

科学の 峰々

96

取材日：2018年6月19日
慶應大学 理工学部
物理学科 22棟304号室

慶應義塾大学 理工学部物理学科 教授

ナカサコ マサヨシ

中迫 雅由先生に聞く 生命になぜ水が必要なのか? 生体タンパク質分子の構造解析で 生命の根源活動に迫る（上）

聞き手：高橋 秀雄 日本科学機器協会 広報副委員長

鹿江 良一 (株)池田理化 横浜支店 営業係長

岡田 康弘 日本科学機器協会 事務局長

(取材・撮影・編集協力：クリエイティブ・レイ(株) 安井久雄)

中迫 雅由先生のプロフィール

- 1990年3月 東北大学大学院理学研究科物理学第二専攻
博士後期課程 単位取得退学
- 1990年4月 理学博士(東北大学 理博大1182号)
X線回折法によるバクテリオロドプシン光反応中間体Mの構造研究
- 1990年4月 東京大学 薬学部 薬品物理分析研究室 助手
免疫関連蛋白質のX線結晶構造解析
- 1994年1月 理化学研究所 生物物理研究室 研究員
SPring-8放射光利用に向けた低温結晶解析技術の開発
蛋白質の水和構造解析、X線結晶構造解析
- 1997年6月 東京大学 分子細胞生物学研究所 蛋白質解析分野 講師
SPring-8放射光利用に向けた低温結晶解析技術の開発
蛋白質の水和構造解析、膜蛋白質のX線結晶構造解析
- 1996年～99年 科学技術振興事業団 さきがけ研究21 兼務研究員
- 2002年4月 慶應義塾大学 理工学部 物理学科 助教授
- 2005年4月 慶應義塾大学 理工学部 物理学科 教授
X線回折イメージングによる細胞構造の研究
X線自由電子レーザー利用技術開発
蛋白質水和構造解析および分子動力学シミュレーション



慶應大学 理工学部物理学科
神奈川県 横浜市 港北区 日吉3-14-1



产学官との連携

タンパク質の表面には
水分子が付着する現象を発見

— 中迫先生は、大きな研究テーマの1つとして「水と生命の関わり」について取り組まれています。まずはこの点から研究の概要を教えて頂けますか。

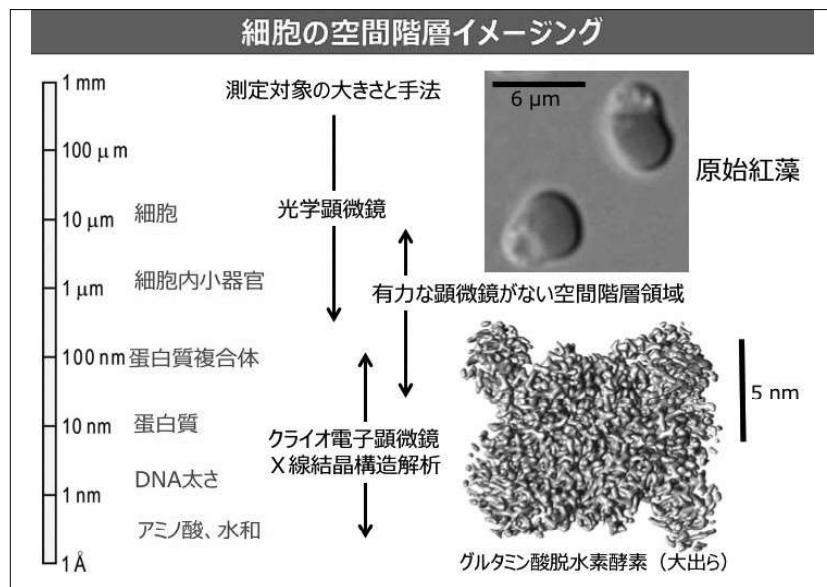
中迫 一般論として、生命には水が必要と言われています。宇宙の研究でも水があるかないかを根拠として生命がいる、いないということを議論していますが、では「生命になぜ水が必要なのか」というと、実は物理や化学の面での根拠は希薄なのです。つまり、生命に水が必要な理由を、まだ十分に理解できていないと考えています。

