

# 授業では教わらない X 線結晶学

小型シンクロトロン光研究センター

渡邊 信久

学生の復習等の便宜用に公開していますが、以下の書籍の図が使用されている部分があるためこのPDFファイルにはコピー制限がかけてあります。

**Richard E. Dickerson** Present At The Flood: How Structural Molecular Biology Came About

**鈴木 理** 分子生物学の誕生—奇跡の年1953年 (上)

小型シンクロトロン光研究センターの渡邊です。シンクロトロン光って知っていますか。早い話が X 線とかの「光」です。私の所属は、シンクロトロン光を使って研究する、そういう施設を整備しているセンターです。

今日は、生物機能工学に進学して来た皆さんに、X線結晶学の話をしようと思います。1月の生物学序論で、「しばらくみなさんに講義をすることはない」と話しましたが、今年は私の順番ということです。DNAの二重らせんの話は、皆さん良く知っていると思うので、今日のテーマは蛋白質です。今では蛋白質という物質がどういうもので、だいたいどんな構造(形ですね)をしているかは良く知られています。でも、私が生れる少し前、つまりほんの半世紀前にはほとんど分っていませんでした。

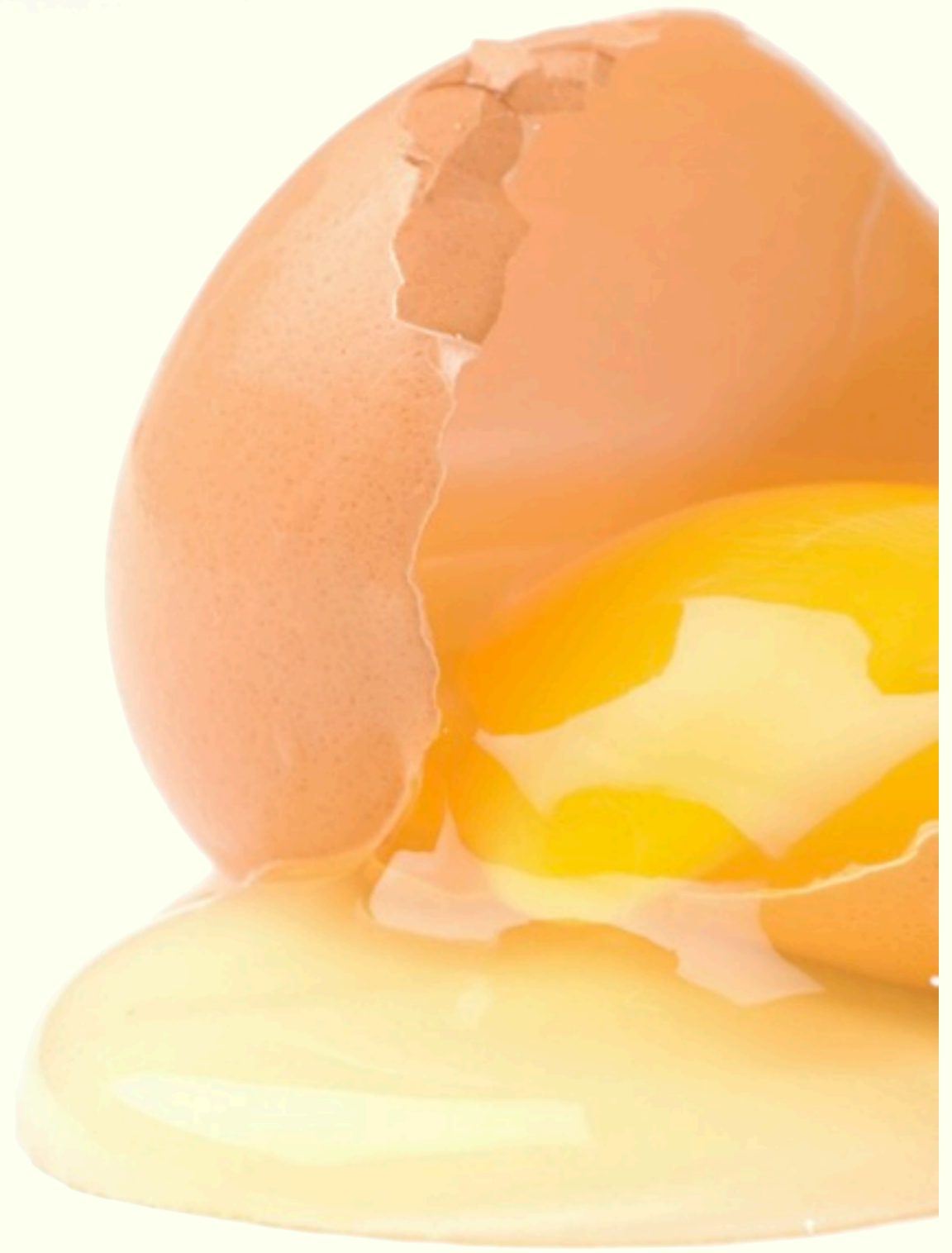
蛋白質の研究がどういう経緯をたどったかをみることで、研究とは、学問とはという雰囲気をちょっとだけ感じてもらおう、というつもりです。

# 「タンパク質とは何だろうか」 の時代

2

さっきも話したように、およそ半世紀前ちょっとには、そもそも蛋白質とはどういう物質なのか、ということが議論がされていました。

# タンパク質とは？



3

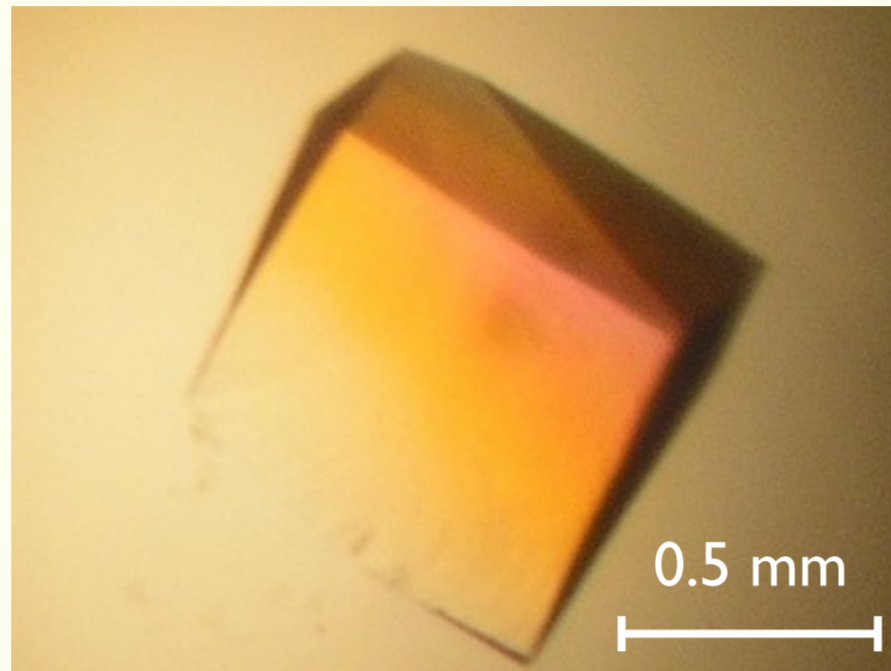
1930年代ころまでは、いったい蛋白質とはどういう物質なのか、ということも問題だったわけです。例えば、

- ・蛋白質は巨大な分子なのか、それとも、ただのコロイド状の物質なのか。
- ・個々の蛋白質の分子量は決っているものなのか。
- ・蛋白質を構成しているアミノ酸の含有量と種類は決まっているのか。
- ・アミノ酸同士はどういう結合をしているのか。
- ・アミノ酸の並び順は一定なのか、ランダムなのか。
- ・さらには、酵素とかの「分子機械」としての機能は、いったいどうやって発現されているのか。

といったことが全部分っていないかったわけです。

これは「プロテイン・ジレンマ」と呼ばれています。

# 結晶になったタンパク質



## タンパク質の結晶の例

4

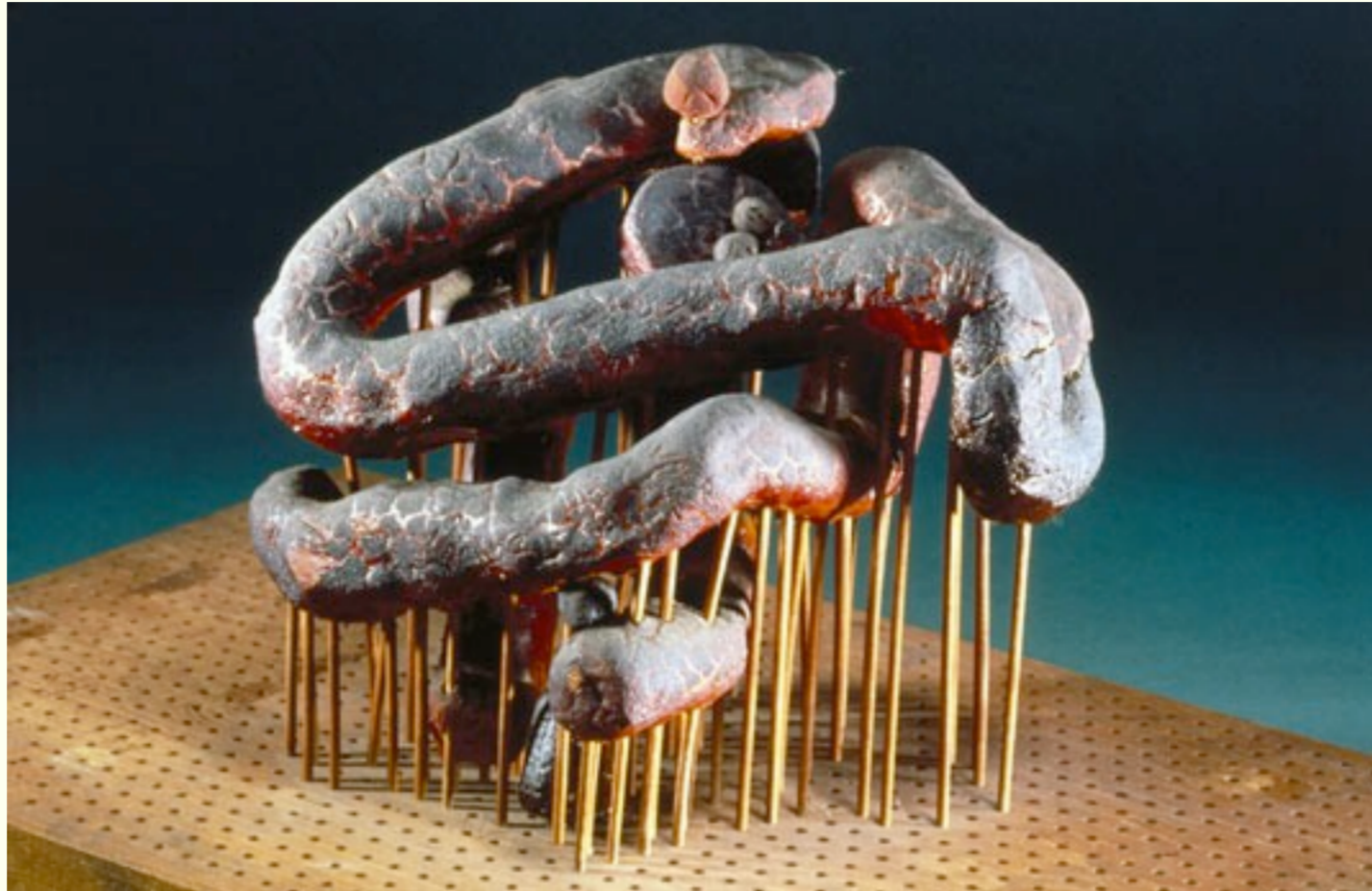
蛋白質がコロイド状の物質ではなく、一定の構造(形)を持った物質である、という一番の証拠となったのは、蛋白質が「結晶」になった、ということだろうと思います。

**\*\*「どうして?」と質問する\*\*\***

結晶は、結晶中で分子が3次元的に規則正しく並んでいるということですから、蛋白質が結晶になるということは、個々の蛋白質にはちゃんとした「形」があるんだ、ということになります。

当時は、ようやく小さい分子のX線結晶構造解析が可能になって来ていた頃でもあり、このような結晶が得られても、蛋白質の複雑な構造が解析出来るということに直ちに繋がらなかったのですが、「結晶になるなら解析することが出来る」という強い信念で、バナーがX線結晶構造解析を決意、イギリスのケンブリッジに研究室を作りました。

# 1957年



ミオグロビン (Kendrew ら)

しかし、最初の蛋白質の立体構造が解析されたのは、それからずっと後のことです。

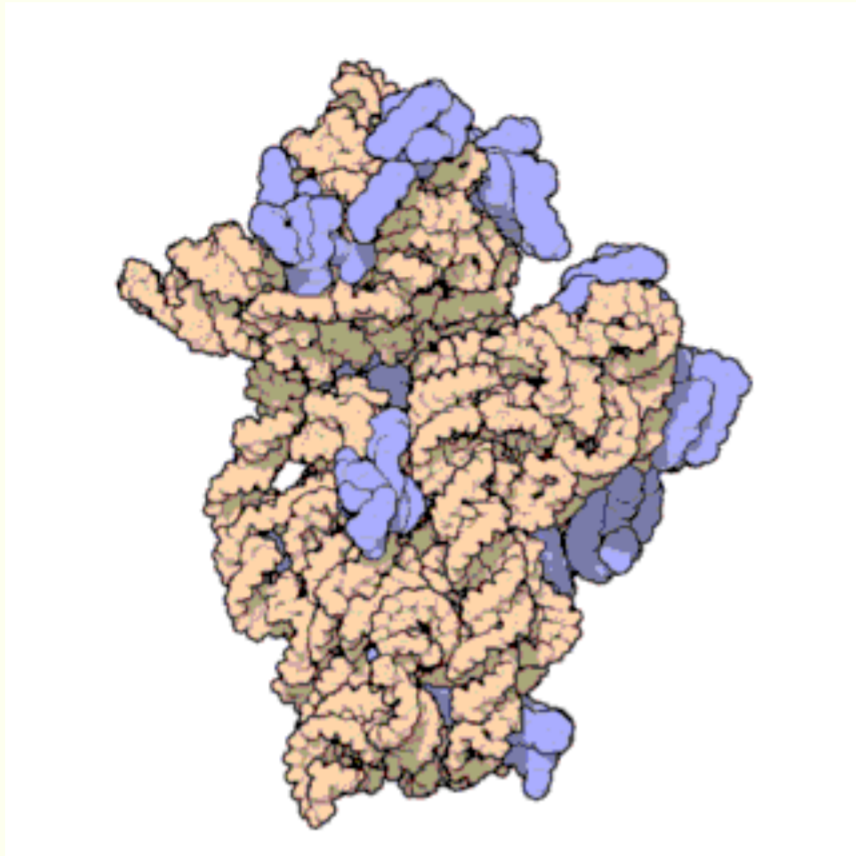
この写真は、ケンドリューらによって解析されたミオグロビンの「構造」です。

「1957年」って、みなさんにとってはどういう感じでしょうか。ものすごい昔のこと、それともごく最近？

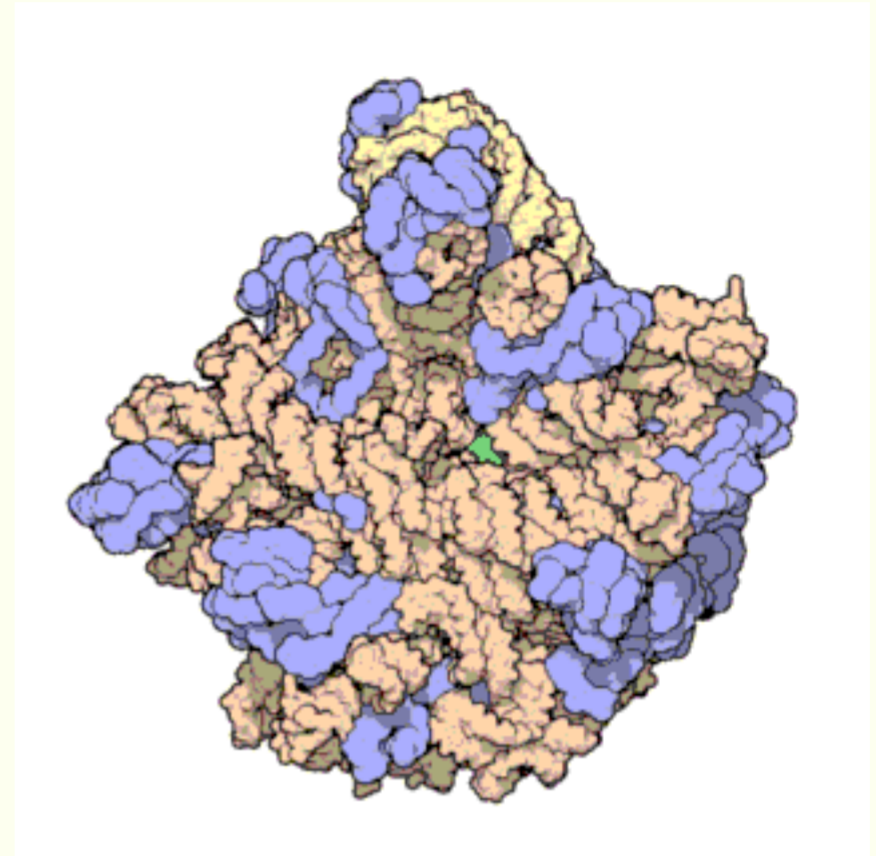
科学技術という意味では、変な話ですが、原爆だって1945年に完成されています。それと比べれば、実は蛋白質の三次元立体構造解析が解析出来るようになったのは、最近のことだ、ということになります。1957年には、解析出来るといっても、こんなソーセージのような「およその折れ畳まれ方」がやっとでした。

# 2000年

## 巨大なリボソームだって構造解析可能



真正細菌 *Thermus thermophilus* の  
30Sサブユニット



古細菌 *Haloarcula marismortui* の  
50Sサブユニット

ところが、今では、巨大なリボソームでも結晶構造解析が可能な時代です。

\*\*\*リボソームって知っていますよね?\*\*\*

\*\*\*さっきのミオグロビンと比べると、どのくらい大きいですか?\*\*\*

リボソームはおよそ300万Da以上。ミオグロビンは約2万Daだから、150倍以上の大きさのものまで、しかもさっきの「ソーセージ」ではなくって原子の位置まで正確に決めることができます。もちろん簡単ではないですが、...

# 繊維写真の時代

さて、1930年代にとりあえず「結晶」はあったのですが、結晶構造解析は当時としては「将来の夢で」、蛋白質の構造研究は実際には繊維写真によるものでした。

# 2種類のタンパク質

## 球状タンパク質

## 繊維状タンパク質

8

他にもいろんな分類方法が可能ですが、蛋白質は、球状蛋白質と繊維状蛋白質の2種類に分類することができます。

\*\*\*聞いたことがありますか?\*\*\*

\*\*\*それぞれ、どんな蛋白質がありますか?\*\*\*

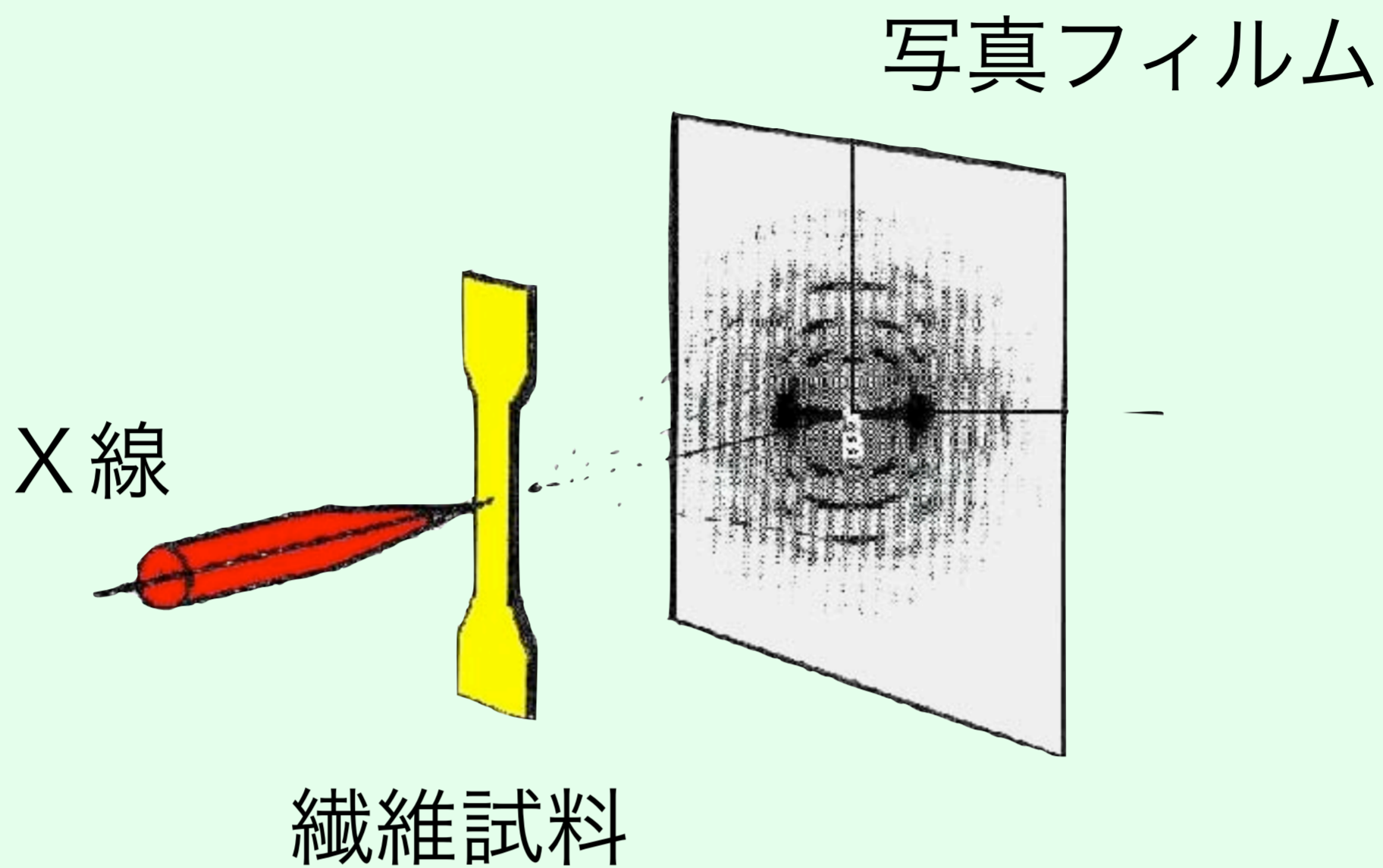
球状蛋白質は酵素や抗体のような細胞中で働くいわゆる「普通の」蛋白質、繊維状蛋白質は髪の毛やウール、絹やコラーゲンといった生物の構造構築に使われている蛋白質ですね。

最初に「構造」が研究されたのは、球状蛋白質ではなくて繊維状蛋白質です。

\*\*\*なぜですか?\*\*\*



# 初めは繊維から



なぜかという、もともと「繊維」ですから、簡単に引き延して持つことができ、そのままX線を当てることが出来たからですね。

こんな感じです。

# 繊維写真の父：Astbury

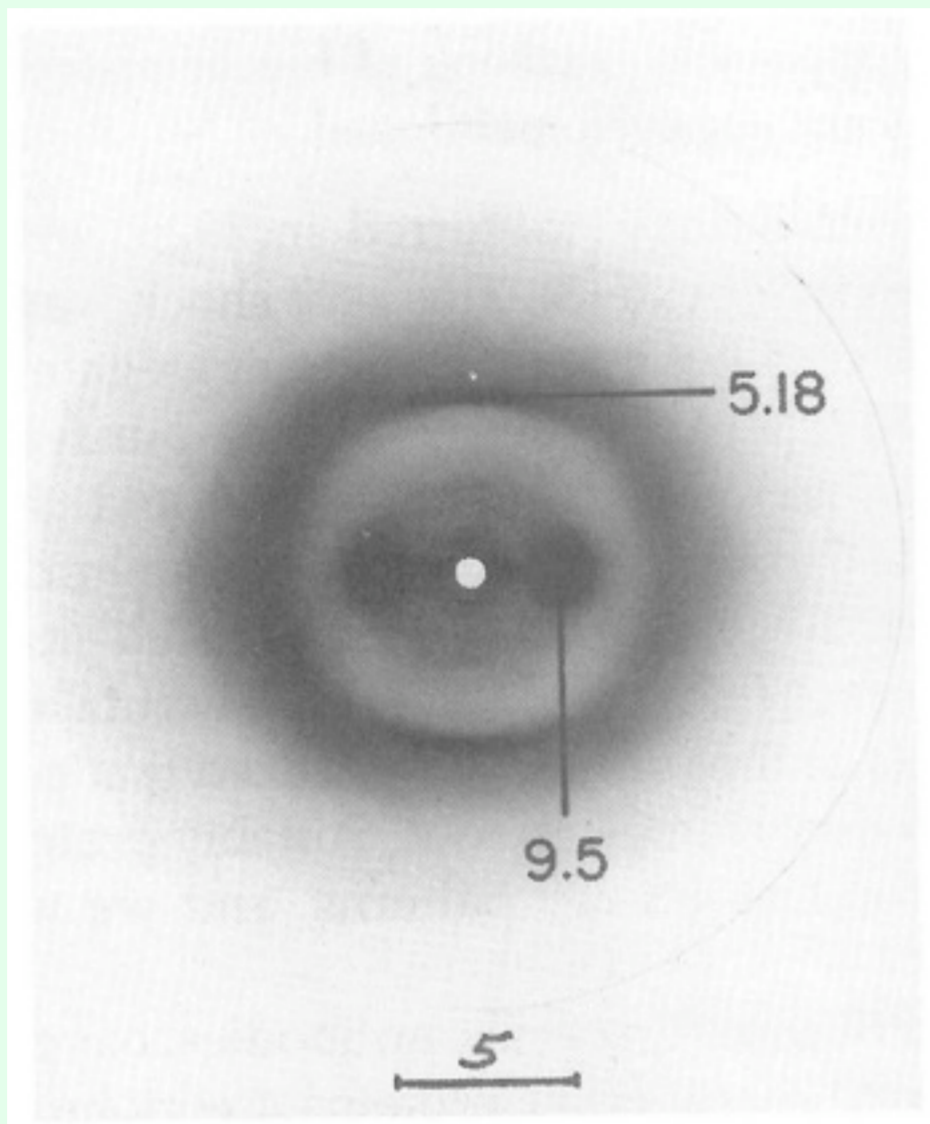


1898 - 1961

イギリス(蛋白質結晶学のかなりの部分はイギリスの貢献が大きいです)のリーズ大学のアストベリーは、さまざまな繊維のX線回折実験を行なっていて、繊維写真の父と呼ばれています。繊維状蛋白質の実験だけでなく、DNA繊維の回折実験もやっています。

