

西川賞

構造生物学から生物構造化学にいたる タンパク質結晶学の展開

三木邦夫
(京都大学)

タンパク質結晶学は、この40年で大きな進展を見せた。私が結晶学の手ほどきを受けたのは、大学学部の卒業研究を行った1974年のことであるが、その当時、結晶構造が決定されていたタンパク質はごくわずかで（PDBでは10余りの登録）、この分野の人であれば、構造が分かっているタンパク質を（その構造も）諳んじていたくらいだった。一つのタンパク質を構造解析するためには、さまざまな試行錯誤を繰り返さなければならず、計算に必要なプログラムを一つ一つ書き下ろしたりして、一ステップ毎に手間がかかった。そのような状況なので、一つのタンパク質の結晶構造を決めるのに、時間がかかるのは当たり前と思われていた。

私が最初に手がけたタンパク質は化学修飾ヘムで再構成したミオグロビンで、修飾ヘムが及ぼす構造変化と酸素親和性の関係を探ろうというものであった¹⁾。タンパク質の研究と並行して、有機金属化合物²⁾や有機化合物³⁾の構造化学研究も1990年代まで継続し、それぞれの専門分野での優れた共同研究者に恵まれて、構造化学的に興味深い多くの知見が得られた。

1982～83年に西ドイツ（当時）ミュンヘン近郊のマックスプランク生化学研究所で光合成反応中心の結晶構造解析に従事する機会を得た。Robert Huber

の主宰する研究室は、当時欧米で有数の研究室で着実な成果をあげていた。光合成反応中心はそれまで構造解析の成功例がなかった膜タンパク質であるが、私の研究所滞在中に位相がついて、1984年には最初の報告を出した⁴⁾。膜タンパク質の最初の結晶構造であること、光合成初期過程の反応機構の解明に大きく貢献したことで、1988年にノーベル化学賞の授賞対象となった（J. Deisenhofer, H. Michel, R. Huberが受賞）。

1990年代になってもPDBに登録されたタンパク質の構造は500程度しかなかったが、この状況は1990年代後半から一変した。結晶化に必要なタンパク質を遺伝子工学の技術で作り出せるようになったこと、シンクロトロン放射光が汎用的に使えるようになったことで、構造決定されたタンパク質数は急激に増加するようになった。「構造生物学」ということばが市民権を得たのも1990年代で、Nature誌の姉妹紙であるNature Structural Biology（現在も誌名を少し変えて刊行）が創刊されたのは1994年のことである。

タンパク質結晶学の強みは、言うまでもなく、タンパク質の折りたたみ構造（フォールディング）と活性部位を構成するアミノ酸の配置を、原子のレベルで実験的に決定できることにある。しかしながら、それまでに得られてい

たタンパク質の構造情報は、細胞内でのタンパク質のはたらきを理解するには、あまりに限られた数でしかなかった。構造解析技術の進歩に相まって、生物の細胞内ではたらくタンパク質の構造を網羅的に決定しようという構造ゲノムプロジェクトが注目されるようになった。我が国では「タンパク 3000」プロジェクト（2002～2007）が、タンパク質の構造ライブラリーを構築することのみならず、構造生物学の技術的な底上げに一定の役割を果たした。

その後は、より難しい構造解析にターゲットが向けられ、複雑な超分子複合体状態での膜タンパク質、細胞内で機能する状態での（過渡的な反応）複合体などを対象に、いずれも生体内で実際に起こる反応状態における構造情報を得ることを目的とした。私たちの研究室では、光合成反応の分子機構⁵⁾、DNA の認識と機能制御⁶⁻⁸⁾、タンパク質のフォールディング⁹⁾ や成熟化¹⁰⁾、物質輸送・貯蔵¹¹⁾、酵素タンパク質における分子認識や電子伝達¹²⁾などを対象に、構造生物学の研究を行った。

現在 PDB には 13 万にもおよぶタンパク質の X 線構造が登録されている。そのおよそ 83%が 1.5～3Å 分解能で解析されている。そのような分解能ではタンパク質の折りたたみ構造（フォールディング）を正確に得ることができ、そもそも X 線回折データは、タンパク質分子内のすべての電子分布に関する情報を含んでおり、より高分解能・高精度で解析することで、外核電子を含めた電子分布を観察することが可能である。最近までタンパク質がそのような対象になり得るとは考えられ