そこで水の生命への関わりを研究していますが、それを知るには生体分子の周辺の水分子の吸着構造、すなわち「水和構造」と言うのですが、これを調べる必要があり、様々な方法で研究を進めています。

水の研究をしている人というのは実は非常に少数ですが、私自身は人と違うことをしたいという思いもあり、大変興味深く取り組んでいます。

— 微少な領域を観察するわけですが、どれくらいの単位なのでしょうか？

中迫 生体分子の水和構造については、ナノよりももう一段階小さな長さの単位であるオング



生物細胞には様々な空間階層があり、それに適したイメージング手法が開発されています。

ストロームの領域で解析をします。その領域は顕微鏡でも見ることが出来ないレベルですので「X線結晶構造解析」という技術を使います。さらに付け加えますと、私の研究室では、もうひとつサイズ的には大きな「クライオ電子顕微鏡で観察ができる領域」、さらにもっと大きくなって「光学顕微鏡で観察ができる領域」、そしてその間にある「有力な顕微鏡がない空間階層領域」についても、私達が開発した「X線回折イメージング」という手法で取り組んでいます。これだけの空間階層を1つの研究室で対象にしているのは、国内では当研究室のみだと思います。

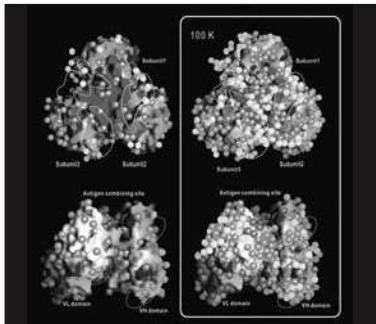
— 「生命と水の関わり」を研究するようになったきっかけを教えて頂けますか。

中迫 きっかけは1994年頃です。私は東北大学で理学博士の博士号を取得した後、東京大学の薬学部で「免疫関連タンパク質のX線結晶構造解析」の研究を行っていましたが、その年、理化学会に移りました。その理由は1997年から稼働することになっていた兵庫県の播磨にあるX線放射光施設「SPring-8（スプリングエイト）」で“タンパク質を冷却し、X線で結晶構造を解析する”技術を確立したいと考えたからです。

理化学会で、タンパク質結晶を100 K程度に冷やして解析するという事を進めていた過程で、たまたま、冷却したタンパク質結晶では、タンパク質の周りに水分子、正確に言うと水分子の酸素原子ですが、それらがたくさん見えるという現象を見つけたのです。室温と低温の構造解析の結果を比べると、

産学官との連携

タンパク質の表面に見える水の数が3倍～4倍に増えていることを発見して、非常に驚きました。それは、低温だと水分子が運動エネルギーを失い、水素結合相手となるタンパク質表面の原子の周辺に居ると解釈できる現象でした。それがきっかけで「水が生命活動にそもそもどう関わっているのか」という疑問を抱き、水がタンパク質の周りにどう付いているのかを細かく研究するようになりました。



同じタンパク質でも、冷却した場合の水分子の比較図。室温 293K(左)に比べ、低温 100K(右)の方が、水分子が格段に増えていることが分かる。

国家プロジェクトの放射光施設の運用に貢献

以前このコーナーで「SPring-8」を運営する理化学研究所の放射光科学総合研究センターの石川哲也センター長にインタビューをさせて頂きました（2016年12月号／2017年1月号掲載）。SPring-8は世界一の高エネルギーのX線を用いた施設ですが、先生はその運用の一端に貢献されていたのですね。

中迫 私は1984年に静岡大学の理学部を卒業した翌年に東北大学の大学院に進みましたが、既に1983年に筑波にあるフォトンファクトリーという放射光科学研究施設が稼働を始めました。東北大学の大学院生時代は筑波に頻繁に通う形で実験を行っていたのですが、その頃、石川先生はフォトンファクトリーで助手をしていらっしゃったので、当時から存知上げていました。

