



## タンパク質の小角散乱法による低分解能構造解析

### 1. はじめに

近年、多くの雑誌でタンパク質の小角散乱（溶液散乱）を利用した論文をしばしば見かけるようになり、この2、3年で小角散乱は構造生物研究の一手法として定着したと言える<sup>1)</sup>。小角散乱の結果を客観的に判断するには、その解析プロセスをある程度把握しなくてはならない。本稿は、最も良く使用されている ATSAS (A program package for small-angle scattering data analysis) プログラム群<sup>2)</sup>を用いた解析の進め方、応用例を RecFR 複合体<sup>3)</sup>で示す。

DNA 二重鎖切断や一本鎖 DNA 領域上の DNA 障害は鋳型を用いて修復することができない。この際組換え修復と呼ばれる、失った部分にゲノム領域にある相同領域をコピーすることで修復を行う。原核生物の DNA 組換え修復タンパク質 RecFR 複合体は、二重鎖 DNA に結合し RecA フィラメントの延長を減衰する。これら RecFR 複合体がどのようにして二本鎖 DNA と単鎖 DNA の境界を認識しているかを知るためには、第一段階として溶液中での RecFR 複合体構造を解明する必要がある。*Deinococcus radiodurans* (dr) RecR のリング型の四量体結晶構造<sup>4)</sup>と、drRecF の単量体のピーナツ型構造<sup>5)</sup>が得られている。しかしながら、いずれの種でも RecFR 複合体の構造は報告されていない。また、高度高熱菌 (*Thermus thermophilus* (tt)) 由来の ttRecR は溶液中では二量体として存在するが、ttRecFR 複合体中では、drRecR と同様な相互作用部位を持つ四量体として存在することがアミノ酸置換体などで判明している<sup>3,6)</sup>。本稿では ttRecR, ttRecF, ttRecFR の X 線小角散乱データを用いた構造解析<sup>3)</sup>を例にタンパク質の小角散乱を紹介する。

### 2. 小角散乱の原理

タンパク質溶液の小角散乱は、タンパク質溶液に X 線を照射しその散乱・回折像を測定する。溶液であるため、基質の濃度滴定、pH の変化など生体条件により近い形での測定が可能となる。結晶構造解析と同様、タンパク質の電子密度の空間分布が小角散乱実験データに反映される。溶液中においては入射 X 線（中性子線）に対してタンパク質粒子は様々な方向をとるので、その散乱強度は方位角方向では一定となる（図 1(a)）。通常、散乱角の関数  $q$  ( $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$  で  $2\theta$  は散乱角、 $\lambda$  は波長) を用いて散乱強度を  $I(q)$  と表す（図 1(b)）。詳しくは、別途解説を参照されたい<sup>7)</sup>。小角散乱では全ての粒子がデータを与える。1 分子の構造を得るには多数のタンパク質粒子からの散乱が、1 個のタンパク質粒子の散乱と比例関係でなくてはならない。すなわち、粒子間の相互作用により粒子相互の空間配置に偏りがなく、散乱体が単分散であることが必要となる。特に、会合体が混在すると構造解析は非常に難しい。

散乱体の特徴づける重要な小角散乱パラメータは三つある。回転半径  $R_g$  は分子の重心からの広がりパラメータであり（図 1(c)）、原点での散乱強度  $I(0)$  は、重量濃度 mg/ml で規格化すると分子量に比例するので会合の重要な指標である（図 1(b)）。最大長  $D_{max}$  はタンパク質粒子内の最大の 2 点間距離であり、 $R_g$  と組合わせて形の特徴を定量的に表す（図 1(b), (c)）。これらを総合的に判断して溶液中での ttRecR, ttRecF, ttRecFR はそれぞれ二量体、単量体、RecF 二量体+RecR 四量体であることが分かった<sup>3)</sup>。

### 3. アブイニシオモデル法

小角散乱における構造決定は、基本的に三次元モデルを仮定し、そのモデルから計算される一次元散乱曲線が実験散乱曲線に適合するようにモデルを最適化（モデリング）する。実験値との適合性は、実験値の誤差で重みをつけた計算値と実験値のずれ  $\chi$  値を用いて定量的に判断される。ここでのアブイニシオとは、あらかじめ雛型のモデル構造を使用せずにモデリングを行うことを意味する。その中でもタンパク質の構造を多数の球から成り立つ球充填（ビーズ）モデルで表現し、計算するビーズモデリング法<sup>8,9)</sup>が最も良く使われる。ビーズモデルの電子密度一様性、連続性、スムーズさなど生体高分子の性質を模倣するような制約条件を組込み、40 万程度のモデルから実験値に適合するモデルを絞り込む。図 2 は RecFR 構造体のビーズモデ