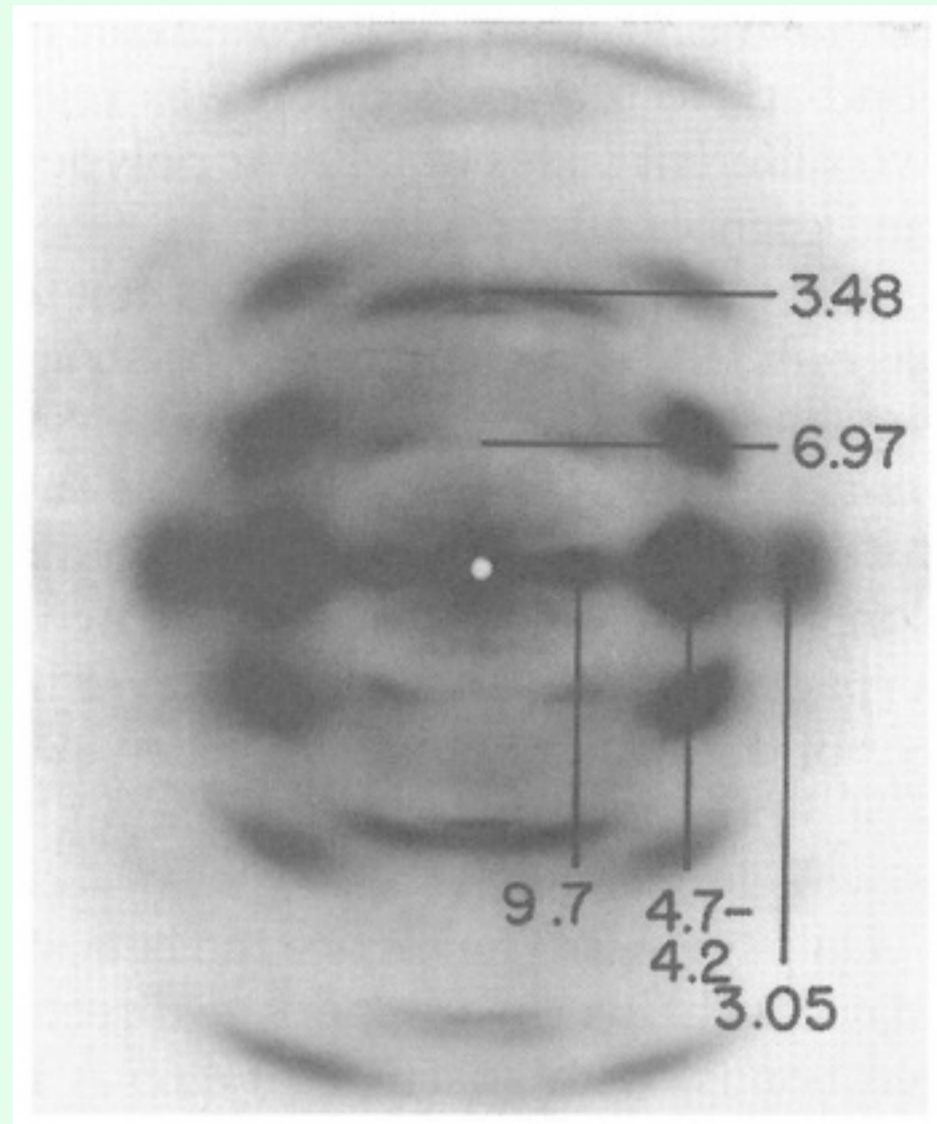
# 2種類の繊維写真

$\alpha$ パターン



ケラチン繊維

$\beta$ パターン



シルク繊維

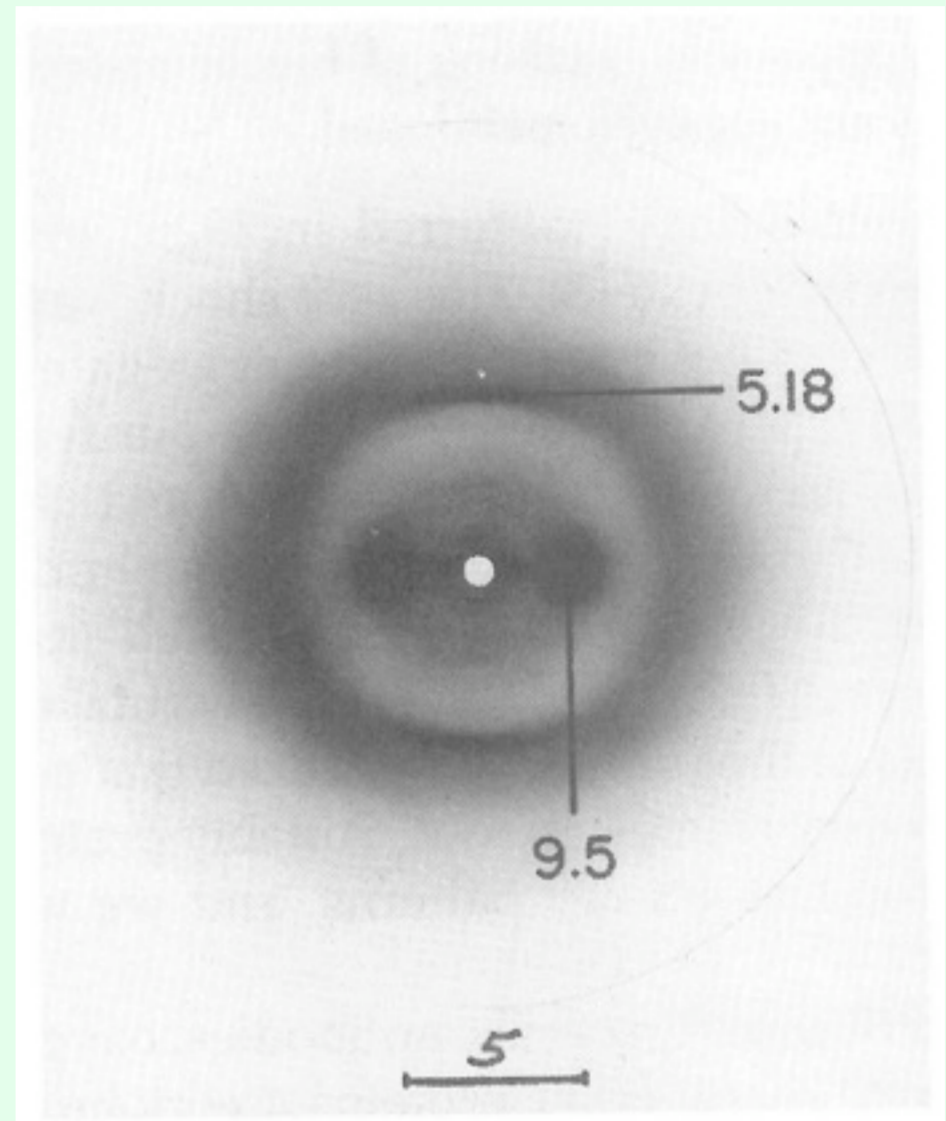
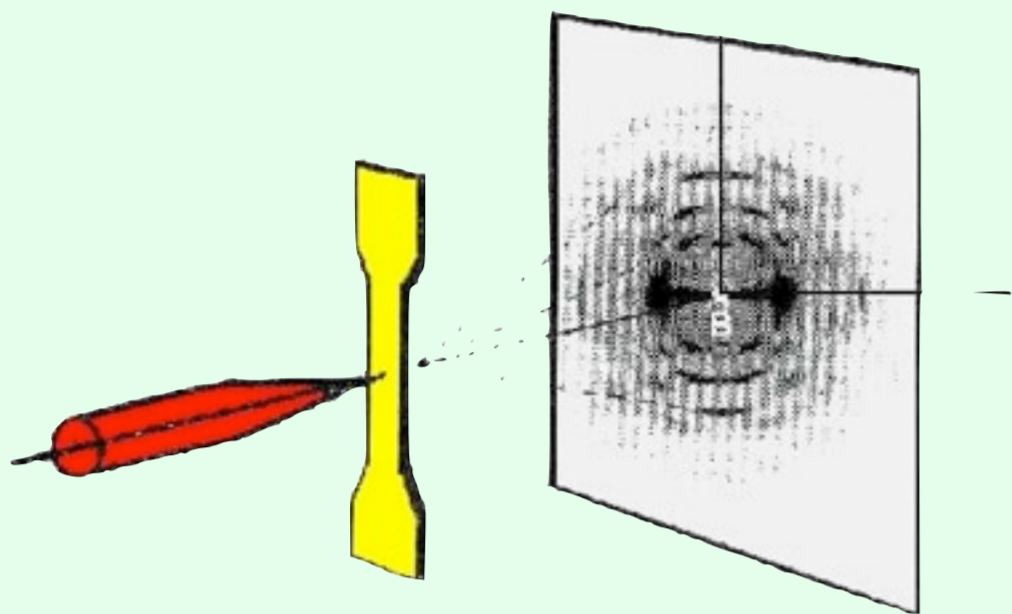
さて、繊維状蛋白質にX線を当て、回折写真を取ると、写真に2つのパターンがあることが分りました。

2つですから、アストベリーが順番にアルファパターンとベータパターンと名前を付けました。アルファパターンを与える蛋白質としてはケラチンが、ベータパターンを与えるものにはシルク(絹ですね)があります。

つまり、同じ繊維状の蛋白質であっても、どうも構造には2種類があるようだ、ということがこれで分ったわけです。後で出て来ますが、このアルファとベータがみなさんが良く知っているアルファヘリックス、ベータシートの「アルファとベータ」の由来です。知っていました?

この写真が意味するところは(分ります?), 回折写真にこういうスポットが写るということは、蛋白質繊維中には何らかの周期的な繰り返し構造がある、ということを示しています。スポットの位置が写真の中心に近いほど長周期、写真の周辺にあるほど短周期の繰り返し構造があるということです。

# $\alpha$ パターン

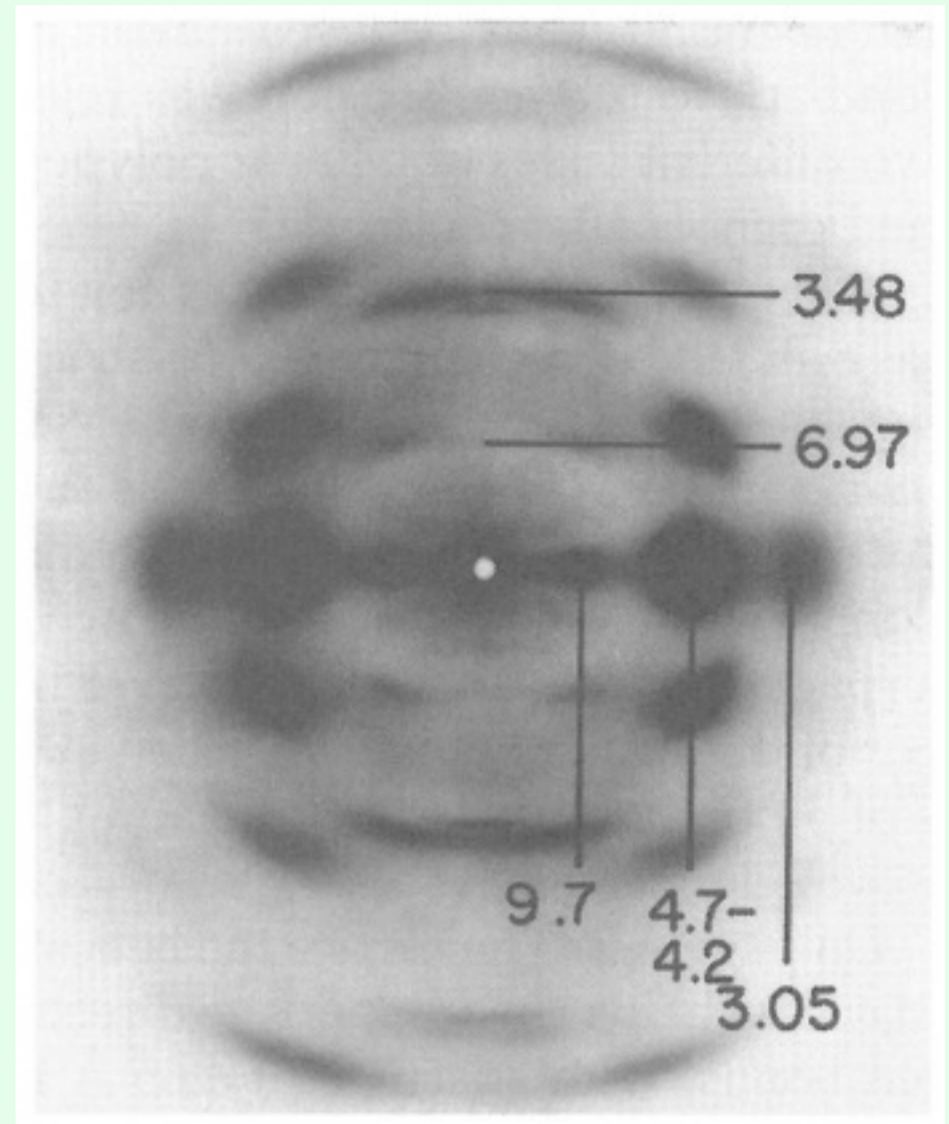
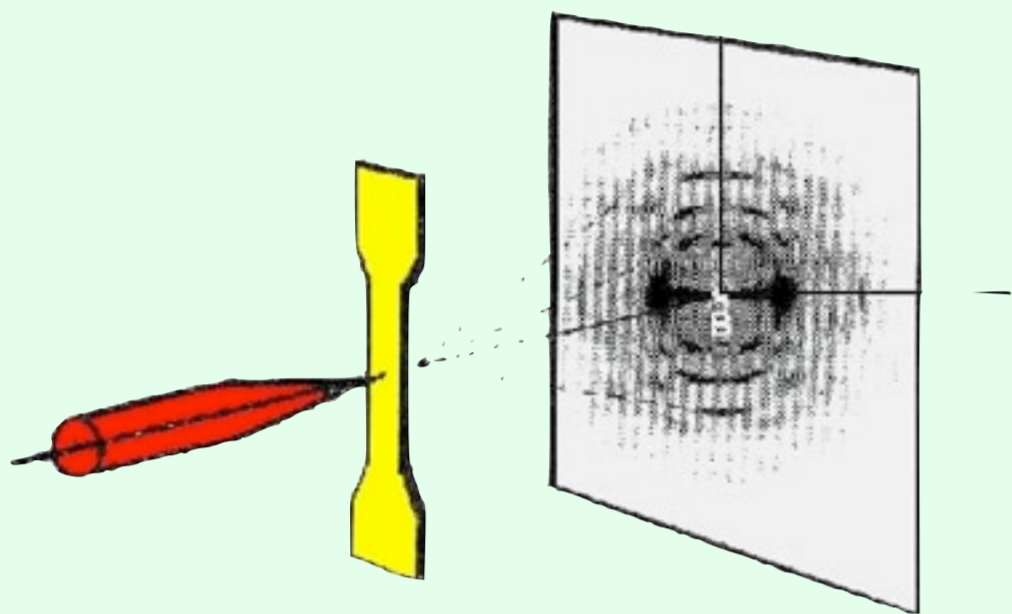


ケラチン繊維

さっきも見たように、実験では、こんなふうに繊維を保持してX線を当てています。

$\alpha$ パターンを与えるケラチンは繊維の方向に約 $5.2\text{\AA}$ の周期があり、繊維同士は約 $9.5\text{\AA}$ の間隔でパッキングしているらしい、ということが分ります。

# βパターン

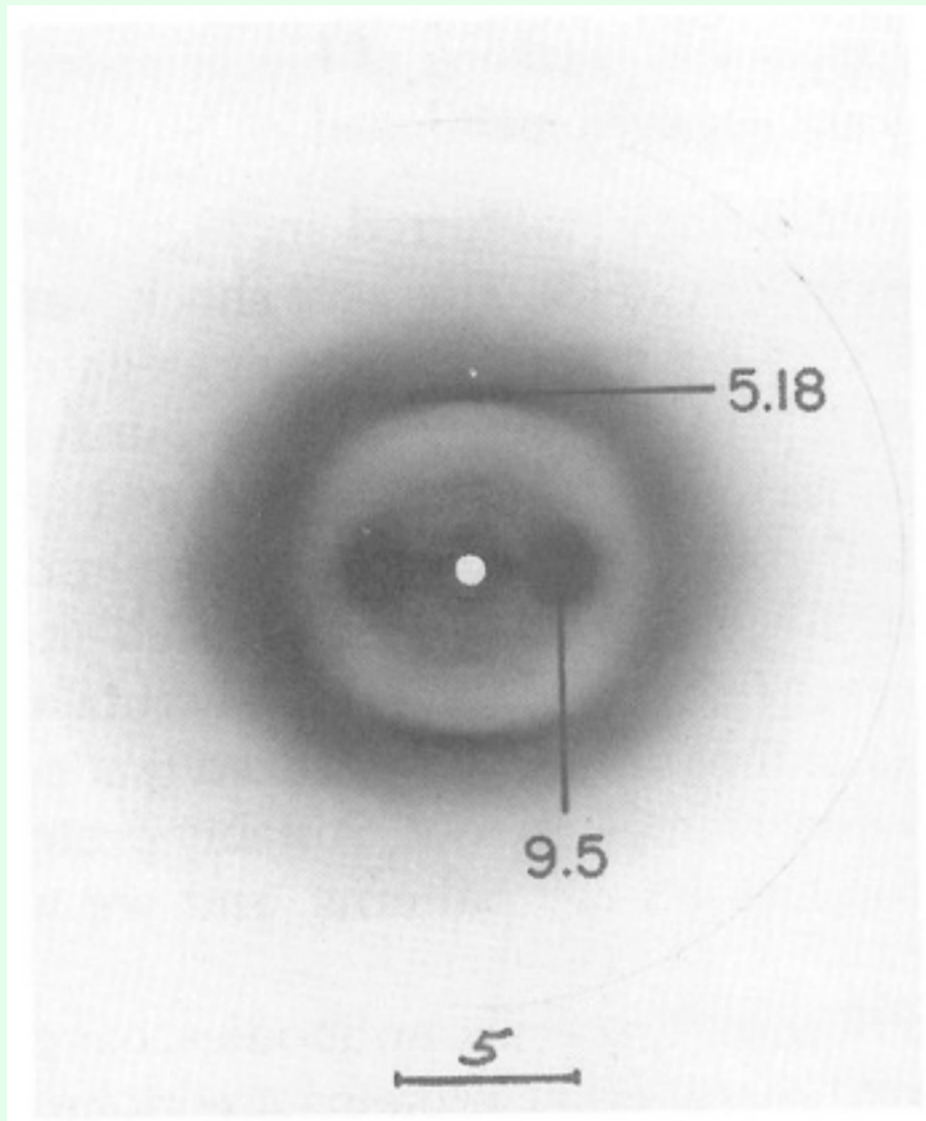


シルク繊維

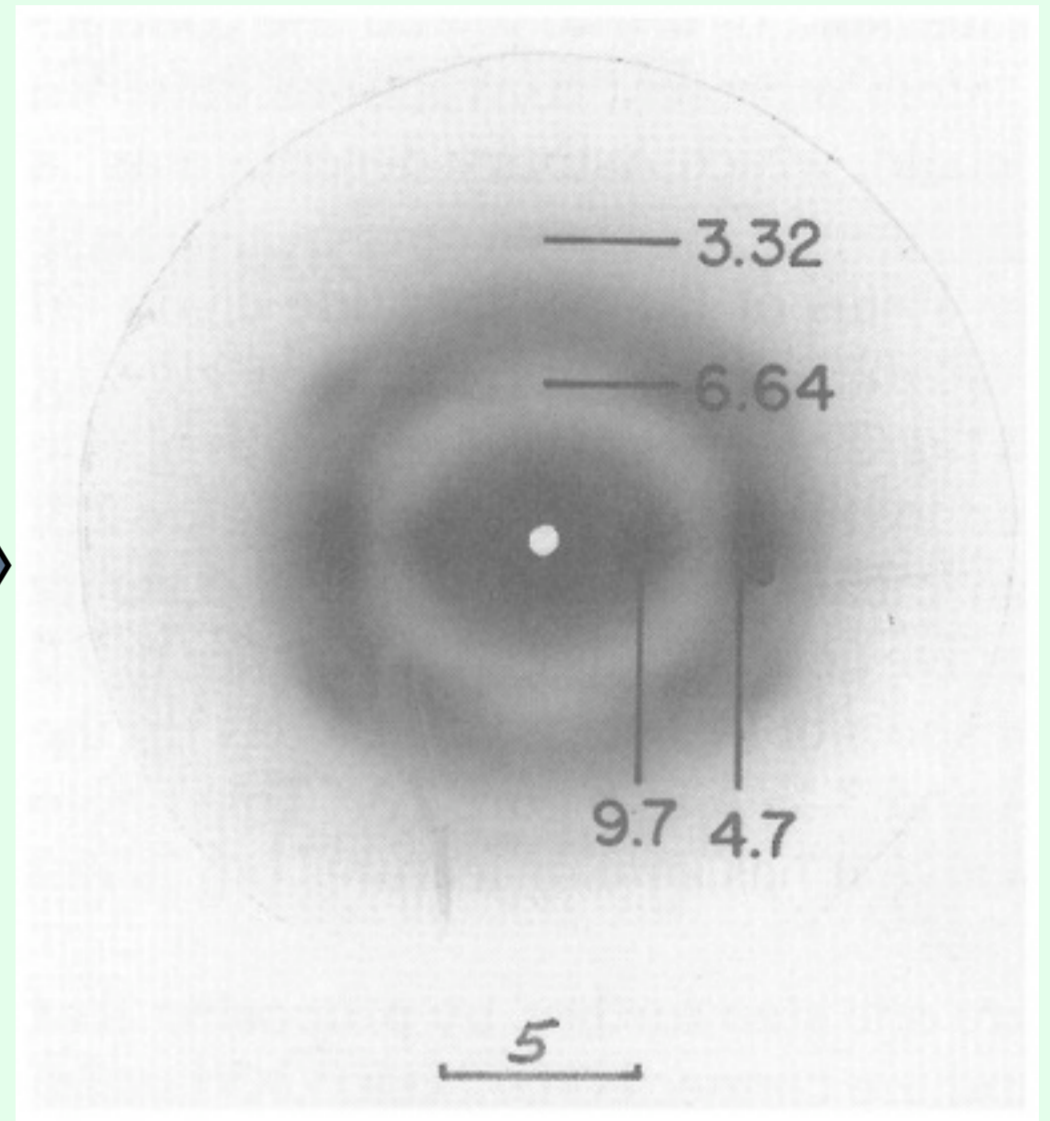
こっこのβパターンを与えるシルクの場合は、繊維軸の方向には約7Åや3.5Åの周期があり、繊維同士の間隔は9.7Å、4.7-4.2Å、3.1Åだということです。それから、こういう実験で、もう一つ大事なことが分りました。それは、

# 引っ張ったり緩めたり出来る

$\alpha$ パターン



$\beta$ パターン



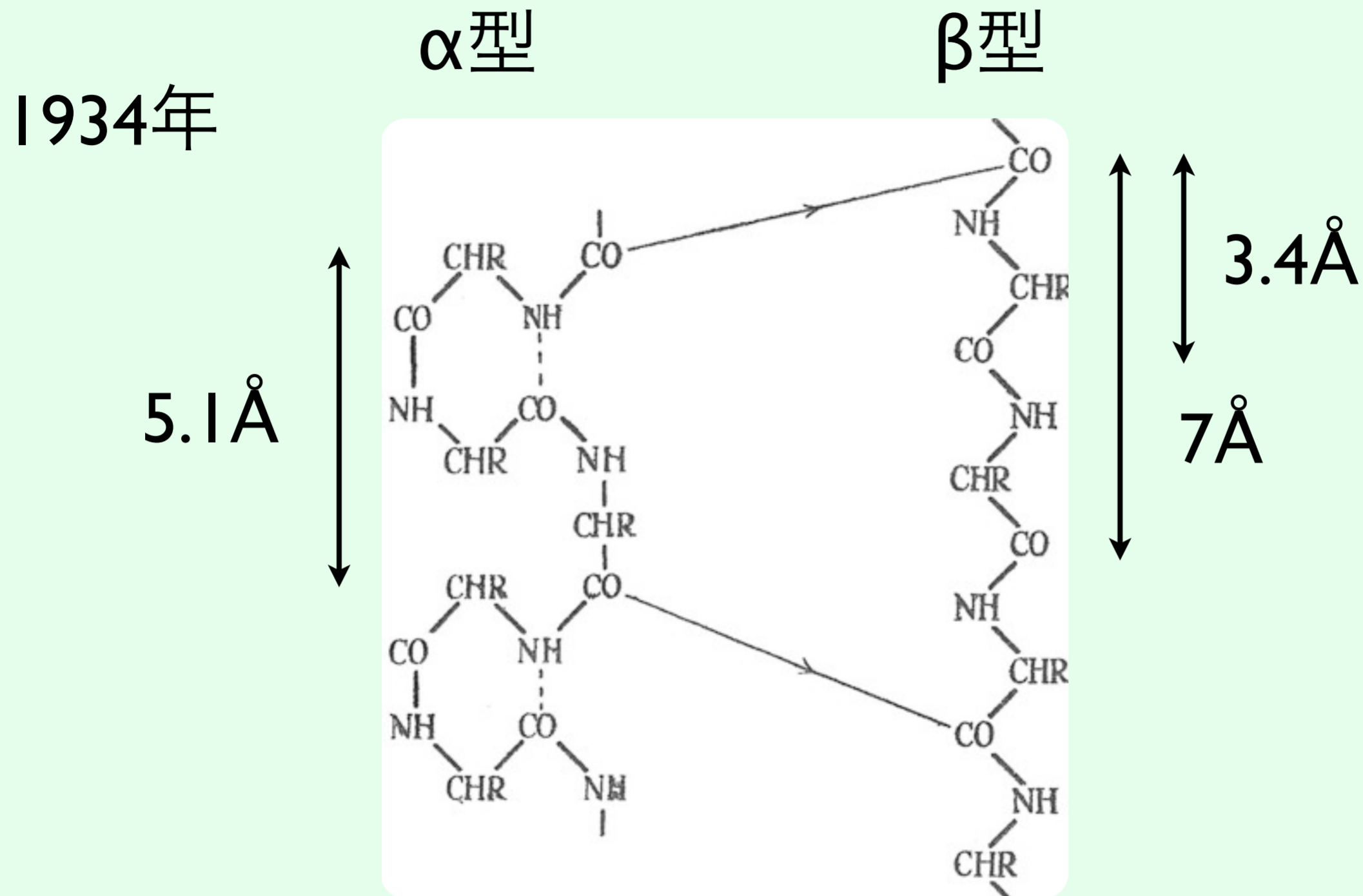
ケラチン繊維

面白いことに、アルファパターンを与えるケラチンは、その繊維を引き延すとベータパターンになり、ゆるめるとまたアルファパターンに戻ることが分りました。こんな感じです。

\*\*\*これで、どんな大事なことが分ったのでしょうか?\*\*\*

何らかの周期構造がある、しかも引き延したり戻したり出来る、といことで、繊維蛋白質は、コロイド状の物質なのではなく、どうやら鎖状の構造をしているようだ。つまり「ポリペプチド」に違いなさそうだ、ということが分ったわけです。

# アストベリーのモデル



15

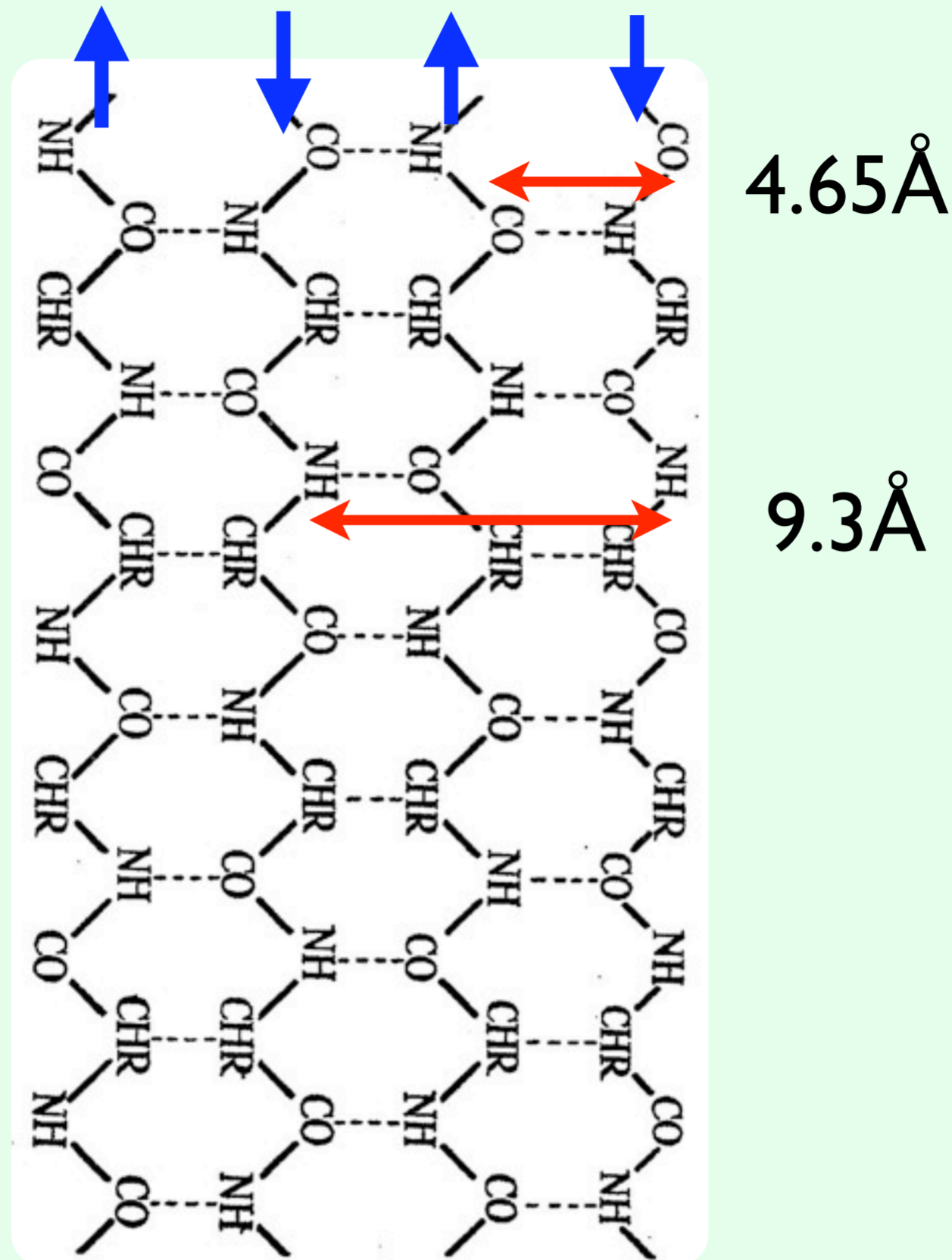
これらの「証拠」を説明するモデルとして、1934年にアストベリーはこのようなモデルを提唱しています。この論文は62ページあります。みなさんはまだ研究「論文」を見たことがないかも知れませんが、普通は多くても10ページくらいなので、この62ページはかなりの大作です。

さて、左がアストベリーの $\alpha$ 型で、右が $\beta$ 型です。さっき見たように、回折写真では、 $\alpha$ 型は繊維軸方向に5.18Å、 $\beta$ 型は3.48Åの周期があるはずで、

この構造であれば、周期もだいたい辻褃が合うし、この点々の部分は水素結合なので、引っ張ったり緩めたりして構造が可逆的に変わることも説明出来ます。実際、左側の構造は間違っていますが、この右側の構造は「正解」でした。

実は、この間違っている左の $\alpha$ 型の構造は、後の球状蛋白質の構造研究に良くない影響を与えます。そのことはまた後で出て来ます。

# βシート構造の提案



アストベリーは、この論文の中で、さらに進んで、ベータシート構造を提案しています。さっきも話したように、この論文は62ページもあって、このシート構造の提案は、なんとさっきのモデルの30ページも後です。

この構造は、隣りのチェーンが逆方向に向いていて、チェーン間に水素結合がかかっています。隣どうしのチェーン間の距離は4.65Å、厳密な周期はひとつ置きですから、約9.3Åごとということになります。

彼の構造の提案では、シルクはその繊維方向には共有結合の鎖で非常に強く、繊維に垂直な方向には今見た水素結合と、シートに垂直な方向にはファンデルワールス結合がある、ということになります。この構造は、後にポーリングらによって確かめられます。



