

# バイオエキスパート

## 11.原子の解像度でわかるタンパク質の構造と機能-タンパク質のX線結晶構造解析-

### X線結晶構造解析

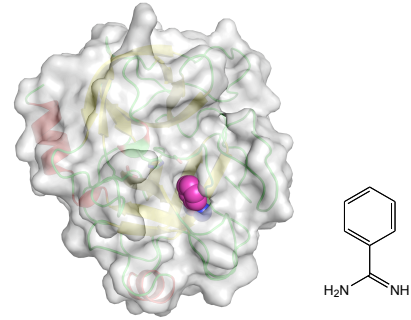
タンパク質や核酸それらの複合体など、生体超分子の立体構造を決定する最も強力な構造生物学的手法の一つ。

### 構造生物学

立体構造に基づき、タンパク質の機能を理解する。

### なぜX線を使うのか？

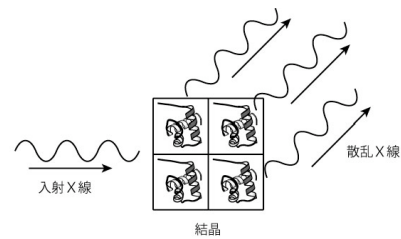
一般に、見ようとする物体の大きさよりも短い波長の光を使わないと、それを観ることはできない。原子の大きさは数Åであるため、原子レベルでの構造解析を行うにはX線の波長領域は最適である。



タンパク質分解酵素と阻害剤の複合体構造

### なぜ結晶を使うのか？

分子(電子)にX線が当たると、散乱X線を生じる。この散乱X線を直接観測できればフーリエ変換によって、分子構造(電子密度)を得ることができる。しかし、この方法では分子がいろいろな方向を向いてはいけぬ。また、散乱X線の強度は非常に弱いため正確に測定することができない。よって、分子が規則正しく配列した結晶が必要とされる。結晶では、分子が規則正しく並んでいるため、散乱X線は干渉し合い、有意な強度を持つ斑点状の回折像を示す。この回折点の強度データから電子密度を得ることができる。

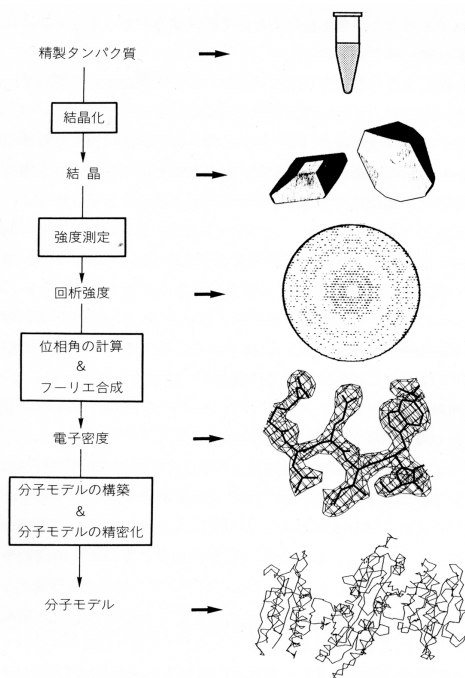


実際には、特別な場合を除き、回折強度から直接電子密度は得られず、位相問題という克服すべき問題がある。位相問題を解決する方法(構造解析法)として、同型置換法、異常分散法、分子置換法などがある。

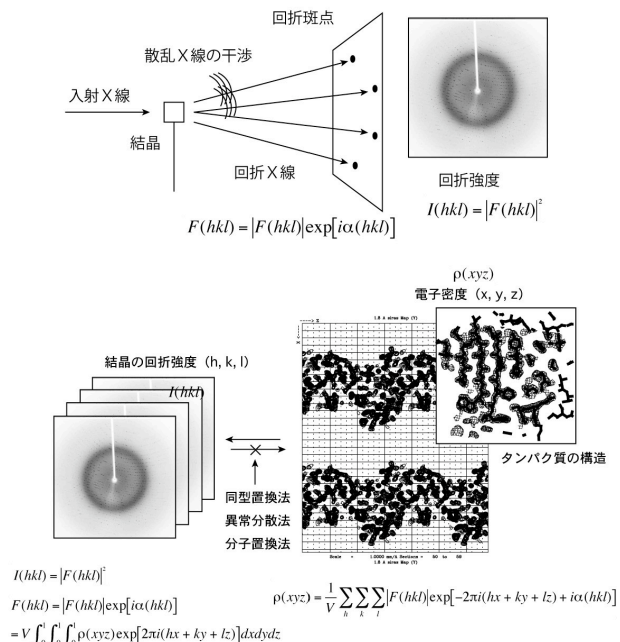
本講座では、タンパク質(リゾチーム)の結晶化と電子密度から分子モデルの構築を行う。

## X線結晶構造解析

### X線結晶構造解析の流れ



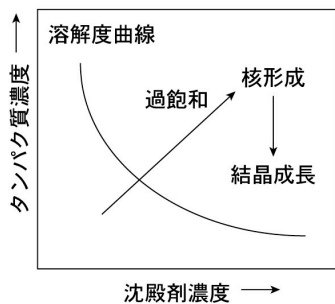
### X線結晶構造解析の概要



## 結晶化

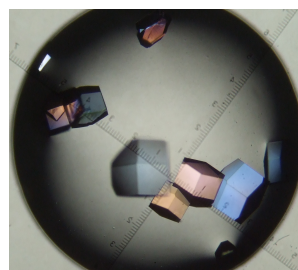
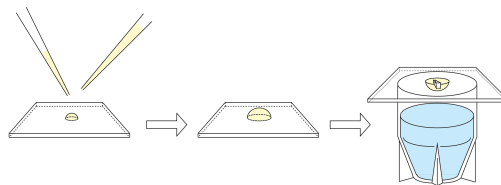
### タンパク質の結晶化

