



化学遺産の第 11 回認定 1

認定化学遺産 第 051 号

タンパク質 (チトクロム c, タカアミラーゼ A) の 3 次構造模型

我が国におけるタンパク質結晶学のあけぼの

月原富武 Tomitake TSUKIHARA

タンパク質結晶学のはじまりは 1958 年英国の Kendrew らによるミオグロビンの構造解析に代表される。我が国では大阪大学蛋白質研究所の角戸正夫 (1918~2005) らが、タンパク質の結晶作りから X 線結晶解析用の装置類と構造解析プログラムの開発を行い、タンパク質結晶学の道を拓いた。その成果として保存されているカツオの還元型チトクロム c およびタカアミラーゼ A のモデル (4 件) は日本のタンパク質結晶学のレベルの高さを示すにふさわしいとして化学遺産第 051 号として認定された。

はじめに

「タンパク質 (チトクロム c, タカアミラーゼ A) の 3 次構造模型」の日本化学会化学遺産認定に当たって、大阪大学蛋白質研究所におけるタンパク質結晶学の足跡を辿ってみる。ちなみに筆者は大学院生として当研究所で初期のタンパク質結晶学に関わることができた。その経験と角戸正夫教授退官記念研究業績目録「えっくす線と共に」などを元に我が国における初期のタンパク質結晶学を紐解いてみたい。

タンパク質結晶学の立ち上げ準備

我が国におけるタンパク質結晶構造解析のはじまりは、1959 年に角戸正夫と笹田義夫が大阪大学に新設された蛋白質研究所物理構造部門に移った時点にさかのぼることができる。角戸は 1958 年 1 月に留学先の米国ブルックリン工科大学において Kendrew によるミオグロビンの結晶構造解析の成功の第 1 報に接していた。角戸たちは解析すべきタンパク質を、大阪大学理学部奥貫一男の研究対象であったチトクロム c と蛋白研初代所長赤堀四郎のタカアミラーゼとした。

当時ミオグロビン (2.0 Å 分解能)¹⁾ やヘモグロビン

(5.5 Å 分解能)²⁾ の構造解析が報告されて、英国で始まったタンパク質結晶学が世界へ拡がりつつあった。

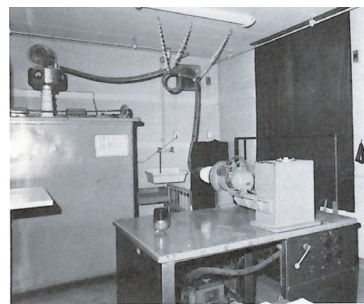
その時期に笹田は米国、英国に留学してタンパク質結晶学の研鑽を積んだ。帰国後日本化学会編集の実験化学講座 (続) 8 巻に収録された総説は、回折実験法から構造解析法にわたるタンパク質結晶学の有用な教科書であった。

蛋白質研究所では 1959 年に GE 社製の 3 軸型の回折計が導入され、プレセッションカメラとともに回折実験装置が整えられた。角戸は前任の工学部時代から尽力して 300 mA の X 線発生機 (図 1) の開発に成功していた。その後、1966 年には植木龍夫を中心に理学電機社と共同で 4 軸型自動回折計を開発した。

タンパク質結晶調製では、堀尾武一の助言を得つつ高野常広を中心にチトクロム c の精製・結晶化を行った。結晶構造解析法も様々な問題について毎週開かれる雑誌会で活発に議論された。芦田玉一はタンパク質結晶構造解析に関する総説を生物物理学会誌にまとめた。この総説は、位相決定の原理から実際まで正確に

つきはら・とみたけ

大阪大学名誉教授、兵庫県立大学特任教授
〔略歴〕 1967 年大阪大学薬学部卒、71 年鳥取大学工学部助手、73 年同講師、78 年同助教授、91 年徳島大学工学部教授、95 年大阪大学蛋白質研究所教授、2008 年大阪大学名誉教授、兵庫県立大学特任教授。〔主な受賞歴〕 日本結晶学会賞 (1987 年)、The Amgen prize of Protein Society of USA (1996 年)、文部科学大臣賞 日本結晶学会西川賞 (2010 年)、内藤記念科学振興賞 (2013 年)。