# 球状タンパク質の 構造の探求

17

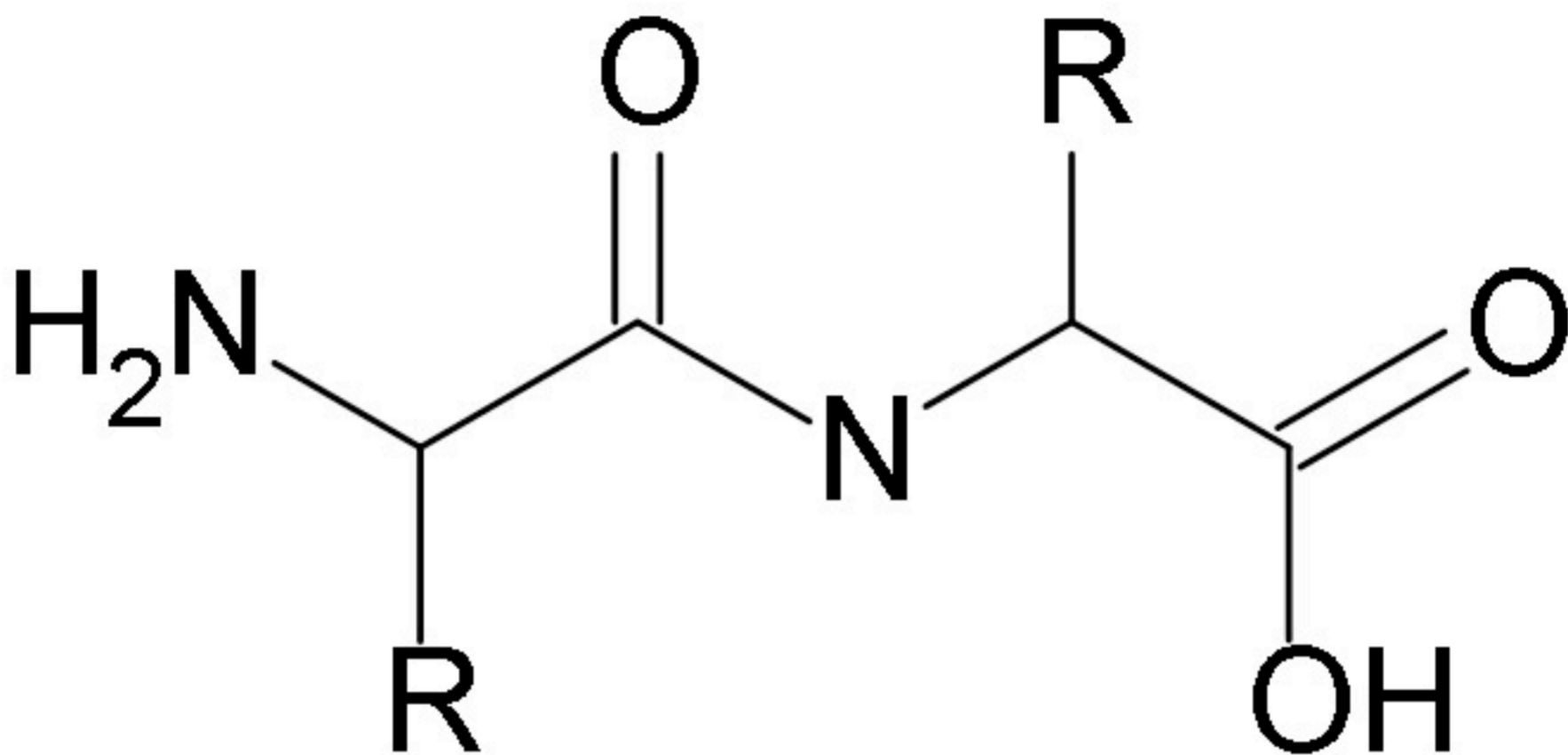
こうして $\beta$ タイプの方は構造が分りました。  $\alpha$ タイプの繊維の構造は解決するのに少し時間がかかりました。 今日の話はだいたい歴史に従っているのです、 ちょっと置いておきます。

さて、 こんどは球状蛋白質の話です。

変性した球状蛋白質はベータパターンを与えるので、 球状蛋白質も繊維状蛋白質に似ていて、 やはり鎖状のポリペプチドだろうと考えられました。 球状蛋白質は何らかのかたちで折りたたまれていると考えられますが、 それがどういう構造なのかは不明です。 球状蛋白質ですから繊維写真を撮影することは、 もちろん出来ません。 でもなんとかして構造が知りたい訳です。

実は、 球状蛋白質は繊維状蛋白質と違って、 結晶化することが出来ました。 そこから歴史が展開しますが、 まずは、 その前の話です。

# ペプチド結合 (復習)



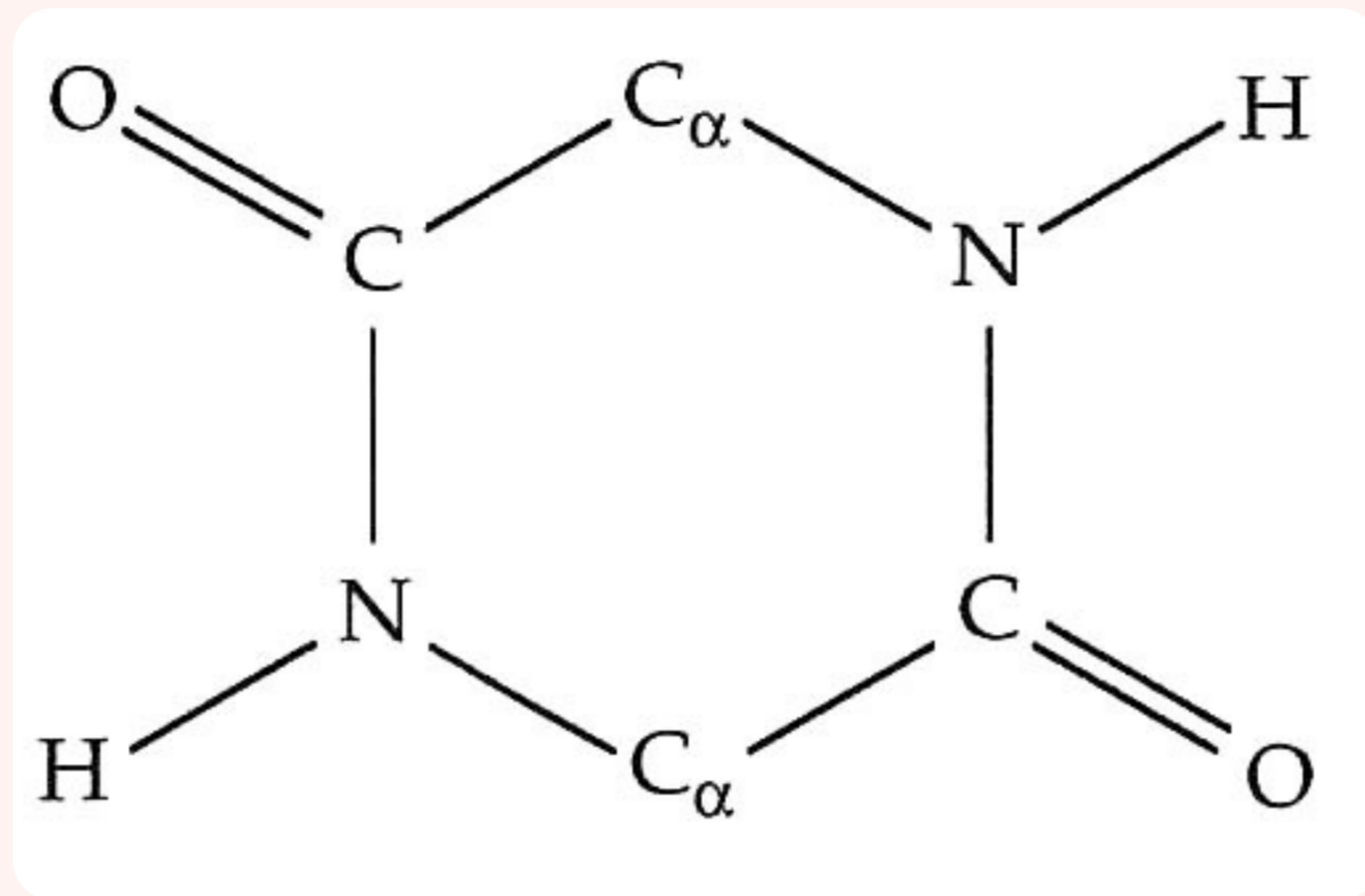
さて、さきほどのベータ構造でも分るように、このころまでには、蛋白質が鎖状のポリペプチドである、ということは確立されました。

これは2つのアミノ酸がペプチド結合した絵です。「復習」と書いてありますが、みなさんよくご存知と思います。

**\*\*\*ペプチド結合ってどういうものですか?\*\*\***

2個のアミノ酸が脱水縮合して出来たものですよね。では、この両側端同士がもういちどペプチド結合したらどうなりますか?

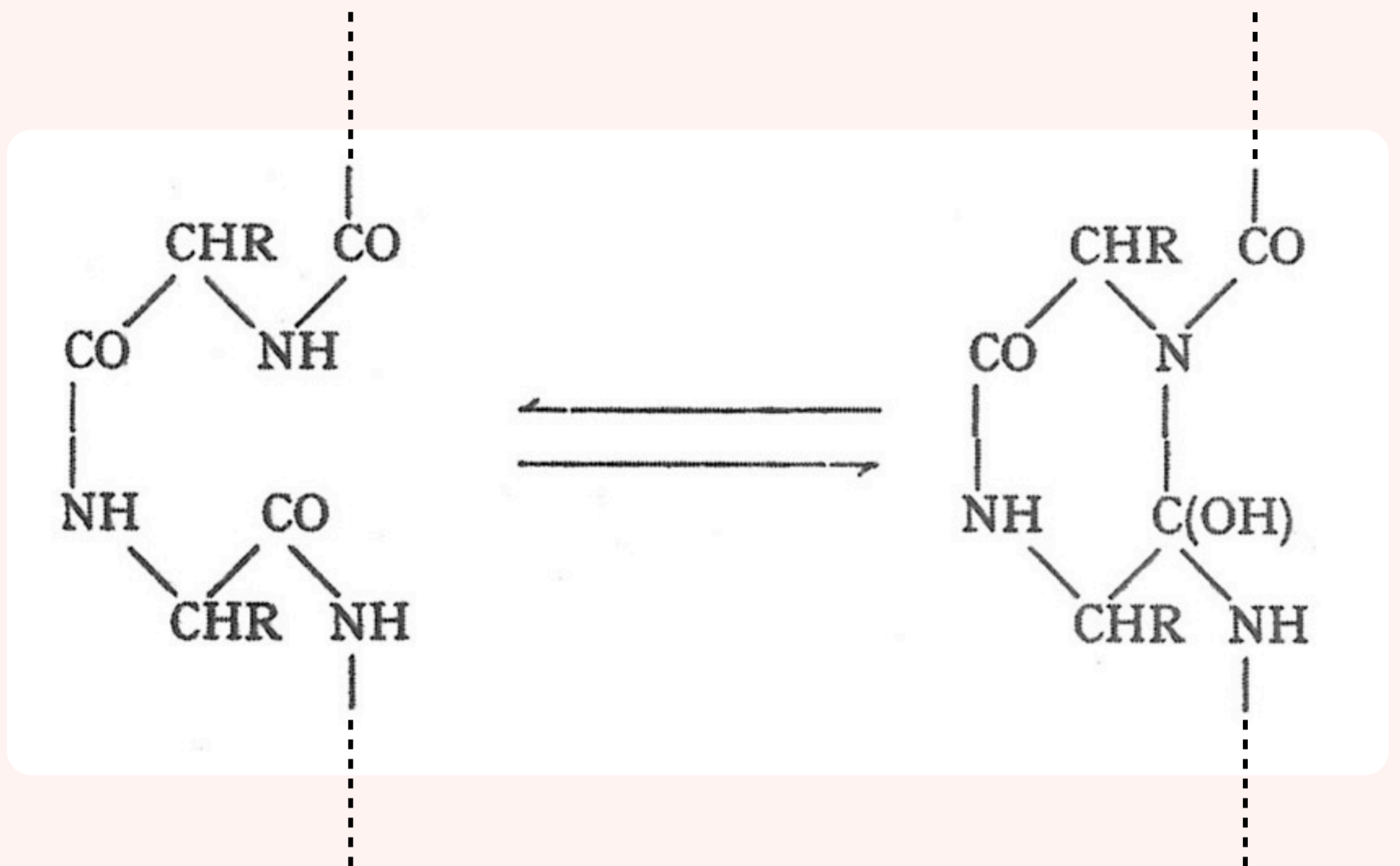
# ジケトピペラジン



こんなふうな環状の構造になります。これはジケトピペラジンですが、アストベリーが提案した $\alpha$ 型のモデルにも影響されて、1936年にリンチがサイクロールモデルを提唱することになります。

どういうことかというと、

# Wrinch のサイクロールリング



こんなふうに、アミノ酸が共有結合で環状構造をとって、それがずっと繋がっているというものです。

リンチは、このサイクロールリングが積み重なっているのが球状蛋白質だろう、として球状蛋白質の構造を説明しました。

# The Pattern of Proteins

By Dr. D. M. Wrinch, Mathematical Institute, Oxford

ANY theory as to the structure of the molecule of simple native protein must take account of a number of facts, including the following:

(1) The molecules are largely, if not entirely, made up of amino acid residues. They contain —NH—CO linkages, but in general few —NH<sub>2</sub> groups not belonging to side chains, and in some cases possibly none.

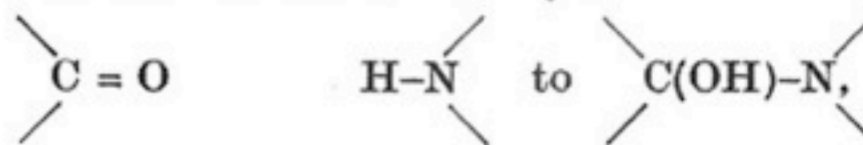
(2) There is a general uniformity among proteins of widely different chemical constitution which suggests a simple general plan in the arrangement of the amino acid residues, characteristic of proteins in general. Protein crystals possess high, general trigonal, symmetry.

(3) Many native proteins are 'globular' in form.

(4) A number of proteins<sup>1</sup> of widely different chemical constitution, though isodisperse in solution for a certain range of values of pH, split up into molecules of submultiple molecular weights in a sufficiently alkaline medium.

The facts cited suggest that native protein may contain closed, as opposed to open, polypeptides, that the polypeptides, open or closed, are in a folded

whereas the distance in our case is at most 1.54 Å. By using the transformation\* suggested by Frank in 1933 at a lecture given by W. T. Astbury to the Oxford Junior Scientific Society,



which has already proved useful in the structure of α-keratin<sup>2</sup>, the situation is at once cleared up and we obtain (Fig. 1) the molecule 'cyclol 6' (the closed

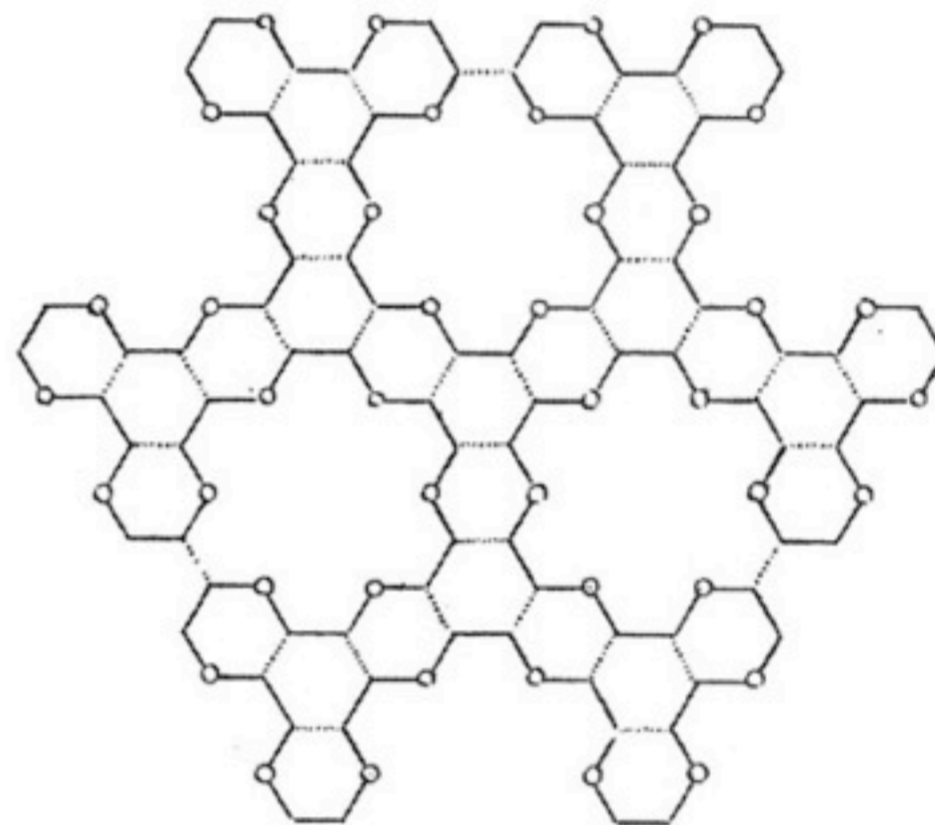
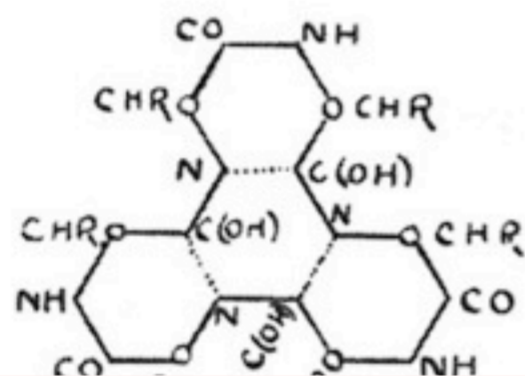


FIG. 2. A 'cyclol 42' molecule.

これが1936年のNatureに掲載されたリンチの論文の一部です。例えば42個のアミノ酸が結合して環状になっているとすると、このような構造を取っているのだろうという提案です。

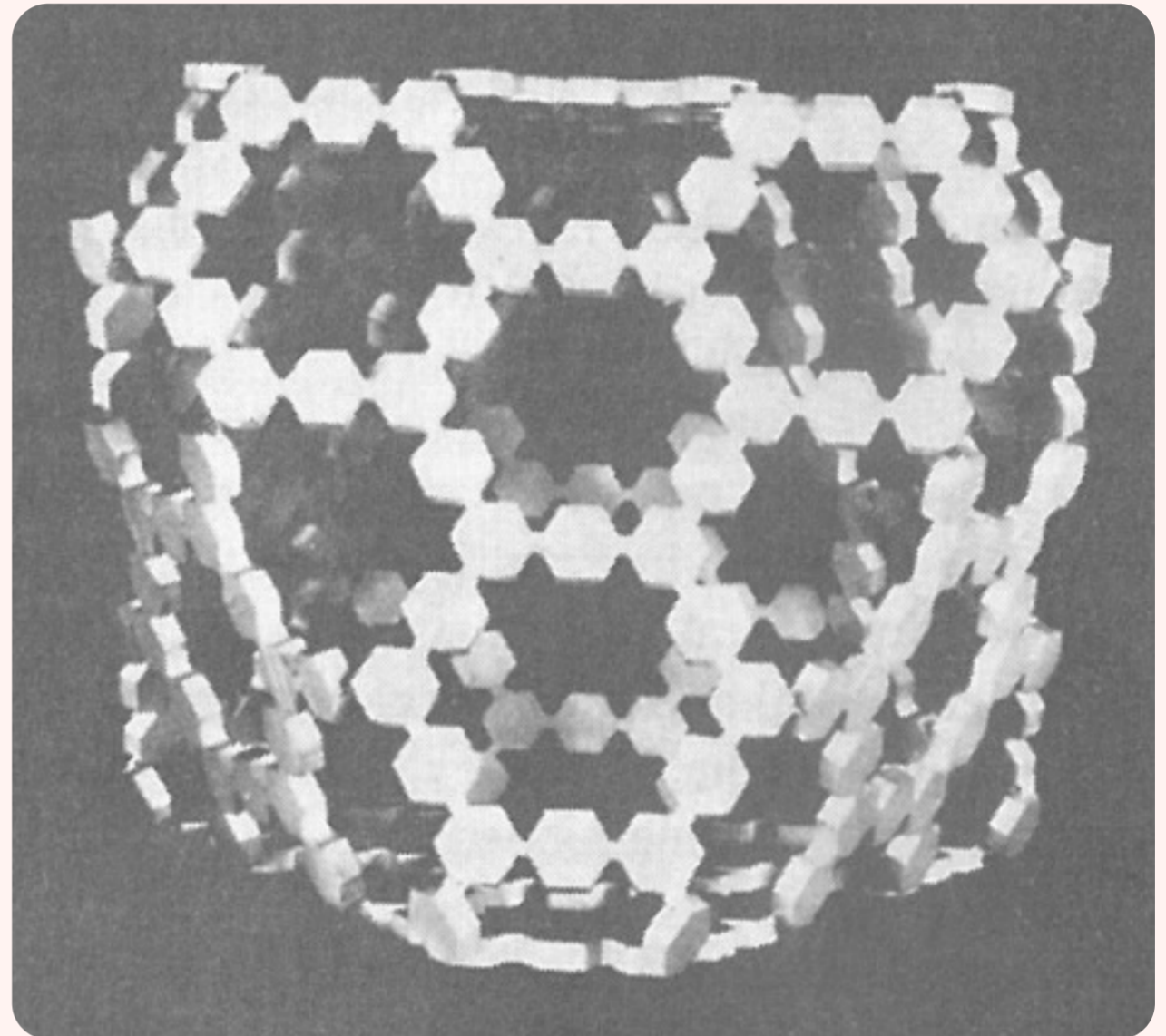
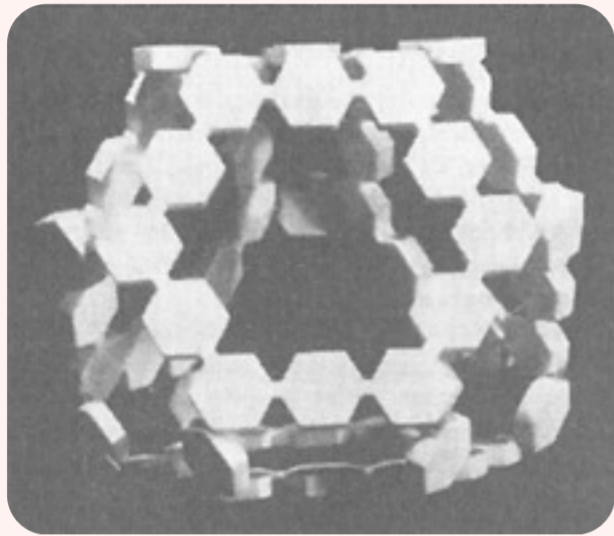
リンチはさらにこのサイクロール理論を進めて、立体構造を説明しようとして、翌年のNatureにも、こんな論文を書きます。

## The Cyclol Theory and the 'Globular' Proteins\*

By Dr. D. M. Wrinch

A NUMBER of facts relating to proteins<sup>1</sup> suggest that the polypeptides in native proteins are in a folded state<sup>2,3</sup>. The type of folding must be such

can then be stated precisely as follows. Is it possible for a cyclol network to bend across one line after another so that it joins up and thus surrounds a

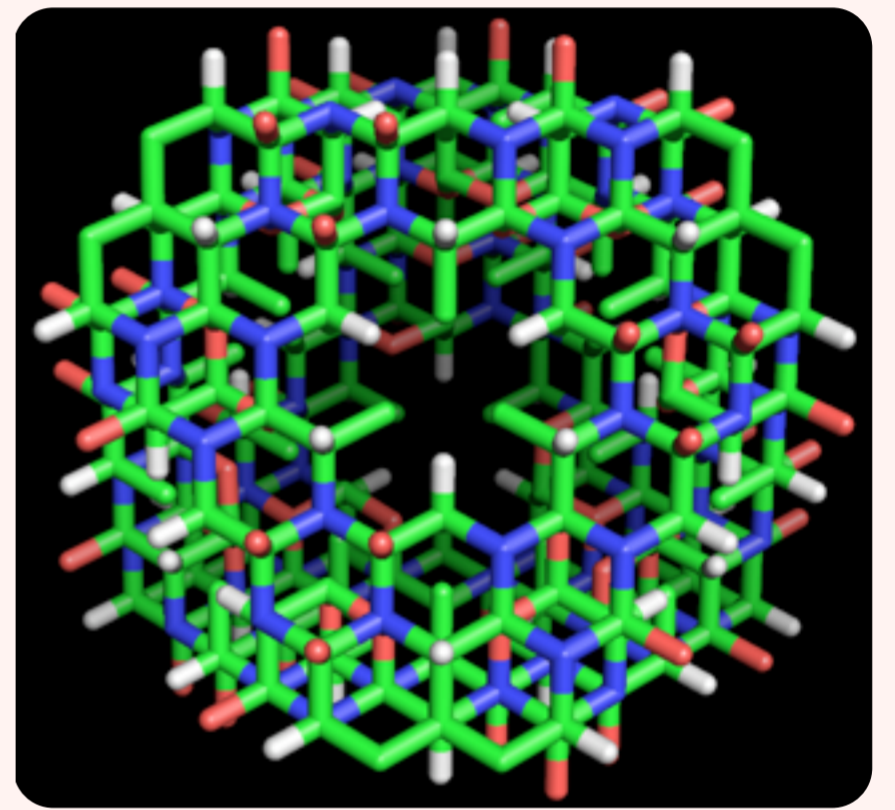


当時、超遠心分析の実験から「蛋白質の分子量は17,600の整数倍になっている」という主張がありました。この左のモデルは72個、右のモデルは288個のアミノ酸からなっています。288アミノ酸だとすると、およその分子量は34,560になって、17,600の2倍でちょうど良く、このカゴ状の構造こそが「球状蛋白質の立体構造だ」という主張です。

\*\*\*この構造を見て、どう感じますか?\*\*\*

# 「美しさ」

巻き起る議論



23

リンチのこのアイデアには、実は実験的に確かな証拠は何もありません。ただ、複雑な蛋白質分子にも対称的な「美しさ」があるこのリンチの提案は、コロイド化学の大家であったラングミュアがこれを支持したこともあって、結構受け入れられました。おそらく、この当時、最初に見たケンドリューとペルーツのミオグロビンのモデルのような、「美しくない」訳の分らない構造を提案したら笑い飛ばされていたでしょう。

実は日本では、このサイクロール説は1950年台まで教科書に載っていたそうです。

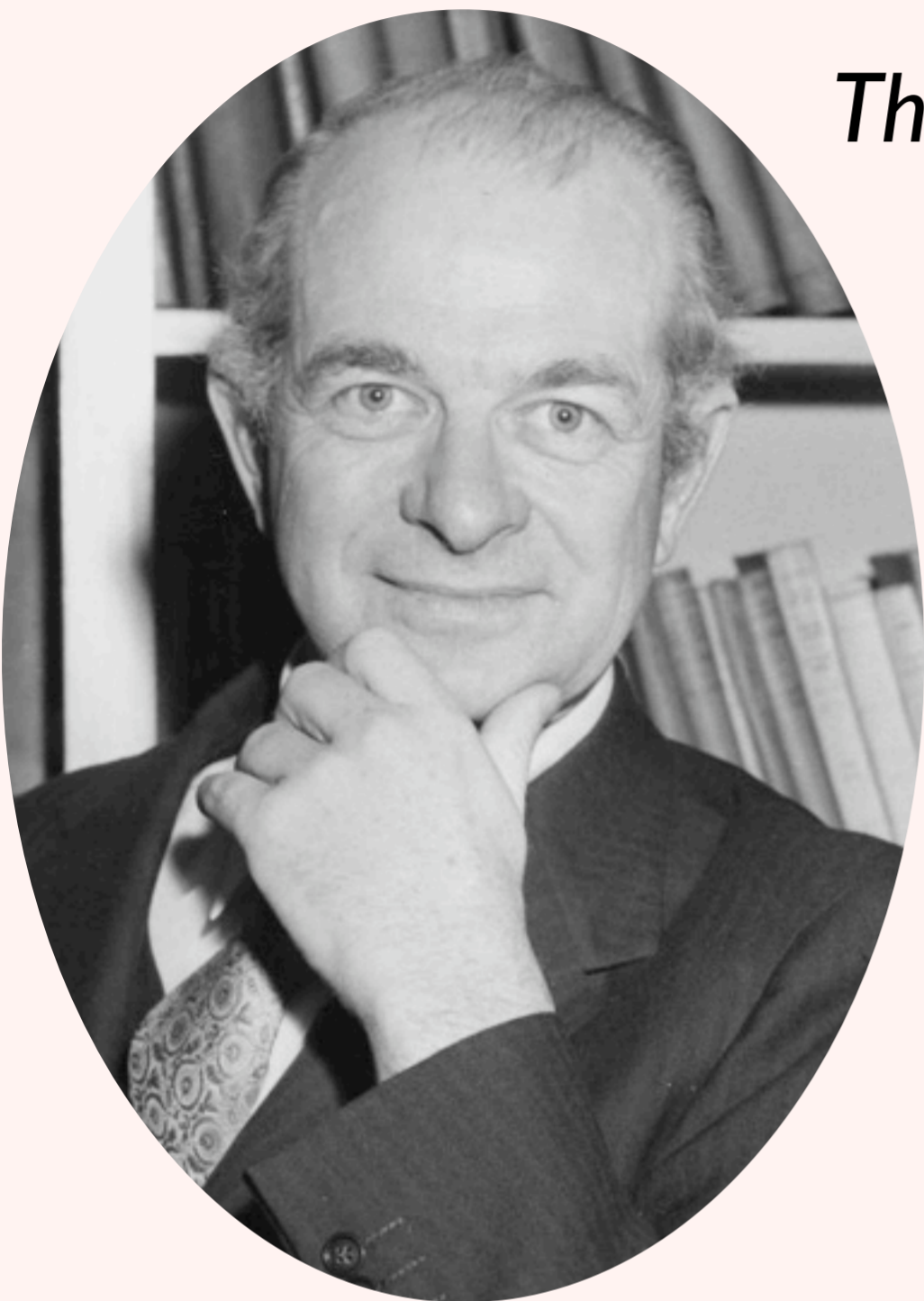
しかし、特にカルテックのポーリングらは、この説に強く反対しました。サポーターと反対論者の間で「議論」が巻き起こったのです。