結晶化に及ぼす因子として、溶液のpHと緩衝液の種類、イオン強度、温度、沈殿剤の種類と濃度、タンパク質溶液の濃度などが挙げられる。通常はこれらを変化させた条件下で結晶化実験を行い、最適な結晶化条件を検索していく。本講座では、代表的なタンパク質である鶏卵白リゾチームの結晶化を行う。



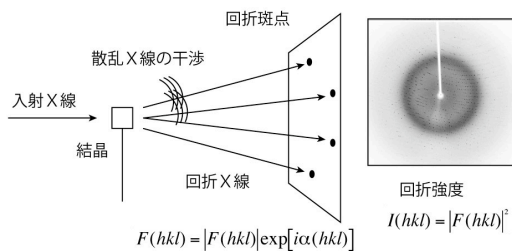
### ハンギングドロップの作り方

グリースを塗ったサンプルカップ、スライドガラスを用意する。リザーバー溶液150μLをカップに入れる。カバーガラスの中央に3μLの溶液をのせ、同量のリゾチーム溶液を加えて合計6μLの液滴(ドロップ)を作る。カバーガラスを反転させ、カップの上に乗せ、上から軽く押さえて、確実に密閉する。

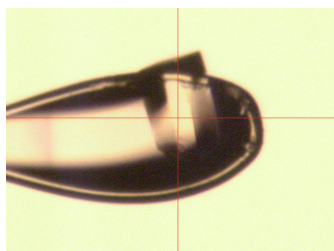


数日後にはこのような結晶が得られるはず

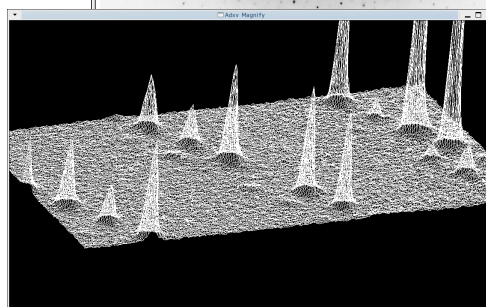
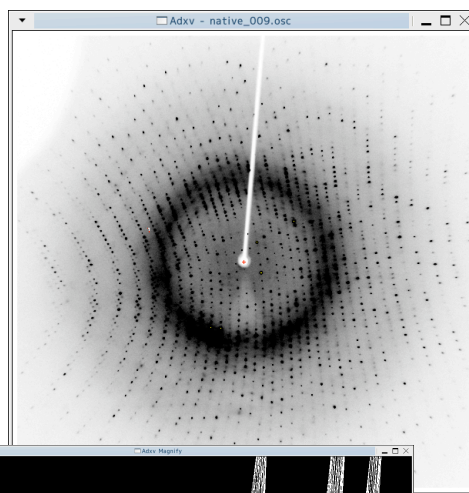
## X線実験



構造解析を行うには、結晶を回転させながら、様々な方向からの回折像を集積する。



凍結したタンパク質結晶



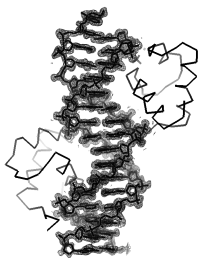
## 構造の構築

実際のX線結晶構造解析では回折強度から電子密度を計算し、タンパク質の電子密度を得るが、本講座では電子密度の計算は割愛し、電子密度からリゾチームの分子構造を構築する。

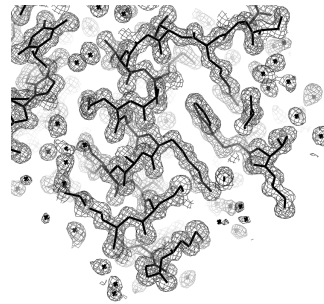
電子密度とは電子が存在している三次元的な分布である。電子が存在している領域の中心には原子が存在するので、電子密度が得られれば、その電子密度に原子を当てはめることで、分子構造を構築できる。タンパク質の場合、アミノ酸から構成されているので、アミノ酸を当てはめていく。DNAやRNAの場合は、核酸を当てはめていく。

本講座によって、20種類のアミノ酸の構造、 $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シートなどのポリペプチド鎖の二次構造を理解し、ポリペプチド鎖が三次元的に折りたたまれてタンパク質の三次構造が構築されることを理解できると思う。右には、 $\alpha$ -ヘリックス構造と $\beta$ -シート構造の電子密度を示した。黒の実線がタンパク質の構造で、その周りのかごの様なものが電子密度である。

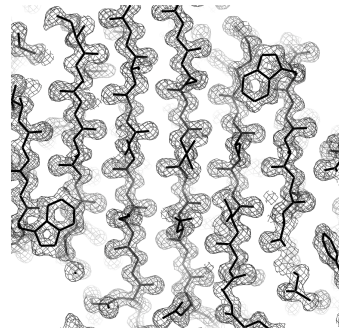
参考までに2本鎖DNAの電子密度を示した。二分子のDNA結合タンパク質がDNAの主溝に結合している様子がわかる(見やすくするためにタンパク質の電子密度は表示していない)。このようにX線結晶構造解析はタンパク質の立体構造や相互作用メカニズムを原子レベルで明らかにすることができる強力な構造生物学的手法の一つである。



