは...

「回折」を利用する



例えばスリットに光が当たると、こんなふうにして波が干渉して起こる現象ですね。

「回折」を利用する

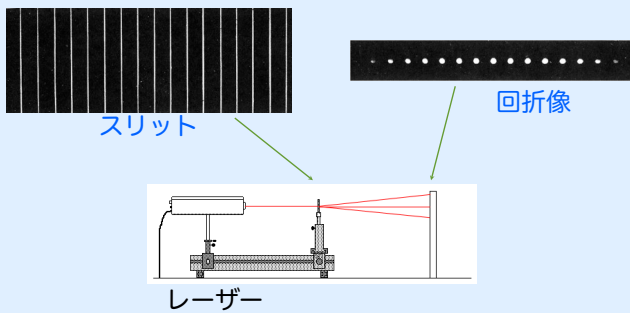


観測する光（X線）の波長と物質の構造の大きさは同じくらい

二つの波だと、こんなふうに干渉して縞々になります。

実像と回折像

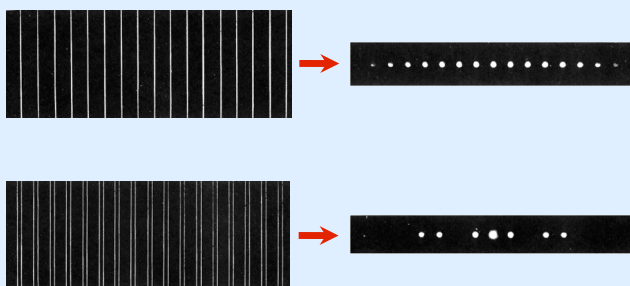
一次元の場合



中学校か高校で、こういう実験をしたことがあると思います。
例えば、こんなスリットに光を当てると、こんな回折像になり...

実像と回折像

一次元の場合



「化学結晶学」C.W.Bunn 培風館(1970)

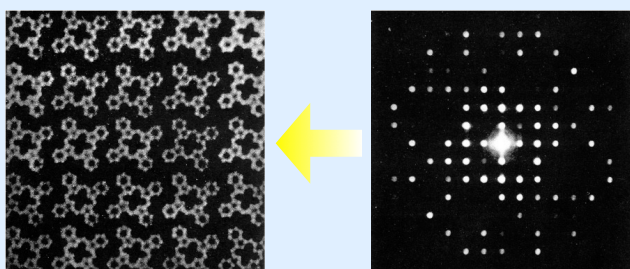
こんな（下）スリットだと、こんな回折像になります。

ここで分るように、回折パターンは、実空間の「構造」を反映しています。

ですから、何らかの方法で、右の回折パターンから左の元の「構造」を導くことは出来そうです。

実像と回折像

二次元の場合



「化学結晶学」C.W.Bunn 培風館(1970)

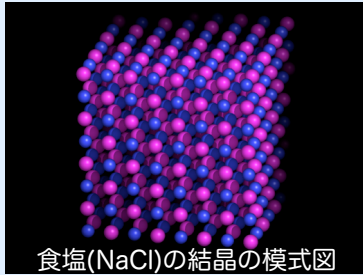
これは二次元の例ですが、この場合は、右のような回折パターンが得られます。

右の回折パターンから元の左の「構造」が「解析」できれば良いわけです。

（今日は具体的な理屈の話はしません...）

三次元の場合

結晶を作れば、分子を規則正しく並べられる

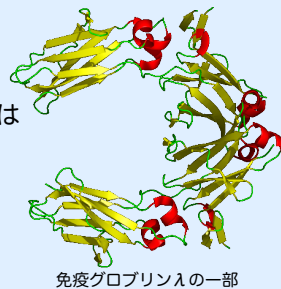


三次元の場合ですが、三次元で規則的に分子を規則的にならべるには「結晶」を作れば良いわけです。
これは、NaClの例です。ただ、タンパク質の場合は、

三次元の場合

結晶を作れば、分子を規則正しく並べられる

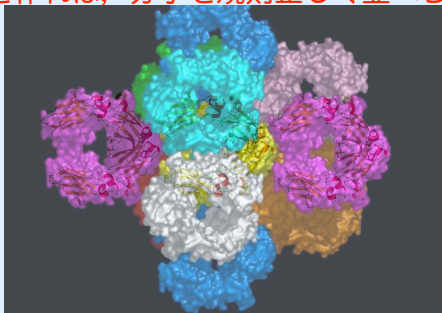
ところが、タンパク質分子は複雑な形をしている



分子が結構複雑な形なので、それを3次元的に並べて「結晶」にするのは結構大変です。
例えば、こんな分子が規則的に並ぶかなと考えてみると、大変そうでしょう...

三次元の場合

結晶を作れば、分子を規則正しく並べられる



でも、頑張れば、それが可能です。

リゾチーム結晶の成長の様子



Newcastle Structural Biology
Laboratory (@YouTube)

10億～100億個のタンパク質分子が規則正しく並んでいる

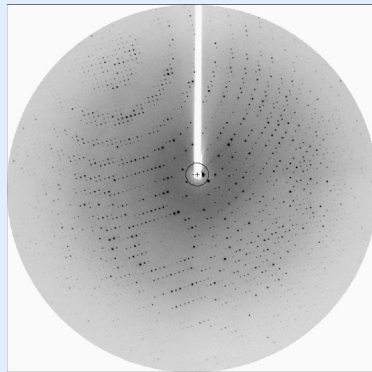
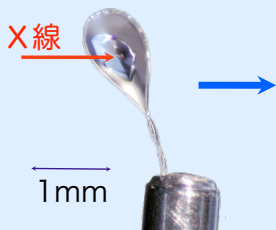
これはさっき「形」の例で見た蛋白質リゾチームの結晶の例です。

こんなふうに、うまく条件をみつけば、複雑な形をした蛋白質でも、綺麗に三次元的に並んで結晶になります。

さっき見たように結晶は、3次元に分子が規則正しく並んだ「回折格子」として働きますが、結晶中には10から100億個の分子がずらっと並んでいることになります。

タンパク質結晶と回折

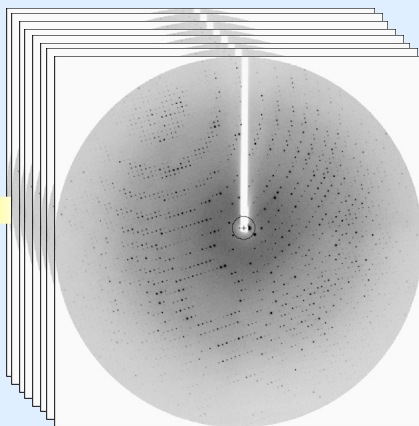
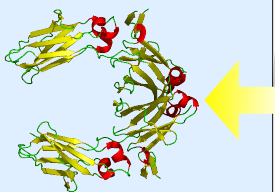
三次元の場合



実際蛋白質の結晶にX線を照射すると、こんな回折パターンが得られます。

タンパク質結晶と回折

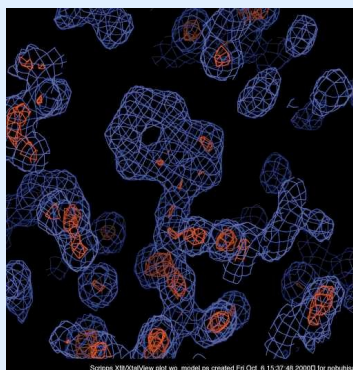
三次元の場合



結晶は三次元ですから、実験では、結晶をくるくる回しながら、このような回折パターンをどんどん測定し、それから分子の構造を解析するのが「蛋白質結晶構造解析」ということです。