# Paulingの道具

*The theory of chemical binding*

## 化学結合論

量子力学に基礎を置く論理的な議論



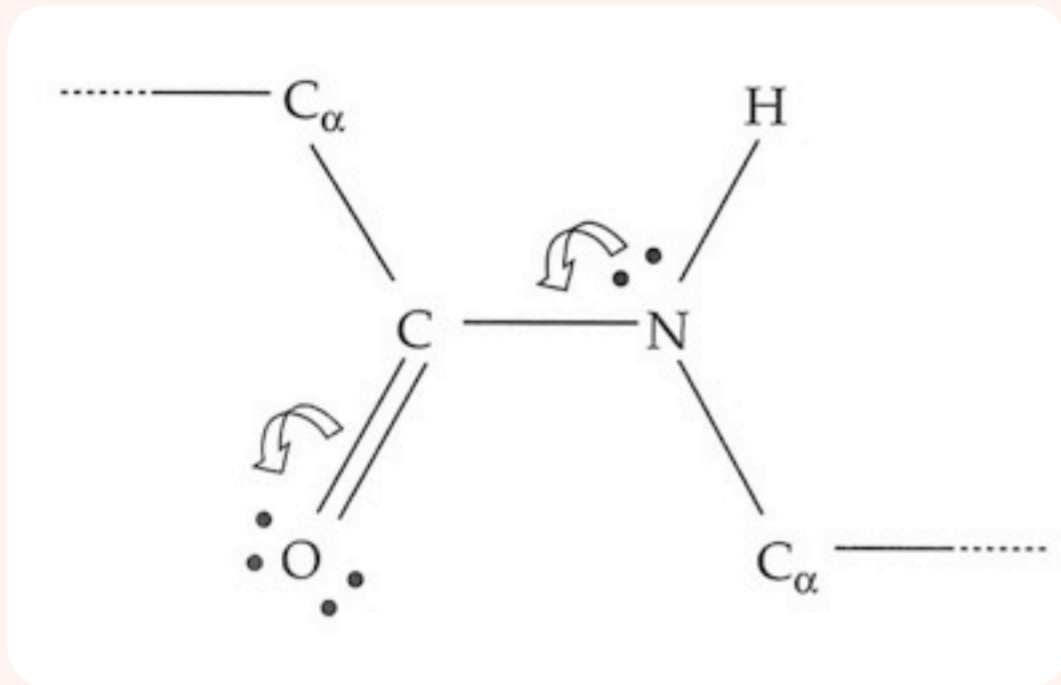
ポーリングの反論の道具(ツール)は化学結合論です。彼らは、1930年代に確立された、量子力学に裏付けられた結合エネルギーの熱力学を駆使して、「自然は対称的で美しいはず」というサイクロール説に「論理的に」反論しました。

特に、ポーリングが提案した重要な概念は「共鳴構造」という概念です。高校の化学でも習いますよね。

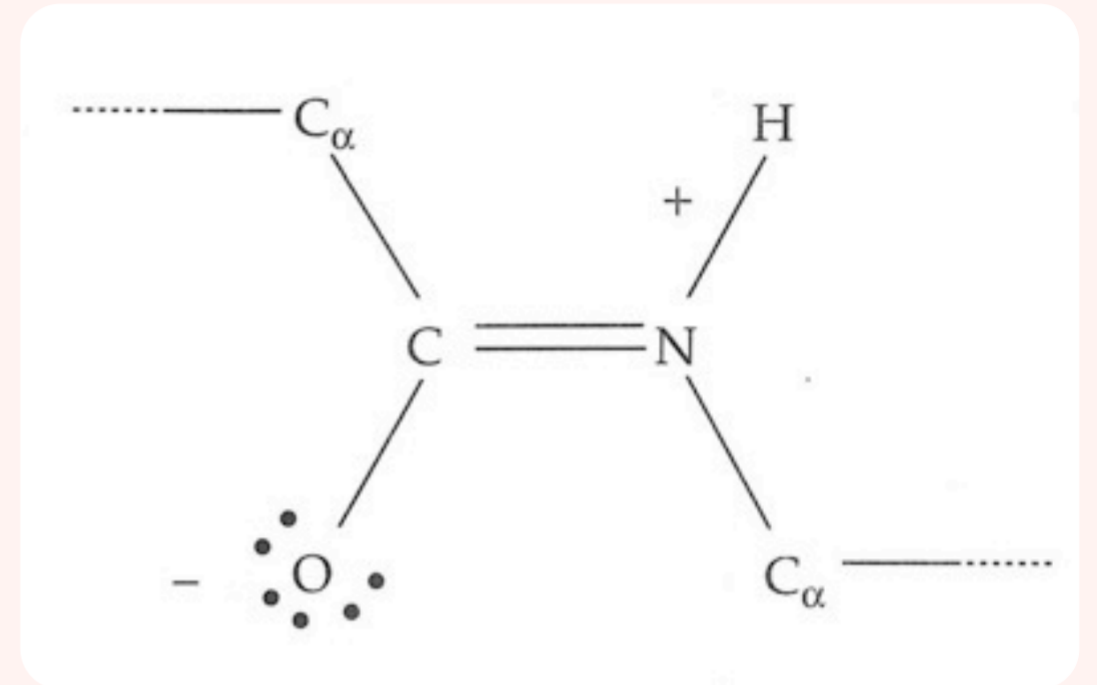
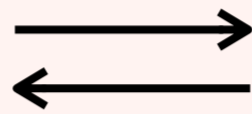


# 共鳴構造

## Resonance



1.49Å

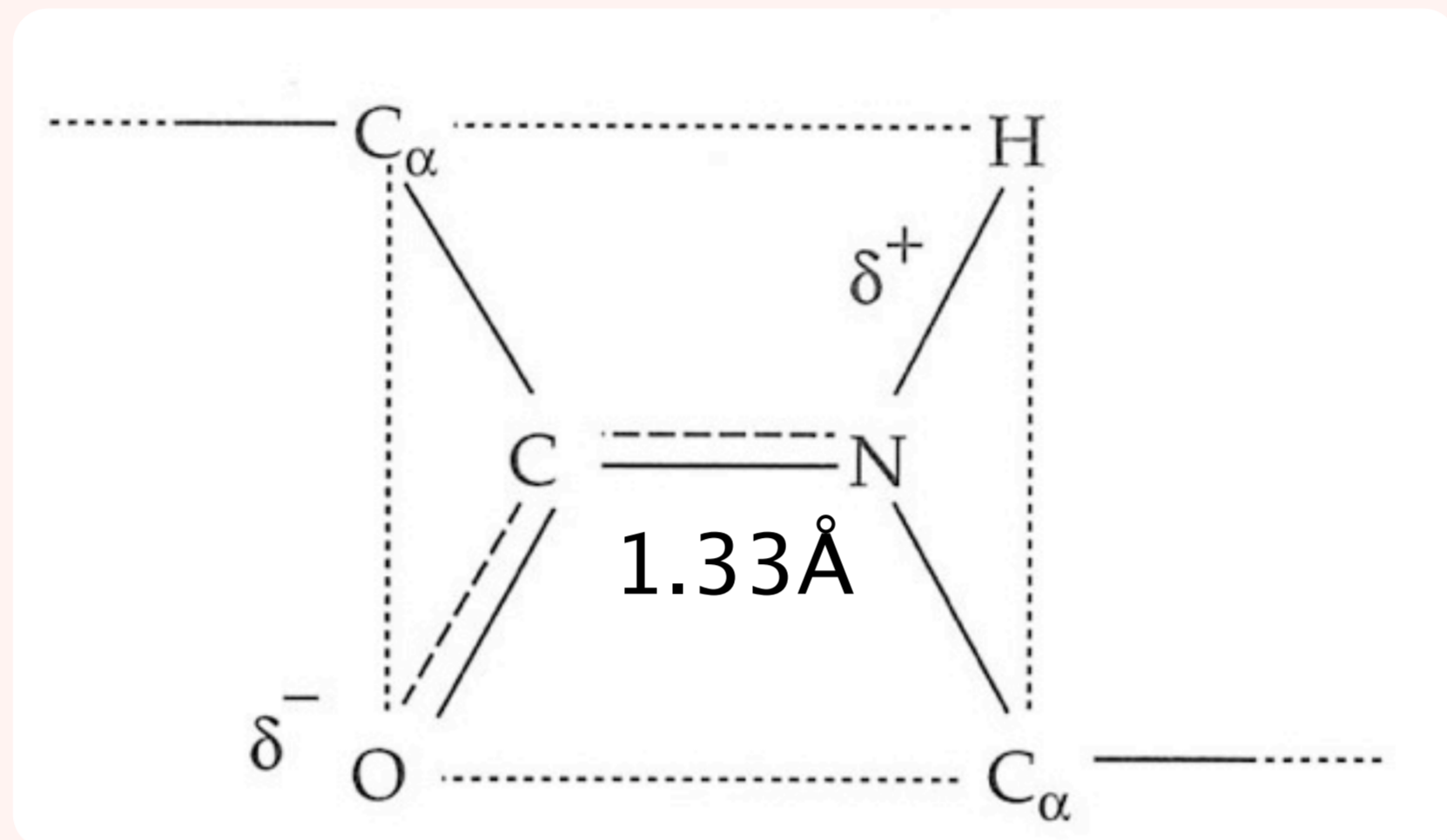


1.27Å

よくご存知と思いますが、ペプチド結合の共鳴構造はこういう感じです。この共鳴のため、ペプチド結合C-Nは一重結合と二重結合の間間的な性質を持っています。

当時、小さい分子はX線結晶構造解析が可能になって来ていて、この共鳴の概念は、実際にジペプチドのX線結晶構造解析で確かめられました。C-N一重結合は1.49Å、C=N二重結合は1.27Åだったので、ジペプチドのC-N間距離は、その中間の1.33Åだったのでした。

# 共鳴構造のポイント



26

ペプチド結合は、この共鳴によってただの一重結合よりも $21\text{kcal/mol}$ だけ安定化しています。

さらに、この共鳴構造には「構造」の面でも2つの重要なポイントがあります。

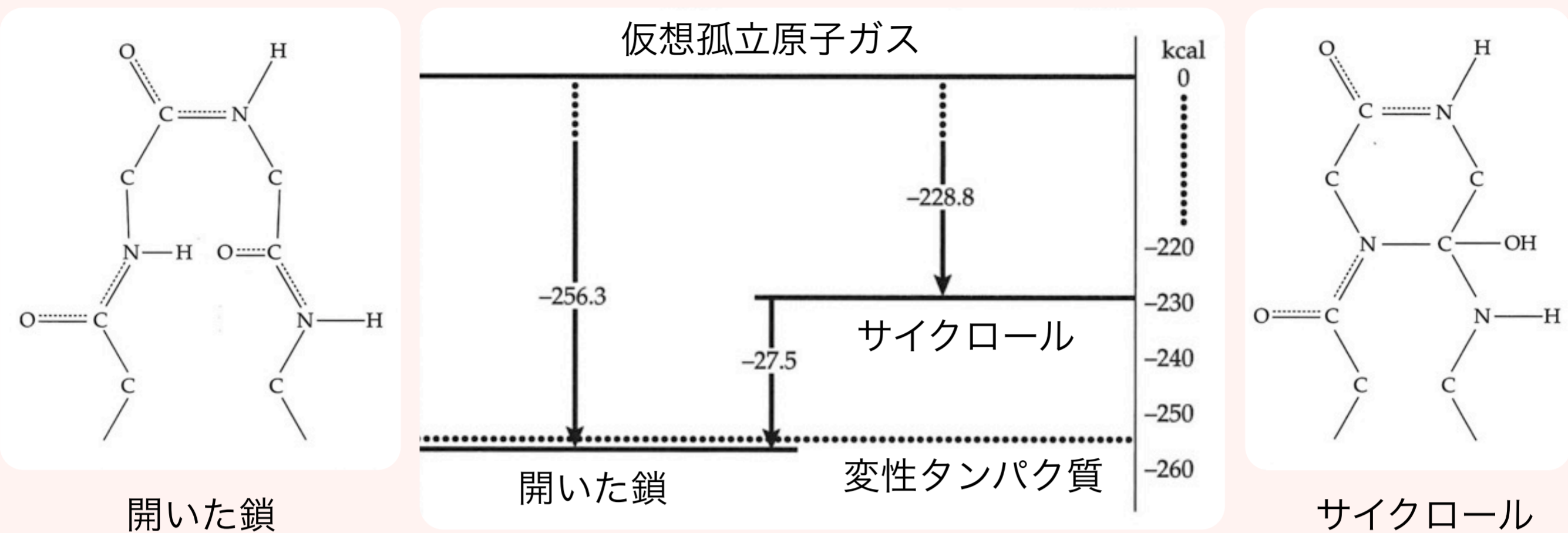
\*\*\*何ですか?\*\*\*

ペプチド結合の「平面性」と「チャージ分布」です。

平面性は蛋白質すなわちポリペプチドの鎖の折り畳まれ方に重要な制限になりますし、このチャージの偏りのために、ポリペプチドの鎖は主鎖間で容易に水素結合を形成し、構造を安定化することが出来るわけです。

# 化学結合エネルギーとサイクロール

エネルギー図



さて、ポーリングらは、この化学結合論を使って、開いた一本の鎖の状態と、サイクロール結合が一箇所形成された状態のエネルギー(エンタルピーですが)を計算しました。この図は仮想的な孤立原子状態を基準として、どれだけエネルギーが安定化されているかを示しています。

\*\*\*こういう図は見たことがありますか? 説明してみてください\*\*\*

下にいくほど安定なのです。

左の開いた一本の鎖状態であれば、変性蛋白質よりも安定であり、そういう構造を取ることが出来るが、右のように一箇所サイクロールの結合が出来ると、それだけで変性状態よりもエネルギー的に不安定なので、そんなものは存在しない、ということが分るわけです。

しかし、この化学結合論自体が新しい考え方だったということもあり、しばらく論争は続き、それぞれの説を信じる者は、それぞれの説を信じていた状態が1940年台まで続きます。

# 1930年代後半の状況

**Astbury :**

一つのタンパク質の完全な構造解析が必須だ.

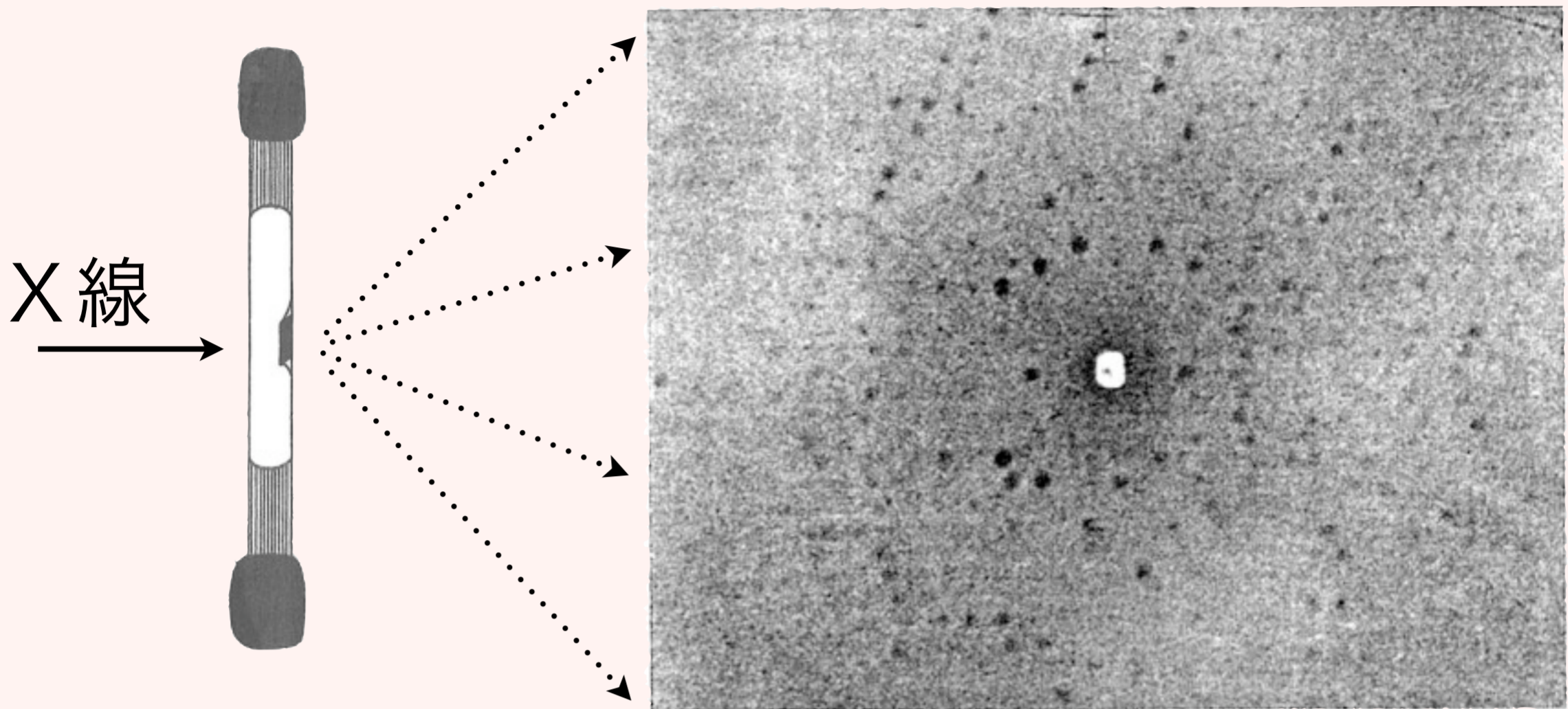
**Pauling :**

複雑なタンパク質分子中の原子位置を決定することは、これからもまず出来ないだろう.

実は、この当時、ポーリングはタンパク質の複雑さを考えると、タンパク質のX線結晶構造解析はずっと無理だろうと思っていました.

アストベリーは、積極的に構造解析の必要性を唱えていたのに対して、ポーリングは、どっちかという「そんなの出来っこない」と言っていたのです.

# タンパク質の「結晶」の登場



ヘモグロビンの結晶のX線回折写真  
(1937年 ペルーツらが撮影)

29

こうした議論も、トリプシン、キモトリプシン、ペプシンといった比較的小型の蛋白質が結晶化されたことで状況が変わって来ます。当時、ジペプチドのような小型の分子であれば、なんとか結晶構造解析も可能な時代になりつつありました。「結晶化することが出来る」、ということは「**原理的には**」構造を解析することが出来る、ということの意味します。

これは、1937年にペルーツ、ファンクーヘン、バナールが撮影したヘモグロビンの結晶のX線回折写真です。今日は「回折」の原理の詳細な話はしませんが、分子が規則的に並んでいる結晶にX線を当てると、こんなふうに点々が写ります。タンパク質の結晶そのものは、もう少し前から出来ていたのですが、このようにキャピラリーに封入してやるということに気がつくまで、ろくな回折写真が得られなかったのです。

**\*\*\*封入すると良かったのはなぜですか?\*\*\***

# Bernalの決意

J.D.Bernal がタンパク質結晶構造解析の  
研究グループを組織



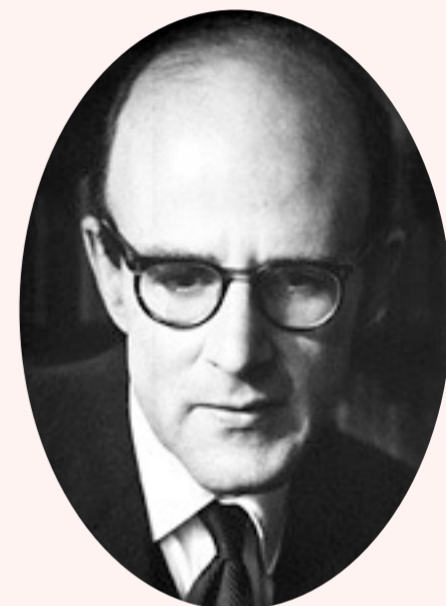
1933年：D.C.Hodgikin

ペプシン，インシュリン



1936年：M. Perutz

ヘモグロビン



当時は、ようやく小さい分子のX線結晶構造解析が可能になって来ていた頃でもあり、このような写真が撮れても、蛋白質の複雑な構造が解析出来るということに直ちに繋がらなかったのです。さきほど見たようにポーリングも不可能だと考えていました。しかし、「結晶になるなら解析することが出来る」という強い信念で、バナルがX線結晶構造解析を決意し、イギリスのケンブリッジに研究室を作りました。1933年にドロシーが、1936年にペルーツが加わります。

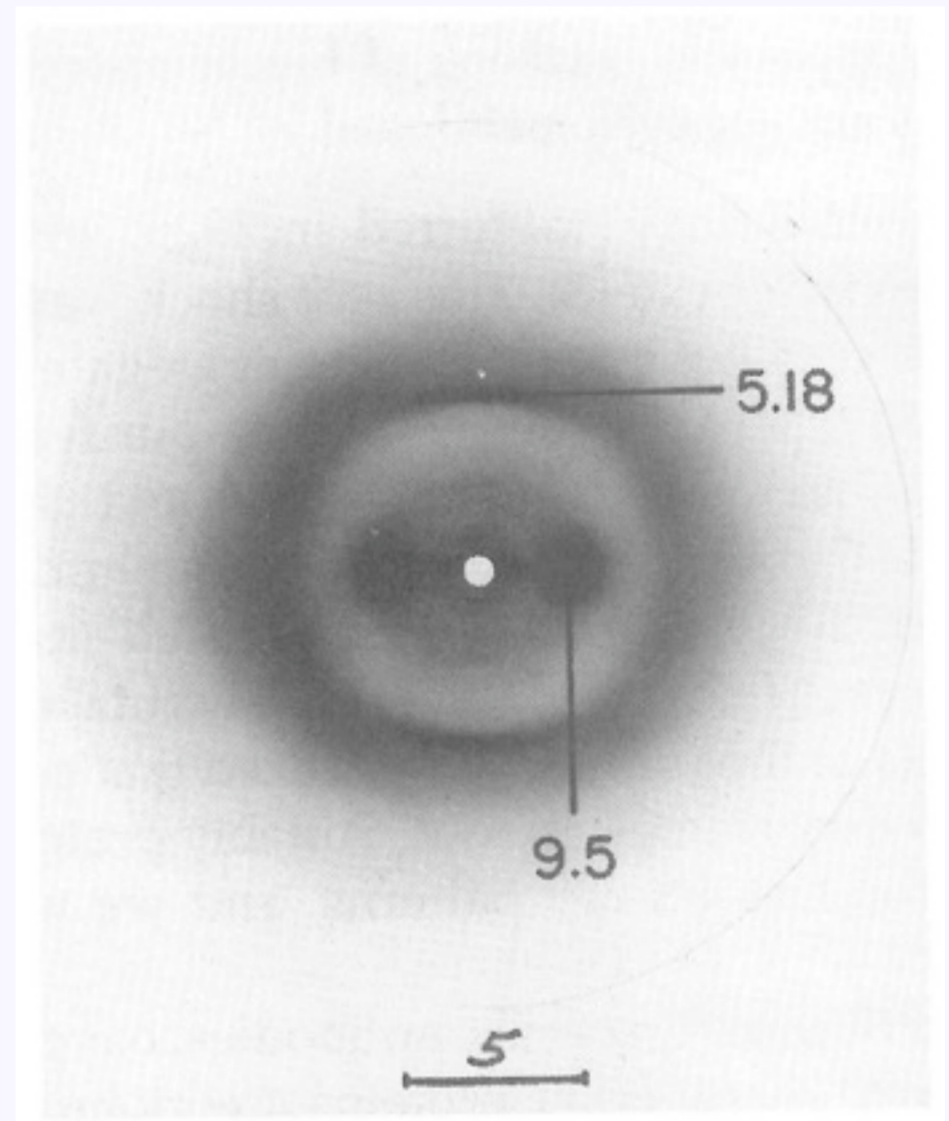
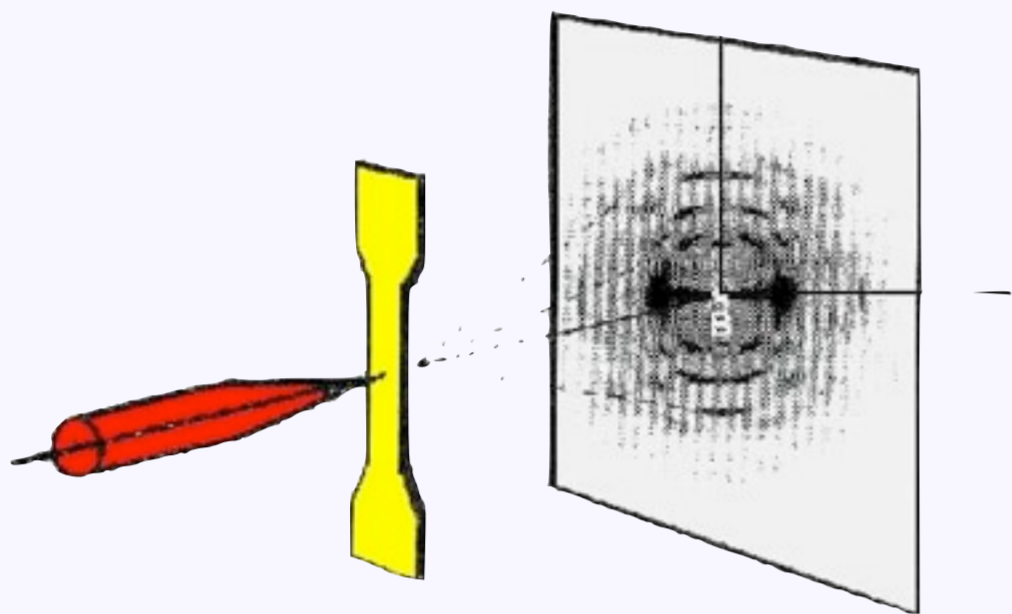
「タンパク質はコロイドかも」という時代は終わりました。

# 残された課題

蛋白質の結晶構造解析の話は、ちょっと置いておきます。

さて、タンパク質分子全体の構造も未知ですが、アストベリーの繊維写真の2つのパターン的一方、アルファ型の構造は未知のままです。

# $\alpha$ パターン



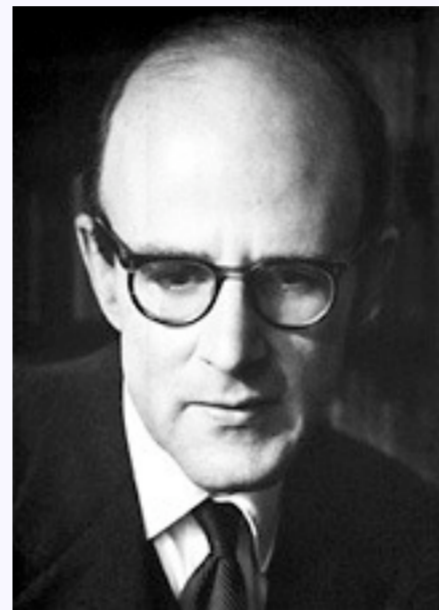
ケラチン繊維

アストベリーのベータケラチンの「伸びた鎖」の構造は一般的に認められていましたが、折り畳まれたアルファ構造はなぞです。この繊維軸方向の $5.18\text{\AA}$ の周期性を説明することが出来る、もっと良い解釈が求められていました。