DNA結合タンパク質とDNAとの複合体構造



$\alpha$ -ヘリックスの電子密度



$\beta$ -シートの電子密度

本講座では、グラフィックプログラムCOOT(クート)を用いて電子密度から構造を組み立てていく。

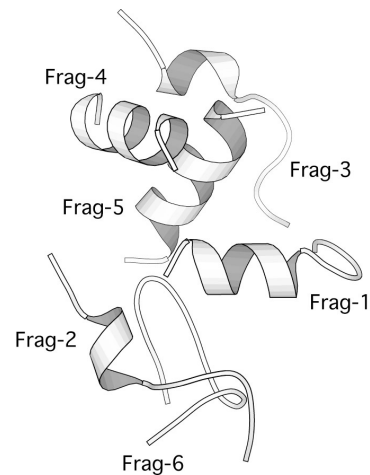
ターミナルを開き、ディレクトリxrayに移動し、cootを起動する。

```
cd xray [Enter] (ディレクトリの移動)
ls [Enter] (ファイルの確認)
coot [Enter] (cootの起動)
```

まず練習として、13残基の $\alpha$ -ヘリックス構造(helix.pdb)を読み込む。これはリゾチーム分子の一部である。全てアラニンで構成されたポリアラニンモデルあり、本来は様々なアミノ酸で構成されている(アラニンも含むかもしれない)。したがって、側鎖の電子密度の形状にフィットするように、本来のアミノ酸に置換していく。これが終わったら、一度COOTを終了する。

再び、COOTを起動し、先と同様に<File><Open coordinates>から構造lysozyme.pdbを、<File><Auto Open Mtz>から電子密度lysozyme.mtzを読み込む。

lysozyme.pdbもリゾチームの部分構造(ポリアラニンモデル)であり、6つのフラグメントから構成されている(右図参照)。アミノ酸の残基番号はリゾチーム本来の番号とは異なっている。電子密度を見ながらこのポリアラニンモデルを電子密度にフィットするように本来のアミノ酸に置換する。また、本来のアミノ酸の番号に変更する。さらに余裕があればフラグメント同士をつなぎ、リゾチームの完全な結晶構造を完成させる。



リゾチームの部分構造

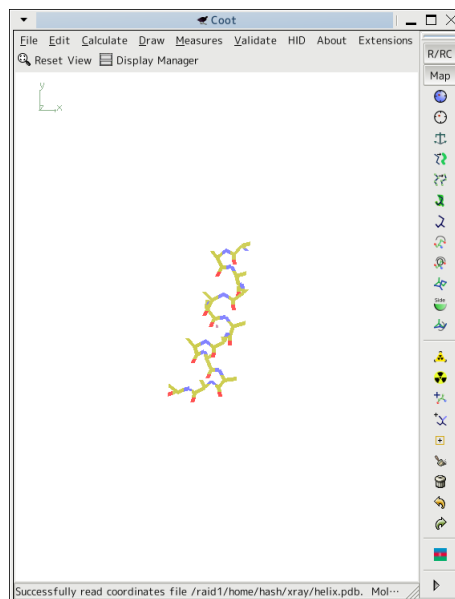
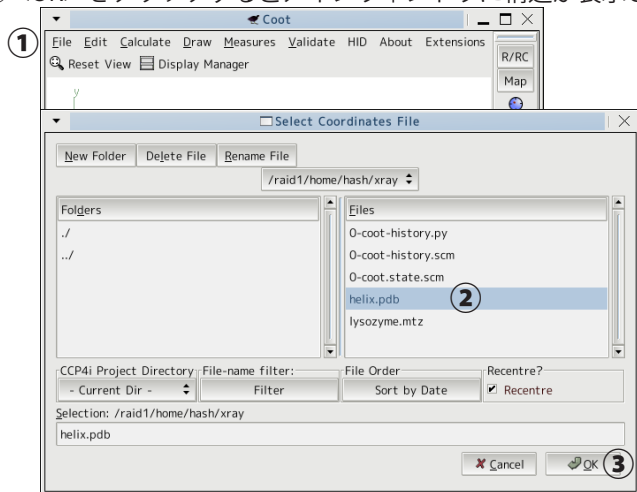
1	11	21	31	41
KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS
51	61	71	81	91
TDYGILQINS	RWWCNDGRTP	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS
101	111	121		
DGNMGNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCR		

Frag-1	1114~1129	16残基
Frag-2	1144~1158	15残基
Frag-3	1300~1214	15残基
Frag-4	1422~1432	11残基
Frag-5	1501~1513	13残基
Frag-6	1623~1638	16残基