昭和 39 年 300 mA X 線発生機

図 1 強力 X 線発生機

書かれていて、筆者は疑問が生じた際やプログラム作成時にはいつも参照していた。

その後、笹田は東京工業大学に移ったが、角戸、芦田、高野、植木を中心に、結晶化の目処が立っていたカツオの心筋のチトクロム *c* の結晶構造解析を最優先にした。タカアミラーゼ A はしばらく結晶化法を探ることとした。

カツオの還元型チトクロム *c* の精製・結晶化

チトクロム *c* 精製用のカツオの心臓は、灯油缶に詰めたものを約 30 缶焼津から購入して、冷蔵会社の冷凍庫で保存した。毎回 1 缶ずつ処理して約 1 週間で心臓 20 kg から 3 g のタンパク質を得て結晶化に供した。現行の 1000 倍のスケールである。

結晶化は 6.5% (w/w) という高濃度のタンパク質溶液数 ml を試験管に入れて行った。この結晶化は硫酸塩析法で、最初硫酸濃度を 60% 飽和にして、その後硫酸粉末を少しずつ加えて過飽和状態にして、室温に静置する。数日すると試験管全体がゲル化して、逆さにしても液が溢れなくなる。それから数日すると試験管壁に結晶核を示す黒い斑点が見えるようになる。結晶核が成長するにつれてその周囲の色が薄くなる。ゲル状態のタンパク質が結晶に移行する。この特異な結晶成長の過程は高野によって動画で記録されている。

還元型チトクロム *c* の回折強度測定

1960 年代におけるタンパク質結晶の回折強度データ収集法はプレセッションカメラによる写真法とカウンターで回折強度を係数する回折計による方法であった。蛋白質研究所では、正確な回折強度を計測できる 4 軸回折計法によって行った。3 軸 (ω, χ, ϕ) は結晶の方位、残りの 1 軸 (θ) は強度を観測するカウンター位置の設定に使う。チトクロム *c* 結晶の格子定数は $a=58 \text{ \AA}$ 、 $b=85 \text{ \AA}$ 、 $c=38 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ で、当時経験していた有機化合物結晶と比べると桁違いに大きく回折実験も困難を極めた。最も大きな違いは測定すべき反射数の多さである。有機物結晶と比べれば 2 桁以上多

い反射の強度を観測することになり、自動回折計を開発した。

回折強度データ収集法では、結晶の *c* 軸を回折計の ϕ 軸に平行にして、特定の結晶面の回折強度計測時にほかの結晶面による反射が同時に計測されるのを回避した。植木は迅速かつ正確な軸立てを行う手順をマニュアル化し、回折実験の迅速化を図った。各斑点の積分強度を求める方法には、ピーク値やピーク前後数点の和で代用する方法、 $\omega/2\theta$ 走査法、 ω 走査法があった。それぞれ長所、短所があるが、重原子誘導体でのモザイク幅の大きい斑点の正確な強度測定にも対応できる ω 走査法を採用した。結晶は脱水を避けるために常法に従ってガラスキャピラリー中に封入した。

構造解析ソフトウェアの開発

1967 年に大阪大学で大型計算機 NEAC2200 が利用できるようになった。それまで機械語の紙テープ入力であったのが、言語は FORTRAN、カード入力が行えるようになってプログラム作成効率が飛躍的に高まった。何よりも大きく変化したのは使用できる容量が増えたことであった。結晶構造解析プログラム開発は芦田を中心に行われた。多くのプログラムが開発されたが、そのうち最も重要なプログラムは、重原子同型置換体の重原子パラメータを精密化するプログラム“LS3D”と、最良位相角計算と最良電子密度計算を行うプログラム“PHASE”である。当時、構造解析計算に使われる種々のパラメータの扱いが定着しておらず、独自に検討を重ねて使用された。

重原子誘導体の調製と位相決定

構造解析の成功の鍵は良好な重原子誘導体を得るか否かにかかっており、その調製は困難を極めた。最初に見つかった誘導体は K_2HgI_4 であったが利用できたのは 6 \AA 分解能までだった。次に K_2PtCl_4 が見付き最後に最も良い誘導体 $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$ を得た。重原子誘導体調製に苦戦した理由は、還元型チトクロム *c* の結晶は溶媒の占める体積が結晶全体の 34% と極めて小さい