ていなかったが、放射光技術を初めとするさまざまな技術革新は、タンパク質分子の電子密度解析に道を拓くようになった^{13,14)}。0.48Å 分解能での光合成電子伝達タンパク質 HiPIP の結晶構造では、鉄の *d* 電子やポリペプチド鎖の結合電子、孤立電子対を実験的に観察している¹³⁾。X 線の回折現象に含まれている電子の情報を深く探ることで、タンパク質の化学結合や反応性に関しても、いわゆる「化学」を直接的に論じることが可能になると思われる。

- 1) K. Miki *et al.*, *JB*, **100**, 269 & 277 (1986)
- 2) K. Miki *et al.*, *JACS*, **105**, 2482 (1983); H. Kurosawa *et al.*, *JACS*, **107**, 8253 (1985); K. Miki *et al.*, *JACS*, **110**, 3191 (1988)
- 3) K. Miki *et al.*, *JACS*, **110**, 6594 (1988); M. Miyata *et al.*, *Nature*, **343**, 446 (1990)
- 4) J. Deisenhofer *et al.*, *JMB*, **180**, 385 (1984); J. Deisenhofer *et al.*, *Nature*, **318**, 618 (1985)
- 5) S. Sogabe & K. Miki, *JMB*, **252**, 235 (1995); T. Nogi *et al.*, *PNAS*, **97**, 13561 (2000); K. Kitano *et al.*, *Structure*, **9**, 473 (2001); S. Niwa *et al.*, *Nature*, **508**, 228 (2014)
- 6) T. Tamada *et al.*, *NSB*, **4**, 887 (1997); H. Komori *et al.*, *PNAS*, **98**, 13560 (2001);
- 7) H. Komori *et al.*, *EMBO J*, **18**, 4597 (1999); A. Nakamura *et al.*, *PNAS*, **104**, 18484 (2007)
- 8) S. Watanabe *et al.*, *PNAS*, **105**, 4121 (2008)
- 9) T. A. Fukami *et al.*, *JMB*, **312**, 501 (2001); Y. Shomura *et al.*, *JMB*, **335**, 1265 (2004); H. Kida *et al.*, *JMB*, **383**, 465 (2008); Y. Hanazono *et al.*, *Structure*, **21**, 220 (2013)
- 10) S. Watanabe *et al.*, *Mol Cell*, **27**, 29 (2007); S. Watanabe *et al.*, *Structure*, **20**, 212 (2012); D. Sasaki *et al.*, *JMB*, **425**, 1627 (2013); T. Tominaga *et al.*, *PNAS*, **110**, 20485 (2013); S. Watanabe *et al.*, *PNAS*, **112**, 7701 (2015); S. Kwon *et al.*, *PNAS*, **115**, 7045 (2018).
- 11) K. Takeda *et al.*, *EMBO J*, **22**, 3199 (2003); N. Numoto *et al.*, *PNAS*, **102**, 14521 (2005); J.-R. Su *et al.*, *PNAS*, **106**, 417 (2009)
- 12) A. Kita *et al.*, *Structure*, **7**, 25 (1999); J. Saito *et al.*, *JBC*, **274**, 30818 (1999); M. Fujihashi *et al.*, *PNAS*, **98**, 4337 (2001); A. Kita *et al.*, *Structure*, **10**, 715 (2002); L. Liu *et al.*, *JMB*, **319**, 479 (2002); T. Nonaka *et al.*, *JBC*, **278**, 24818 (2003); Y. Nishitani *et al.*, *JBC*, **281**, 19740 (2006); D. Maruyama *et al.*, *JBC*, **282**, 17221 (2007); M. Fujihashi *et al.*, *JACS*, **135**, 17432 (2013); Y. Aikawa, *et al.*, *Proteins*, **84**, 374 (2016); R. Nagata *et al.*, *Nat Commun*, **9**, 1765 (2018)
- 13) Y. Hirano *et al.*, *Nature*, **534**, 281 (2016)
- 14) K. Takaba *et al.*, *Sci Rep*, **7**, 43162 (2017)

学術賞

ゼオライトの粉末X線構造解析と 解析ソフトウェア高度化への貢献

○池田拓史

(産総研 化学プロセス研究部門)

分子吸着や分子篩、固体酸等の特性を持つゼオライトは無機系の多孔質材料として幅広く産業利用されている。現在239種の構造の異なるゼオライトが存在するが、産業利用されているのはその1割もなく、多様なニーズに適した新規構造種の探索が世界レベルで行われている。これまで様々な共同研究を通じ、結晶構造解析を活用して新しいゼオライトおよび類縁多孔体の創製に取り組んできた。