# プログラム COOT を使った電子密度からのモデル構築

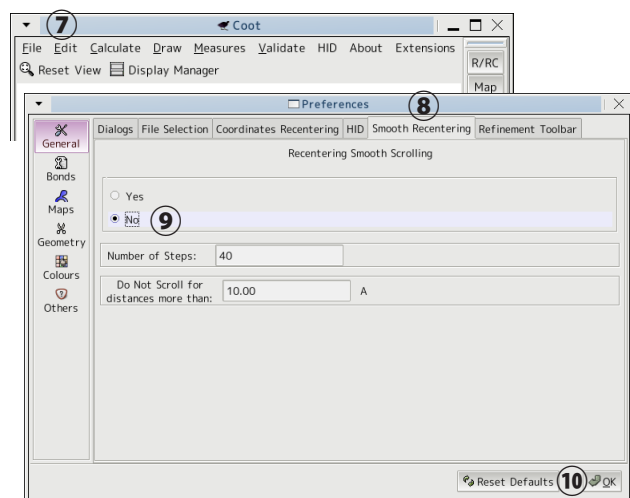
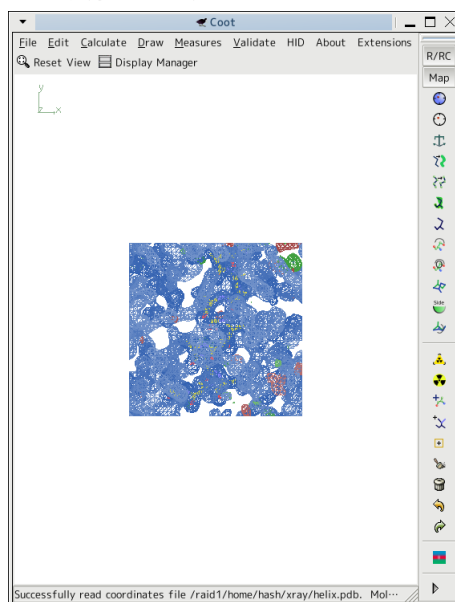
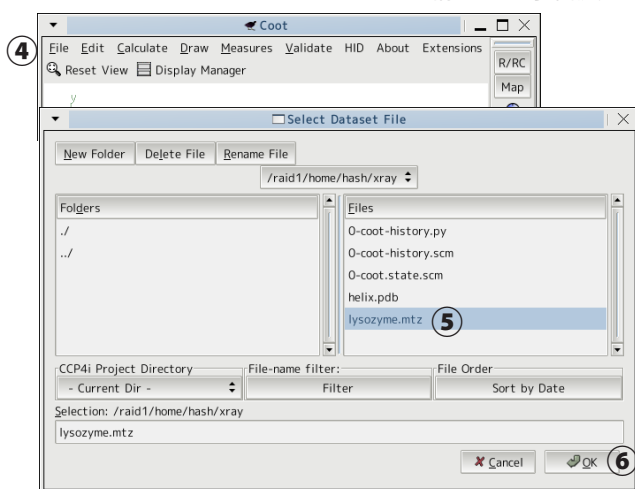
## 構造の表示

- ①メニューの <File> から <Open Coordinates...> を選択する。
- ② helix.pdb を選択する。
- ③ <OK> をクリックするとメインウィンドウに構造が表示される。



## 電子密度の表示

- ④メニュー <File> から <Auto Open Mtz...> を選択する。
- ⑤ lysozyme.mtz を選択する。
- ⑥ <OK> をクリックするとメインウィンドウの構造に電子密度が重なって表示される。



計算機環境によっては、残基の移動に伴う電子密度の描画が負荷となり、操作性が悪くなるので、電子密度の描画方法を変更する。

- ⑦ <Edit><Preferences...> を選択。
- ⑧ <Smooth Recentering> タブを選択。
- ⑨ No を選択。
- ⑩ OK をクリック。

## COOT の基本操作

### マウス操作



左ボタンをクリックしながらマウスを動かすと分子が回転する。



右ボタンをクリックしながらマウスを動かすと分子が拡大・縮小する。



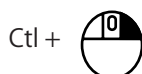
中ボタンで原子をクリックすると、クリックした原子が画面の中心に移動する。



ホイールを回転させると電子密度のレベル(濃さ)が変わる。



コントロール+左ボタンを押しながらマウスを動かすと分子が並進する。



コントロール+右ボタンを押しながらマウスを動かすと画面の奥行きが変わる。

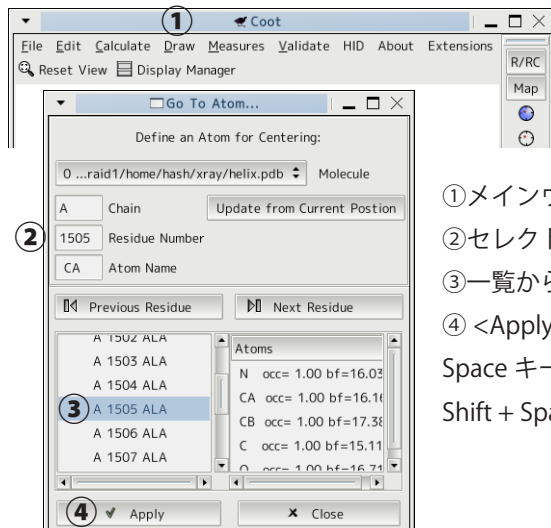


原子を左ボタンでダブルクリックすると残基番号、残基名が表示される。

(Shift + 左ボタンのシングルクリックでも同様)

