

放射光を用いた多波長異常分散法による ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析

京都大学大学院理学研究科助教授

樋口 芳樹

放射光を用いた多波長異常分散法による巨大タンパク質の立体構造解析

1 研究の背景と目的

本研究は放射光より得られる白色X線を利用した多波長異常分散法により、微生物の水素発生システムを調節している巨大タンパク質・ヒドロゲナーゼの結晶構造を解明することを目的としている。この酵素はこれまで重原子誘導体の調製が困難であったが、最近、2種類の誘導体の調製に成功して、活性部位の鉄やニッケル原子の位置を6 Å分解能で同定している。しかし重原子同型置換法ではこれ以上分解能を上げることは困難なため、この分子の持つ鉄とニッケル原子の異常分散効果を利用した多波長異常分散法を計画している。これらの金属原子の異常分散効果の大きい波長を放射光より選び、異常分散効果を精密に測定し、種々の計算により、観測構造因子の位相情報を得、最終的には3 Å分解能で精密立体構造を解明することを目標としている。

生命現象を支配しているタンパク質の機能はその立体構造に起因している。しかしこれまでに立体構造の解明されたタンパク質は一般的に安定で、結晶化しやすく、また試料の調製の容易な、いわゆる結晶構造解析に向いているものに限られていた。これはタンパク質の結晶構造解析の中心的手法である多重原子同型置換法のための重原子誘導体の調製に時間と多量の試料を必要とすることが原因である。最近、多波長異常分散法という方法が新しい構造解析法としてにわかに脚光を浴びてきている。この方法は結晶中の金属原子などの異常分散効果に基づく回折強度の小さな変化を精密に測定してこれを解析に利用する方法で、これまでは分子量の小さな分子のみに有効であると考えられていた。

しかし、アメリカのHendricksonらにより理論式が見直され、分子量の大きな分子にもその有効性が確認されたことによりタンパク質にも適用できることが分かってきた。特に、近年の放射光技術の著しい進歩により、異常分散効果を大きく測定できる波長のX線が安定に利用できるようになったことがこの方法の利用価値を引き上げてきている。

2 研究方法・研究内容

以下に示す実験計画のもとに研究を遂行した。

- (1) 硫酸還元菌を大量培養し、その菌体よりヒドロゲナーゼを抽出、精製する。
その試料から質の良い大きな結晶を調製する（約3.5 mm）。
- (2) 回折データの測定は高エネルギー物理学研究所・放射光施設・BL-6Aで巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いて測定する。このデータ測定のために鉄やニッケル原子の異常分散効果の最も大きな波長を実験的に選ぶ。
- (3) 得られたデータに種々の補正を施し、実際の異常分散効果による測定物理量を実験データから正確に見積る。
- (4) これらの値からすでに求めている鉄とニッケル原子の結晶中の座標位置を更

に精密化し、最終的にネイティブ結晶の構造因子の位相情報を求める。
(5)その後、この位相化した構造因子から電子密度を計算し、現在よりも分解能の高い電子密度図を得、それより分子モデルを構築する。

3 研究結果

(1)多波長異常分散実験

異常分散効果を測定する実験は5つの波長のX線（1.040、1.489、1.730、1.743、1.750 Å）を用いた。1.040 Åは鉄原子もニッケル原子も異常分散効果の小さな波長であり、1.488 Åはニッケルの吸収端、1.730 Å、1.743 Å、1.750 Å鉄原子の吸収端の近傍の波長である。本実験ではX線の照射位置を測定波長毎に変えてやることにより放射線損傷に依存しない回折データを1個の結晶から収集したので放射線損傷の補正や結晶間スケーリングなどの誤差から解放された精度の良いデータが収集できた。測定したX線回折データより鉄およびニッケル原子の異常分散効果が有意に測定されているかどうかをみるため各波長のX線による回折データ間の平均強度変化率を見積もったところ第1表に示すような値を示した。これによると両原子とも $\Delta f'$ 値の理論値の大きな波長（鉄原子の場合1.743 Å、ニッケル原子の場合1.488 Å）と小さな波長（ともに1.040 Å）の回折データ間の平均強度変化率が他と比べて大きく $\Delta f'$ 値が有意に測定されたことを示していた。同様に $\Delta f''$ の大きな波長で測定した回折データ内でのパイフット対の平均変化率から異常分散虚数項 $\Delta f''$ が有意に測定されたことがわかった（第2表）。