どんな風に見える？

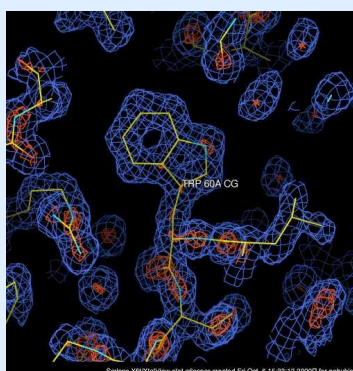
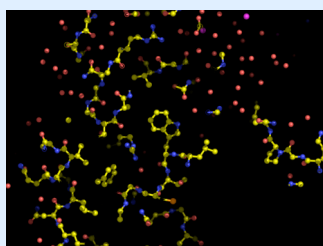
X線結晶構造解析で見えるのは**電子密度分布**



実際には、X線が相互作用するのは結晶中の電子なので、構造解析で見えるのは結晶中の電子密度分布です。

どんな風に見える？

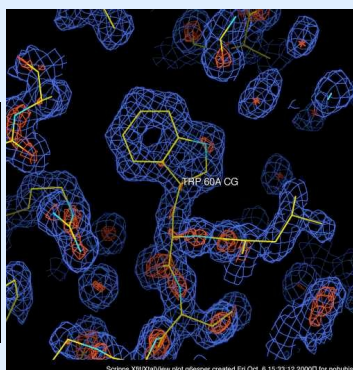
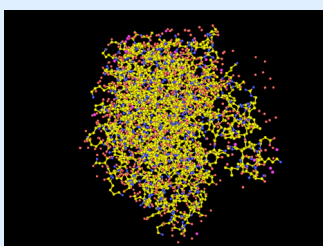
X線結晶構造解析で見えるのは**電子密度分布**



電子は原子にまとわりついているわけですので、電子密度の高いところに原子を置いていくことで「構造」が決定されます。

どんな風に見える？

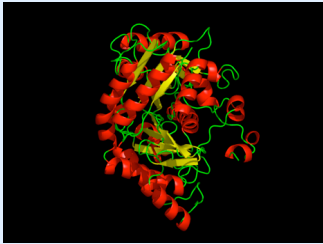
X線結晶構造解析で見えるのは**電子密度分布**



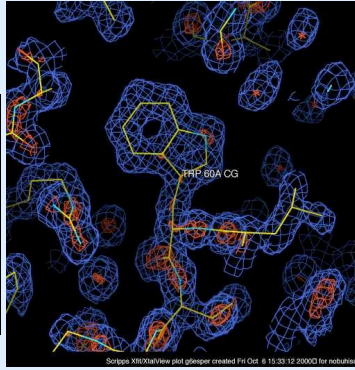
こうして分子全体の原子配置（構造）を決めて...

どんな風に見える？

X線結晶構造解析で見えるのは電子密度分布



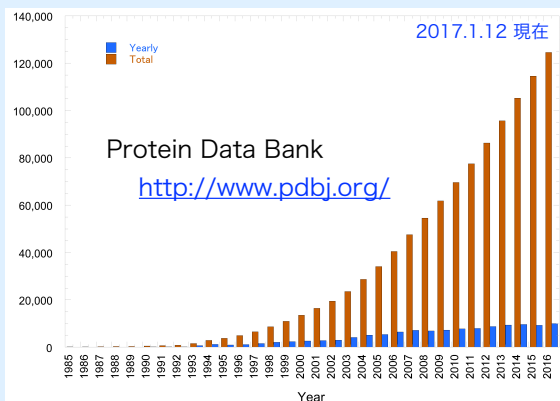
アミノ基転移酵素



ある蛋白質の構造解析出来た！となる訳です。

構造解析の現在

登録数
125,795 構造



さて、現在では、どんどん蛋白質の構造が解析されています。
構造解析された蛋白質の構造は、データベースに登録されていますが、このグラフは年間に登録された構造の数をプロットしています、
皆さんが生れたのは何年？
その頃は、まだ1万種類くらいの蛋白質の構造しか分っていませんでした。それが今では12万を越える構造が登録されています。

(本多先生の方の授業をやった

2016.12.19 現在：125,093 構造だっ

構造の応用例

さて、後半は、こうして解析した構造が何に使われるかの例を見てみることにします。
分かり易い「例」は薬です。



さて、話を進める前にちょっと復習してみましょう。そもそも「薬」とはなんですか？

(何人かに質問する)

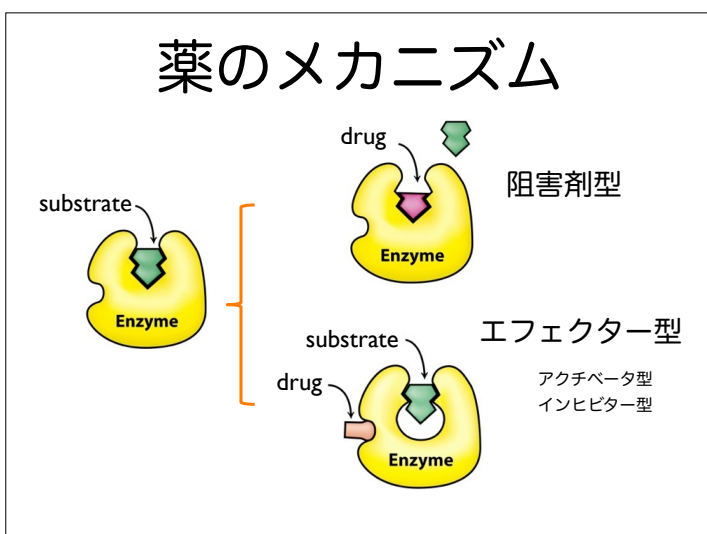


広辞苑によると：薬とは「病気や傷を治療・予防するために服用または塗布・注射するもの」ということです。では、いったいなぜ「薬」は「薬」なんですか？ そんなことは既に分り切っている？

家族（弟や妹とか）に「薬って何？ どうして効くの？」って聞かれたら、名大生としてはどう説明するの？

(何人かに訊いてみる)

話を進める前に、まず最初に薬が働くメカニズムの簡単な整理をしておきましょう。



薬は、酵素等の生体高分子に作用します。おおざっぱに言って酵素阻害剤として働くものと、何等かの方法で酵素の活性調節をするものがあるかと思います。この絵はストライヤーの生化学の教科書の絵をちょっと改造したのですが、上の例のように阻害剤として標的蛋白質の活性部位に直接結合して、肝心の基質を結合出来なくしたり、あるいはこのように例えば酵素のどこかに結合してアロステリックに活性部位の構造を変えて酵素の活性を上げたり下げたりするようなものがあります。

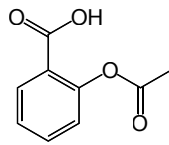
アスピリン



今日、例として見てみるのは痛みや炎症の薬「アスピリン」です。

アスピリンって聞いたことが無い人が居るかな？

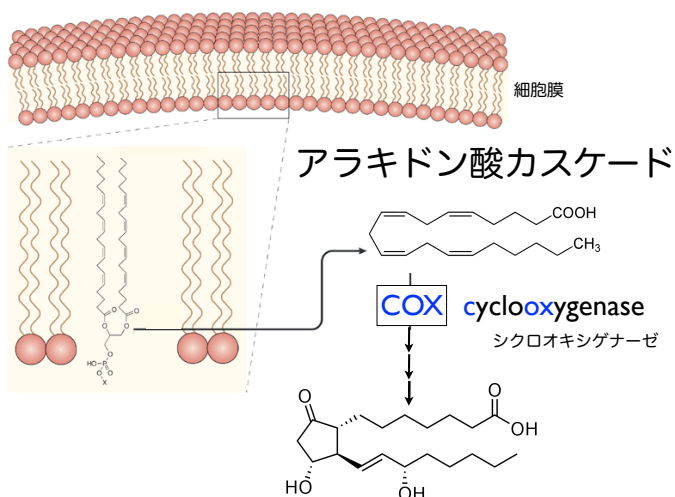
Aspirin



これがアスピリンです。アスピリンは年間4万トンも消費される超ロングセラーのヒット商品です。(4万トンといっても想像出来ませんが)。

ところで、「痛み」や「炎症」って何ですか？そのメカニズムは？

まずは、そこから復習します...