### 特定の残基に移動

例えば 1505 番のアラニンに移動してみる



①メインウィンドウのメニューから <Draw><Go to Atom..> を選択。

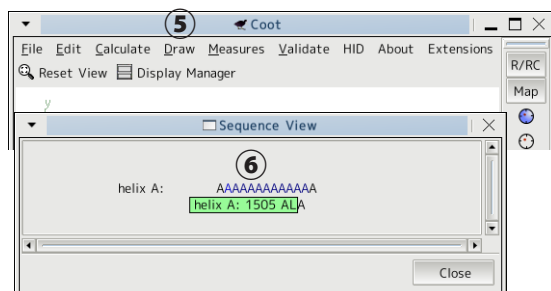
②セレクトウィンドウで、移動したい残基番号を入力するか、

③一覧から移動したい残基を選択。

④ <Apply> をクリックすると、その残基が画面の中央に移動する。

Space キーで次の残基に移動する。

Shift + Space キーで1つ前の残基に移動する。

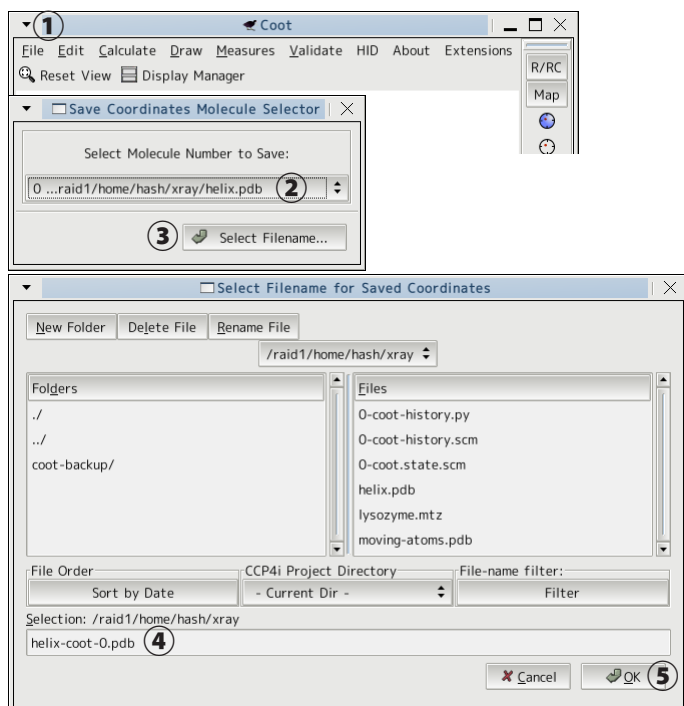


あるいは、

⑤メインウィンドウのメニューから <Draw><Sequence View> で選択し、配列を表示

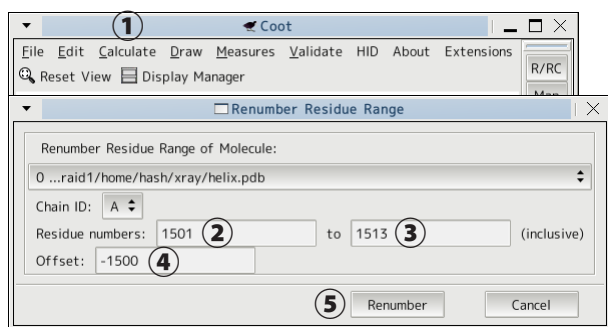
⑥配列にマウスカーソルを合わせると残基番号が表示されるので、クリックするとその残基に移動できる。

## 構造の保存



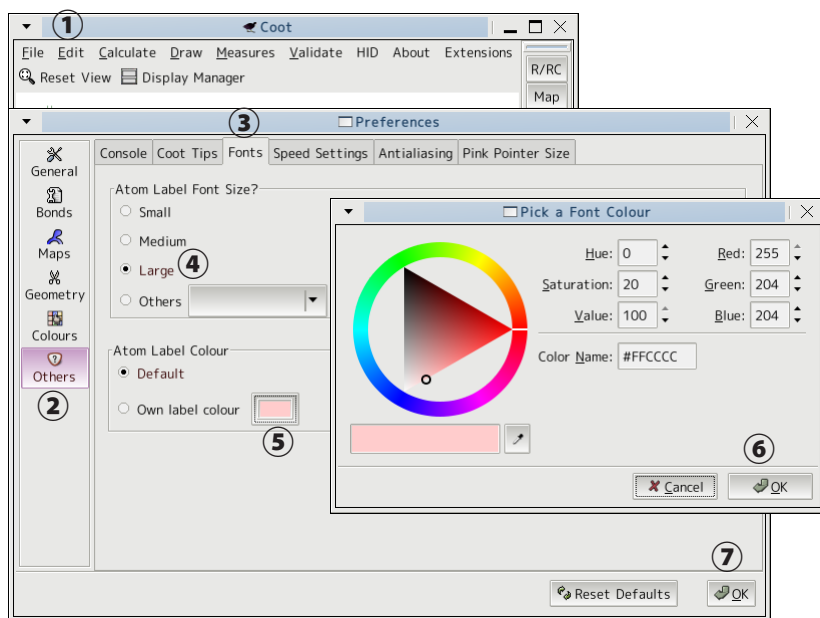
- ① <File><Save Coordinates...> を選択。
- ② 保存したい分子を選択。複数の構造を読み込んでいる場合はプルダウンメニューで保存したい構造を選択する。
- ③ <Select Filename...> をクリック。
- ④ 保存するファイル名を入力する。自動で現在のファイル名に -coot-0 が付加されたファイル名が入力される。通常はこのままでよい。次に保存するときには、-coot-1 となり、番号が増えていく（上書きされることは無い）。
- ⑤ <OK> をクリック。

## 残基番号の変更



- ① <Calculate><Renumber Residues...> を選択。
- ②③ 変更した残基番号の範囲を入力する。
- ④ 補正値を入力する。例えば 1501 から 1513 を 1 から 13 に変更したい場合は -1500 を入力する。
- ⑤ <Renumber> をクリック。