ルを示したものである。アーチファクトにより試行毎に微妙に形が違うので、平均化することにより代表ビーズモデル（低分解能構造）としている。さらに、対称性を仮定することによりモデルの信頼性は向上する。ttRecFR 複合体が、drRecR 四量体の中心部の空洞と同じサイズの空洞を持つことが分かる。しかし、複合体中の ttRecF の位置に関しては分からない。一方、ttRecF、ttRecR 個々のビーズモデルは drRecF、drRecR の結晶構造の特徴を非常に良く表現している。この方法は確率的な方法であり、構造導出の理論的根拠もあいまいではあるが、溶液中での低分解能構造決定方法として実証的に受け入れられている。ビーズモデリング法は、ビーズ自体には化学的意味はないので、タンパク質のみならず、DNA、高分子などにも拡張される。

#### 4. Rigid body modeling 法<sup>10)</sup>

ビーズモデルは特徴的な形を示すには有効であるが、多くの場合、生命機能を議論するには分解能が不十分である。一方、小角散乱の長所は、散乱強度がタンパク質の原子座標から直接計算できることである。従って、与えられたモデル構造が溶液中のタンパク質構造と同一かどうかは高精度に評価できる。いわゆる、モデルを検証する道具としての小角散乱である。

この特徴を生かし、最初から部分的にでも既知のタンパク質の構造情報を取り入れていこうとするのが rigid body modeling (RB) 法である。具体的には各ドメイン、サブユニットの原子座標を与え、各部分構造の内部を動かさずに小角散乱によってそのドメイン、サブユニットの方向、相対距離を決める方法である。図3は drRecF、drRecR 結晶構造を用いた ttRecFR の RB 法による結果を示す。対称性を導入したものより drRecF を自由に配置したモデル、trans 型より cis 型に配置したモデルがより散乱曲線に一致し、低い  $\chi$  値を示す。

図4では drRecR、drRecF の結晶構造を使用せずに、それらの結晶構造を鋳型として ttRecF 単量体、ttRecR 二量体構造を小角散乱法によりモデリングし、それらを用いて RB 法を行った結果である。図3よりも  $\chi$  値は低くなる。二つの ttRecF は、ttRecR 四量体に対し中心空洞を塞ぐように cis 型に結合しているように考えられる。

図3と図4の例から言えることは、第一に、 $\chi$  値は微妙な部分構造変化に依存すること。第二に、RB 法は初期配置と対称性で最終結果が変化し、最適化がビーズ法より困難なこと。第三は、同じ  $\chi$  値でも複数の構造が可能で、小角散乱の情報だけでは一つに絞り込むことが困難である

ことである。第三に関しては、残基間距離の縛りや NMR データを取り込んだりして構造を特定する努力が活発になされている。ビーズモデル法と違い、RB 法では可能なモデル構造が大幅に制限され、それぞれが構造生物学的に意味があるかどうかをより容易に判断できる点に意味がある。また、複数のモデルが最後まで残るということは多数のタンパク質分子を一つの構造で表すことができないという本質的な問題とも関わりあっている。小角散乱は溶液中でのタンパク質の構造のダイナミクスにおいて貴重な実験情報を与えることは疑う余地はない。実際、小角散乱を利用してタンパク質のダイナミクスを定量化する試みもなされつつある<sup>11)</sup>。

#### 5. おわりに

小角散乱の結果でどこまで議論できるかは、取り扱う系に依存し、それは低分解能という側面から避けられない。モデルの分解能の定義、結晶構造解析や NMR などの構造解析のような解析の標準化など早急に解決すべき課題である。しかし、技術的な進展も踏まえ、着実に小角散乱の分解能は向上し、より一般的な機能と結びついた構造変化の検出と定量化が可能となりつつある。

ttRecFR 系の小角散乱データは理化学研究所美川務博士、柴田武彦博士、本多賢吉博士との共同研究で SPring-8 BL45XU<sup>12)</sup>で得られたものである。この場を借りて感謝したい。