細胞が炎症などの刺激を受けると、細胞膜中のアラキドン酸が遊離し、それがシクロオキシゲナーゼ(COX)によって変換されて、さらにその後のいくつかのプロセスを経て、生理活性脂質である様々な**プロスタグランジン**が産生されます。以前はCOXはプロスタグランジン合成酵素と呼ばれていました。プロスタグランジン類は、少しずつ構造が違い、それぞれが様々な強い生理活性を持ちます。今話題にしようとしている発熱や炎症との関係では、プロスタグランジンE2が、炎症時の発熱

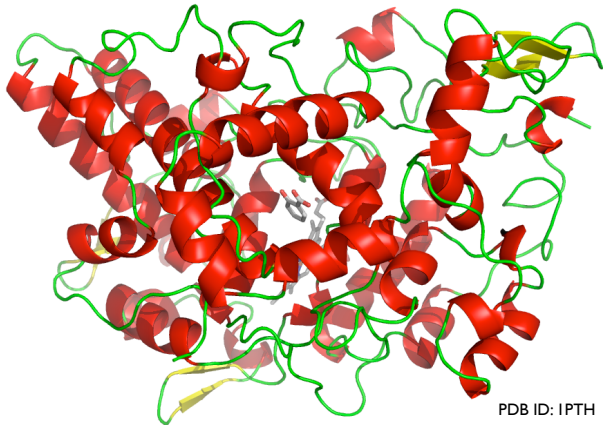
Aspirin の COX 阻害メカニズム



PDB ID: 1PTH
Nat. Struct. Biol., 2, 637(1995)

COXの構造がアスピリンとの複合体としてX線結晶構造解析されています。

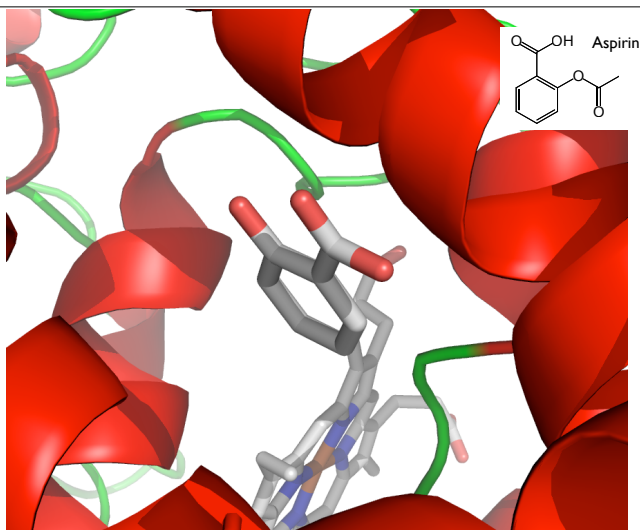
これはどうやってやられたかというと、結晶が成長した結晶化ドロップに100mMのブロモ-アスピリンを加えて、18度で24時間インキュベートすることで、複合体にしています。もしも興味があったら、この論文を見て下さい。



PDB ID: 1PTH
Nat. Struct. Biol., 2, 637(1995)

複合体として構造解析してみると、このように、トンネルのようにになっている中心部分のところにアスピリンが結合していました。

拡大してみると、



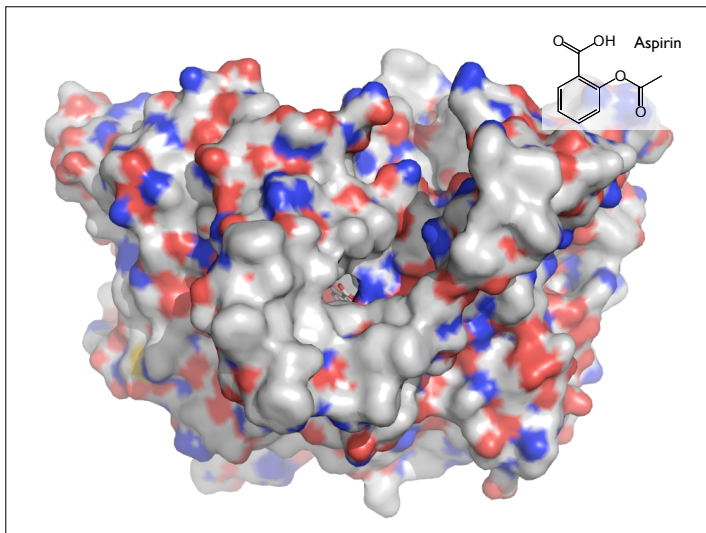
こんな感じです。

(何か変ではないですか?)

加えたのはアスピリンですが、見えたのはサリチル酸です。

後ろに見えているのはヘムです。

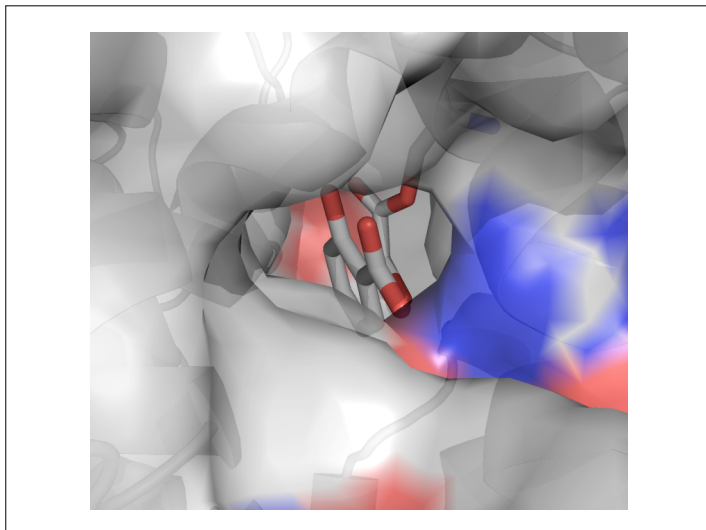
(ヘムって知ってるのかな?)



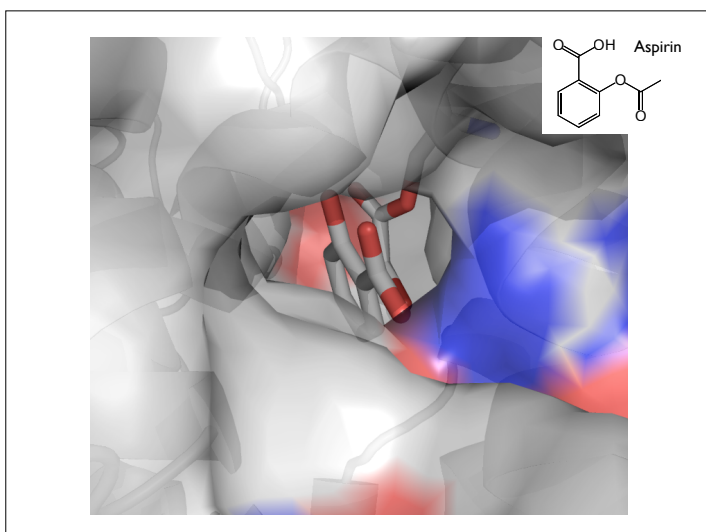
どんな所に結合しているかをイメージしやすいように、COXの分子表面を描いてみます。