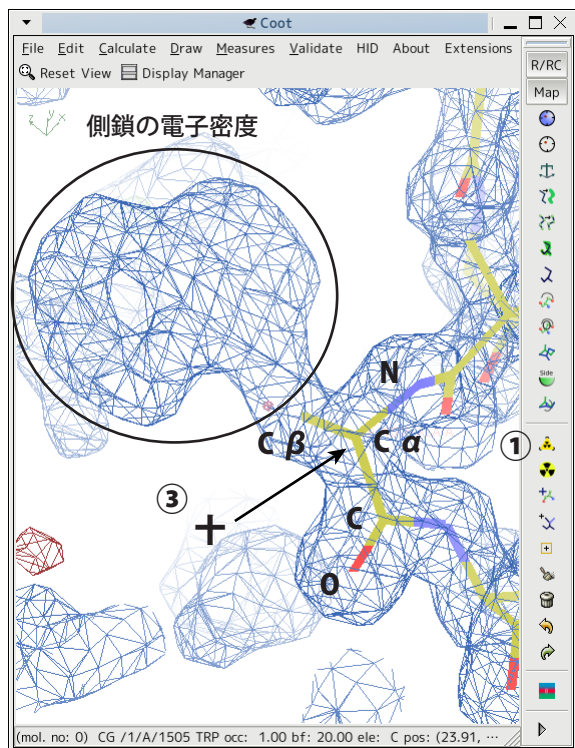
## 文字サイズの変更



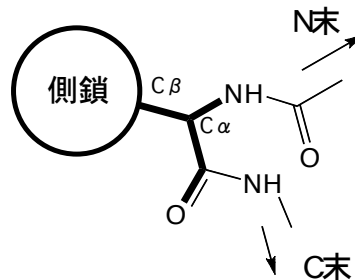
- ① <Edit><Preferences...> を選択。
- ② <Others> を選択。
- ③ <Fonts> タブを選択。
- ④ 文字サイズを選択。
- ⑤ 色も変更できる。
- ⑥ <OK> をクリック。
- ⑦ <OK> をクリック。

## アミノ酸の置換

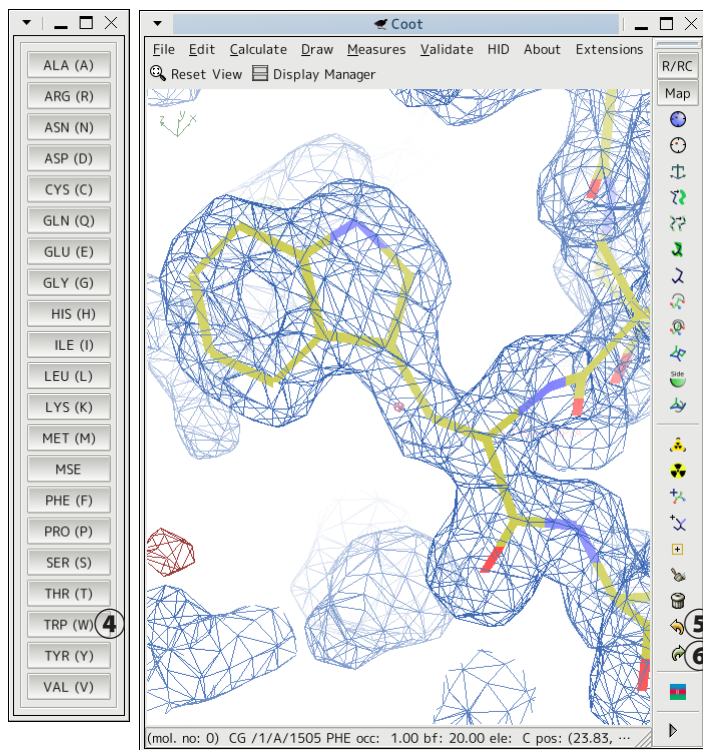
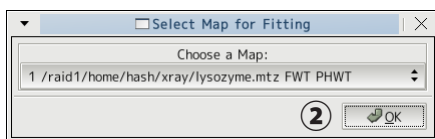
例として、1505 番のアラニンに移動し、電子密度から正しいアミノ酸を推定して置換してみる。






ペプチド結合の構造を考えて、どの電子密度がアミノ酸の側鎖に相当するかを考えてみる。アミノ酸の構造の図を参考にすると良い。

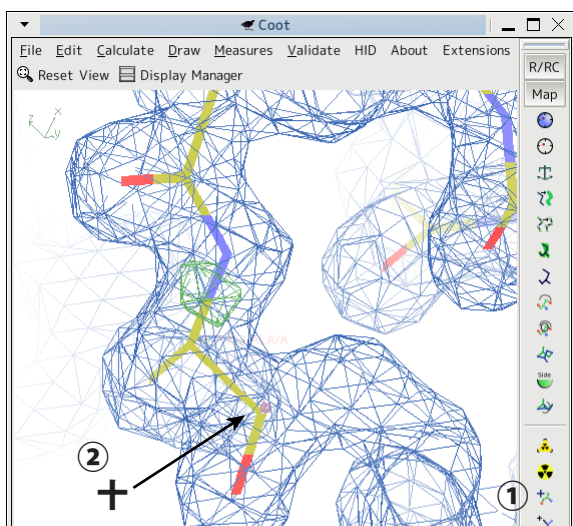


Cβ炭素およびその先の電子密度が側鎖の電子密度に相当する。1505 番の場合、側鎖の電子密度は、比較的大きく平たいことから、芳香族アミノ酸であることが推測できる。また、電子密度の大きさから、2つの芳香環を持つと考えられるので、1505 番はトリプトファンであることが予想される。では、実際に 1505 番をアラニンからトリプトファンに置換してみる。