(2)結晶構造解析

得られた回折強度データから実際の異常分散効果による測定物理量（ $\Delta f'$ および $\Delta f''$ ）を実験データから正確に見積った。この多波長異常分散を示す回折データとネイティブ結晶の回折データとの差および $\Delta f'$ 、 $\Delta f''$ の値からすでに求めている鉄とニッケル原子の結晶中のおよその座標位置を更に精密化し、最終的にネイティブ結晶の構造因子の位相情報を求めた。この位相化した構造因子から電子密度を計算し、現在よりも分解能の高い電子密度図を計算した。この電子密度図に対して最初アミノ酸主鎖のみの分子モデルをグラフィックワークステーションを用いて構築した。次に、そのモデルを元に分子マスクをプログラムOを利用して計算し、それをもとに溶媒領域平滑化および電子密度精密化の手法を用いて先の電子密度図を更に改良した。これらの操作の妥当性は信頼度因子である、 R 、 R_{free} で逐一モニターをした。改良された3 Å分解能の電子密度図に対して側鎖も含めた全原子の分子モデルを構築した。

(3)結晶構造

ヒドロゲナーゼ分子は大、小2つのサブユニットからなるヘテロダイマーで、それぞれ567および267残基からなる。分子全体の概略図を第1図に示す。

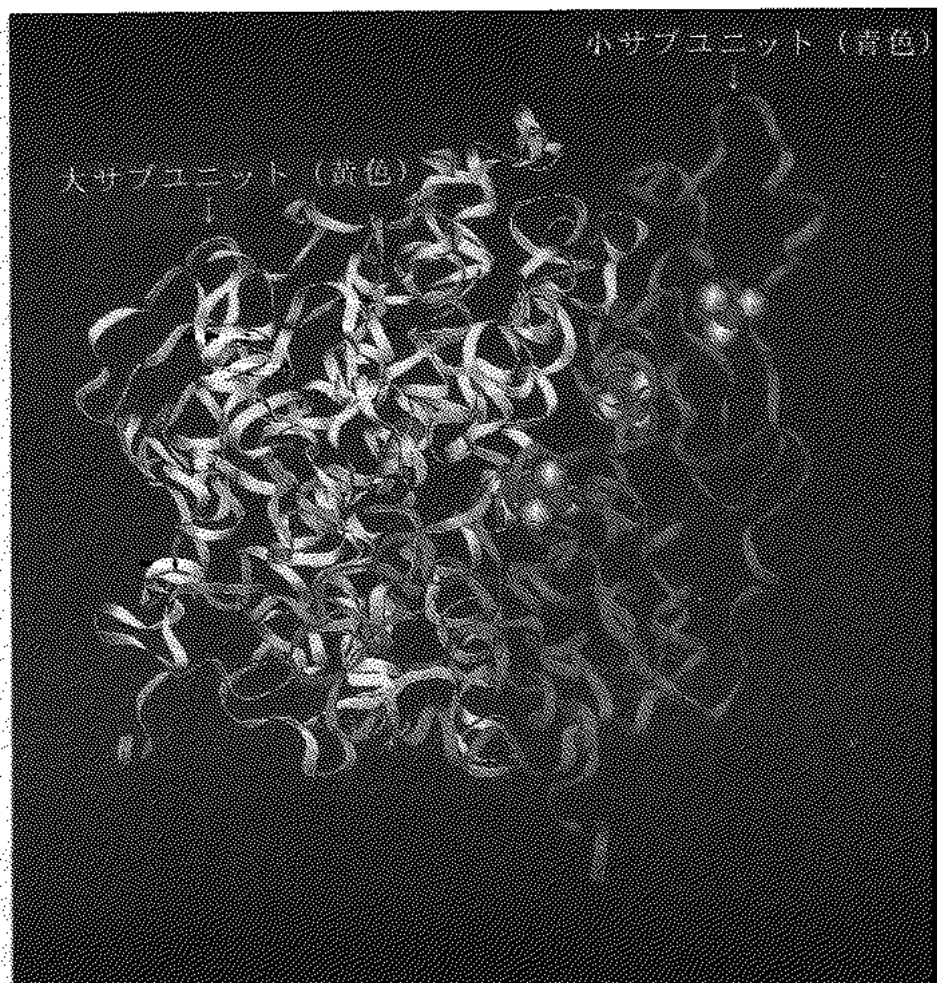
大サブユニットを黄色で、また小サブユニットを青色で示す。分子全体の大きさは a , b , c 軸方向にそれぞれおよそ 70, 62, 65 Å あり、サブユニット間には S-S 結合のような共有結合は見られない。分子量と結晶単位格子の大きさから予想されたように分子は結晶格子中に密に充填しており隣接の分子間と強い相互作用をしていた。両サブユニットともに N 末端および C 末端側のいくつかの残基は電子密度図上に原子をフィッティングすることができなかった。大サブユニットの N 末端部分はこの分子を膜成分から抽出する時トリプシン処理により切断されて除かれてしまっている可能性も考えられる。大サブユニットは α -ヘリックスに富んでいる。水素の酸化還元活性中心であるニッケル原子はこの大サブユニットに保持されている。大サブユニットはニッケルを含むドメインと主に α -ヘリックスからなるドメインの 2 つにわけられる。ニッケルを保持しているドメインは N 末端と C 末端に β -シートを形成している。ヘリックスドメインには 30-40 残基の長いヘリックスが 4 本あり、固い骨格を形成している。小サブユニットはあまり特徴的な 2 次構造を示さないが、N 末端にフラボドキシン様の平行型の β -シートを持つ。3 個の鉄・イオウのクラスターすべてを共有結合で保持している。また、大小サブユニットのインターフェースは疎水性の側鎖により形成されている。