最初に、ゼオライトと骨格構造に類似性がある層状ケイ酸塩に着目し、ナノ多孔体に転換する方法を検討した。層状ケイ酸塩 PLS-1 は、酸素5員環を含む剛直な層状骨格構造からなり、そのトポロジーは ferrierite 型ゼオライトと部分的に良く一致した。構造解析からシリケート表面に分布するシラノール基が、隣接するレイヤー間で 2.5 Å 程の近い距離関係にあることか、脱水縮合させれば層状からバルク構造に変換でき、且つ層間にケイ素8員環相当の2次元細孔が形成できると予想した。予想は的中し、焼成により新型ゼオライト CDS-1 を得ることが出来た(*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005)。また PLS-1 の層間を SiO₄ 四面体で架橋し、ナノ細孔を形成させた層間拡張型多孔体の開発も行った(*J. Phys. Chem. C*, 2010)。

ゼオライト構造の定義では、Si, Al, P, などの4配位元素と酸素のみで構成されることが条件とされるが、官能基を骨格

に導入することで、既存のゼオライトにはない物性の出現が期待される。近年、有機シランを用いた規則性ハイブリッド化合物の合成が報告されている(Bellussi et al., *Micropor. Mesopor. Mater.* 113, 252, 2008)。我々は2種類の有機シラン(1,4-bis(triethoxysilyl) benzene (BTEB) & tetraethyl-orthosilicate (TEOS)) を用い、その加水分解を制御した水熱反応による物質探索を行い、新しいハイブリッドナノ多孔体 KCS-2 の合成に成功した(*Chem. Lett.* 2014 & *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015)。

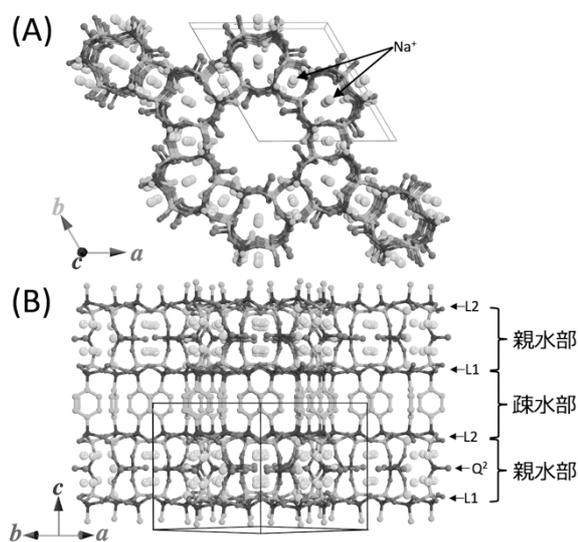


図1 KCS-2 の(A) [001]方向、および(B)[110]方向から見た結晶構造モデル。

解かれた KCS-2 の結晶構造は、*c* 軸方向に沿って約 7.2 Å の酸素 12 員環からなる細孔構造をしている (図 1 (A))。Si, Al, O 原子からなる層状部位 L1, L2 が主要な骨格となっていて、[110]方位から見ると、

Q² (O₂Si(OH)₂)ケイ素種とフェニレン基がそれぞれ隣り合う L1 と L2 を架橋し、多孔体構造を形成している (図 1 (B))。これらは用いた BTEB と TEOS が加水分解したのち結晶化に用いられたことを示している。なお Si と Al は O を介して交互に配置している。KCS-2 は、親水部と疎水部が細孔に沿って積層していることから両親媒性を示し、水、アンモニア、ベンゼンや *n*-ヘキサンなど細孔径より小さな分子であれば、それぞれに特化したゼオライトと同等量を吸着することが可能である。また卵殻リゾチームなど KCS-2 の細孔には入らない大きな酵素分子も吸着でき、固定化酵素の支持体としての利用に有効なことも分かった。

一方、従来からあるアルミノシリケート型ゼオライトは、高い熱的・化学的安定性と固体酸性質を有し、現在でも最も需要が高く、その合成研究も活発である。

Dimethyldipropylammonium カチオンを、細孔構造を作るための構造規定剤に用いて作られたゼオライト YNU-5 は、国内初のアルミノシリケート型の合成ゼオライトである (*J. Am. Chem. Soc.*, 2017)。空間群は *Cmmm*、格子定数は約 $a = 18.09 \text{ \AA}$, $b = 31.74 \text{ \AA}$, $c = 12.61 \text{ \AA}$, $V = 7242 \text{ \AA}^3$ であり、ゼオライトの中でも大きなユニットセルを持つ。Si/Al 値が 9 である結晶性の高い試料を用い、powder charge flipping 法による解析で、骨格を構成する全ての T(Si, Al) サイトと大半の O サイトの位置を見つけることができた (全体の約 85%)。