実は、この $5.18\text{\AA}$ には落とし穴があったのですが、それはまた後で話します。



# Braggのチーム



Perutz

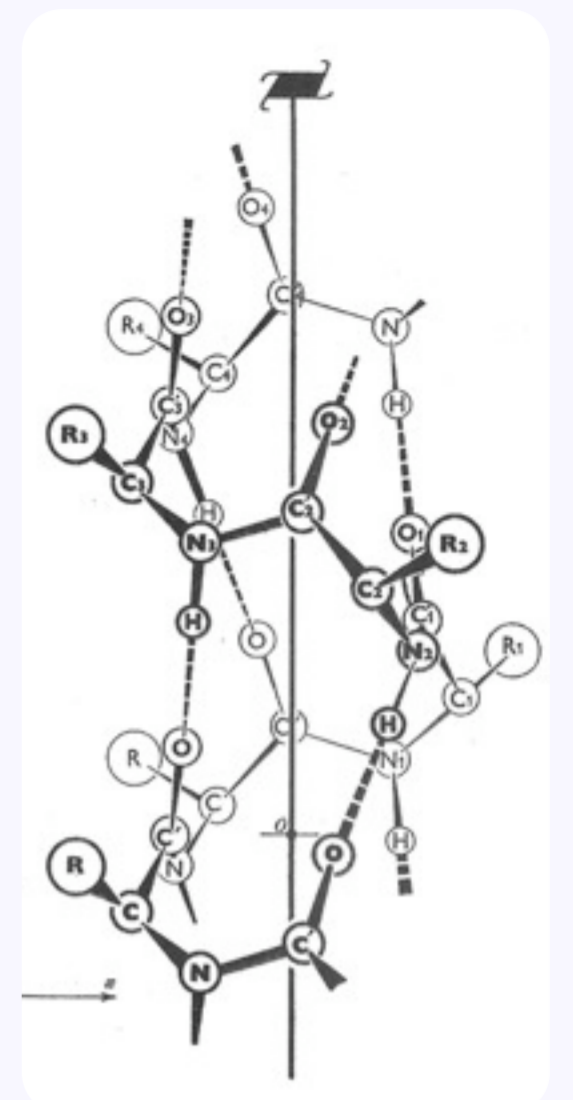
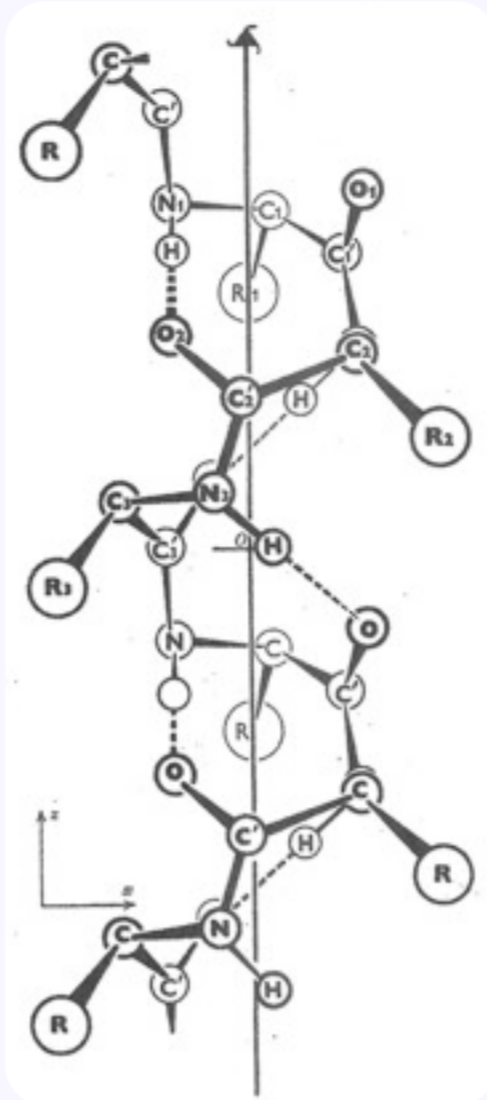
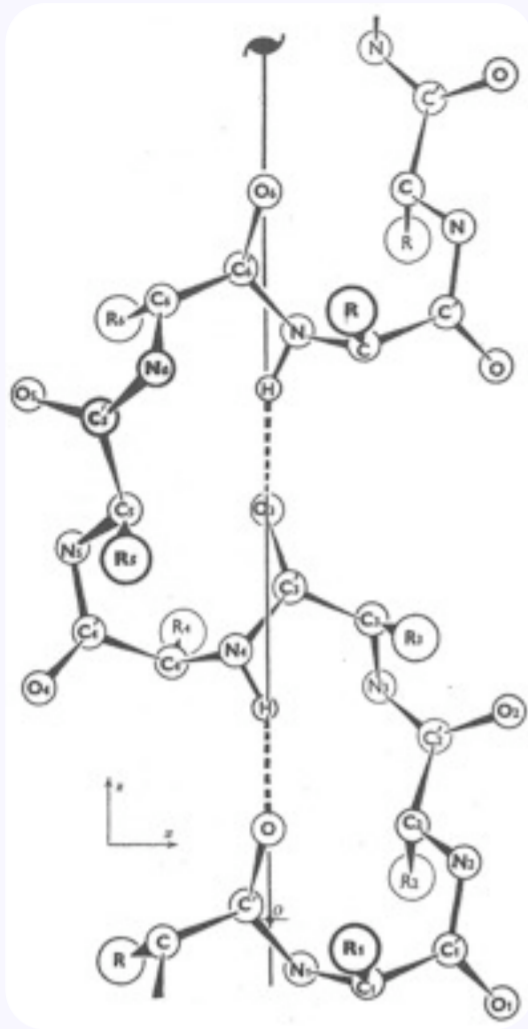


Kendrew

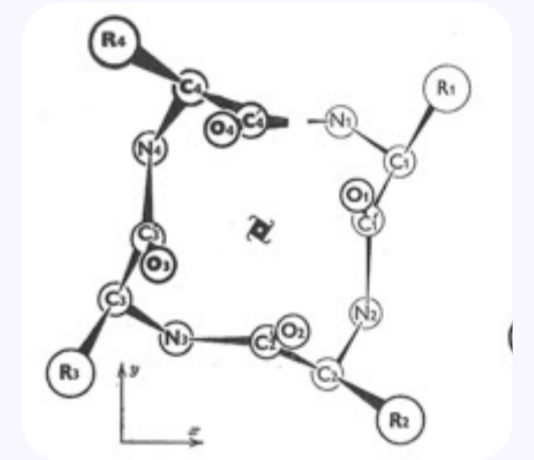
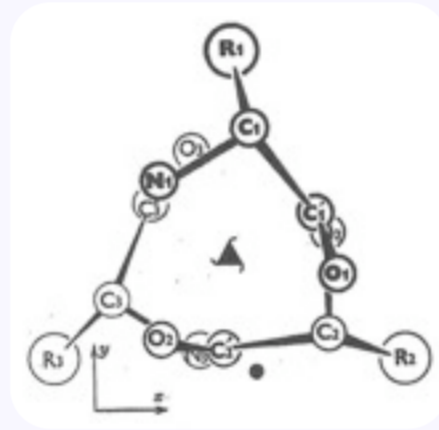
そのころ、バナールはロンドンへ移り、ドロシーも学位を取ってオックスフォードに行きます。バナールの後にはブラッグ(息子の方)がやって来ます。第二次世界大戦中にインドでケンドリューがバナールに逢い、ブラッグの研究室に行くことを勧められます。兵役の後ですから、ケンドリューがブラッグの研究室に入ったのは27, 8歳のころです。

こうしてケンブリッジの構造解析のチームは、ブラッグ、ペルーツ、ケンドリュー体制になりました。

# ら旋モデルの登場



1950年



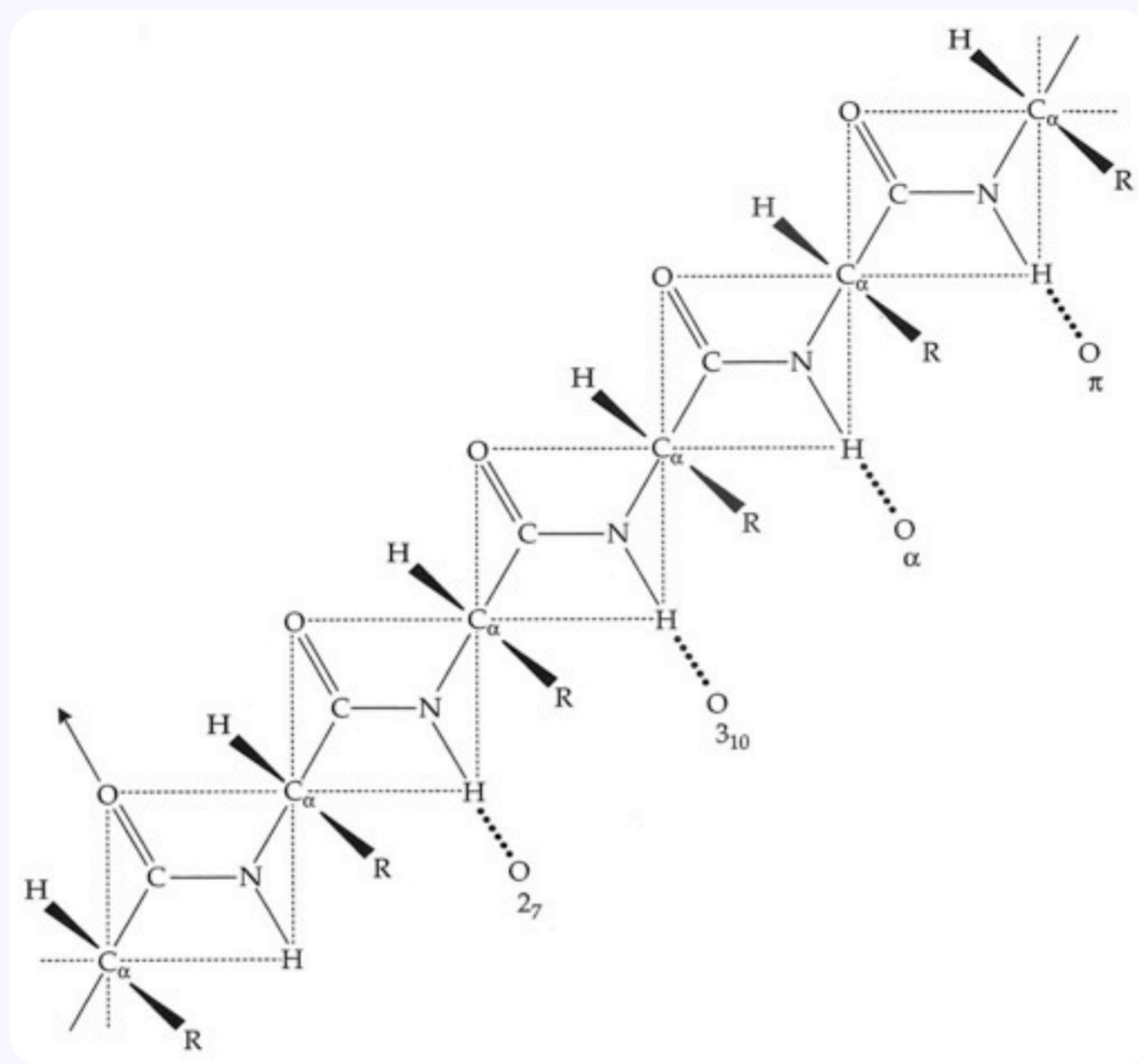
彼らは $\alpha$ 型の条件を満す構造を検討します。条件はアストベリーの写真の $5.1\text{\AA}$ の周期性です。彼等は、 $\alpha$ 型の構造として、ら旋構造をいろいろ検討しました。ペプチド結合の平面性は、あまり厳密に考えなかったようです。20種類くらい考えて、その中からそれらしいものを発表しました。1950年、「ら旋型のモデル」の登場です。

ブラッグらは、結晶学者としてトレーニングを積んで来た研究者でした。「結晶学」は「対称性」の学問です。

\*\*\*対称性っていいですか?\*\*\*

なので、 $\alpha$ 型の構造を検討する際に、この図のように対称性(整数性)を考えました。これらのモデルは2回ら旋、3回ら旋、4回ら旋になっています。一周回って、ちょうど真上に来る構造です。でも、どれもピッタリ来ず、どれがいいのやら分らないという状況でした。実際には、この「整数性」は間違っていたのです。さっきみたサイクロールもそうですが、「自然界には数学的な対称性という美しさがあるはず」という期待は、タンパク質の場合には裏切られています。

# Paulingの「紙」モデル



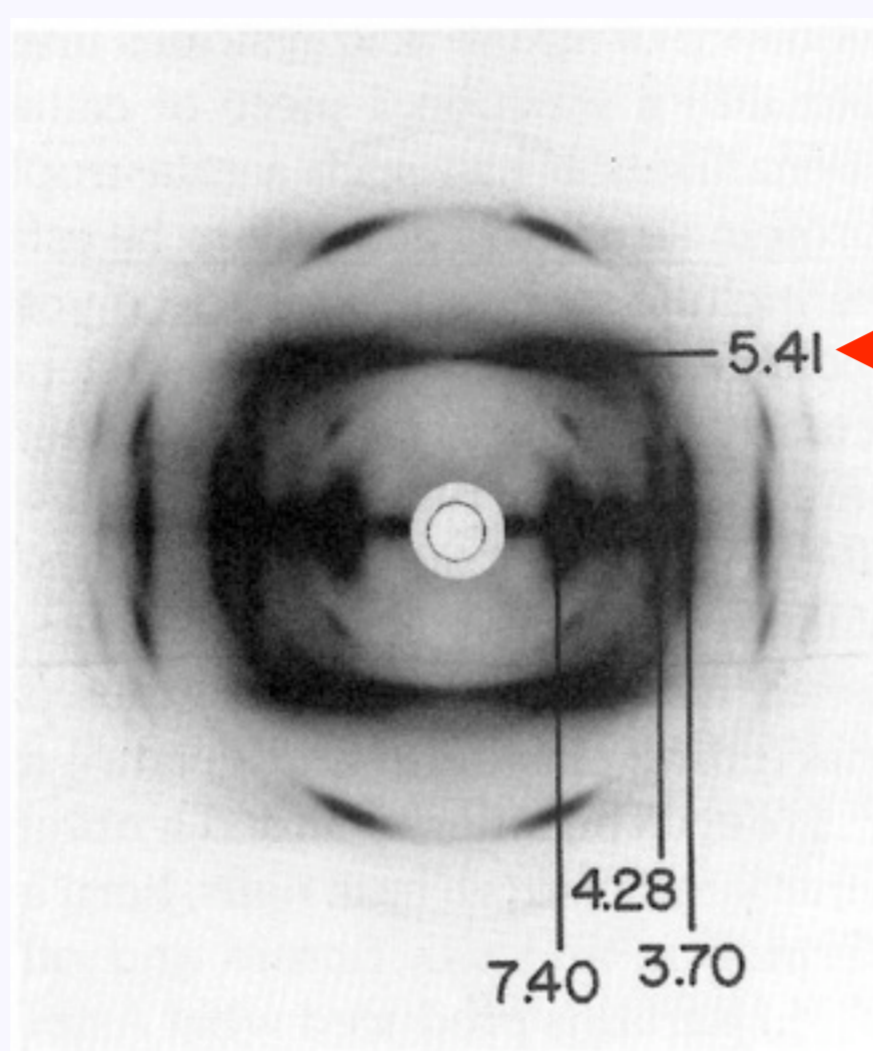
35

一方、アメリカのカルテックのポーリングもヘリックスの構造を検討していました。1948年に、オックスフォードを訪れていたポーリングは風邪を引いてベッドで休みながら、紙に原子間の結合距離と角度の情報を使って、こんな絵を書いて、その紙を折り曲げて、水素結合の様子を検討していました。

この四角は(何でこうしてあるんだっけ?)ペプチド平面ですので、ここを曲げないようにしながら、ここにある矢印の酸素とどこの水素がちょうどいい位置関係になるかをやってみたわけです。こんなふうにやったわけですから、ブラッグ達のように「整数性」にはこだわらず、いわば、「ヘリックスのありよう」に従ってみたということになります。

このベッドでの紙のモデルによる検討で、ポーリングは、ヘリックスの1ターンはペルーツらのような整数ではなく3.6残基であると都合が良いことを発見します。ただ、らせん方向の周期はアストベリーの5.1Åに一致せず、5.4Åになったので、このモデルを発表しないでしばらく、3年間そのままにしました。その間にブラッグらが、さっきの対称性のあるヘリックスモデルを発表します。

# 人工ポリペプチドのX線回折写真



~~5.1 Å~~

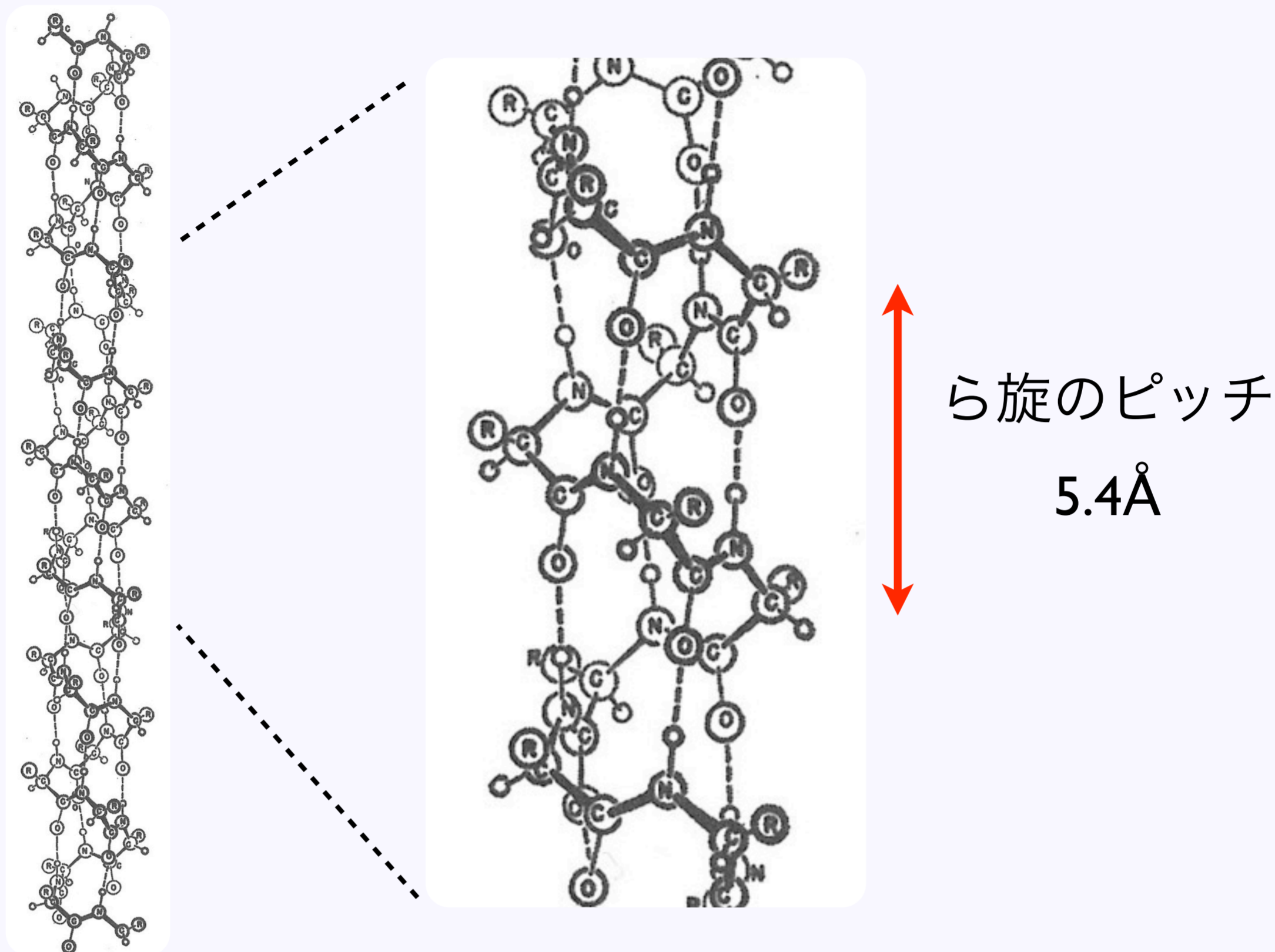
(これは $\alpha$ 型のポリアラニンのもの)

そうしているうちに、人工ポリペプチドであるポリベンジルグルタミン酸の回折写真が撮影されます。その写真では、この例のように5.1Åの代りに5.4Åの周期が観察されていきました(これは後年撮影されたポリアラニンの写真です)。

これで、5.4Åが良いということになりましたから、ポーリングはコーリーと $\alpha$ ヘリックスのモデルを論文にします。1951年のことです。

1951年

# $\alpha$ ヘリックスの構造



37

これが1951年のポーリングらの論文に載ったヘリックスのモデルです。このモデルでは、ら旋の一巻き当りの残基数は3.6残基で整数ではありません。

ポーリングは、最初「スパイラル」と呼んでいたようですが、ポーリングの研究室のポスドクが「ヘリックス」と呼ぶことを提案したらしいです。もしかしたら今頃 $\alpha$ ヘリックスではなく、 $\alpha$ スパイラルと呼んでいたかも知れませんね。

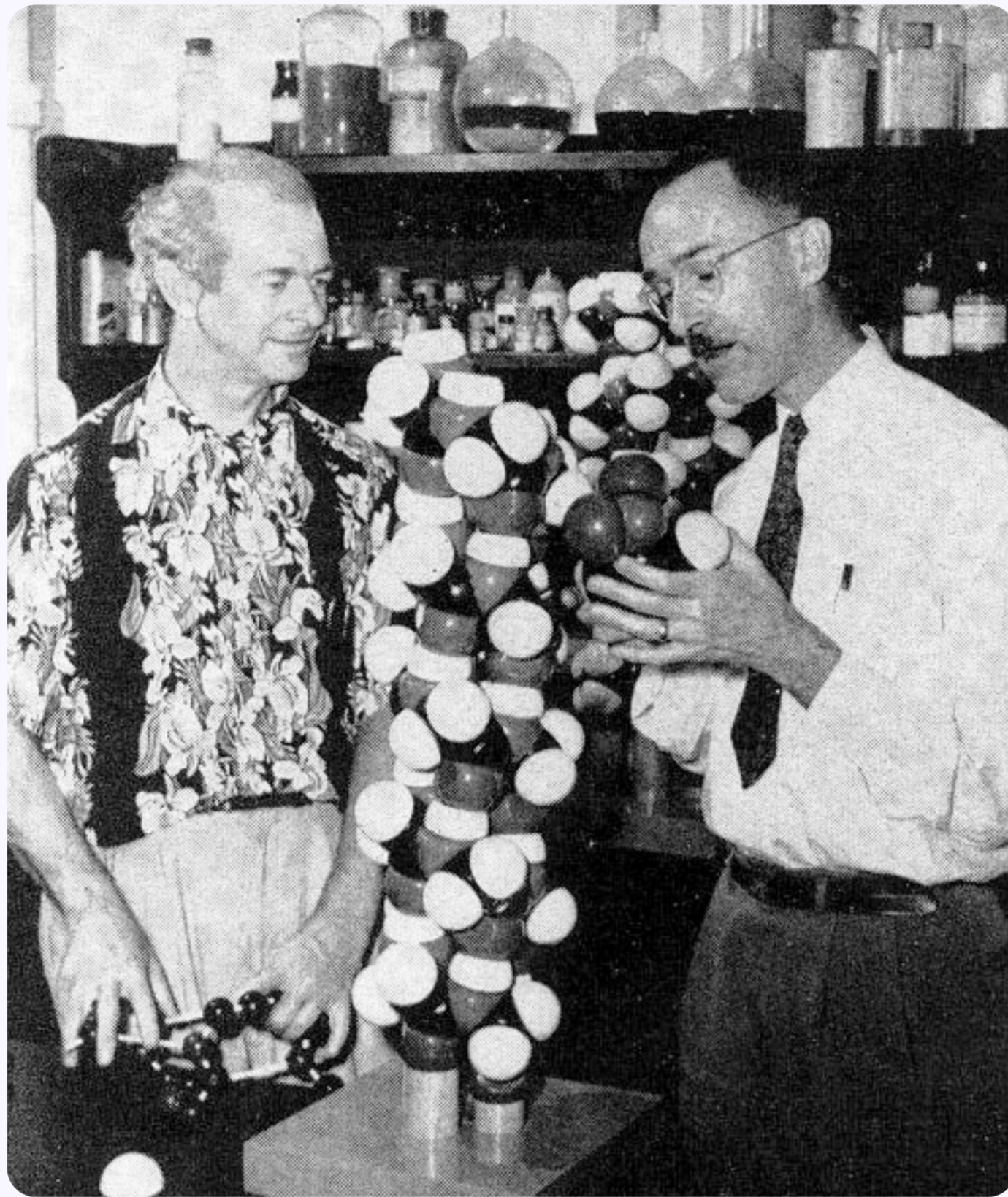
実は、この論文のヘリックスには、おかしなところがあります。分ります？

アミノ酸がD体で、ヘリックスが左巻きなんです。

1951年当時は、まだアミノ酸の鏡像体の区別(絶対配置といいます)は意識されておらず、ポーリングからも重要視していなかったということです。間違っただけというより、気にもしていなくて、たまたまD体でモデルを作っただけ、ということのようです。

もちろん、今、試験でこういう構造を描いたら不可ですよ。

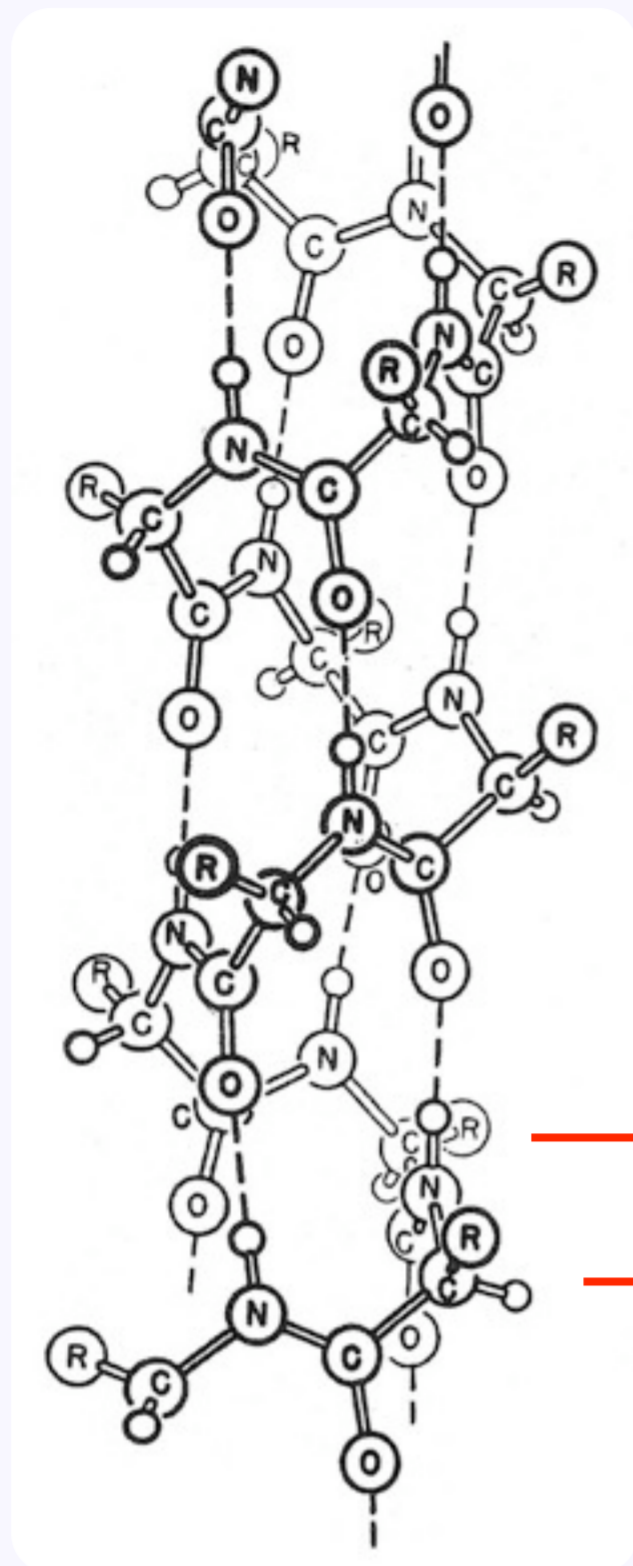
# PaulingとCoreyと $\alpha$ ヘリックス



38

これは、ポーリングとコーリーが $1\text{\AA}$ を1インチに拡大したヘリックスのモデルをいじっている写真です。コーリーはX線結晶学者で、ポーリングに原子間結合距離や結合角度の情報を供給していたのです。同じ1951年に、やはりポーリングのコーリーの共著で、ベータシートの構造の論文がアメリカ科学アカデミーの紀要に投稿されています。

# Perutzの反省



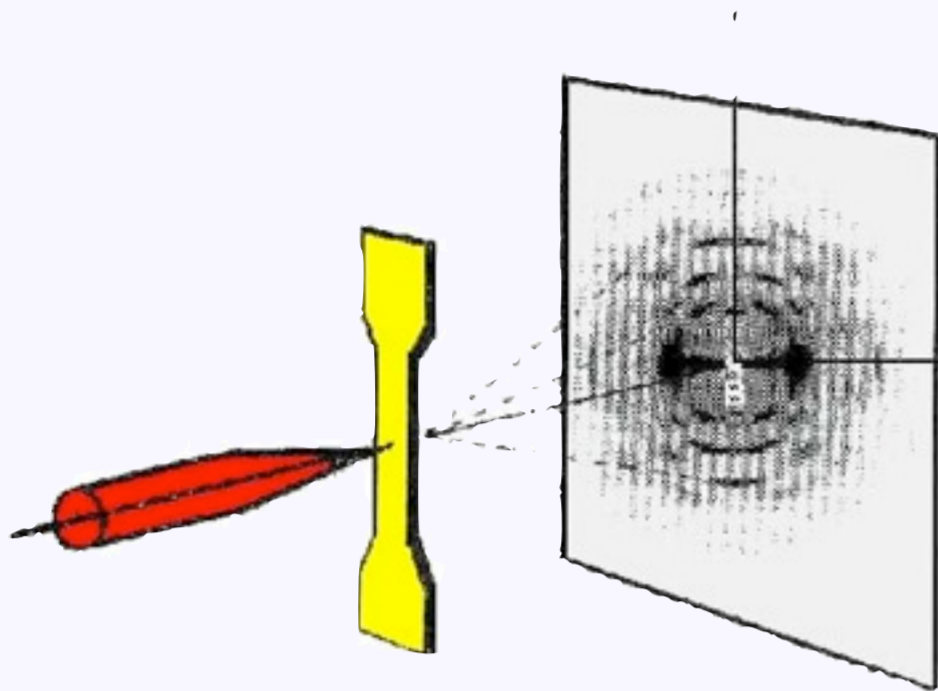
一残基あたりの並進

1.5Å

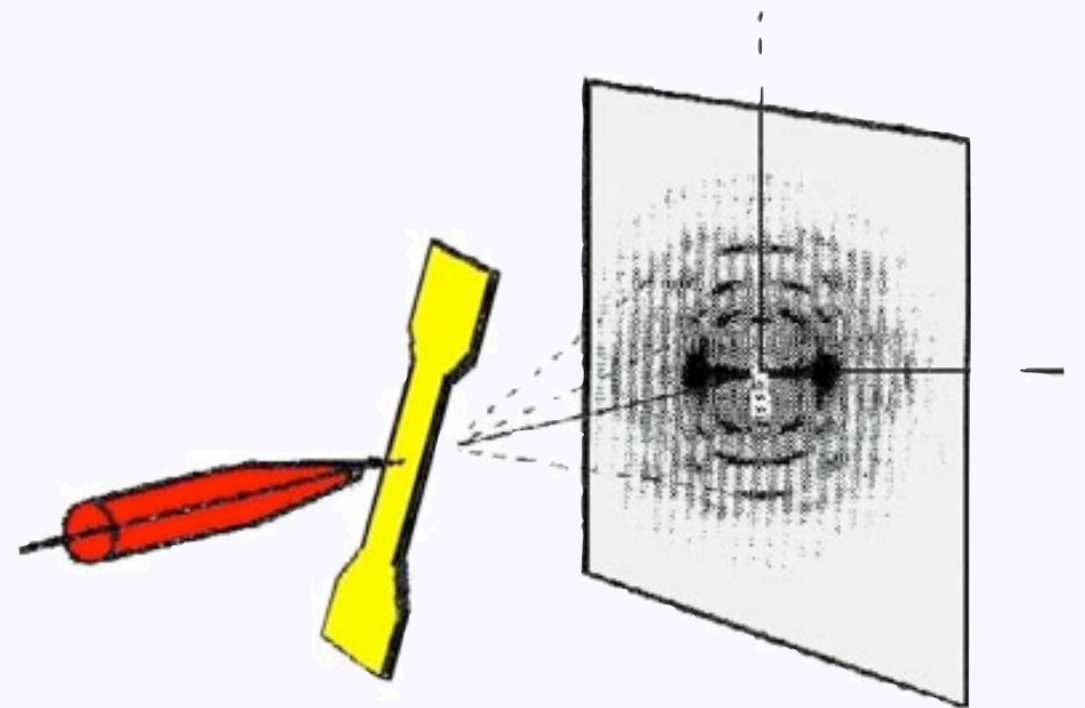
さて、ポーリングの論文を見たペルーツは「人生最悪の経験だった」と言っています。ら旋の一巻あたりの残基数は整数なのが当たり前と思い込み、しかもペプチド結合の平面性をちゃんと考えないでたかさんのモデルを検討して発表してしまっていたからです。(この絵は右巻きヘリックスで描いてあります。)