こういう表示は見たことがありますか？

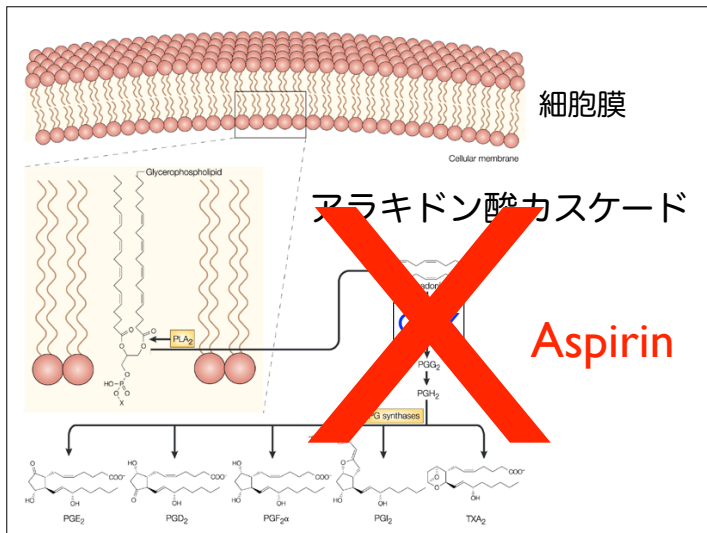
プラスの電荷を持つはずの残基が青、マイナスの電荷を持つはずの残基が赤で示されています。
中心の窪みにアスピリンが見えます。
やはり拡大してみると、



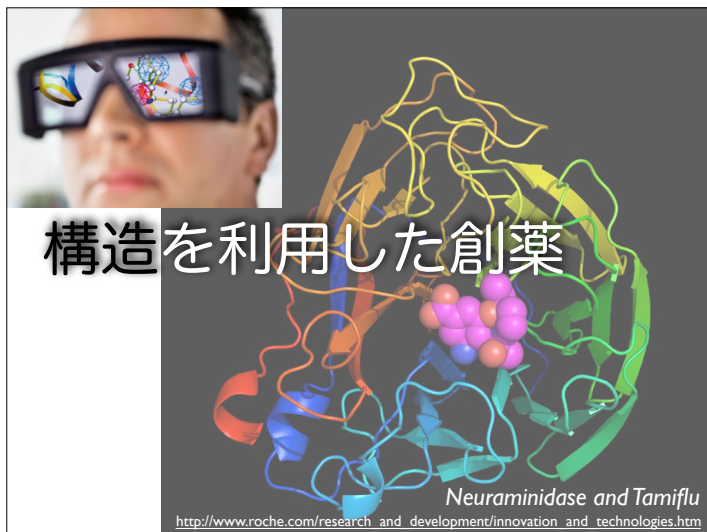
こんな感じ...



COXの空洞のなかにアスピリン(この場合はサリチル酸)が結合していました。こうしてアスピリン(この場合はサリチル酸)が穴を塞いでしまうために、基質であるアラキドン酸が、この穴を通して活性部位にやって来れないという訳です。



こうしてアスピリンがCOXに結合して、その反応を阻害するため、アスピリンには消炎・鎮痛作用があるという訳です。



薬がなぜ薬なのかということでアスピリンの例を見ましたが、今では病気の原因となる蛋白質の構造情報を利用して、薬の開発が行なわれています。

これはロシュのホームページにあるノイラミダーゼに結合したタミフルの様子です。構造解析が成功すれば、このように分子レベルで結合の様子を理解することが出来る。そうした構造情報を今度は薬の開発・改良に利用することが出来るというわけです。

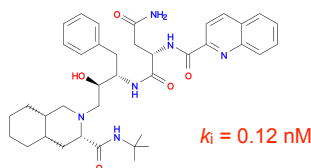
HIV (AIDS)の最初の実用阻害薬

偶然とハードワークの産物...

saquinavir (Ro 31-8959)

ロシュ社

1995年 FDA 認可



バイオアベイラビリティ (生物学的利用能)

が低く、かつ体内で分解され易い...

例としてHIV-1の薬の開発を少し見てみましょう。

PR 阻害剤として、1995年に最初の薬が認可されました。

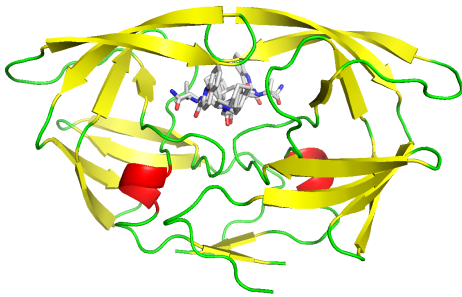
これは、従来型の創薬です。

この薬には摂取しても実際に働かない、分解も早いという問題点がありました。

Saquinavir との複合体の構造

(Ro 31-8959)

ロッシュ 1991年



Krohn A., et al., *J Med Chem*, **34**, 3340-42 (1991)

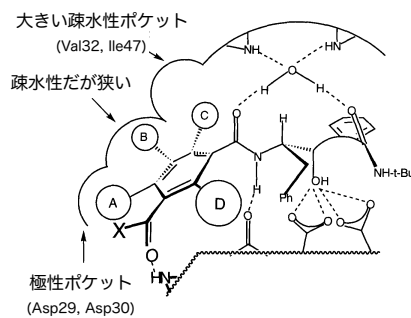
薬としては今一の性能ですが、HIV-1 PR と結合した複合体の構造が1991年に分かりました。

これで、「薬」がどうやって機能しているかが分子レベルで分かったということになります。

構造は1991年に解かれているはず
PDB登録は 1996 だが、*J Med Chem* の「編集者への手紙」は 1991

阻害剤複合体の結晶構造利用

SBDD Structure-based Drug Design



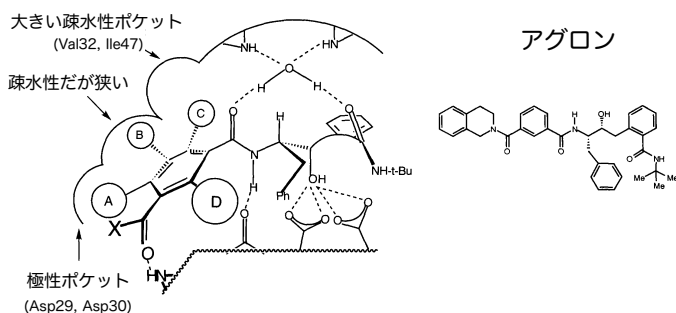
Kaldor, SW, et al., *Bioorg Med Chem Lett*, **5**, 721-726 (1995)

「構造」が分かることの意味は、この図で分かるでしょうか。

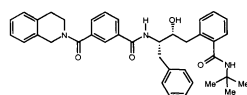
サキナビルとPRの結合の構造情報を元にして、もっとうまく結合する化合物を理論的に設計することが可能になる訳です。

阻害剤複合体の結晶構造利用

SBDD Structure-based Drug Design



アグロン



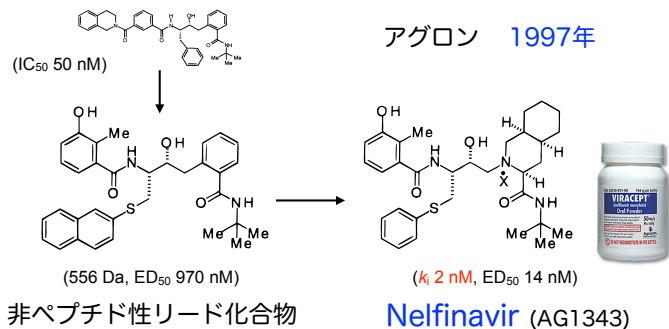
Kaldor, SW, et al., *Bioorg Med Chem Lett*, **5**, 721-726 (1995)

サキナビルとPRの結合の構造情報を元にして、アグロンが、こうしたリード化合物を開発します。

SBDDの時代の幕開けです。

最初の 構造情報を利用した創薬

SBDD Structure-based Drug Design



さらに構造情報を利用して、より効果的な化合物が設計され、最終的にはネルフィナビル（薬名：ビラセプト）として1997年に認可されました。

ここまでで、そもそも蛋白質とはどういうもので、なぜその「形」を研究するのか、つまり「形」の意味を復習し、では「形」はどうやって観るのか、そして「形」が分かったら、どういう意義があるかを例も含めて一通り見たつもりです。