得られた YNU-5 の結晶構造は、有効内径約 4 Å の孔からなる 1 次元細孔と、有効内径約 4 Å と 7 Å の孔からなる 3 次元細孔の 2 つの独立した異なる形状のナノ細孔で構成されていて、ゼオライトの中

でも極めて珍しいタイプである (図 2)。

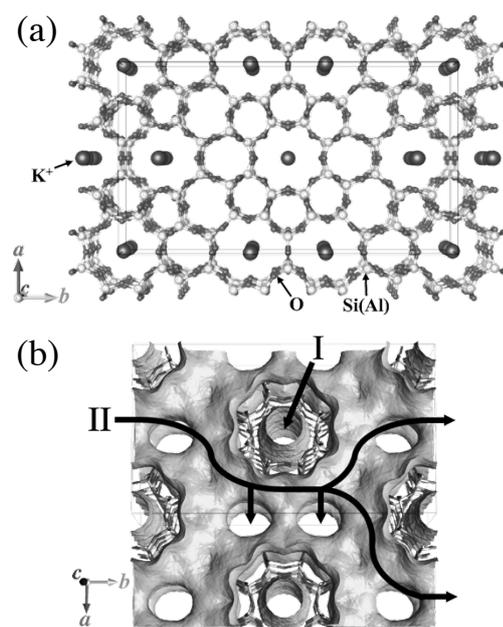


図 2 YNU-5 の(a) [001]方向からみた構造モデル、及び(b)2つの独立した異なる形状のナノ細孔 (I:1次元、II:3次元)を示す図。

合成ゼオライトでは通常粉末試料しか得られないため、リートベルト法を中心とする粉末回折パターンフィッティングが、構造決定のためのキーテクノロジーとなる。発表者は、泉 富士夫博士の開発したプログラム RIETAN の最も大幅なアップデート作業に参画し、RIETAN-2000 を完成させた (*Mater. Sci. Forum*, 2000)。

分割型プロファイル関数、部分プロファイル緩和、複合バックグラウンド関数および Le Bail 法が追加され、更に規模の大きな構造モデルに対する非線形抑制条件機能の拡張および MEM 解析との連携も可能になった。これによりゼオライトの構造研究を進展させることができた。現行の RIETAN-FP でも、Le Bail 法を発展させたハイブリッドパターン分解、CIF 等の情報出力の追加のなどに貢献してきた。現在、RIETAN-FP は国内外の多くの研究者に利用して頂いている。

学術賞

電子密度分布解析による新奇化学結合状態の解明と 化学反応解析への展開

橋爪 大輔

(理化学研究所 創発物性科学研究センター)

結晶構造解析に基づく構造化学研究では、解析によって得られた原子間距離・結合角といった構造パラメータを既知の分子や結合と比較して、その性質を詳らかにする。ところが、研究対象がこれまでに合成されたことのない「新奇」な結合である場合、既知の分子の構造パラメータを比較対象として使えないだけでなく、理論計算の確度を実験的に担保することも難しくなる。

高精度・高分解能 X 線回折データを用いた電子密度分布解析(EDD 解析)によって価電子も含めた結晶中の全 EDD を解析すれば、実測のデータに基づいた分子の電子状態や結合様式を計算化学に近い形で議論することが可能になる。さらに理論化学計算で全 EDD を再現することで、計算の確度を担保できる。本講演では、EDD 解析を手法として、新奇化学結合の結合状態解析から、溶液中の触媒反応機構解析へと展開した一連の研究について概説する。

二次元検出器と試料との出会い

およそ 20 年前、助手として勤務していた電通大岩崎研では、4 軸型単結晶回折装置を用いて、金属錯体や超原子価硫黄化合物、分子磁性体の EDD 解析による研究を行っており、EDD 解析を使った研究を始める環境が揃っていた。ところが、当時は相転移ダイナミクスの研究に興味

を持って従事しており、時に、数週間に渡る長時間測定と試行錯誤が要求される EDD 解析に二の足を踏んでいた。始めるにはきっかけが必要であった。

契機はすぐにやってきた。電子密度分布解析用データ収集に最適であろうと注目していた大面積 IP 型回折装置が研究室に導入された。ほぼ同時期に、SPring-8 BL04B2 にも同様な IP 装置が導入され、放射光の利用も視野に入った。