X線屋だったペルーツは、ポーリングのヘリックスモデルを実験的に検証して一矢報います。ポーリングのヘリックスは、ら旋のピッチが5.4Åですが、この構造の場合、一残基で1.5Å進みます。なので、もしもポーリングの構造モデルが正しいなら、X線回折写真には1.5Åの周期に対応するピークが観察されるはずですが、アストベリーの写真にはそんなピークは写っていませんでした。

# Perutzの検証実験



Astburyの実験

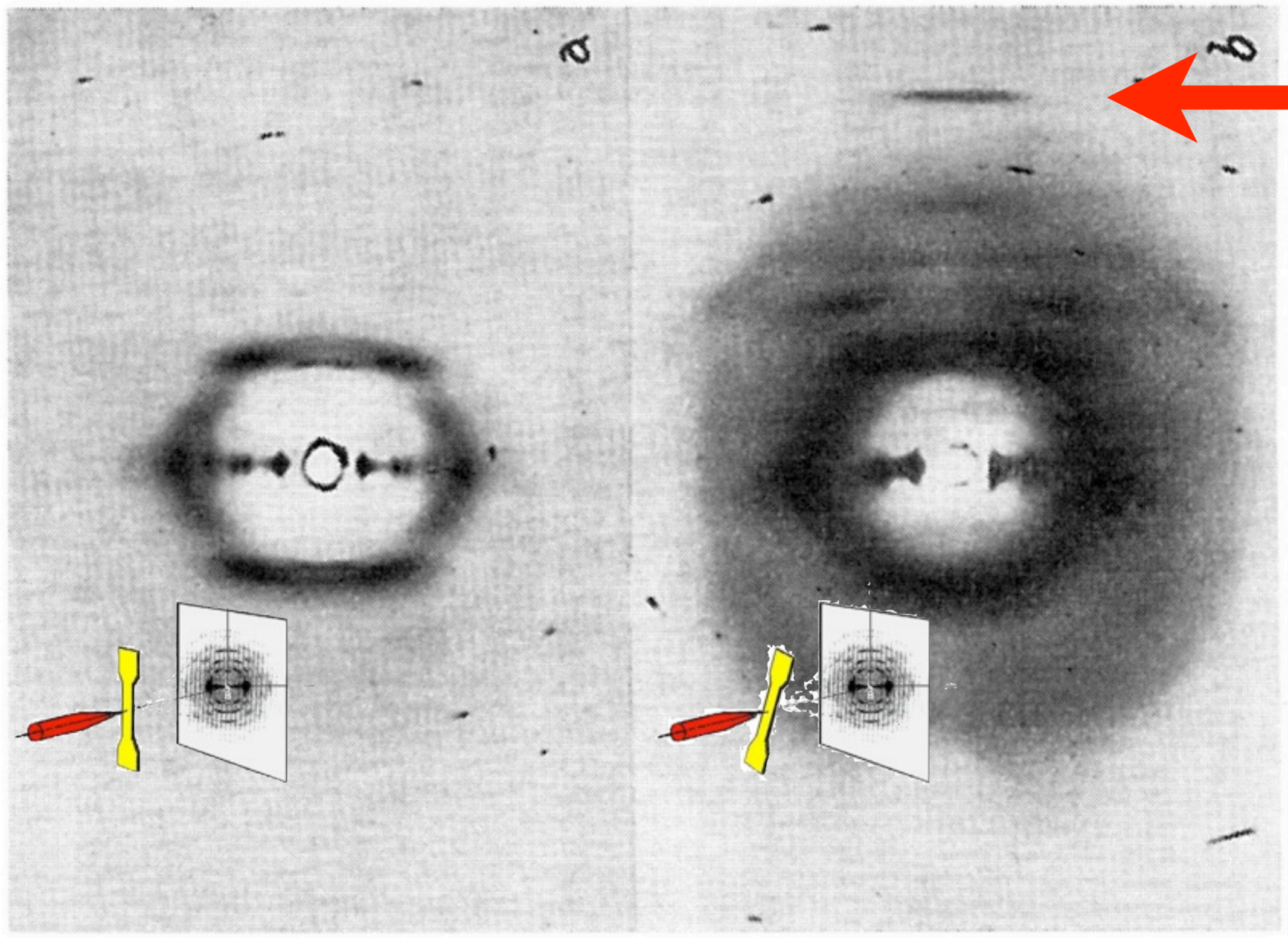


Perutzの実験

ちょっと難しいので今日は説明を省略しますが、実はこの $1.5\text{\AA}$ の周期のX線回折を観察しようと思うと、繊維を傾けて写真を撮らないといけないことにペルーツは気が付きます。



# Perutzの検証実験



41

彼は、ポリベンジルグルタミン酸の繊維を55度から85度の間で傾けて写真を撮影し、1.5Åの回折を確認し、1951年のNatureに投稿しました。これはその写真です。

こうして、 $\alpha$ ヘリックスは、構造モデルを提案したのはポーリング、実験的に検証したのはペルーツということになりました。

球状タンパク質の構造の基本単位として $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートの2つの構造が確定することで、サイクロール説は完全にすたれます。

# DNAの構造とX線回折

42

この後、1950年代には、DNAの繊維写真と、その解釈によるDNAの構造解明の激しい競争があります。ワトソンとクリックのDNA二重らせんまでの歴史は、みなさんも目にする機会が多いと思いますので、今日のお話では省きます。

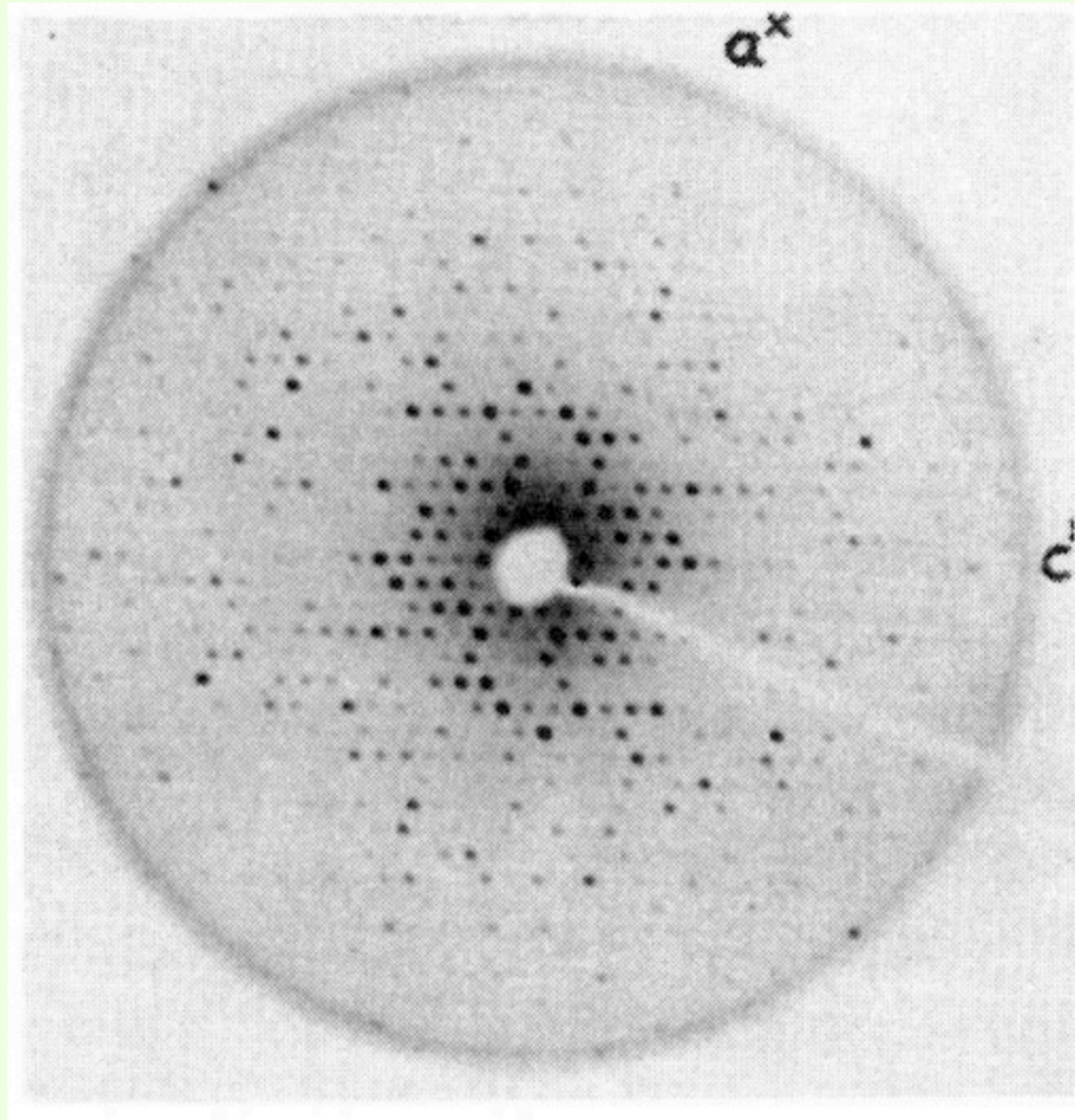
DNAの繊維写真でもアストベリーが貢献していますし、ワトソンとクリック、それにフランクリンだけでなく、ポーリングやコーリーも論文を書いていることだけ触れておきます。

# 蛋白質結晶学の時代

さて、バナーが始めた蛋白質結晶構造解析の話に戻ります。

DNAの構造研究も含めて、ここまでのX線回折パターンの利用は、繊維写真の回折ピークを説明することが出来る、そういうモデルを予想し提案することでした。X線回折パターンの回折強度を利用して、直接原子の位置を決めてしまうような、いわゆる構造解析は実現されていません。少し前に紹介したように、ポーリングでさえ、そんなことは無理だ、と考えていたのです。

# 結晶からの回折パターン



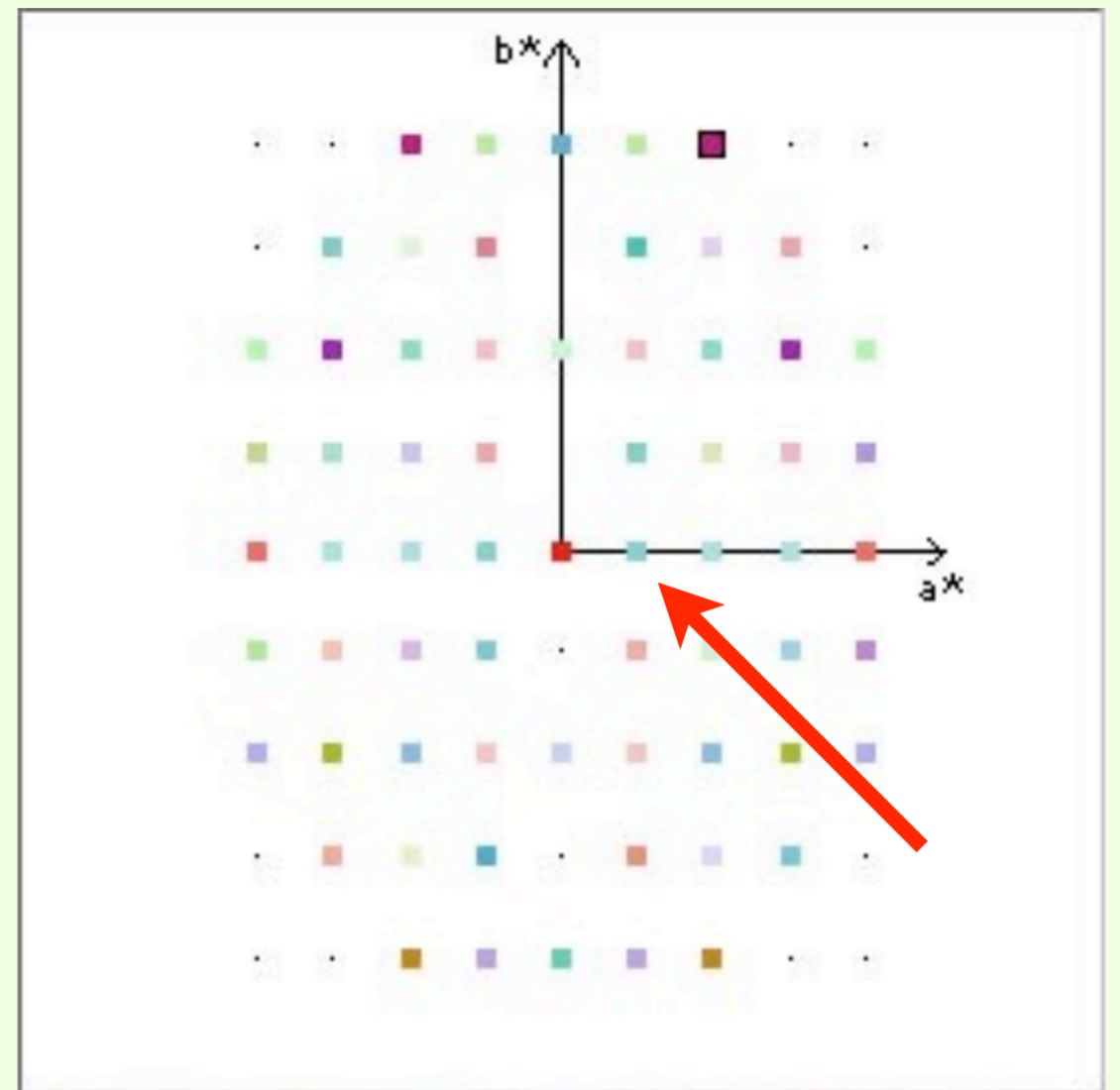
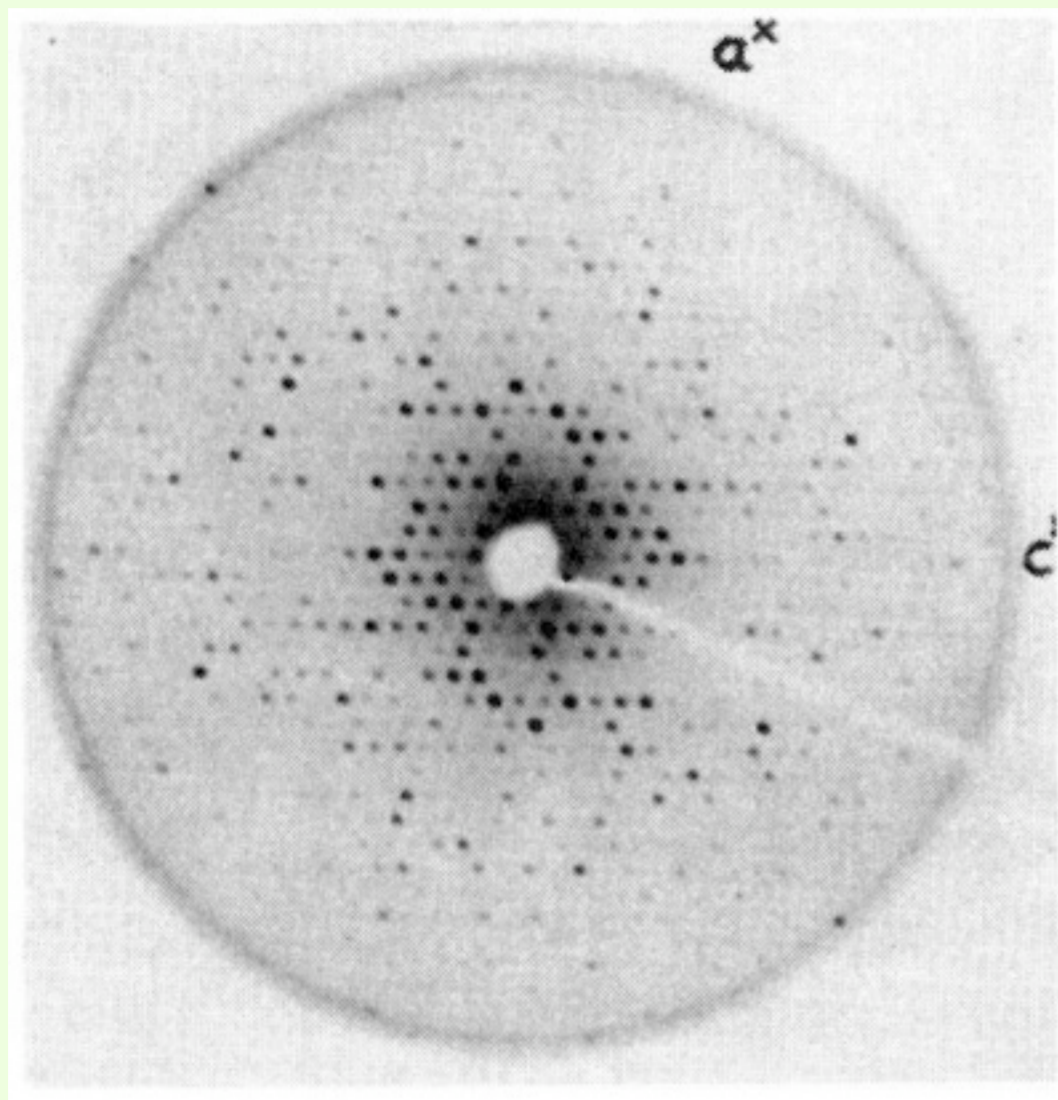
## ヘモグロビンの結晶のX線回折写真

44

これはペルーツが撮影したヘモグロビンの結晶の回折写真です。さっきまでさんざん見て来た繊維写真と違って、たくさんの回折斑点(回折スポット)が写っています。これらの点々の一つ一つは結晶中(正しくは単位格子中)の電子密度分布のフーリエ変換です。

つまり、これらの点々の一つ一つの強度(この場合、点々の黒さですが)は、結晶中の電子密度分布を波の足し合せに分解した時の、それぞれの波の振幅(つまり強さ)に対応しています。

# 回折点の意味

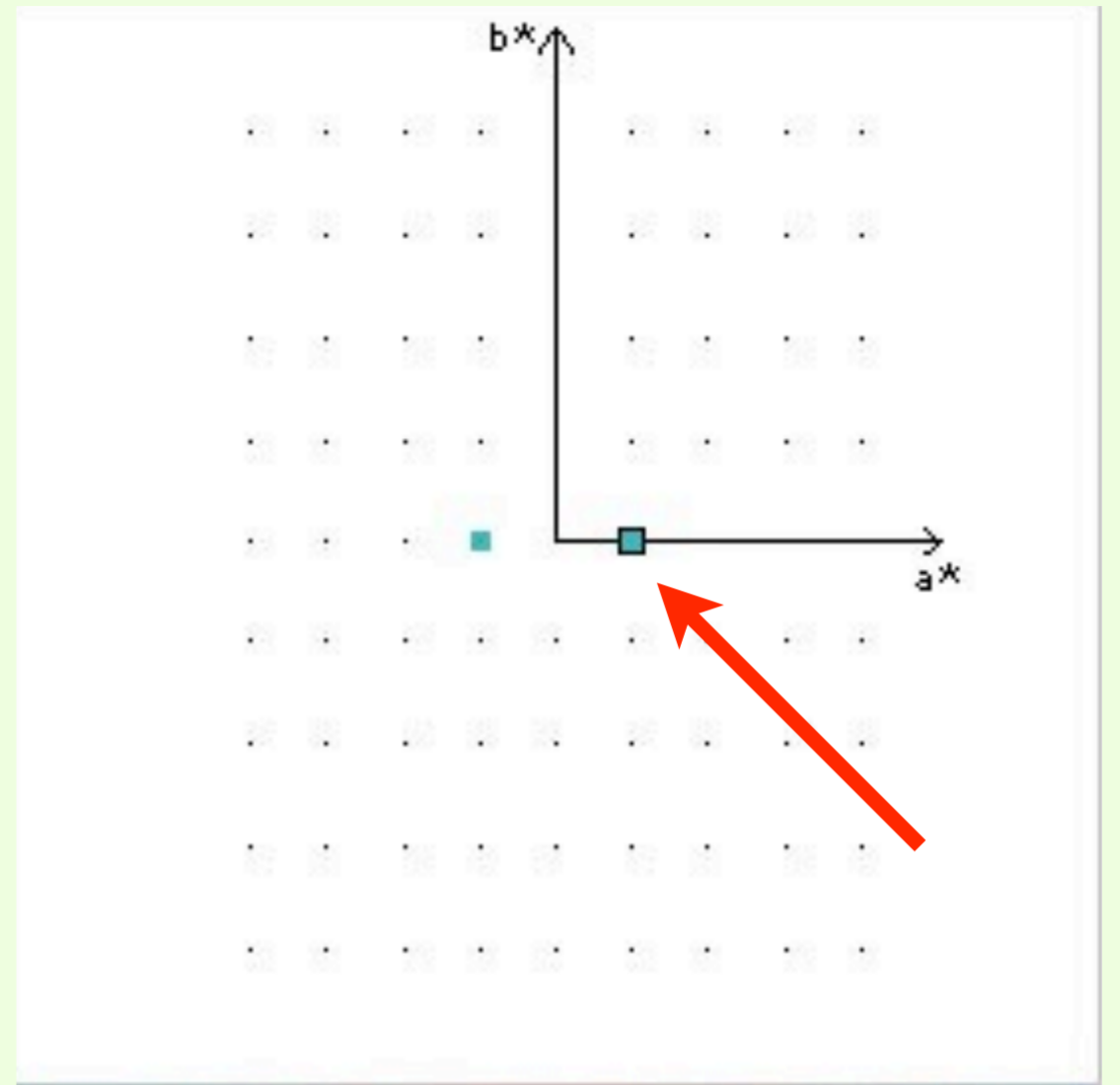


数学的な話は、やめておきますが、フーリエ合成をちょっとだけ紹介しておきましょう。簡単のために「二次元」で話します。

左のような回折写真を、右に模式的に描いています。

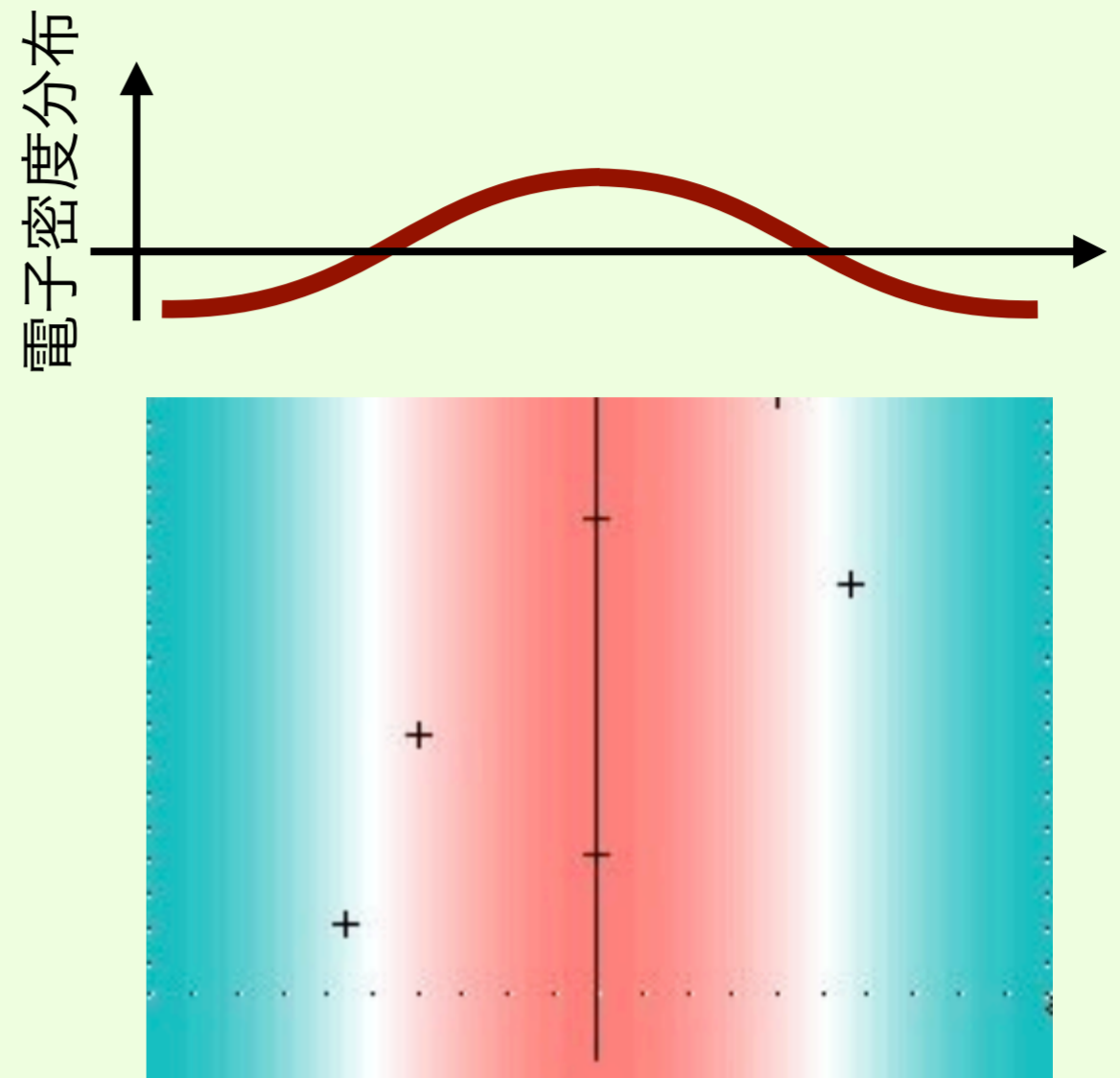
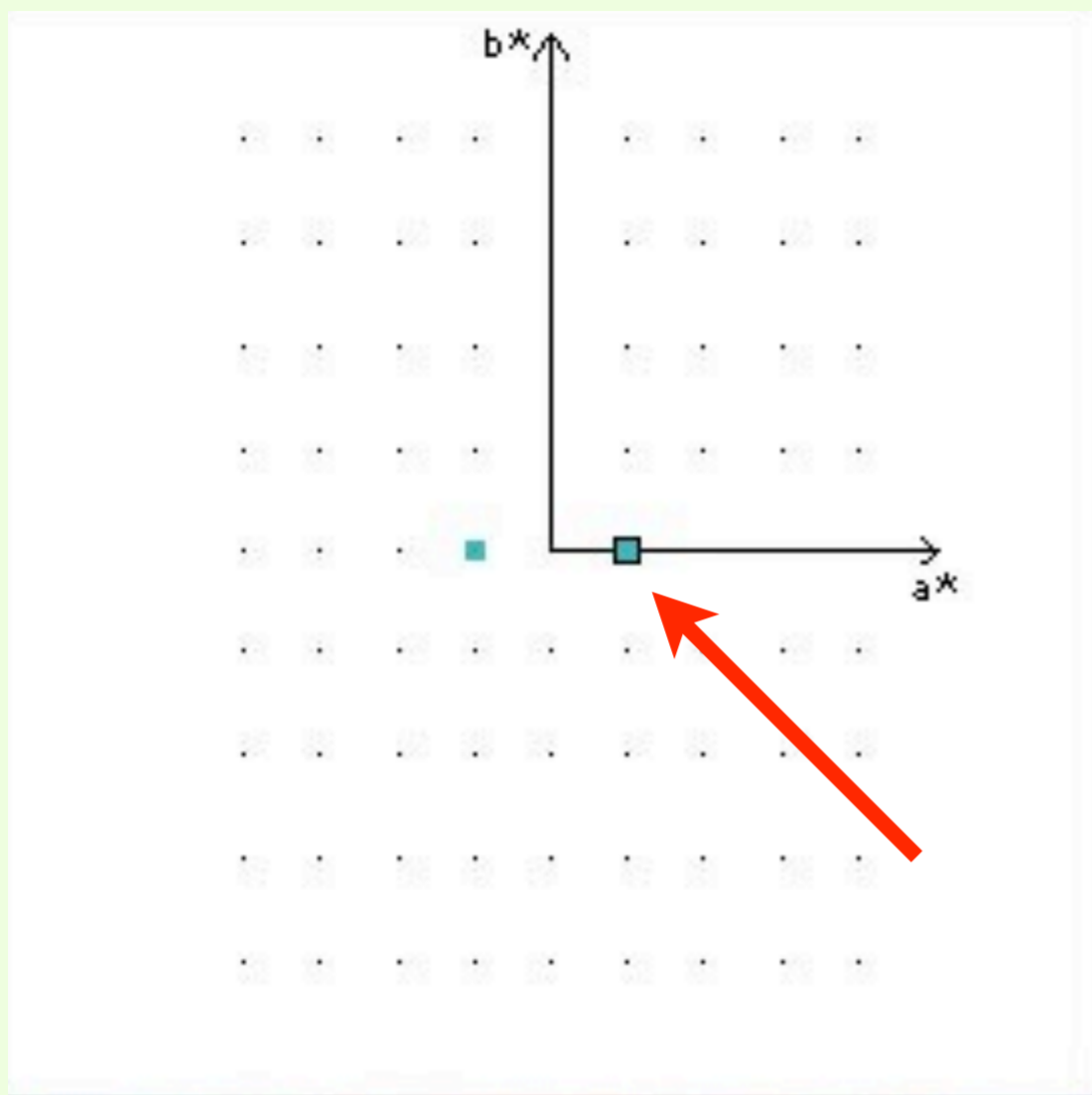
たとえばこの点の場合、