研究紹介

1. シンクロトロン放射光
2. 高圧X線結晶構造解析

残りの時間で、自分の研究紹介をします。

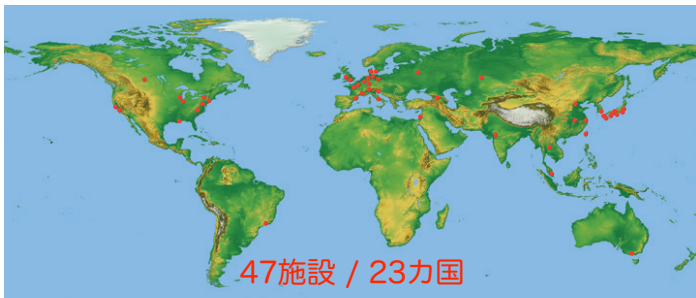
そもそもの私の本籍である「シンクロトロン放射光」のこと、そして、最近こだわっている高圧結晶構造解析の紹介です。

研究紹介 1

シンクロトロン放射光

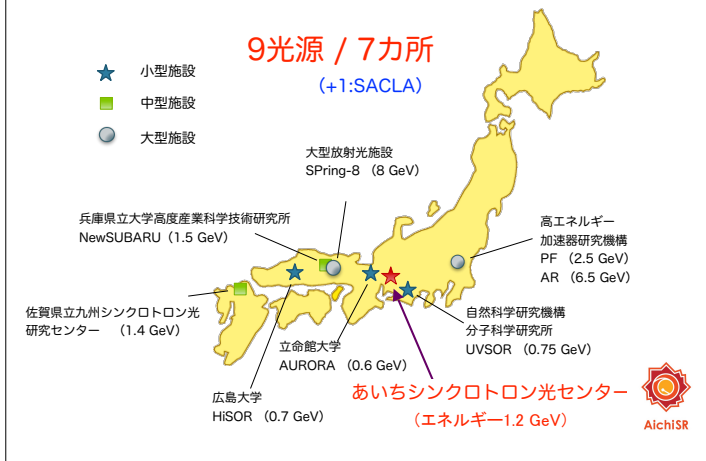
@あいちシンクロトロン光センター

世界の放射光施設



Nature Photonics, 9, 281 (2015)

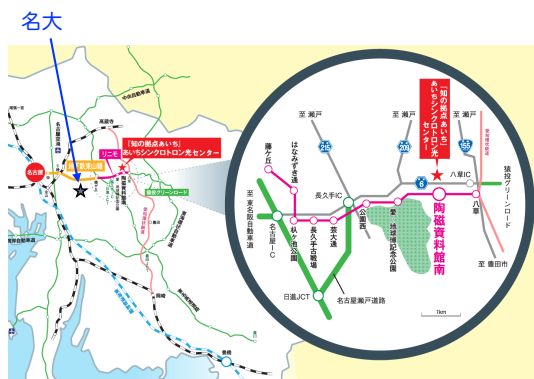
国内のシンクロトロン放射光源



日本の放射光

あいちシンクロトン：2013年3月
開所

あいちシンクロトロン光センターの位置



場所

東山線 → リニモ



リニモの陶磁資料館南駅。ダッシュすれば「2分！」

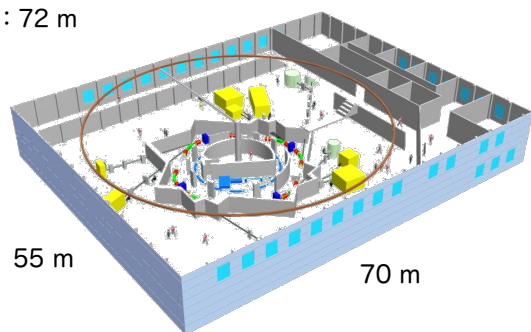
この施設のアクセスの良さは、たぶん日本一

(ただ、名大からは40分かかる...)

あいちシンクロトン光センター概観

エネルギー：1.2 GeV
蓄積電流：300 mA
周長：72 m

偏向電磁石 (超伝導) (常伝導)
磁場強度：5 T / 1.4 T

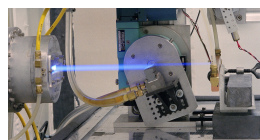
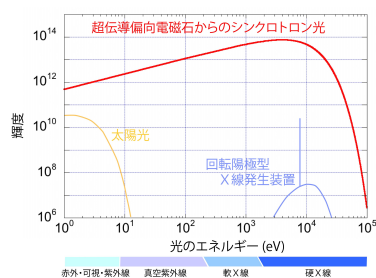


ちょっとした体育館くらいの大きさ

茶色の輪っかは天井クレーン

シンクロトン放射光とは

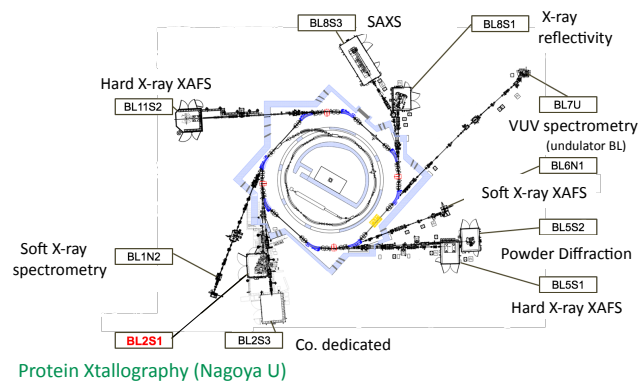
- 極めて明るい
- 細く絞られ拡がりにくい
- X線から赤外線までの広い波長領域を含む



空気中に取り出したシンクロトン放射光

放射光の性質

実験ホールのビームライン配置図



10本（実は11本）のビームラインがある。

「名大ビームライン」もある！

蛋白質結晶構造解析用ビームライン

BL2S1（名古屋大学ビームライン）

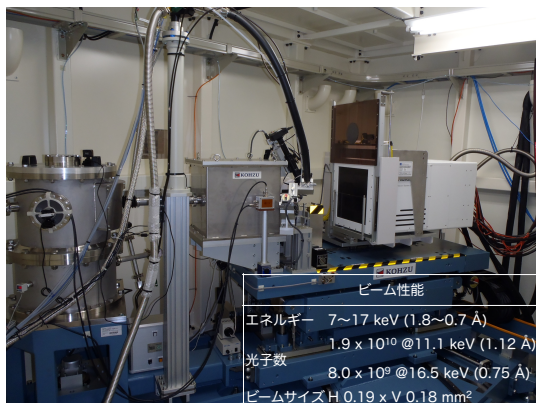
2015年5月
供用開始



そこに蛋白質結晶構造解析用のビームライン BL2S1 が名大予算で建設された。

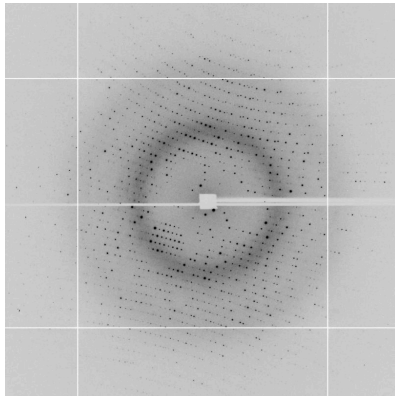
2015年の5月から供用開始している。

BL2S1の回折計



実験ハッチ内の、回折計と検出器

実際の回折写真の例



110枚
(1°/ 1枚)



CCD検出器

実際に撮影出来る回折写真の例（実際はムービーで110枚分を見せる）

研究紹介 2

高圧下でのタンパク質 結晶構造解析

最後は、高圧結晶構造解析の例

高圧X線結晶構造解析

~1 GPa

2000年頃から開発進む...