- 1) Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., & Tainer, J.A. (2007) *Q. Rev. Biophys.*, **40**, 191-285.
- 2) Petoukhov, P.V., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., & Svergun, D.I. (2007) *J. Appl. Cryst.*, **40**, S223-S228.
- 3) Honda, M., Fujisawa, T., Shibata, T., & Mikawa, T. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5013-5020.
- 4) Lee, B.I., Kim, K.H., Park, S.J., Eom, S.H., Song, H.K., & Suh, S.W. (2004) *EMBO J.*, **23**, 2029-2038.
- 5) Koroleva, O., Makhharashvili, N., Courcelle, C.T., Courcelle, J., & Korolev, S. (2007) *EMBO J.*, **26**, 867-877.
- 6) Honda, M., Inoue, J., Yoshimasu, M., Ito, Y., Shibata, T., & Mikawa, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 18549-18559.
- 7) 藤澤哲郎 (2009) X線・放射光の分光 (日本分光学会編), pp. 85-107, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 8) Svergun, D.I. (1999) *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886.
- 9) Svergun, D.I., Petoukhov, M.V., & Koch, M.H. (2001) *Biophys. J.*, **80**, 2946-2953.
- 10) Petoukhov, M.V. & Svergun, D.I. (2005) *Biophys. J.*, **89**, 1237-1250.
- 11) Bernado, P., Mylonas, E., Petoukhov, M.V., Blackledge, M., & Svergun, D.I. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5656-5664.

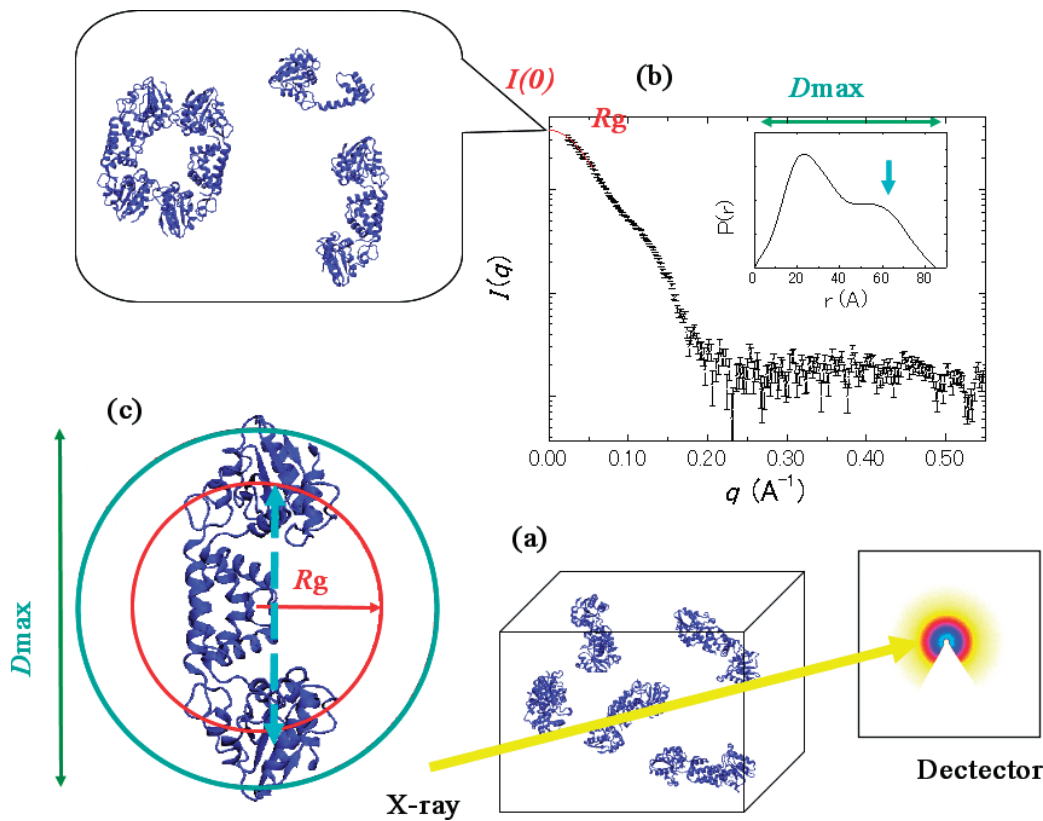


図1 小角散乱の原理

(a)小角散乱はタンパク質溶液に、X線ないし中性子線(黄色矢印)を照射し、その散乱を検出器で記録する。(b)散乱強度 $I(q)$ は散乱角の関数 $q$ の関数となる。 $q$ の小さい領域を外そうすることにより(赤線)、回転半径 $R_g$ と原点散乱強度 $I(0)$ を得ることができる。 $I(0)$ は分子量を与える。 $I(q)$ から計算される2点間距離分布関数、 $P(r)$ 関数は、タンパク質粒子内の2点間距離分布を表し最大長 $D_{max}$ を決める(カッコ内図)。(c) $R_g$ (赤線)、 $D_{max}$ (緑線)をタンパク質構造に対し表示した図。 $R_g$ は $D_{max}/2$ 、すなわち半径よりは少し小さい。二つのドメインの中心間距離(水色)は、 $P(r)$ 関数では $r=60\text{\AA}$ 近傍のなだらかなピーク(水色矢印)に対応する。