# 回折点の意味



その意味はというと、

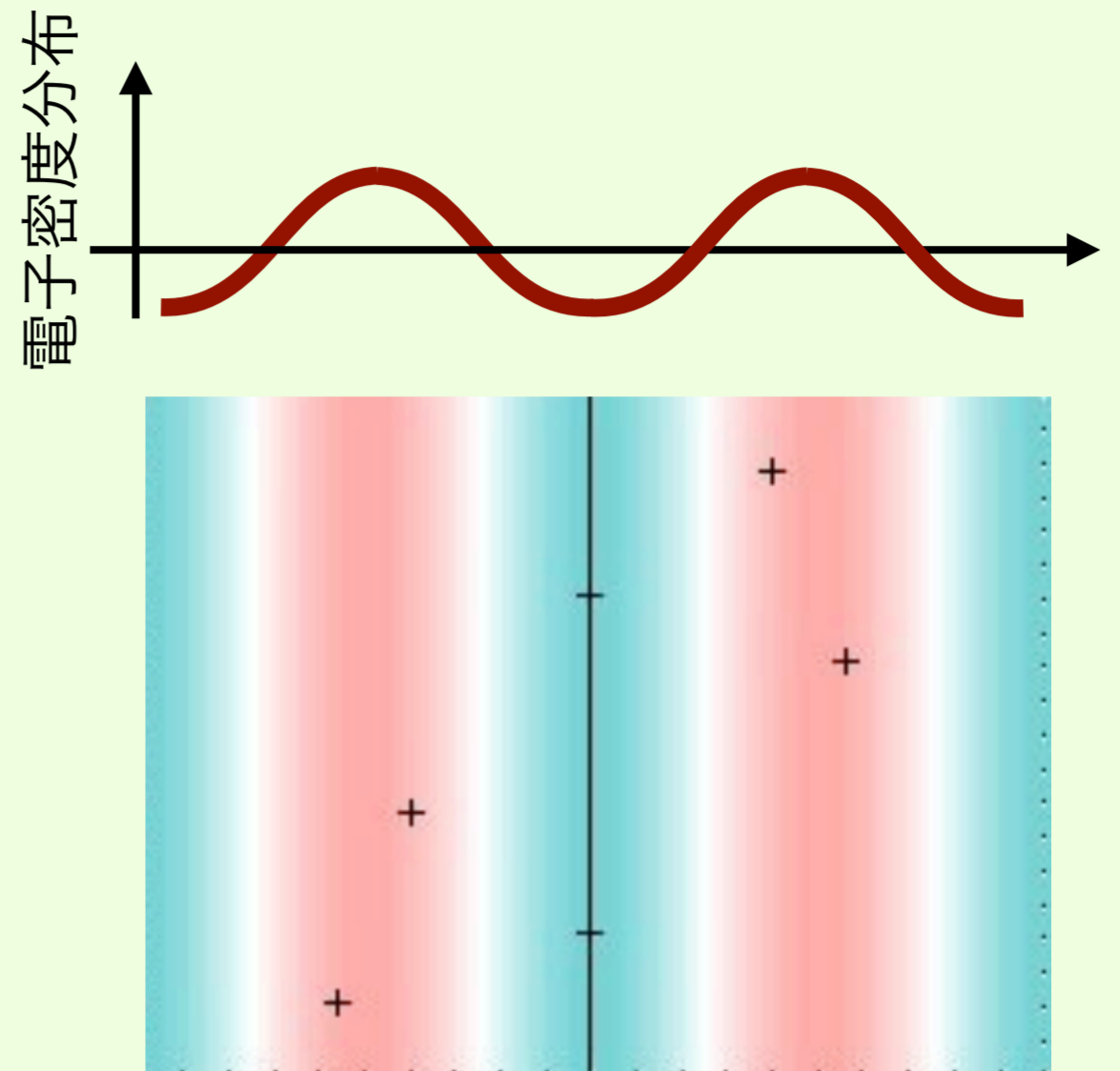
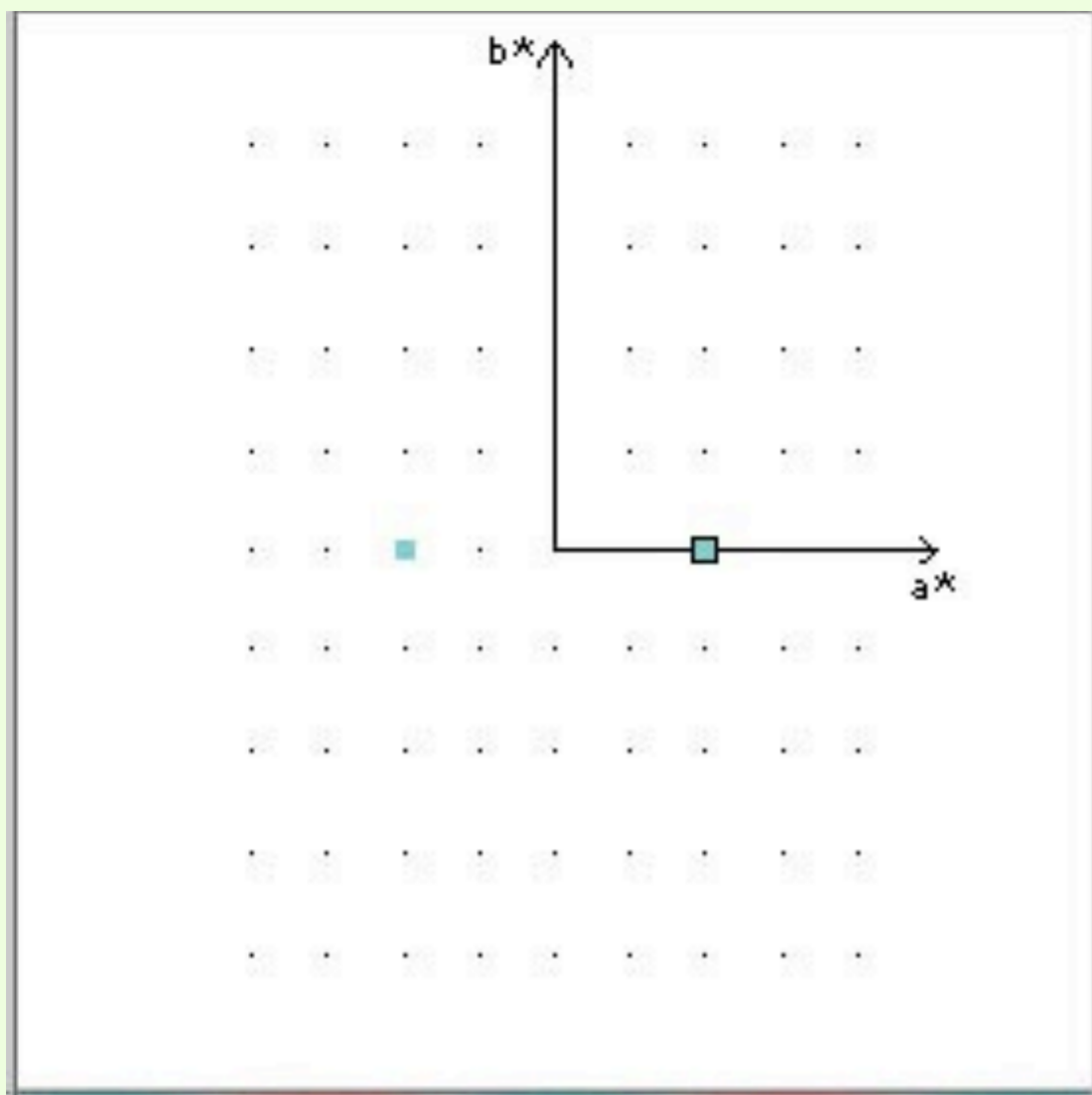
# 回折点の意味



結晶格子中の電子密度分布

この点は、結晶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、こういう「周期が1の波」の成分の強さに対応しています。

# 回折点の意味

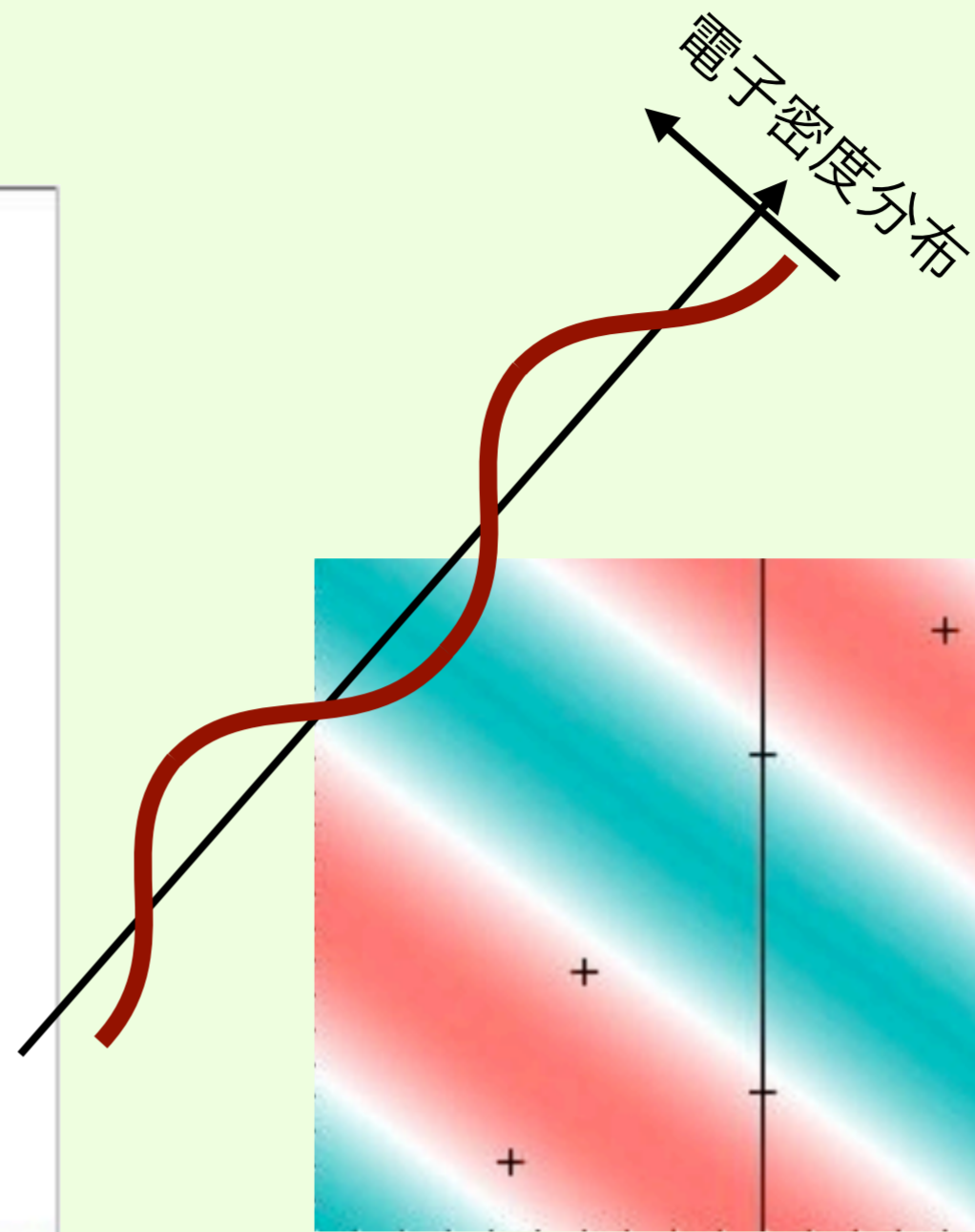
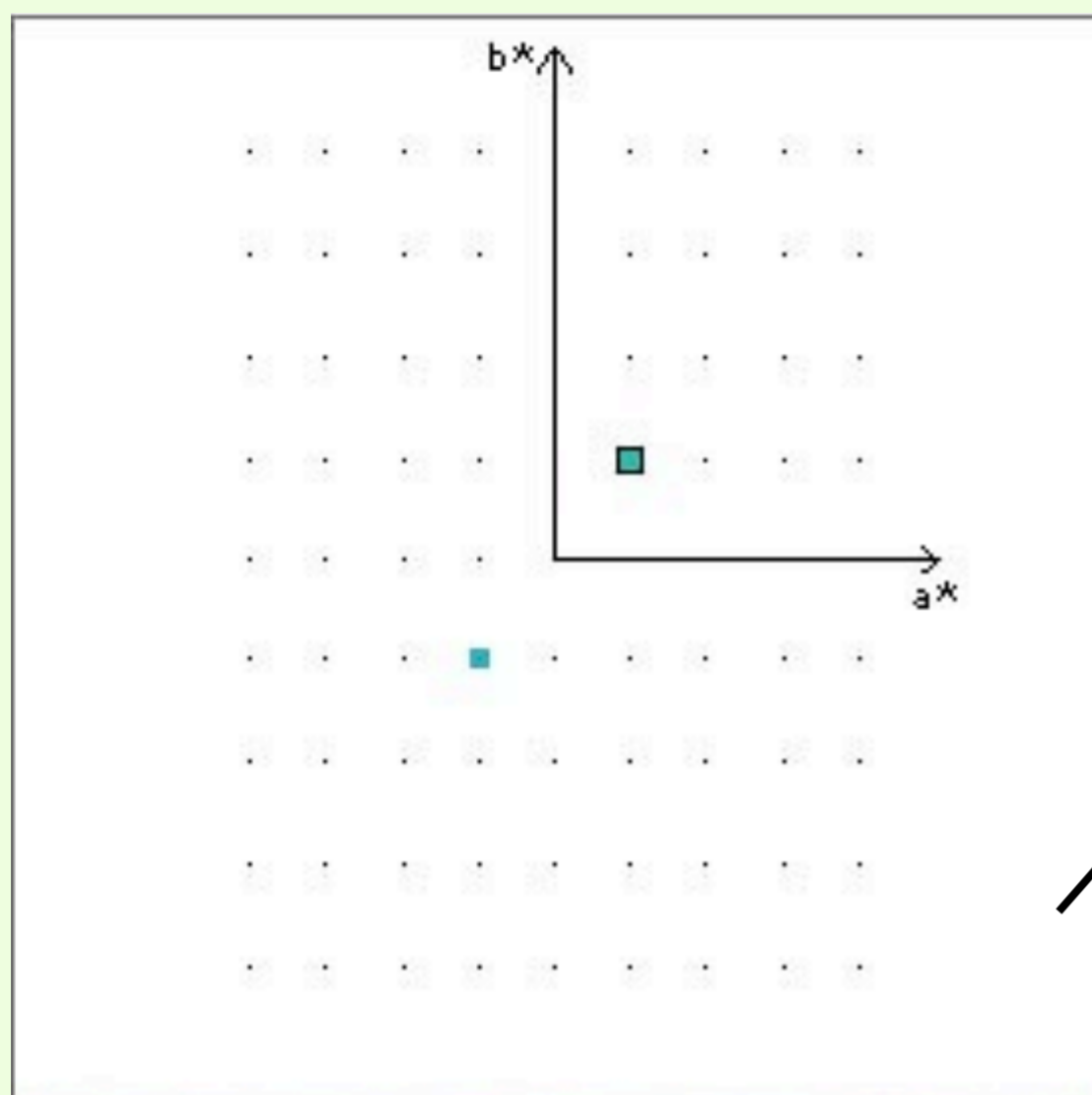


結晶格子中の電子密度分布

おなじように隣りの点は、「周期が2の波」の成分の強さに対応しています。



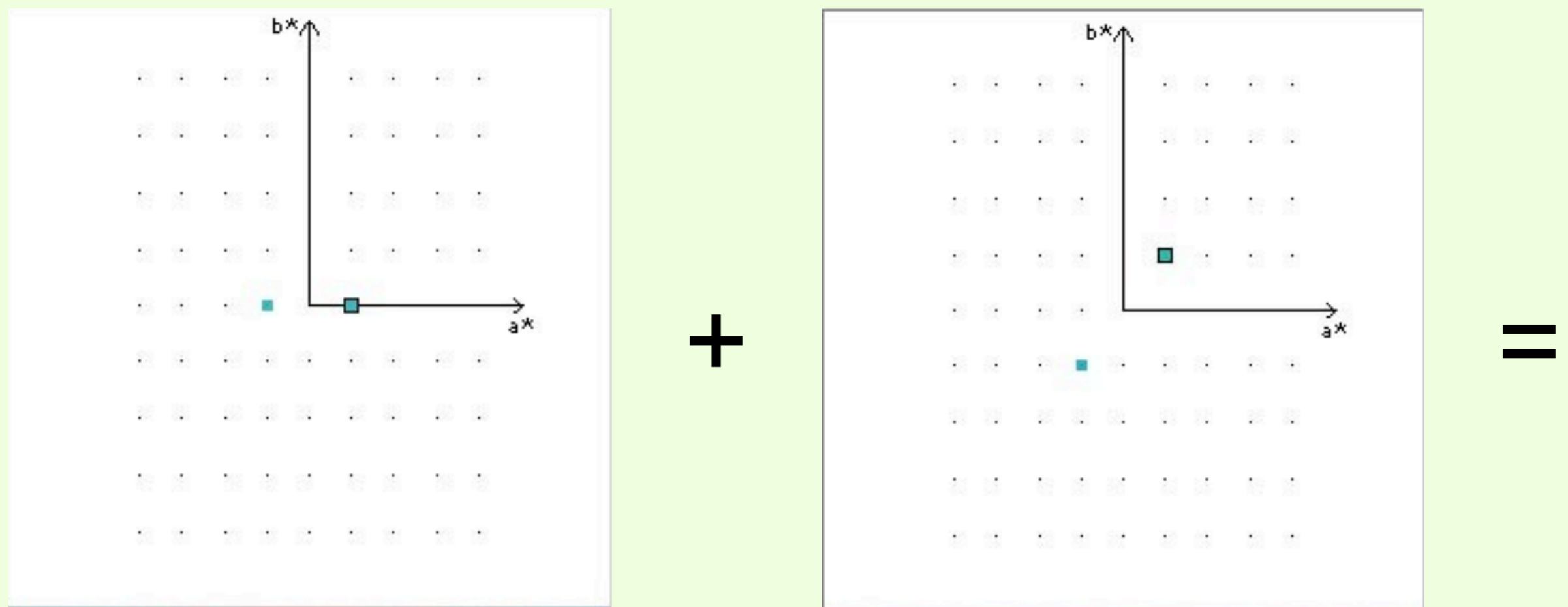
# 回折点の意味



結晶格子中の電子密度分布

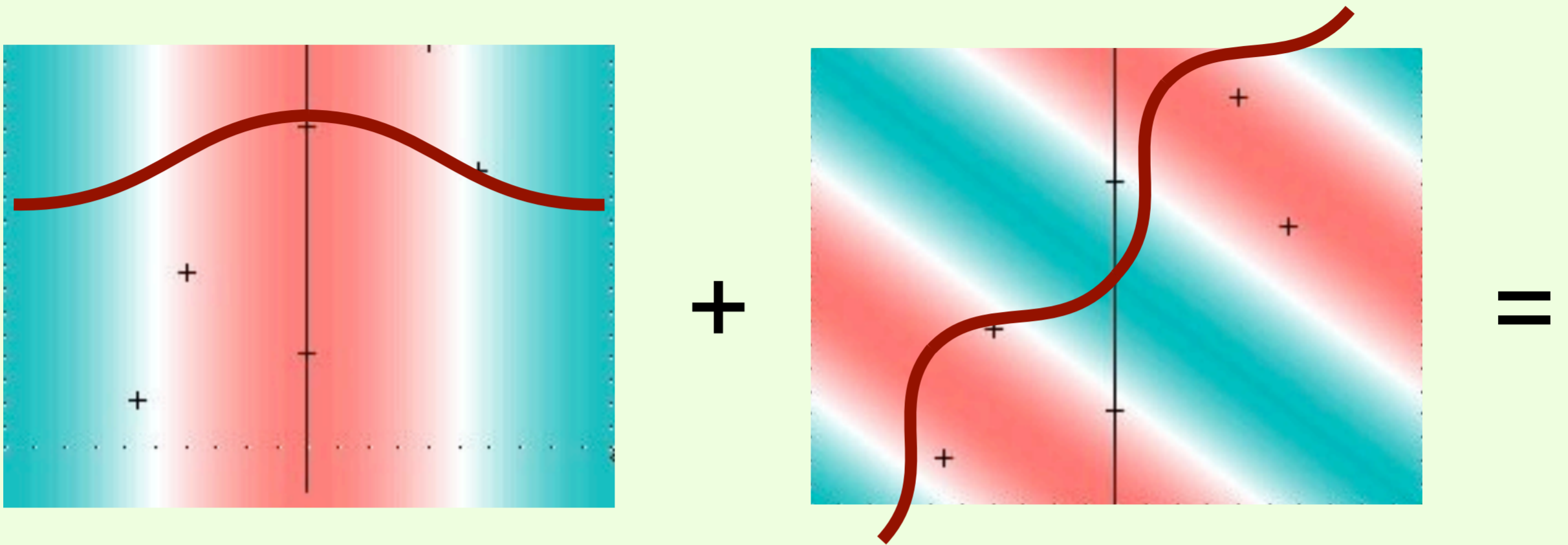
同じように、こんな斜めの点は、「斜めの波」の成分の強さに対応しています。

# フーリエ合成



実験では、それぞれの回折点の強さを測定することが出来るので、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が、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、結晶格子中では、

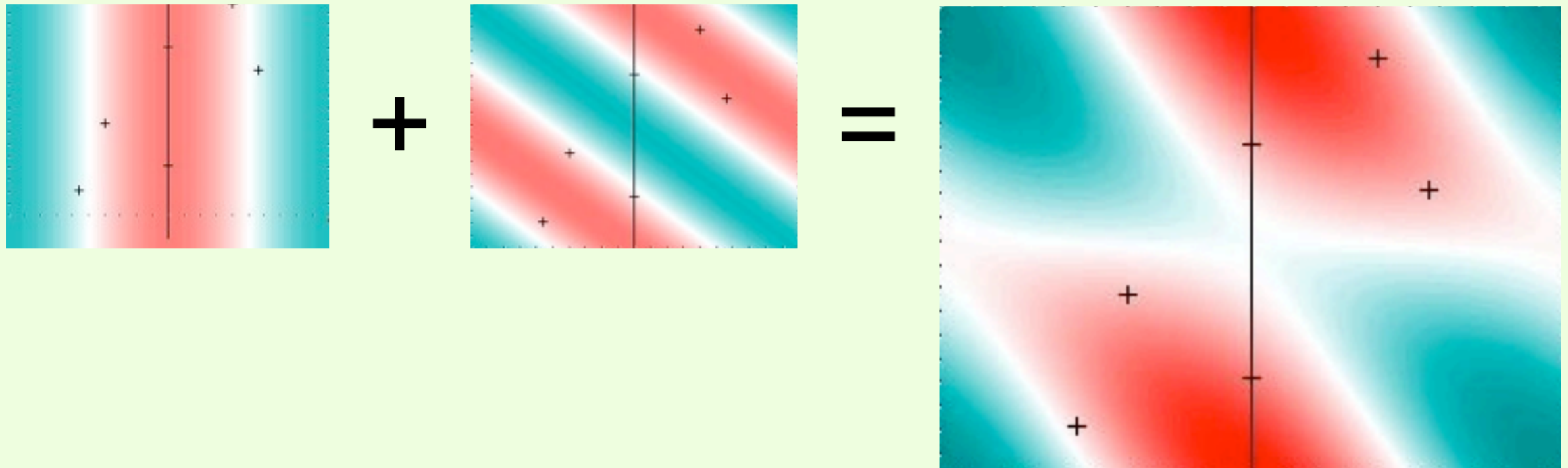
# フーリエ合成



電子密度分布

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。

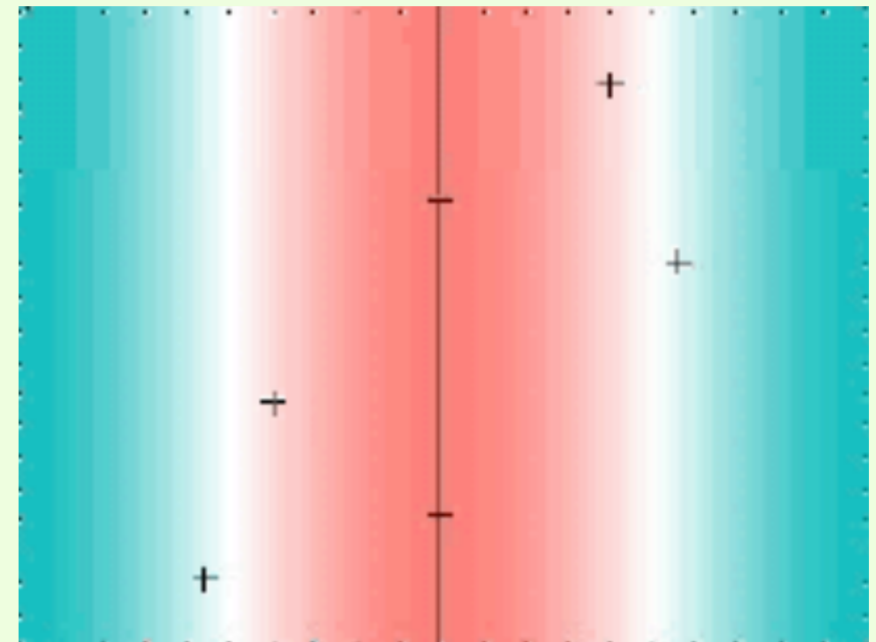
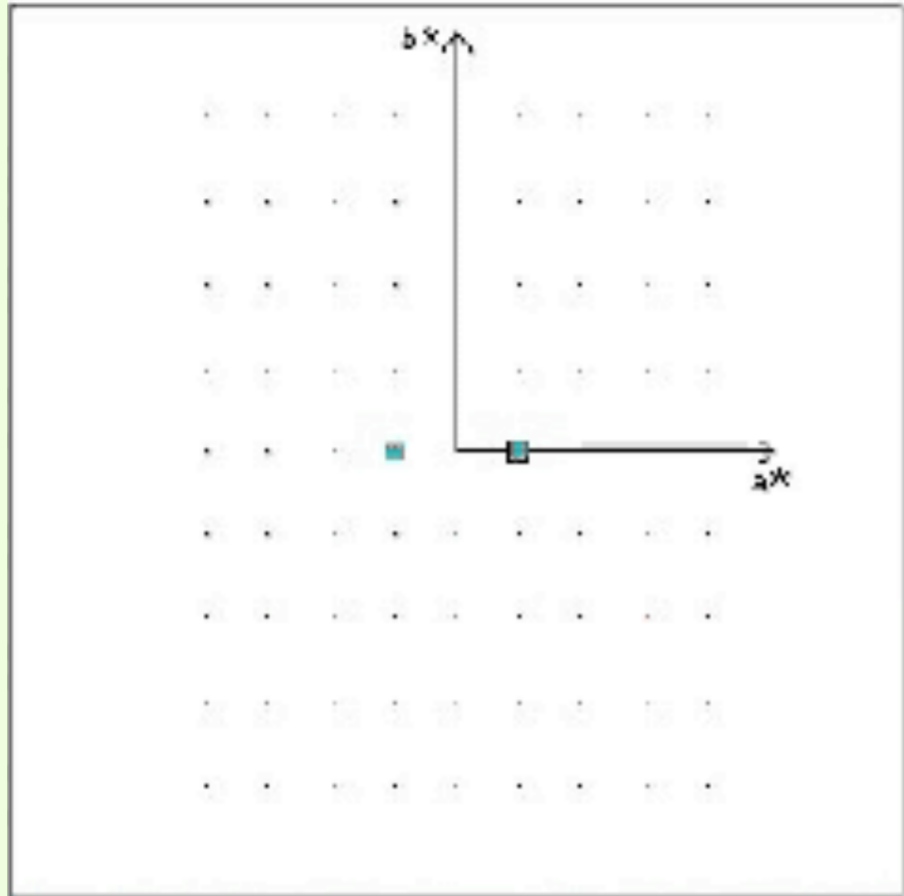
# フーリエ合成