- 蛋白質の圧縮率
- 蛋白質の耐圧性
- 蛋白質の揺らぎと機能
- 蛋白質周辺の水分子の構造

「高圧」 やってみようとしていること

ダイナミックス

1 GPa程度まで： 変性, 水のこと

今日は分かり易い例として耐圧性に着目

蛋白質の圧力効果



蛋白質に圧力（ここでは静水圧です）を掛けていくと、まず、もしも多量体蛋白質だと、解離が起こり、さらに圧力を掛けていくと、分子内部に水が侵入を始め、やがて圧力変性が起こります。

ただし、地球上の生き物の生きている環境では、マリアナ海溝でも約1万1千メートルですので、およそ100MPaが圧力の限界ということになります。この圧力ではまだ変性してしまうということはないはずですが、地上などの常圧

高圧下の結晶構造解析法



まず、どうやって高圧実験をするのかということで、ダイヤモンドアンビルセル (DAC) の話から始めましょう。

これが、DACです。2年半前に作ったばかりの時の写真なので随分きれいですが、直径が5センチ程度でこんな形をしています。

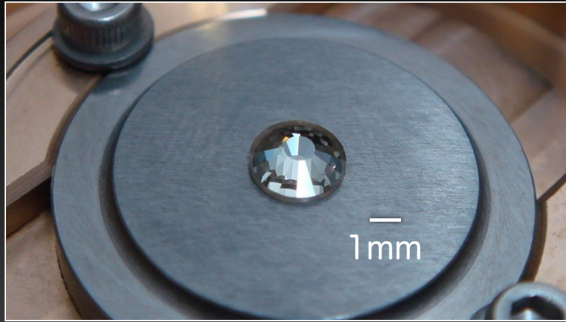
このDACは上下2分割になっていて、

DACの構造



内部はこんなふうになっています。ここに見えているのがダイヤモンドですが、拡大すると、

DACの構造

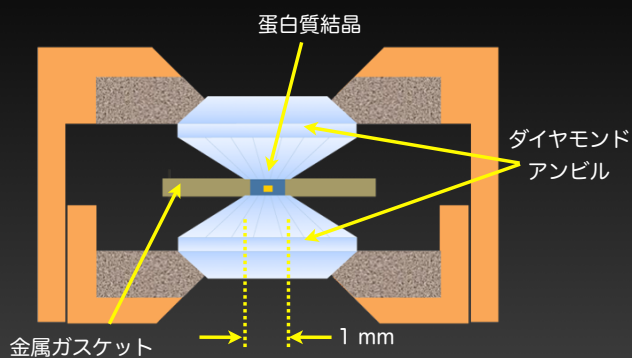


先端部（キュレット面）が、平面に切り出しており、そこで加圧しますが、このDACの場合は先端部の直径は1ミリです。

先ほども示しましたが、蛋白質は1GPa程度以上かけると変性してしまいますので、我々の場合は精々2GPaもかけられれば良いのと、蛋白質結晶の大きさのことがありますから、1ミリにしました。

高圧物性用のDACでは、20GPaとかうんと高圧にする必要があるのです、こ

DACの模式図

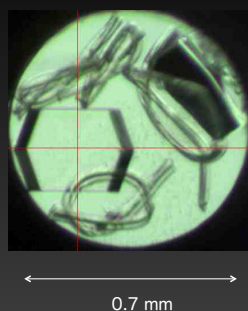


ちょっとダイヤモンドが大きく描かれてますが、...

こんなふうに上下の2個のダイヤモンドでガスケットをはさんで、その中に蛋白質結晶を入れてあります。加圧しないといけませんから、結晶の周辺には圧力媒体としての溶液と一緒に封入されています。

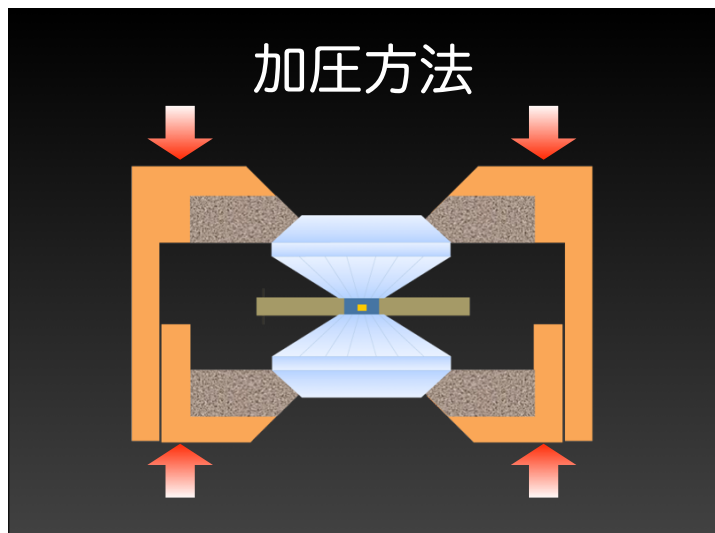
実際の様子は、

DAC試料室内部の蛋白質結晶

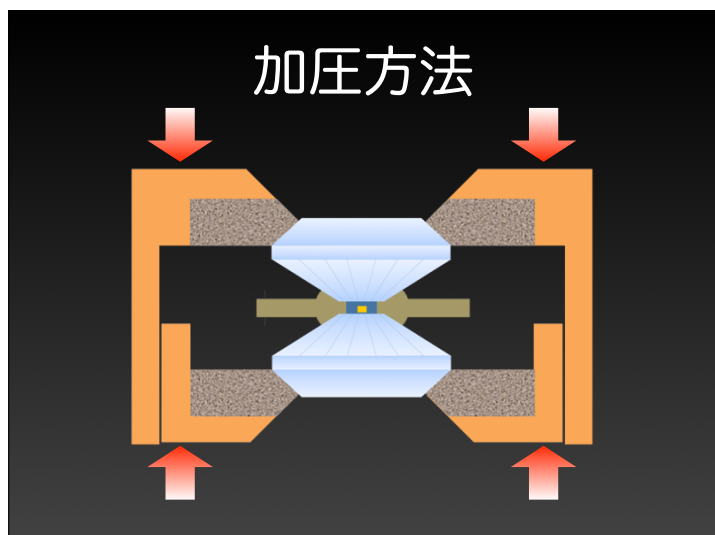


試料室の内部

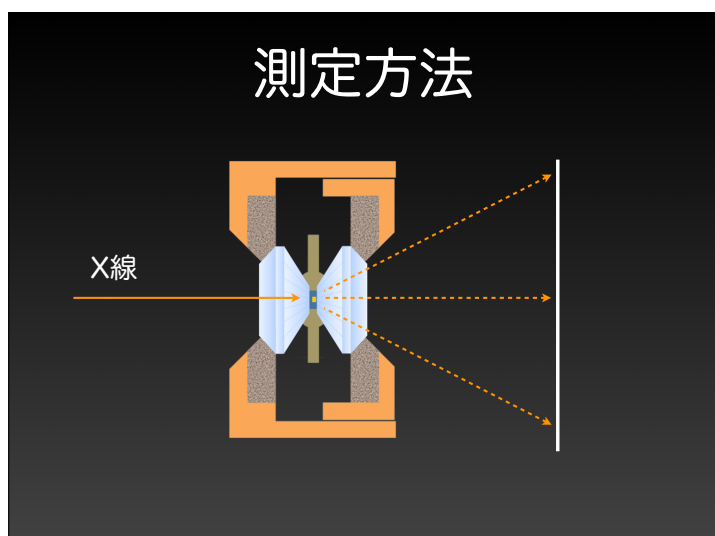
タバコフィルター



このようにダイヤモンドの上下を押し
てやって、



圧力を掛けてやる。それだけです。
X線回折実験は、このまま。．．



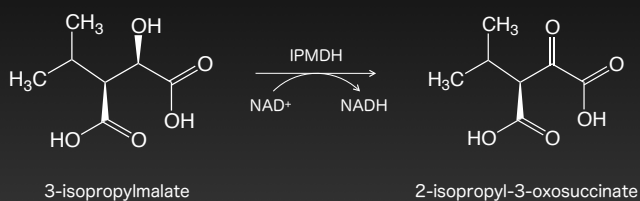
こうして、ダイヤモンドを通して直接
X線を照射して行うことになります。
後でも話しますが、結晶に静水圧を掛
けていく実験ですので、測定は全て室
温で行います。放射線損傷には注意し
ないと、何をやっているのか分からな
いということになる可能性もあります。