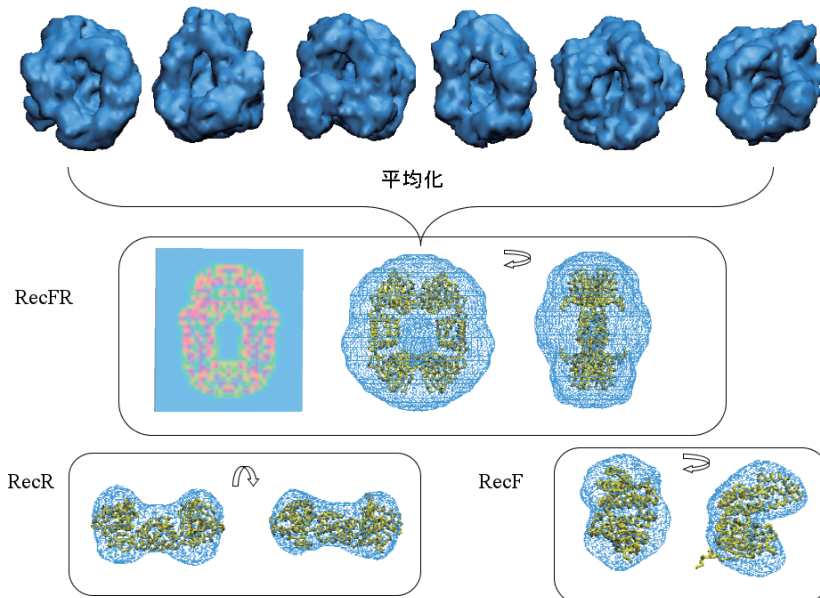


図2 ttRecF, ttRecR, ttRecFRの低分解能構造の導出

上段は対称性の縛りを入れずに gasbor<sup>9)</sup>により計算された各試行の ttRecFR ビーズモデルを VMD ソフトウェア (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) を用いて可視化したもの。表面メッシュは pdb2vol ソフトウェア (<http://situs.biomachina.org/>) でビーズモデルから生成した。中段は、15個のビーズモデルを平均化した ttRecFR 低分解能構造(メッシュ)。中段左図は中央でのスライス面を表す。中段中央、右は drRecR 結晶構造(1vdd.pdb)を黄色で重ねがきしている。最下段左図は ttRecR 二量体の低分解能構造(メッシュ)と drRecR の二量体結晶構造。右図は、ttRecF の低分解能構造と drRecF の結晶構造(2o5v.pdb)。ttRecR (194 残基)、ttRecF (323 残基)と drRecR (1vdd.pdb, 199 残基)、drRecF (2o5v.pdb, 359 残基)とはそれぞれ 55% 以上、40% 以上のアミノ酸一致度がある。