ことにある。重原子が入ると容易に結晶格子が壊れるのである。4 Å分解能の構造解析では、Pt-誘導体は同型性が悪くて5 Å分解能までしか使えなかった。5~4 Å分解能領域は実質的にU-誘導体の位相情報のみであったが、得られた電子密度分布は良好で、ヘムやヘリックスを同定できるものであった³⁾。このときに得られた電子密度分布に基づいて作成したモデルを図2上に示している。この段階で、タンパク質結晶構造解析の最大の難関である位相決定が完成した。その後、田中信夫を中心に新たに、 $(\text{CH}_3)_2\text{SnCl}_2$ 誘導体、 K_3IrCl_6 誘導体が調製されて2.3 Å分解能の構造解析に成功して原子モデル（図2下）が作成された⁴⁾。



図2 チトクロムcの4.5 Å分解能モデル(上)と2.3 Å分解能モデル(下)

タカアミラーゼAの結晶構造解析

チトクロムcの精製結晶化にも尽力していた坂東佐知子が、タカアミラーゼAの結晶化に取り組んで1970年には3種の結晶を得ていた。この酵素の分子量は54000で、単位格子中に3分子存在する最も質の良い結晶を構造解析の対象に選んだ。すなわち、分子量16万という当時どこでも経験のない巨大なタンパク質のX線結晶構造解析への挑戦であった。1973年に角戸の念願であった強力なX線発生装置を備えた4軸自動回折計（理学電機社製）が納入されて迅速なデータ収集が可能になった。1980年に松浦良樹博士と当時大学院生であった楠木正巳が3 Å分解能での位相決定に成功して、分子モデル（図3）を作成することができた^{5,6)}。これによって蛋白質研究所発足以来の赤堀四郎の大名

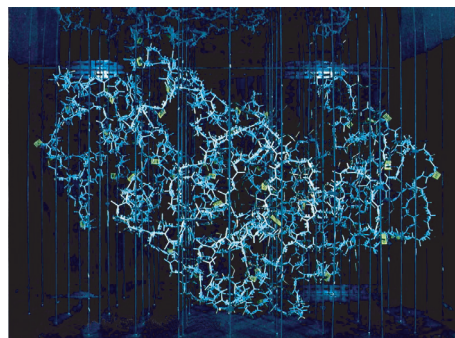


図3 タカアミラーゼAの分子モデル

題に解を得た。

おわりに

タンパク質結晶学の初めの頃、蛋白質研究所ではX線回折装置や解析ソフトウェアなどの必要な手法は独自に開発して臨んだ。そのことによって、学生も実験手段の利用法を学ぶだけでなく、手法をより深く理解するとともに困難に挑戦する勇気を養うことができた。筆者自身もチトクロムcに続いてそれと相互作用するチトクロムc酸化酵素(CcO)、さらにこれらの複合体の結晶構造解析に挑戦することができた。巨大な分子の構造解析であったタカアミラーゼAに続く結晶構造解析として、当研究所ではイネ萎縮ウイルス、ポルト、ダイニンの解析にも成功した。それぞれは当時最大のウイルス、最大のタンパク質集合体、最大の単量体タンパク質の解析例としてタンパク質結晶学の可能性を広げるものであった。

今日、タンパク質結晶学は新たな展開が求められている。この度認定された構造モデルに刻まれた先達の足跡を想起して、タンパク質結晶学の新たな飛躍に挑みたい。

- 1) J. C. Kendrew et al., *Nature* **1960**, 185, 422.
- 2) M. F. Perutz et al., *Nature* **1960**, 185, 416.
- 3) T. Ashida et al., *J. Biochem.* **1971**, 70, 913.
- 4) N. Tanaka et al., *J. Biochem.* **1975**, 77, 147.
- 5) Y. Matsuura et al., *J. Biochem.* **1980**, 87, 1555.
- 6) Y. Matsuura et al., *J. Biochem.* **1984**, 95, 697.

© 2020 The Chemical Society of Japan