高圧下結晶構造解析の例

イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)

さて、ではこれを使って何をやるかということですが、我々の所では、最初の研究対象としてIPMDHを選択しました。

イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)



IPMDHは、核酸の代謝に関与する酵素で、こういう反応を触媒する酵素です。

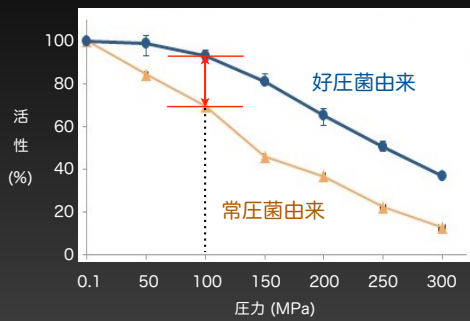
好圧菌 : *Shewanella benthica* DB21MT-2
マリアナ海溝 10,898 m

常圧菌 : *Shewanella oneidensis* MR-1
Oneida湖 (平均水深 6.4 m)

さて、今回構造解析を行ったIPMDHは、この2つの細菌由来のものです。
Shewanella benthica DB21MT-2は、マリアナ海溝の堆積物から分離され、水深1万メートル、つまり100 MPaで生育可能ですが、常圧から50 MPaではほとんど生育出来ず、10度での生育至適は圧力は70 MPaという絶対好圧菌です。
一方の *Shewanella oneidensis* MR-1はアメリカの Oneida湖で採取された低温菌で、鉄還元菌として微生物燃

深海微生物由来酵素の圧力適応

イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素 (IPMDH)



Hamajima, Y., et al., Extremophiles, 20, 177-186 (2016).

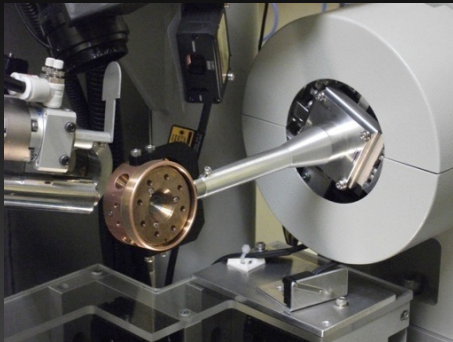
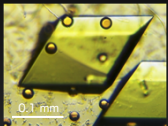
こうです。

横軸が圧力で、縦軸が常圧（大気圧）条件と比較した酵素活性です。両者とも圧力が上がると活性は下がっていくのですが、1万メートルの深海に対応する100MPaでは、常圧菌 *oneidensis* では70%程度に活性が下がってしまうのに対して、絶対好圧菌 *benthica* の方では95%程度を保持しています。両者の一次配列の相同性は85%程度とほとんど同じです。なぜこの差があるのか、原因は何か知れた

放射光施設での高圧実験

@筑波の PF-AR NW12A

0.7 Å (17.7 keV)



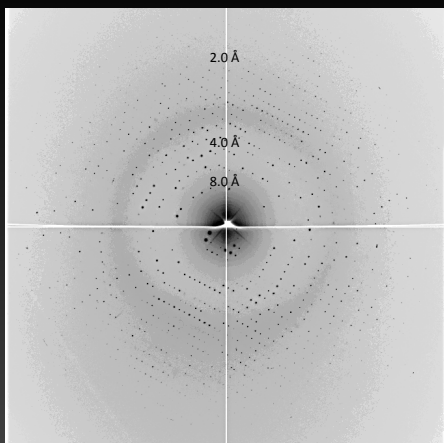
IPMDHは結晶性は悪くない結晶が得られます。今回使用したのはIPM複合体です。

DACによる実験では、入射X線も出射X線もダイヤモンドを通過しますから、波長が短い必要があります。この実験ではPF-ARのNW12Aを使用しています。通常のクライオ実験用の先端部をDACマウント用に作り直した物に交換しています。

[あいちシンクロトロンの名大ビームラインBL2S1でもできます。](#)

回折写真の例

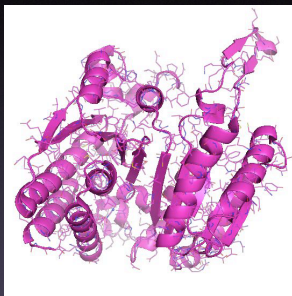
波長 : 0.75 Å



こんな回折写真が DAC を通して撮影出来...

高圧力による構造変化

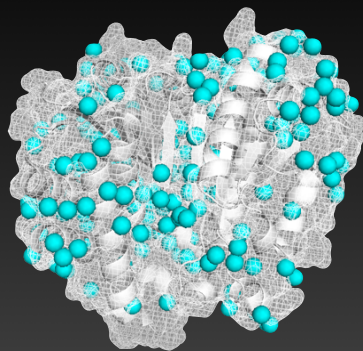
常圧
0.1 MPa



高圧
650 MPa

構造回折写真すると、常圧と高圧力下で構造も変化していることが分かります。（実際は morph ムービー）

常圧菌由来IPMDHの水和水



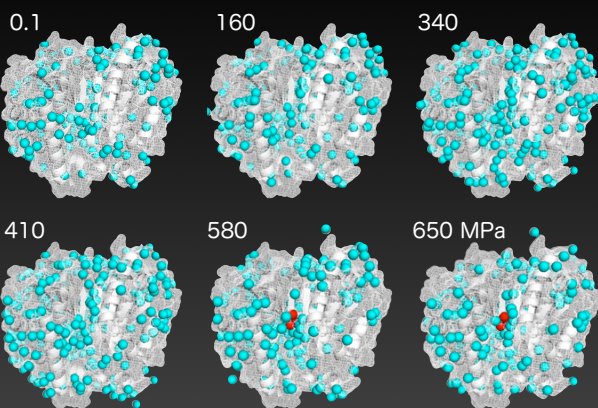
0.1 MPa

2Å以上の分解能があるので、分子表面の水和水を観察することが出来ます。

これは0.1MPaでサブユニットの水和水を描いています。

184個観察されていますが、同様に各圧力で解析すると、

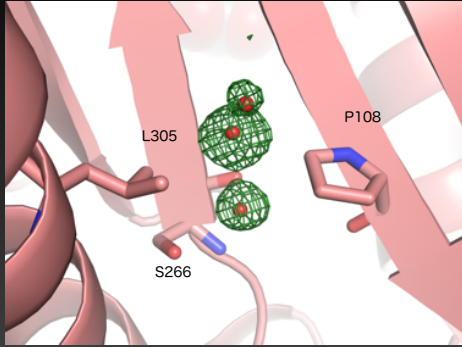
常圧菌由来IPMDHの水和水の構造



こんな感じになっていました。

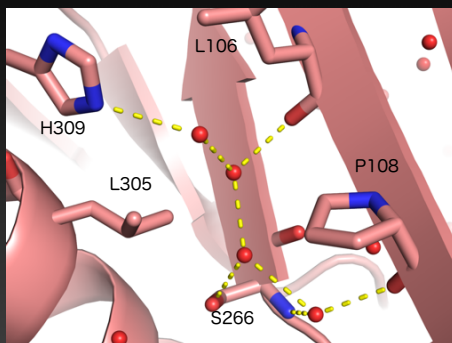
この水和水を詳細に調べたところ、ここに赤で示した水分子は、IPMDHの圧力効果と酵素の耐圧性に重要であるということが分かりました。