電子密度分布

例えば、この二つの波を足すと、こういう模様になります。

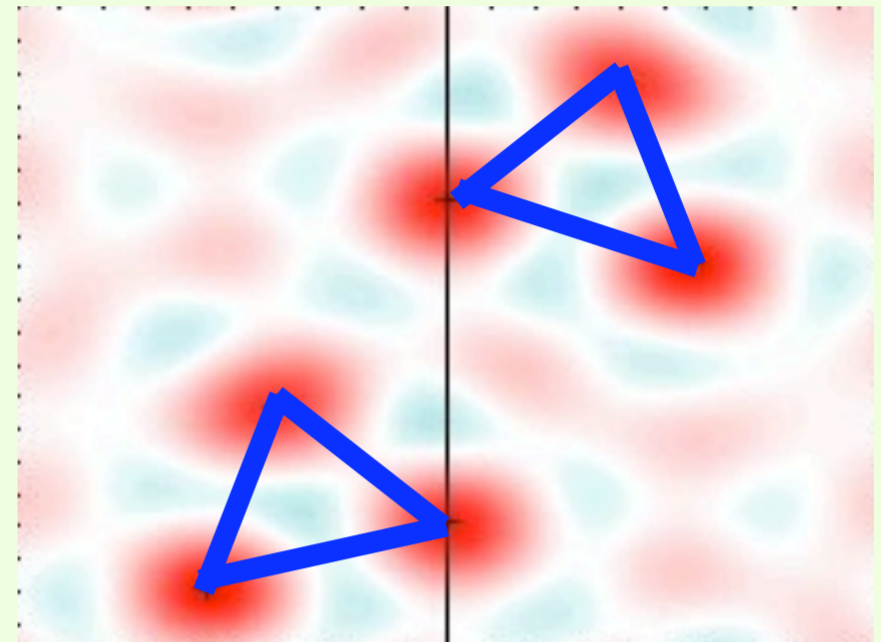
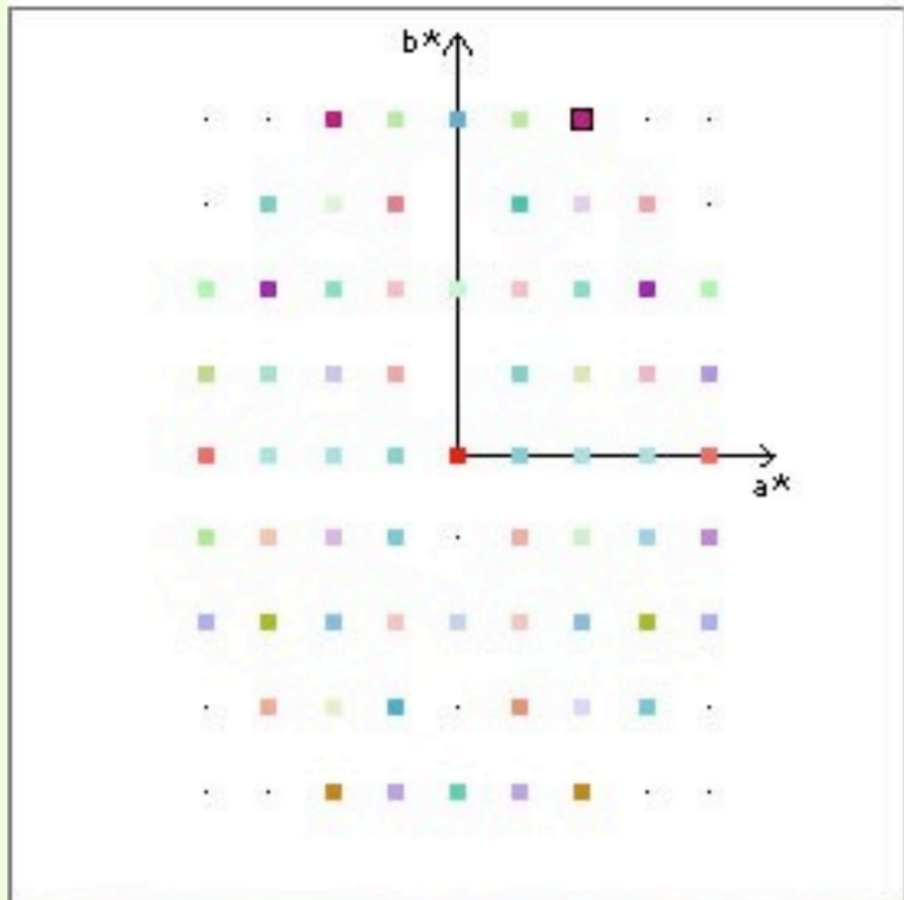
# フーリエ合成



それをずっと全部足し合わせていくと、結晶格子中の電子密度分布がだんだんくっきりと分り、最終的にはつまり「構造」が分る、ということです。

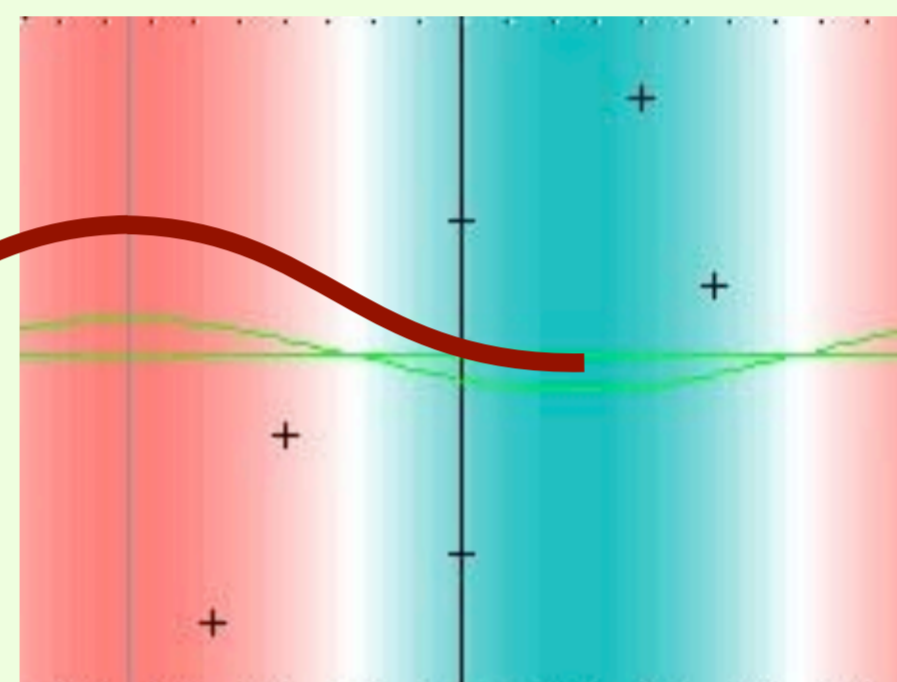
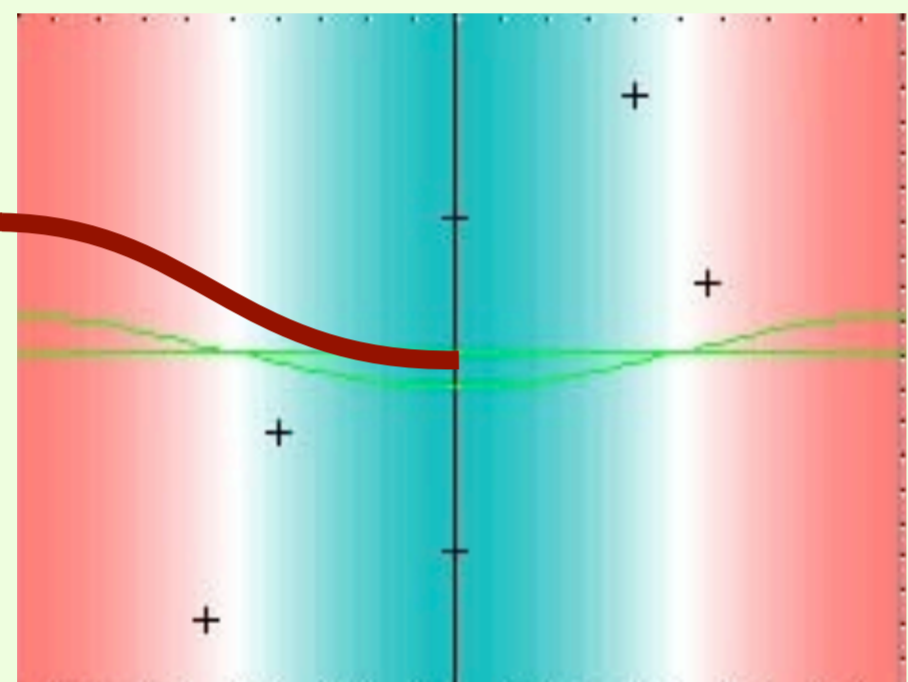
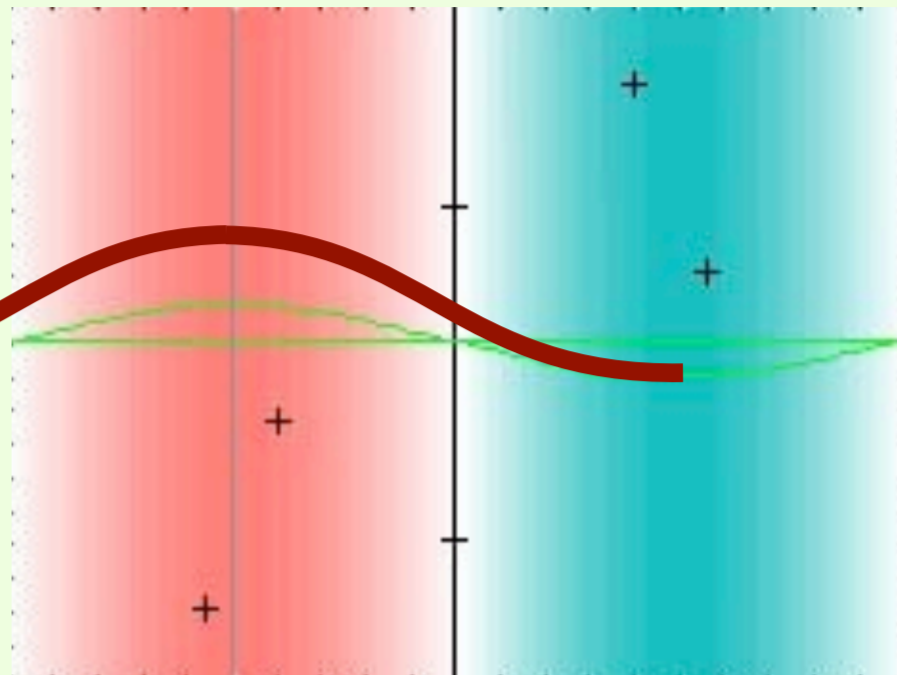
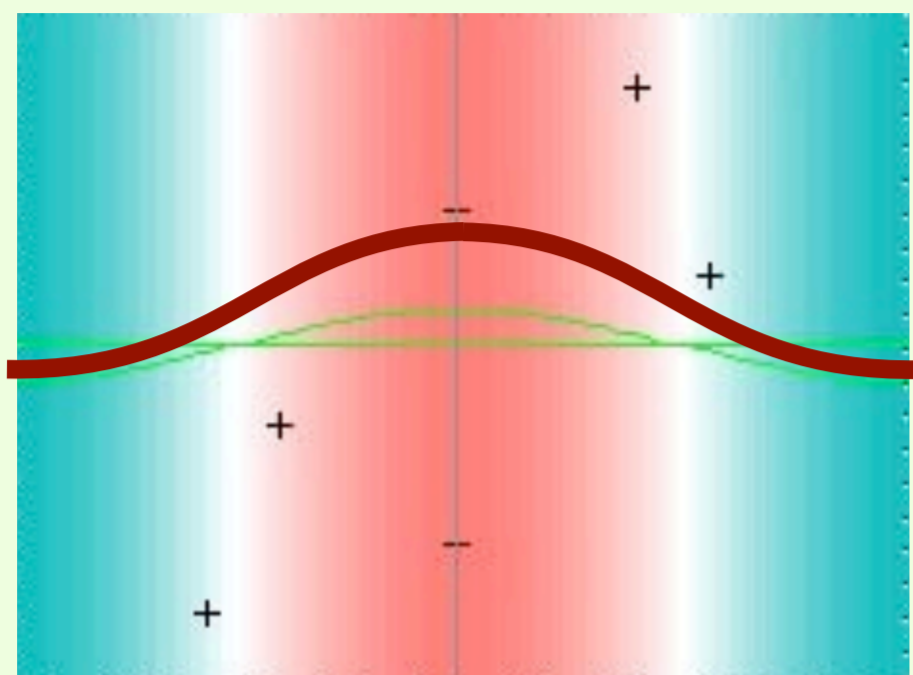
(実際はこのスライドはアニメーションになっていて、フーリエ合成の様子が見える)

# フーリエ合成



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。

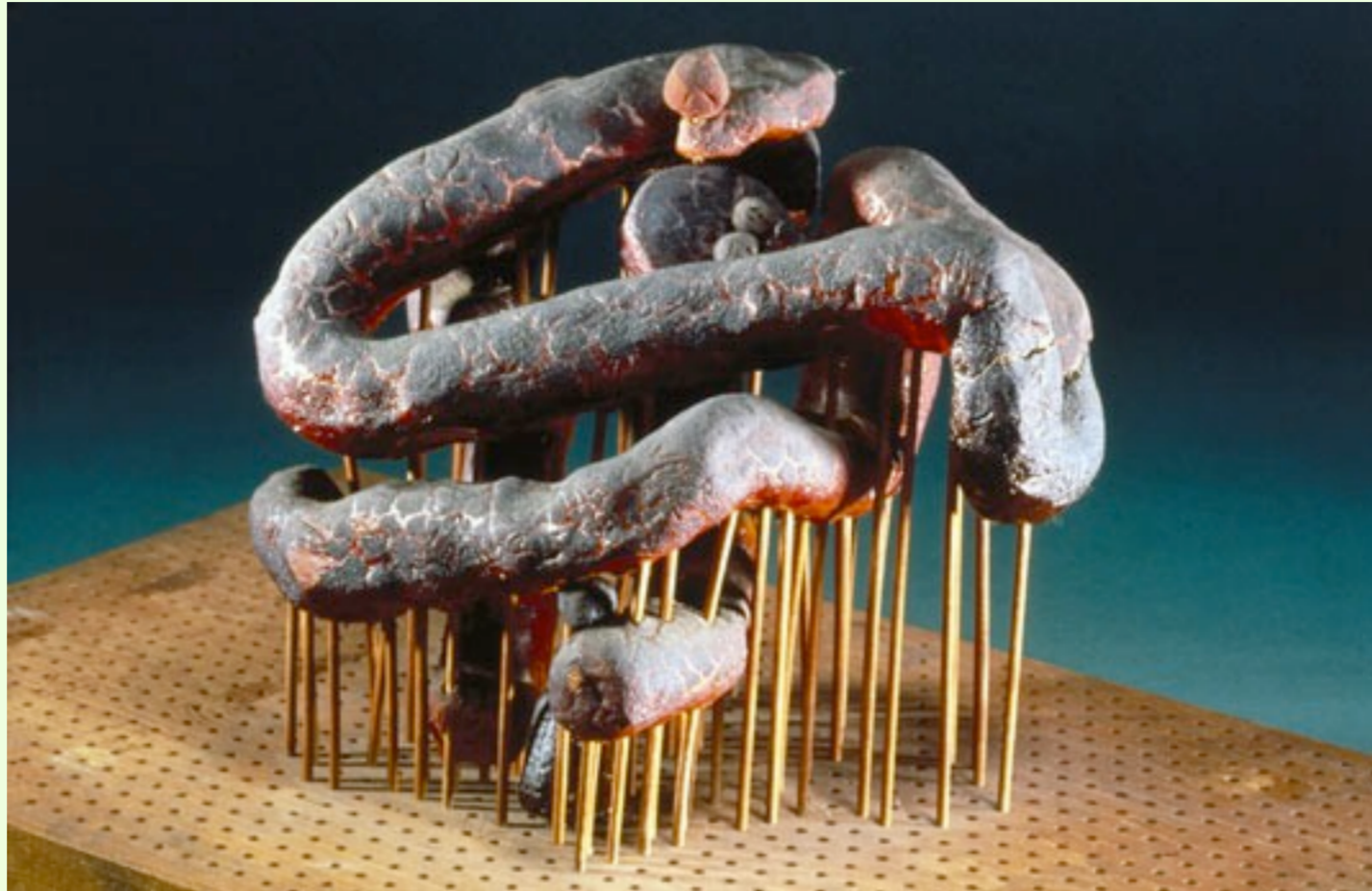
# 位相問題



細かい話は今日はしませんが、実際には「位相問題」という困難があります。一つの回折斑点に対応する電子密度分布の波が結晶格子中でどこに山があるかが実験的には分らないのです。具体的には「周期が1の波の成分」といっても、こんなふうに、波の山がどこにあるのかいろんな場合が考えられます。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、それを重ね合せても何も見えて来ないことになります。

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、そのためです。

# 1957年



ミオグロビンの「ソーセージモデル」  
6Å分解能 (Kendrew ら)

さて、1930年代後半から、1950年代まで、いろいろな人がいろいろな工夫をしました。いくつかのノーベル賞が出ています。そうしてついにタンパク質の「詳細な」構造を解析することが出来る時代が始まりました。

今日の最初にも見ましたが、これはケンドリューらによって解析されたミオグロビンの6Åの構造です。「ソーセージモデル」と言われました。

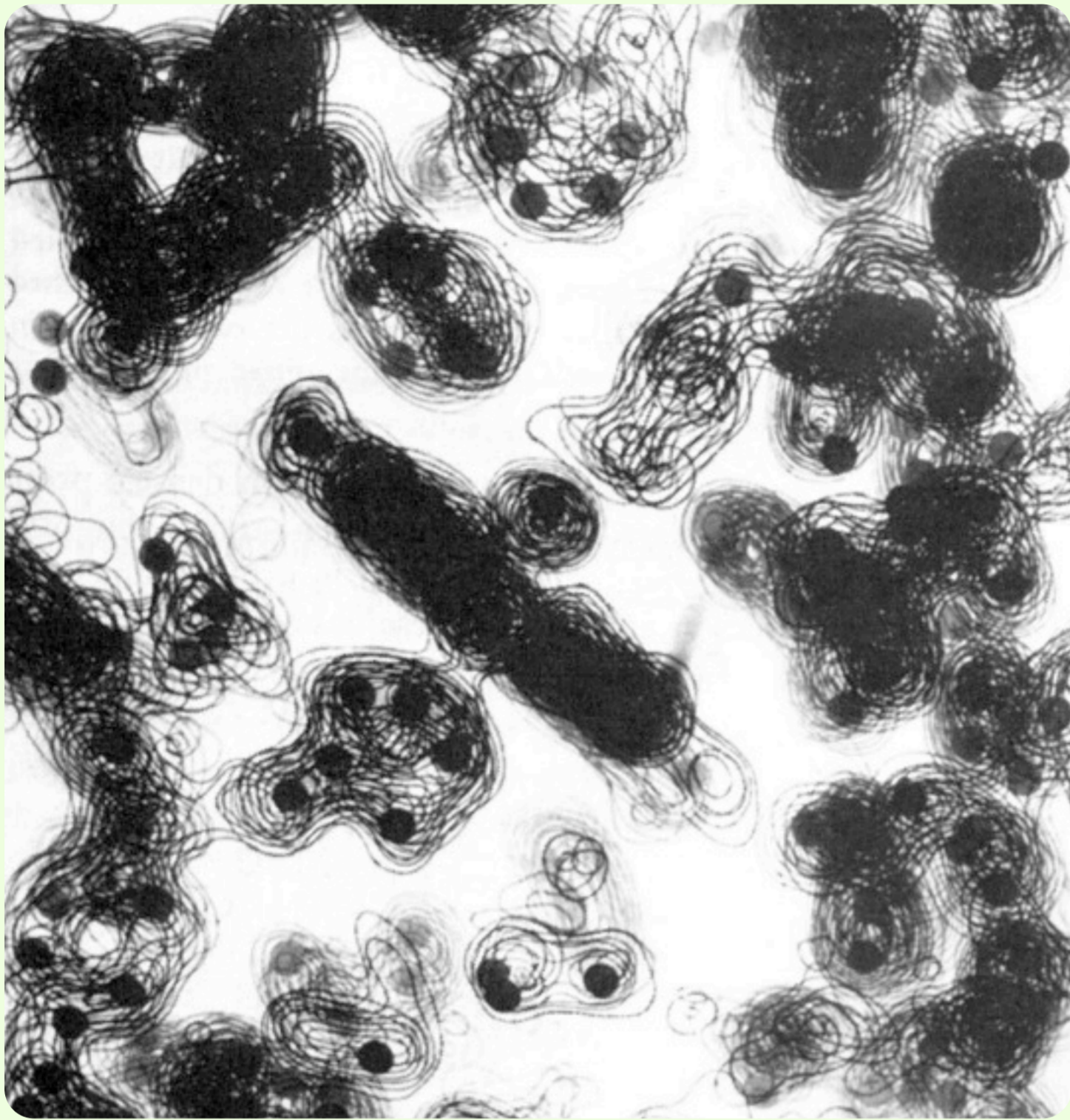


# フランケンドリュー・モンスター



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。このことは当時結構なショックだったようです。

# 1960年



## ミオグロビンの 電子密度分布 (2Å分解能)

58

一旦進み始めると進歩は早く、1960年にはついに2Å分解能、つまり各原子の位置まで決めることが出来ました。

こんなふうにはムの回りの電子密度も、へムの鉄に配位しているヒスチジン残基もきれいに見えます。黒い●が原子位置です。

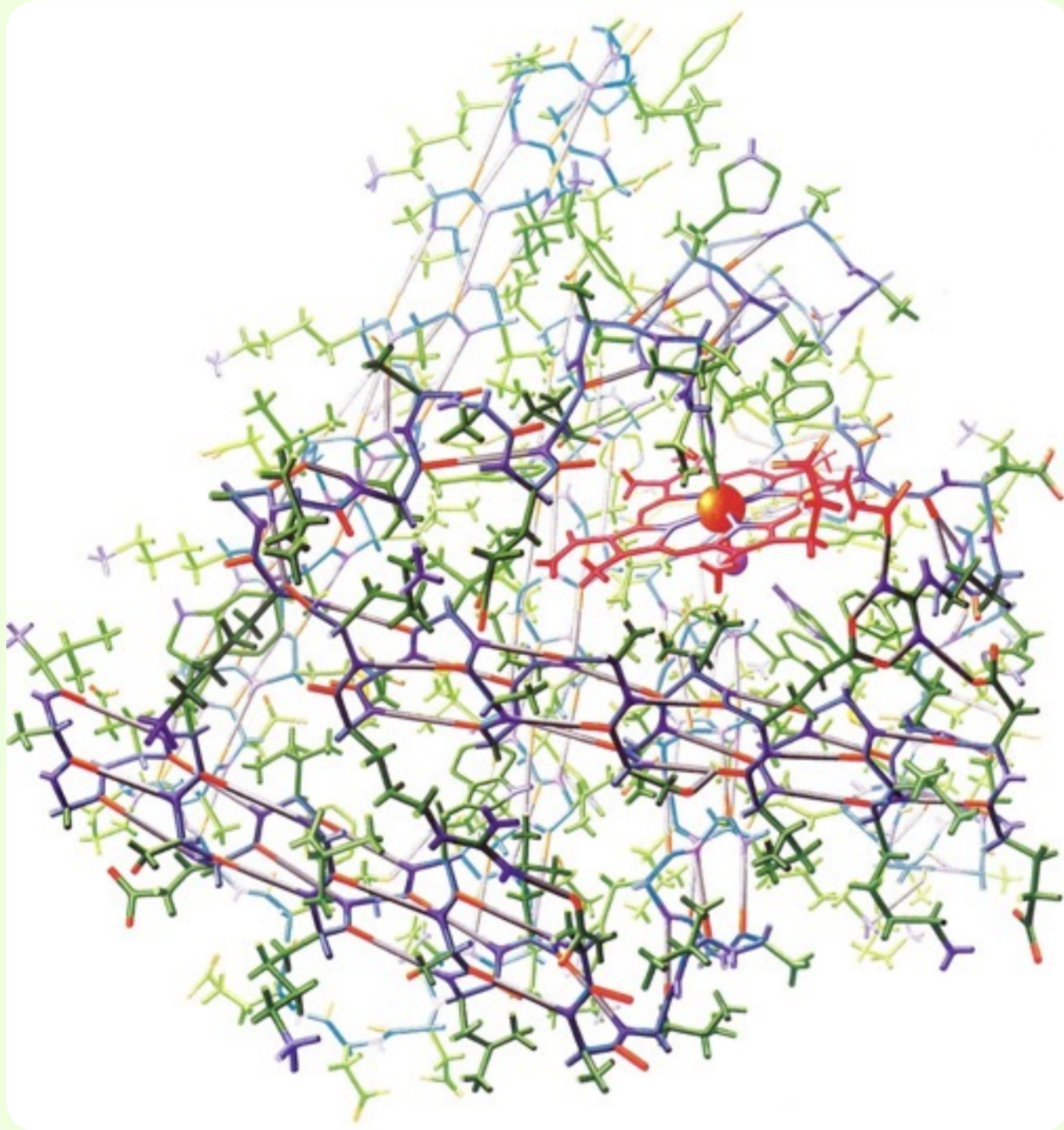
これはコンピューターグラフィクスで描いたものではないですよ。透明なガラス板に手で線を引いて、それを重ね合せて下から光を当てて立体的に見えるようにしたものなのです。

実は、私も最初に構造解析した蛋白質は、こうやって構造を決めました。

もちろん、今ではコンピューターグラフィクスを駆使して解析をします。たぶん、私の世代が、この方法でタンパク質結晶構造解析をしたことがある最後の世代かも知れません。

# 1960年

## ミオグロビンの 2Å分解能構造モデル

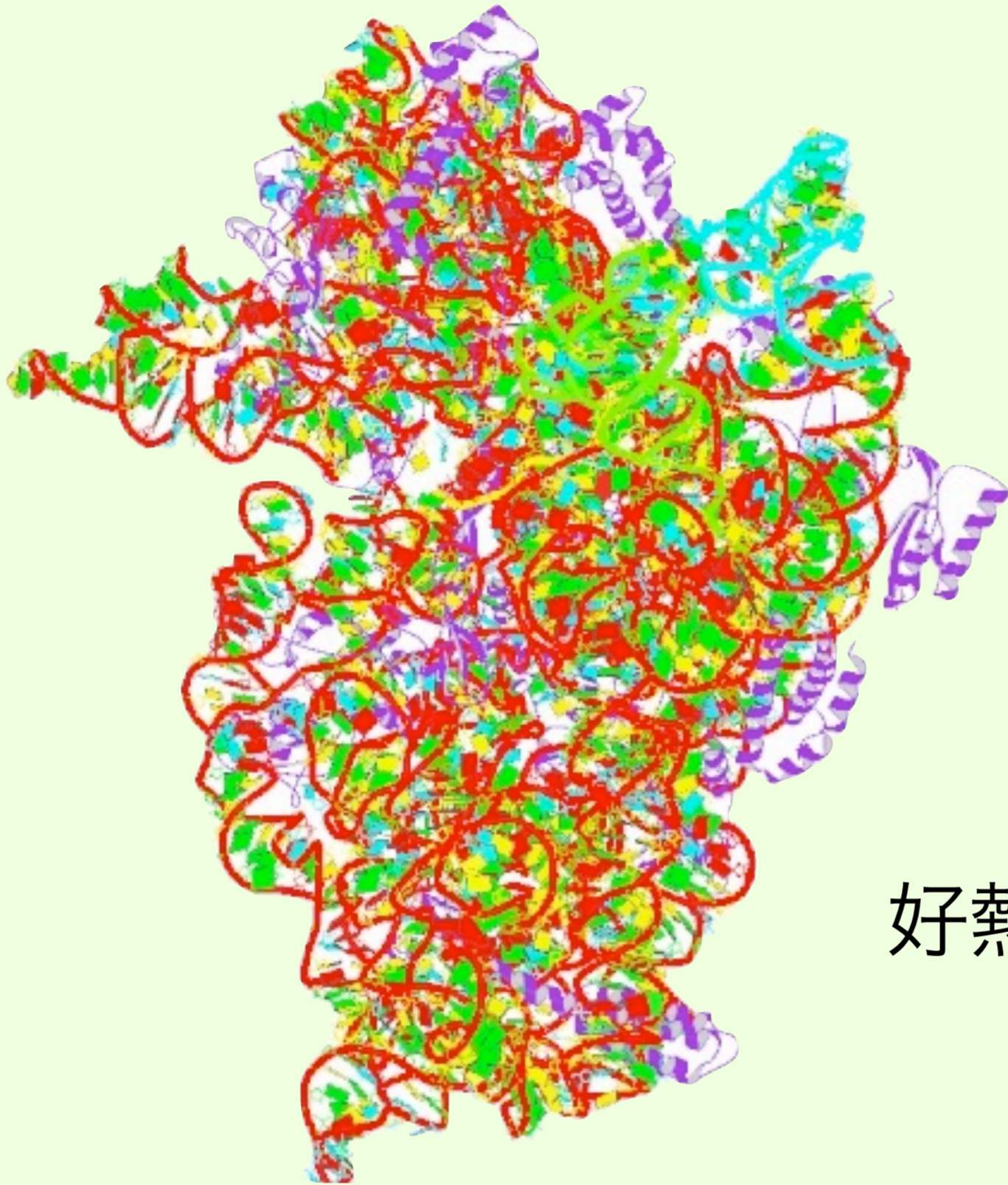


そうして個々の原子の位置までちゃんと分るようになりました。

この図は1961年のケンドリューらの論文に使われた図です。ソーセージではなく、全部の原子の位置が決定されたことが良く分ります。

20年の長い道程の末にようやく解析された構造ですから、ケンドリューらの感動はどれほどのものだったか、ちょっと想像出来ません。

# 現在



好熱菌の70Sリボソーム

60

それからさらに40年経ちました。現在では、ここにあるような、原子数が250万個を超えるリボソームのような超巨大分子複合体でも構造解析が出来る、そんな時代です。

さて、みなさんはこれから専門分野の教育を受けていきます。もしかしたら、色々なことは全部分っていて、物理・化学・生物とかは「記憶科目」のような感覚があるかも知れません。

実際には、もちろん、まだまだいろんなことが未知で、工学部的に言うと、さらにそれらの応用まで考えると、やるべきことはいっぱい残されています。

能力と努力と、そして多少の運も必要かも知れません。ぜひ頑張って勉強して下さい。

授業では教わらないX線結晶学

おしまい

小型シンクロトロン光研究センター  
渡邊 信久