第 1 表 鉄およびニッケル原子に 5 種類の波長の X 線を照射したときの異常分散実数項 ($\Delta f'$) の理論値と各波長間の回折データの変化率

波長	Fe	Ni	回折データ間の変化率 (%)				
	$\Delta f'$	$\Delta f'$	1.040 Å	1.743 Å	1.730 Å	1.750 Å	1.489 Å
1.040 Å	0.20	-0.05	3.90	7.85	6.82	7.31	5.09
1.743 Å	-9.21	-1.75		4.58	5.17	5.96	6.82
1.730 Å	-4.49	-1.78			6.52	5.17	5.87
1.750 Å	-5.33	-1.72				4.39	6.40
1.489 Å	-0.79	-7.39					5.29

第 2 表 鉄およびニッケル原子に 5 種類の波長の X 線を照射したときの異常分散虚数項 ($\Delta f''$) の理論値と各波長の回折データのバイフット対の平均変化率

波長	Fe	Ni	バイフット対の平均変化率 (Rano) %
	$\Delta f''$	$\Delta f''$	
1.040 Å	1.66	2.16	4.25
1.743 Å	-	0.63	5.73
1.730 Å	3.89	0.63	6.88
1.750 Å	0.47	0.64	5.35
1.489 Å	2.97	-	5.54



第 1 図

ヒドロゲナーゼ分子のリボンモデル
大サブユニットを黄色で、また小サブユニットを青色で示す。

4 研究がもたらす効果及び波及効果

本研究が成功すれば 以下に示すような波及効果が期待できる。

a. 生物がエネルギーを獲得するための一連の反応系の中心酵素は ATP 合成分解酵素である。この酵素を活性化するためには細胞膜の内外にプロトン濃度勾配がつくられる必要があることは良く知られている。ヒドロゲナーゼは細胞膜表層に存在する膜タンパク質で膜周辺の分子状水素の酸化還元を触媒するという機能を持つ。つまりこのヒドロゲナーゼは膜内外のプロトン濃度勾配を直接支配して、ATP 合成分解酵素の働きを制御していることになる。従って、ヒド

ロゲナーゼは生物のエネルギー代謝系を円滑に進めるために非常に重要な役割を持つ可能性がある。ヒドロゲナーゼの立体構造を明らかにすることは生命維持のメカニズムのうち最も重要なエネルギー代謝に関わる部分の構造と機能の関係が解明されることになり大きな意義がある。

b. ヒドロゲナーゼ分子の活性部位は鉄-イオウのクラスターを3個とニッケル原子1個から構成されている。現在まで、約300種類のタンパク質の立体構造が解明されてきているが、ニッケル原子を持つタンパク質の構造が解明された例はない。タンパク質中で希にしか見られないニッケル原子にどのようなアミノ酸側鎖が配位し、ニッケル原子の配位状態がどのようなになっているかは多くの研究者の間で最近頻繁に議論されている。また、これまで鉄-イオウのクラスターを2個まで持つタンパク質の立体構造の解明例はあるが3個以上持つタンパク質が解析された例はなく、この酵素の3個のクラスターがどのように機能に関係しているかが注目されている。3個のクラスターのうち、1個は3Fe-4S型であることが分かっているが、これが水素の分解、合成に関与しているのか、それともフェレドキシンやチトクロムノように電子伝達のみ役割を持っているかを明らかにすることは興味深い。更にフェレドキシンなど鉄-イオウのクラスターを持つ他のタンパク質との構造比較によりこの分子の進化や分化について新しい情報を得ることが期待される。特にヒドロゲナーゼがフェレドキシンの部分構造を持つかどうかは分子進化の研究に重要な知見を与える。