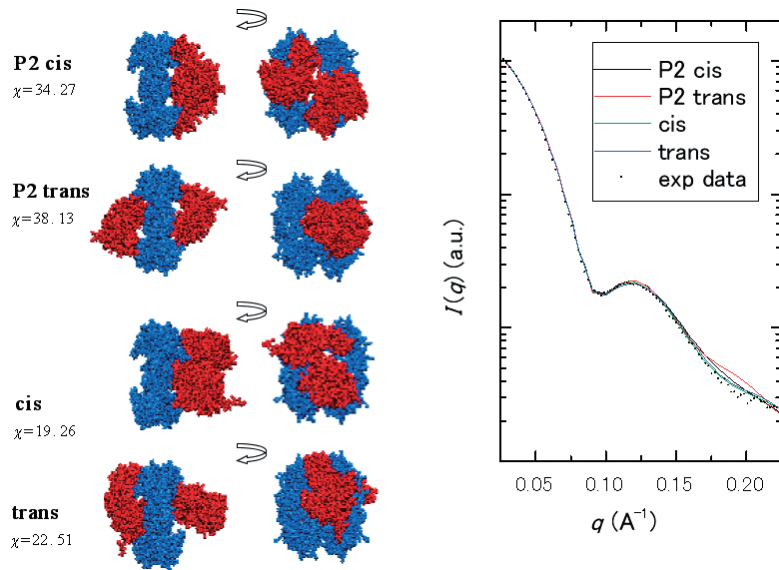


図3 drRecR, drRecF 結晶構造を用いた ttRecFR の RB 法による解析

drRecR 結晶構造 (青) と drRecF 結晶構造 (赤) を用いて sasref<sup>10</sup> を使用し RB 法を行った結果。右側は実験データ (黒点) と RB 法のモデルからのシミュレーション結果。RecF の初期位置と対称性で最終結果が変化している。P2 cis, P2 trans は、両者とも ttRecFR 複合体中の drRecR 四量体中央を 2 回対称軸となるよう RecF を配置したモデルである。前者は cis の初期配置, 後者は trans の初期配置で最適化計算を行った。cis, trans は RecF 配置に対称性の縛りを入れず二つの drRecF が自由に動けるようにモデルを計算した結果。自由度が高いほど  $\chi$  値は低くなっている。右図散乱曲線で  $q > 0.15$  ( $\text{\AA}^{-1}$ ) の散乱領域で実験値とずれが生じている。

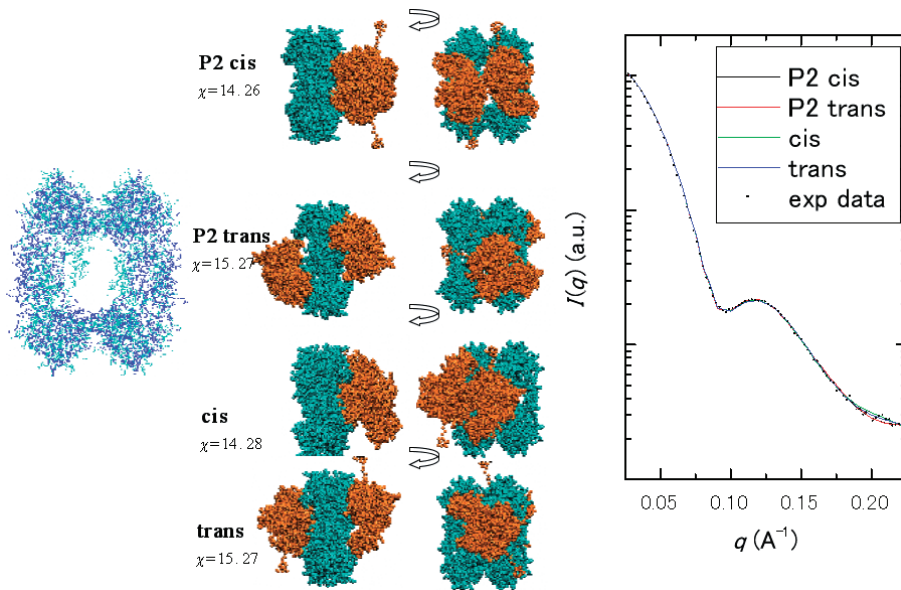


図4 小角散乱で計算した ttRecR, ttRecF 構造を用いて ttRecFR の RB 法を行った結果

ttRecR, ttRecF を drRecR, drRecF を用いて homology building により初期構造をモデリングし, ttRecF の C 末端ループ部, ttRecR 二量体の相互位置はそれぞれの小角散乱曲線を用いて最適構造を計算した。計算は bunch<sup>10</sup> 及び sasref<sup>10</sup> を用いた。左図は, ttRecR 二量体構造から対称操作で生成した ttRecR 四量体 (シアン) と drRecR 四量体 (青色) を重ね合わせたもの。中心部の空洞が狭くなっている。真ん中は, 図3と同じ条件で最適化した結果。図3と ttRecR (シアン), ttRecF (オレンジ) のサブユニット位置関係に共通性が見られるが  $\chi$  値は小さくなっている。右端の散乱曲線でも確認できる。

- 12) Fujisawa, T., Inoue, K., Oka, T., Iwamoto, H., Uruga, T., Kumasaka, T., Inoko, Y., Yagi, N., & Yamamoto, M., & Ueki T. (2000) *J. Appl. Cryst.*, **33**, 797-800.