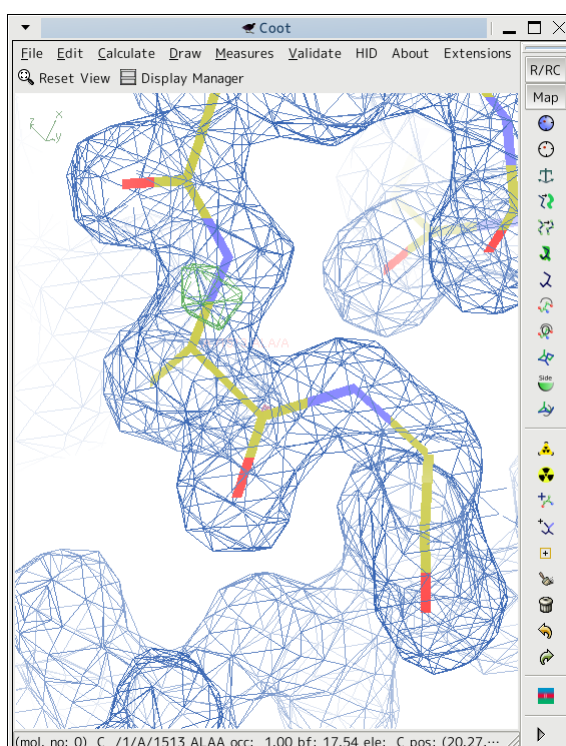
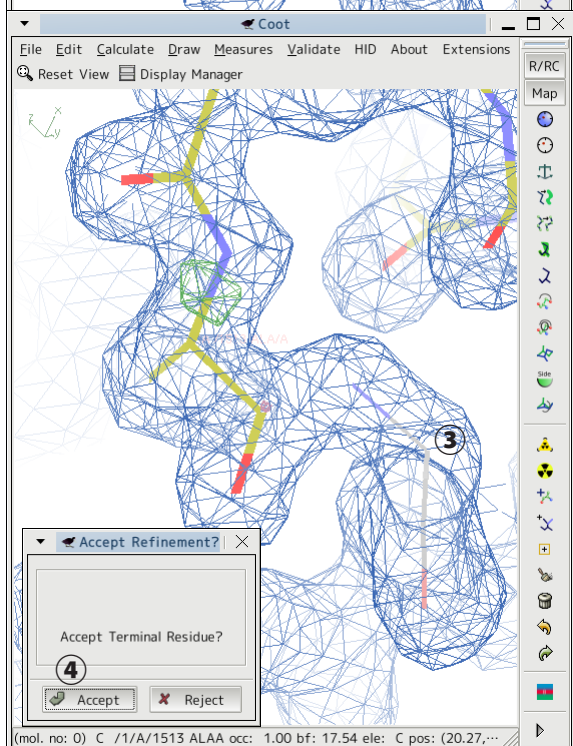
- ①  <Mutate & AutoFit...> をクリック。
- ② 最初だけ電子密度を選択するウィンドウが現れるので、<OK> をクリック (2 回目以降は不要)。
- ③ 再び <Mutate & AutoFit...> をクリックすると、カーソルが十字になる。
- ④ 変更したいアミノ酸残基の原子をクリックする。残基内の原子であればどれでもよい。例えば Cα 原子をクリック。
- ⑤ 変更を取り消したい場合、 <Undo> をクリック。
- ⑥ 取り消しを元に戻すには、 <Redo> をクリック。

## 残基の付加

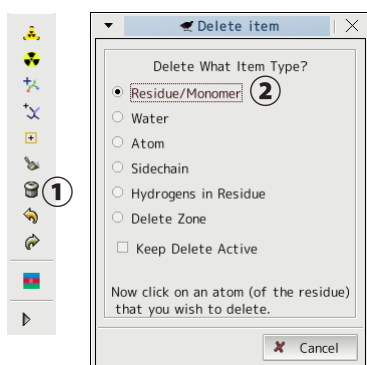



末端の残基に移動する（N 末側でも C 末側でも良い）。

- ①  <Add Residue...> をクリック。
- ②カーソルが十字になり、付加したい末端の残基中の原子をクリック。
- ③灰色の残基が付加される。
- ④ OKであれば、<Accept> をクリックすると、末端に 1 残基連結される。