そのフォトンファクトリーよりも格段に高強度X線を供給できる大型放射光施設SPring-8は「それまでは不可能だった微少な領域の分析を可能にした」放射光施設でした。しかし、それほど強いX線を生体試料に当てるとき試料自体が壊れてしまいます。これを放射線損傷と言いますが、SPring-8を有効に利用してもらうためには、この放射線損傷を低減することが不可欠でした。

私は、SPring-8が出来る2～3年前から、「低温X線結晶解析技術の開発」というテーマを取り組んでいました。日本で初めての技術ということになりますが、これをSPring-8の有効利用のために整えました。当時、世界的にも積極的な取り組みがなされていましたが、SPring-8が稼働する頃には、海外にも私と同じような取り組みを行う研究者が出てきました。この時は国内ユーザーが

使えるようにマニュアル作りや普及活動も行いました。

また、放射光施設関連では、後の2012年からX線自由電子レーザー施設「SACLA（さくら）」が稼働しますが、そちらの方でも運用開始前から関わりました。私が慶應義塾大学で教授になったのが2015年ですが、その年に理化学研究所が日本でもX線自由電子レーザーの利用技術開発を行うということになり、私は文部科学省の小委員会の委員として、石川センター長に連れられ、内閣府の総合科学技術会議へ「SACLA」建設の意味合いを説明しに行きました。そうした立場にあったこともあります。後でお話しするSACLA関連のプロジェクトやソフトウェアの開発などにも色々と関わって来た経緯があります。

水素結合の鎧を着ているタンパク質の姿

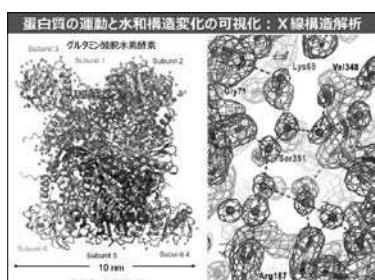
—国家プロジェクトレベルのX線解析のための研究や周知活動なども、両輪で行われてきたわけですね。そうした中で取り組んでこられた「水と生命の関わり」について、もう少し詳しく教えて頂けますか。

中迫 生体分子周辺の水分子の吸着構造は、先ほども申し上げましたように水和構造と呼ばれます。それを調べるのには様々な方法があります。最初は

产学官との連携

主に「X線結晶構造解析法」を使って取り組み、最近では、「分子動力学計算」という方法や、ほぼ自作の装置を使って行う「蛍光時間分解測定法」、さらに大阪大学生命機能研究科の難波研究室にある「クライオ電子顕微鏡」を使って、水のことを調べています。

こうした様々なアプローチを用いて、生体分子の表面で水分子はどこにあるのか、何を行っているのかをちゃんと見よう、というわけです。



X線構造解析図

「タンパク質の運動と水和構造変化の可視化：X線構造解析」という図には、グルタミン酸脱水素酵素というタンパク質の水和構造を示してあります。左の図が全体像で、酵素分子の大きさは10ナノメートルほどとなります。リボンで示したのがタンパク質の結晶構造の模式図で、周囲にある小さな丸が水です。その一部を拡大したのが右の図になります。拡大図の丸は水分子の酸素原子の位置で、点線で示したのが、これらが取る水素結合です。こういうものを調べるわけです。

しかし、ひと口に調べると言っても、水がどう付着しているのかという付き方や水素結合のパターンには、あまり規則性がなく、解析のプログラムもありませんでした。そこで10万行ほどはあるかという水和構造専用の解析プログラムを2年がかりで少しづつ組んで行きました。こうしたことで研究を進めていった結果、得られた知見がいくつかあります。