藤澤 哲郎

(岐阜大学工学部生命工学科)

Low-resolution structure analyses on protein complex by use of small-angle scattering technique

Tetsuro Fujisawa (Department of Biomolecular Science, Faculty of Engineering, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan)

## 相同組換え初期反応に重要なリセクション

### 1. はじめに

相同組換えは、生物のゲノム DNA の恒常性維持に重要な過程である。相同組換えで中心的な役割を担う RecA (recombination A, 真核生物では Rad51 (radiation sensitive 51)) タンパク質は、一本鎖の DNA との複合体をつくり、タンパク質—一本鎖 DNA 複合体 (ヌクレオプロテインフィラメント) を形成して相同鎖の対合を行う。相同組換えの効率 (頻度) は、通常二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に変換すること、及びその一本鎖 DNA に RecA タンパク質をいかに結合させるかによって左右される。最近相同組換え機構の初期反応において、「リセクション」をキーワードとする新しい知見が複数報告されている。

### 2. リセクション

二本鎖 DNA 切断点で DNA 末端を修飾し、比較的長い 3'端をもつ一本鎖 DNA 領域をつくることを「リセクション」と呼ぶ。このような構造をつくることは、細菌の SOS 反応の誘導や DNA 修復に重要である。

相同組換えの代表的モデルである二本鎖切断修復は、二本鎖 DNA の切断によって開始する。平滑に近い DNA 末端では、RecA タンパク質はヌクレオプロテインフィラメントを形成できないので、一本鎖 DNA 部分を露出させる (リセクション構造をつくる) 必要がある。最近この過程で働く候補となるタンパク質の同定が相次いでいる。例えば、酵母では二本鎖 DNA 切断点には MRX (Mre11 (meiotic recombination 11)-Rad50-Xrs1 (X-ray sensitive 1)) 複合体が結合することが既に知られていたが、ここに Sgs1 (slow

growth suppressor 1) ヘリカーゼと Exo1 (exonuclease 1) などが働いてリセクション構造を作ることが報告された<sup>1-3)</sup>。古細菌、あるいはヒトのタンパク質を用いた試験管内再構成実験でも、同様のヘリカーゼとヌクレアーゼがリセクション構造を作ることが示された<sup>4,5)</sup>。

### 3. 大腸菌の RecF 組換え経路～細菌からヒトまで共通の相同組換え経路

相同組換えの様式は、これまで原核生物と真核生物で異なるとされていた。例えば原核生物の大腸菌は二つの相同組換えの機構 (RecBCD 経路と RecF 経路) を備え、DNA の二本鎖切断点から開始される組換えは前者が、一本鎖ギャップから開始される組換えは後者が担うと考えられていた。一方、真核生物では Rad52 タンパク質が関与する組換え経路が知られている。これには、組換えで中心的な役割を担う Rad51 タンパク質の働きをサポートする「メディエーター」と呼ばれるタンパク質 (群) が重要である<sup>6)</sup>。この Rad52-Rad51 組換え経路は DNA の二本鎖切断修復を行うことが可能だが、実は大腸菌の RecF 経路と真核生物の組換え経路の間には共通点が多い。

私たちは最近、試験管内再構成実験を用いて大腸菌の RecF 経路も DNA 二本鎖切断修復に関与することを示すことができた<sup>7)</sup>。この実験では、近年相同組換えの初期反応に重要であることが示唆されている二本鎖 DNA 切断点の「リセクション」も観察することができた。さらに、真核生物と同様にメディエータータンパク質の重要性も明らかとなり、相同組換え経路の、すべての生物における共通の性質が明確になった。

### 4. RecF 組換え経路の構成分子

大腸菌の RecF 経路の初期反応には、RecA, RecF, RecO, RecR, RecQ, RecJ, RecN, 一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) などのタンパク質が関与する<sup>8)</sup>。相同組換えでは、いかにして RecA タンパク質の働ける場を用意できるか、言い換えれば、いかにして長い一本鎖 DNA 領域を作り、そこへ RecA タンパク質を乗せる (ローディング) かが重要である。なぜなら、作成された一本鎖 DNA には SSB タンパク質がまず結合するので、それを RecA タンパク質と置き換える必要があるからである。RecF 経路では、RecQ ヘリカーゼと RecJ ヌクレアーゼが協調して長い一本鎖 DNA 領域を作り、そこへ RecF-RecO-RecR (RecFOR) タンパク質複合体が RecA タンパク質を乗せると考えられていた (図 1)。RecA タンパク質が相同鎖 DNA の検索と