5 配位炭素化合物の EDD 解析^[1]

IP 回折計の導入と時期を同じくして、5 配位炭素化合物の結合状態解析について共同研究の話があった。中心炭素原子が三角両錘型構造を形成する 5 配位炭素化合物は S_N2 反応の中間体モデル化合物と見ることができる。そこで、この化合物の結合状態を明らかにするために、EDD 解析を行った。実験により得られた差等電子密度図(Fig. 1)から、中心の炭素原子の equatorial 位 C-C 結合は全て共有結合、apical 位 C-O 結合は、酸素原子か

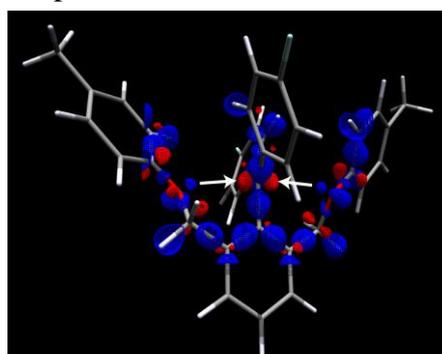


Fig. 1: 5 配位炭素化合物の差等電子密度

ら lone pair が中心炭素原子の空の 2p 軌道へ電子供与された配位結合であることが明瞭に分かる。測定は当初実験室系装置で行っていたが、高分解能のデータが得られないため、SPring-8 の IP 回折計を使って行った。

高歪小員環アルキンの EDD 解析^[2]

2002 年に理研(和光)の研究支援部門に異動した。ここには最新の単結晶回折装置がなく、当面 EDD の研究は諦め、研究支援業務に全力で当たった。

支援部門には自分の好みに関係なく、多様な試料が持ち込まれる。つまり毎日のように、新しい試料と出会う。その中で、シクロペンチン骨格を持つ Zr 錯体の結合状態が計算化学で決まらないとの相談を受けた。そこで、PF-AR に導入された CCD 回折装置を使って EDD の研究を再開した。得られた結果は満足なものであり、実験的 EDD から結合状態を明らかにした。この研究によって、新奇な結合に対し EDD 解析が強力な手法であることを示すことができた。しかし大きな問題も明らかになった。新奇な結合は反応性が高いため、試料は研究室から SR 施設への移動に耐えられないことである。

実験室系高輝度光源と光学系の進歩

新奇結合の EDD によって研究するためには、実験室に『SR のような装置』を設置する必要があることを痛感した。ちょうどこの頃、高輝度光源と人工多層膜ミラーを搭載した単結晶回折装置が発表された。幸いなことに装置の購入予算を獲得し、CCD 検出器との組み合わせで国内 3 号機を導入した。

この装置は EDD 解析のための高精

度・高分解能回折データ測定に非常に有効で、SR 施設への試料輸送が困難な、水・熱・光に不安定な新奇結合化合物の研究に大きく貢献した^[3]。

EDD を鍵とする触媒反応機構解析^[4]

触媒反応機構解明に関する研究は、結晶構造解析および、計算化学による分子構造・電子構造に基づいて行われる。しかし、反応は溶液中で起こるので、溶液中での構造と電子状態が不明である。そこで、固相・気相・溶液中における触媒の電子状態を、EDD を鍵として結び付け、溶液中での Ni 触媒の電子状態を解明した。この研究によって、結合が弱く剥き出しとなった、Ni の d_z^2 軌道および、配位子の水素結合受容体であるアミノ基が異なる基質を選択的にトラップし、立体不斉選択的に反応を進行させることが分かった(Fig. 2)。この研究によって、これまで深く論じられることのなかった、触媒の溶液中の構造・電子状態を反応機構解明の直接的な手掛かりとする方法論を確立することができた。

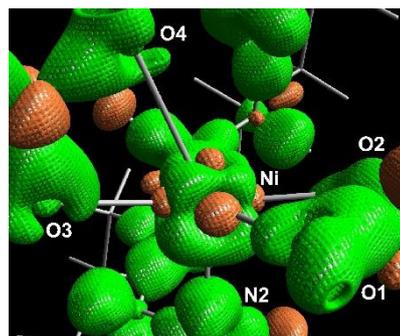


Fig. 2: Ni 錯体触媒の差等電子密度

Reference

- [1] *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5893.
- [2] *Chem. Commun.* **2006**, 1233.
- [3] *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1605175.
- [4] *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14875.