## 削除

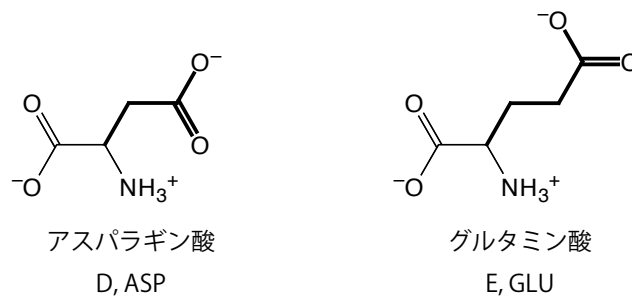
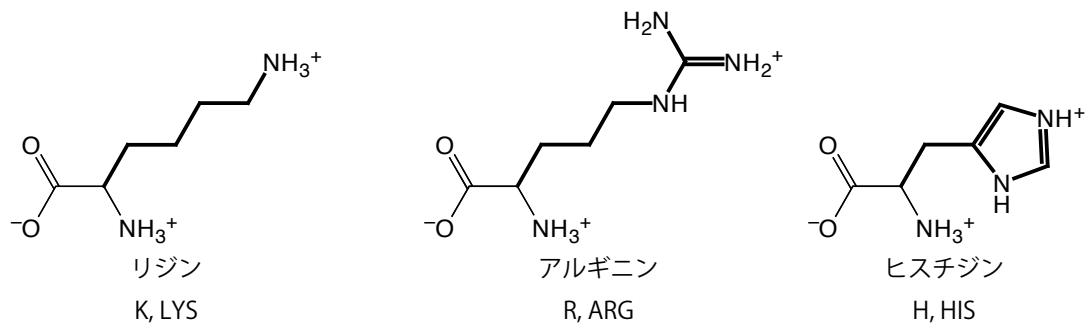
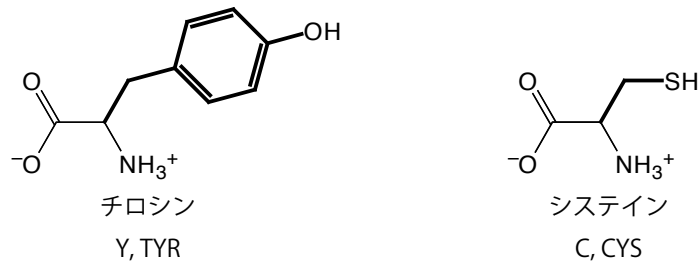
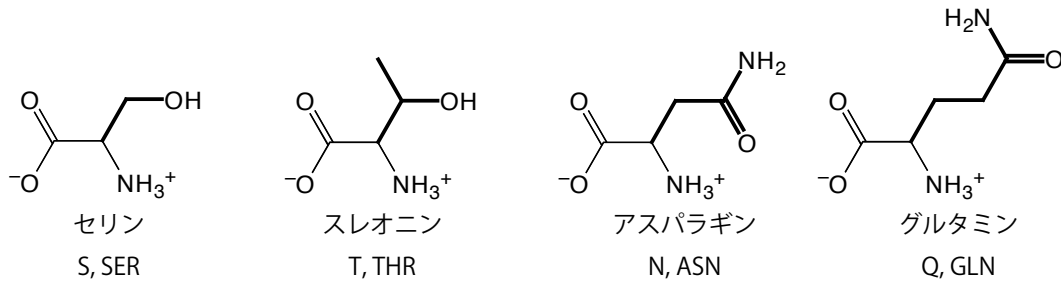
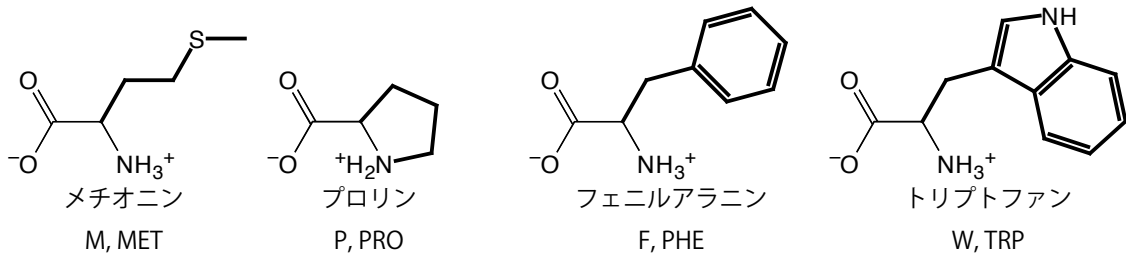
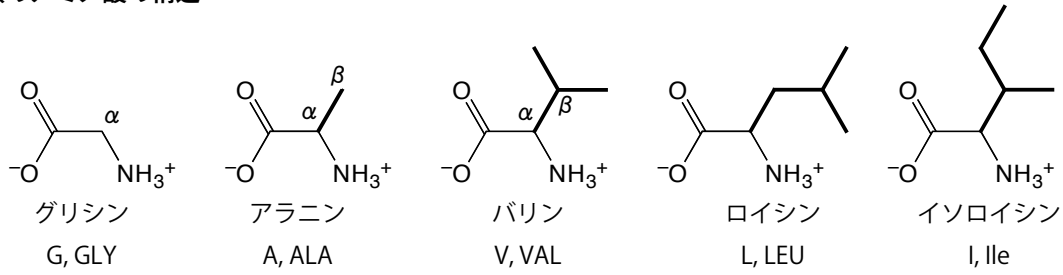


- ①  <Delete Item...> をクリック。
- ②一残基削除したい場合は、<Residue/Monomer> を選択する。  
カーソルが十字になるので、削除したい残基中の原子をクリック。



## 補足資料

### 20種類のアミノ酸の構造



## 参考文献

佐藤 衛, タンパク質の X 線解析, 共立出版

坂部 知平, タンパク質の結晶化, 京都大学学術出版会

D. Blow 著, 平山 令明 訳, 生命系のための X 線解析入門, 化学同人

## モデリングの課題

アラニンから正しいアミノ酸残基に置換し、正しい残基番号を記入する。早く終わった場合は残りのフラグメントのモデリングも行い、さらにリゾチームの全体構造を構築してみる。下の表は例えば1114番が28番のトリプトファンの場合は、

1114
W
28

と記入する。

Frag-1

1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129

Frag-2

1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158

Frag-3

1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314

Frag-4

1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432

Frag-5

1501	1502	1503	1504	1505	1506	1507	1508	1509	1510	1511	1512	1513

Frag-6

1623	1624	1625	1626	1627	1628	1629	1630	1631	1632	1633	1634	1635	1636	1637	1638