タンパク質の表面には水分子が“ほぼ1分子分の厚さ”で吸着していること、水分子は隣同士、あるいはタンパク質表面の酸素や窒素原子と水素結合を形成していること、さらには、その水素結合がネットワーク状に連なっていることがわかりました。まるでタンパク質が鎧を着ているように、水分子の水素結合ネットワークが、少しづつ形を変えながらタンパク質の表面を覆っているという現象を見ることが出来たわけです。これも自身で水素結合をたどっていくプログラムを組んで、地道に調べていったところ、発見出来たことでした。



タンパク質表面に見出される、水分子（水色、黄色、紫色球）とタンパク質表面の酸素原子や窒素原子（灰色球）で構成された水素結合（棒）のネットワーク

また、分子動力学計算という手法を使い、水がどんな頻度で水素結合を行っているかも分かりました。水素結合は共有結合とは違い一度結合したら離れないとというわけではなくて付いたり離れたりしているわけですが、それがどれくらいの頻度で起こっているかを調べました。また、タンパク質の表面は電荷を持っている、また水分子も双極子モーメントと言って電気の性質を持っているのですが、水が付着すると電気の向きが「揃う」ことが起きるということも分子動力学計算で明らかにすることが出来ています。

—こうした世界初の発見は、人類が新たに得た知見ということになるわけですね。

中迫 他の人がほとんど行っていないこともあります、そういうことになります。水和のことは一般の科学雑誌でも2度程表紙に取り上げて頂きました。

また大きな発見として、タンパク質は機能する時にナノメートルのスケールで動くのですが、その動きを水分子の脱吸着が制御しているのではないかという現象を、計算機や結晶解析を行って実際に確認することが出来ました。これは、「タンパク質表面に吸着した水分子が、積極的にタンパク質の運動を制御している証拠を得ることができた」ということになりました。

産学官との連携

—つまり水分子の方が水素結合を行ったりして動くことが、研究対象としたタンパク質が動くことに影響を与えていているのではないか、ということですね。

中迫 そういうことです。外部から何も力を加えなくてもそのタンパク質は勝手に動きうるのですが、そのタンパク質表面に存在する2ヶ所のくぼみに水が出入りすることで、タンパク質分子全体の開閉運動が制御されているのではないかということを計算を通じて分かりました。タンパク質分子全体が開いているときには、くぼみに水分子が入るのですが、タンパク質分子全体が閉じようすると、それくぼみに吸着した水分子を外に出す必要があるといった具合です。また、くぼみに吸着する水分子は複数あるので、ひとつ水分子が入ると口は一段階開く、もうひとつ入るともう一段階開く、反対に口を閉じる時も同様に水分子を出すことに呼応して閉じる、という現象が見出せました。現在は、結晶構造と計算のみの段階ですので、さらにクライオ電子顕微鏡を用いてこの現象を更に詳しく観察したいと考えています。

他にも、水がタンパク質の内部や表面で立体構造を安定化する役割をしていることも明らかに出来ています。

—少しお話を頂いただけでも実に様々なことを明らかにされ

ているんですね。どれも前例がない新発見なわけで、海外でも非常に興味を集めていると思うのですが、いかがでしょうか。

中迫 そうですね、私のようなアプローチで水を研究している人は海外でもほとんど見られないので興味を持って受け止められることが多いです。イギリス王立協会で、いわゆる“ジャパンーズ・イングリッシュ”でタンパク質分子の水和構造に関する講演をしたこともあります(笑)。

そして、私の研究もそうなのですが、世界中でタンパク質の立体構造解析をした結果はプロテイン・データ・バンクというところに登録をすることになります。そのデータは誰が使ってもよいことになっています。そのビッグデータの解析からも、タンパク質の水和について色々な知見を得ることが出来ました。

例えば、プロテイン・データ・バンクに登録されている高い解像度で解析された約1万8千種類のタンパク質の結晶構造モデルに含まれていた約480万個の水分子に着目して、それらがタンパク質表面を構成するアミノ酸残基の酸素原子や窒素原子に対してどんな位置で分布しているのかということを調べました。これにより水素結合の幾何学的特徴を統計的に明らかにすることが出来ました。