580 MPaの構造詳細



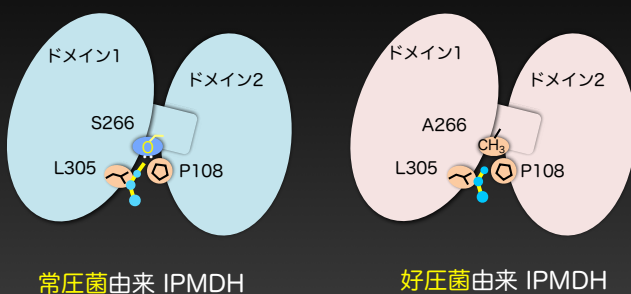
580MPaでは、この様に3つの差電子密度のピークが観測されました。

水素結合ネットワーク



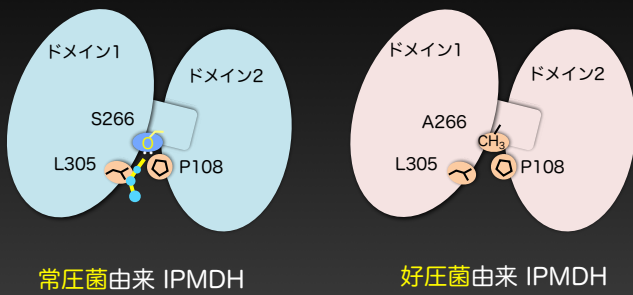
侵入した3つの水分子の周辺の水素結合ネットワークを示した図です。元々は溝の底のこの部分は、全体としてはPro108, Leu305, Leu106などの疎水性残基によって非極性の表面を形成しています。そこに水分子が割り込んで、Ser266やHis309の側鎖、Leu106の主鎖などと水素結合を形成しています。これらの水素結合は、新たに出来た「くぼみ」の内部の水分子の局在を安定化していることが示唆されます。

Ser266 側鎖の役割



高圧下では、部分モル体積を減少させるために、「くぼみ」に水分子が侵入してきます。そうして、先ほどまで見て来た様に、常圧菌由来のIPMDHの場合は水とSer266の側鎖で水素結合を形成し、侵入した水分子が繋ぎとめられます。一方で好圧菌由来IPMDHは266番目の残基がAlaなので、

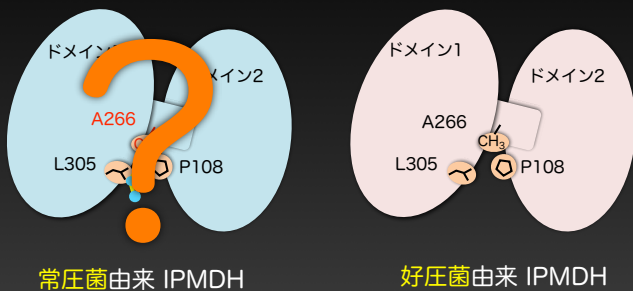
Ser266 側鎖の役割



水分子が侵入して来ても水素結合できず、「くぼみ」内部に安定に局在しにくく、結果的に高圧下での水分子の侵入が生じにくくなっていると考えられます。

Ser266 側鎖の役割

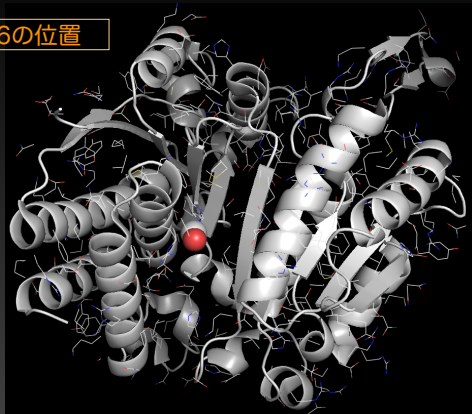
S266A変異体



ということは、常圧菌由来IPMDHのSer266をAlaに変異してやれば、どうなるでしょうか。
耐圧性酵素になるのではないかと予想しました。
そうして、Ser266をAlaに一残基置換した変異体の高圧下の活性を測定してみました。

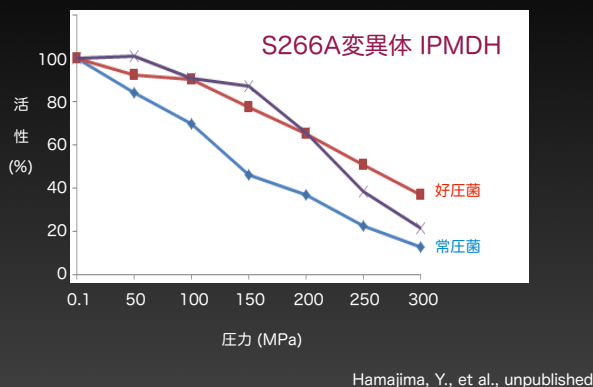
Ser266 側鎖の役割

S266の位置



分子全体の構造からすると、この1残基だけをSer→Alaの置換を試みた、ということです。

S266A変異と耐圧性



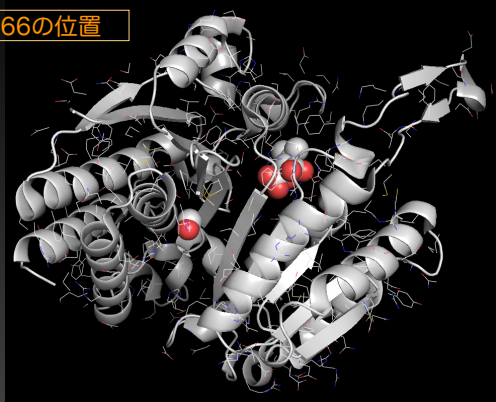
この青の、常圧菌*S. oneidensis* MR-1のSer266をAlaに変えた変異体では、紫で表したデータのようにになりました。

このように、高圧下の活性は好圧菌由来IPMDHと同程度で維持されています。

つまり、IPMDHは266番目の一残基のみの変異で、耐圧性が向上しているということが分かりました。

Ser266 側鎖の役割

S266の位置



活性部位からは遠いわずか1残基（364残基の）の変異が、IPMDHの耐圧性に関与していた！という訳です。

高圧結晶構造解析の結果が、蛋白質の耐圧性のメカニズムに迫れた例です。

- タンパク質とは？
- タンパク質の形とその意味
- タンパク質の形を観る方法
- タンパク質の形の情報の利用
- 研究紹介
 - シンクロトロン，高圧構造解析

今日のお話はこういうことでした。

前半で、そもそも蛋白質とはどういうもので、なぜその「形」を研究するのか、つまり「形」の意味を復習し、では「形」はどうやって観るのか、そして「形」が分かったら、どういう意義があるかを考えました。

後半では、形を観る手段の実際としてのシンクロトロン放射光と、ちょっと変わった構造解析法として高圧結晶構造解析の例を話しました...

生物化学序論

- タンパク質とは？
何 大きさ 構成要素
- タンパク質の形とその意味
構造の階層 構造の意味
- タンパク質の形を観る方法
構造解析法と原理
- タンパク質の形の情報の利用
構造情報は何に役立つ？
- 研究紹介
 - 1) シンクロトン放射光
 - 2) 高圧結晶構造解析

シンクロトン光研究センター
渡邊 信久

<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/WatanabeLab/>
<http://www.nusr.nagoya-u.ac.jp/>
<http://www.astf-kha.jp/synchrotron/>

参考書の例

いきなりはじめる 構造生物学
神田大輔 (秀潤社)

分子レベルで見た薬の働き
平山令明 (ブルーバックス)

ポストゲノム時代のタンパク質科学
構造・機能・ゲノミクス
Arthur M. Lesk 著
高木 淳一 訳 (化学同人)

配布プリント

「ポストゲノム時代のタンパク質科学
構造・機能・ゲノミクス」
は、英語版は第二版が出ていますが、
日本語訳は品切れみたいです...

UNESCO

世界結晶年2014

<http://www.iycr2014.org>

結晶学っていいね！

世界結晶年2014

和訳パンフレット

<http://www.iycr2014.org/about/promotional-materials>