さらに、このビッグデータ解析の結果、水和構造をする予測

方法を開発し、また最近では、水素構造を近似する力場（りきば）を考案しました。先程お話しした「分子動力学計算」では、水素結合の相互作用を表現するパラメーターが不完全だったのですが、それを改訂したことになります。

—様々な発見も独創的ならば、プログラムやアルゴリズムを考え、装置を自作したりなど、実験する方法そのものがオリジナルであることに驚いています。

中迫 誰も行っていなかった分野なので必然的にそういうことがあります。今使っている自作の装置のひとつに「時間分解蛍光測定装置」というものがあるのですが、これはタンパク質と周りに付着している水の関係を時間変化で捉えようとしたものです。水和構造の変化は、ピコ秒、あるいはナノ秒のタイムスケールで起こっていて、それを計測するためのものです。タンパク質分子の中で蛍光を発するトリプトファンというアミノ酸を測定対象としています。タンパク質溶液にレーザー光を照射すると、レーザー光線を受けたトリプトファンが発する蛍光強度が、トリプトファンの周囲での水和水分子の運動に影響されて時間変化しますので、その変化で捉えてトリプトファン周辺での水分子の運動を推定することになります。

産学官との連携

— 水和構造の解析で得られた知見が、私達の身近なところで役立っていく例には、どんなことが考えられますか。

中迫 一例をあげると、薬の開発の進歩に大きく寄与出来ると考えています。

まだ薬剤メーカーに波及してはいないと感じています。現在、メーカーの皆さんのが、新しい薬の対象タンパク質分子への結合を分子動力学計算でシミュレーションする時には、水がない状態で行う場合がほとんどです。というのも、水を使うには、膨大な量が必要になるのです。

しかし、こうしたタンパク質表面での水分子の吸着構造など色々と分かってきているので、水の脱吸着とか力場などをシンプルに考えていくと、新薬開発などにおいてよい成果が得られるのではないかと思っているところです。

雑誌「ネイチャー」の表紙を飾った研究成果

— 先生の低温X線結晶構造解析の研究成果の一部は、2000年に雑誌「ネイチャー」の表紙にもなっていますね。

中迫 SPring-8の運用のために理化学研究所の研究員として勤めた後、1997年に東京大学の分子細胞生物学研究所（当時）に移り「膜タンパク質の低温X線結晶構造解析」を行いました。

膜タンパク質とは、簡単に言い換えると、細胞膜に埋まったタンパク質で、細胞の外側と内側の物質や生体信号の伝達を担います。

「ネイチャー」に掲載されたのは2000年のことで、カルシウムイオン・ポンプの立体構造を明らかにしたことでした。細胞膜の内側と外側でイオン濃度は大きく違うのですが、カルシウムイオンの濃度を制御しているのがカルシウムイオン・ポンプです。これは有名な膜タンパク質でありながらも、当時、詳細な構造は全くわかつていませんでした。ちなみに、これと似たような位置づけで、ナトリウム・カリウムポンプというものもありまして、この存在を明らかにした研究者はノーベル賞を受賞しました。

クライオ電子顕微鏡でも見えないものはまだある

— 自作の装置に加え、先生も研究に使用している「クライオ電子顕微鏡」ですが、これは開発者が2017年にノーベル化学賞を受賞したものですね。どういったものなのでしょうか。

中迫 そのノーベル賞は、開発者のヘンダーソン氏、デュボシェ氏、フランク氏という三氏に対して与えられたものでした。

クライオ電子顕微鏡とは何かというと、基本的なところは光学顕微鏡と変わらない部分もある

のですが、特徴の一つは波長が短い電子波を使用している、もう一つは電子が物質と非常に強く相互作用することで、小さな分子が見えるということです。

仕組みは電子銃からの電子波をコンデンサレンズというもので試料に集中させ、試料で散乱された電子を対物レンズと投影レンズを経て、その実像に近い物を検出器で見ることが出来るというものです。投影レンズから検出器に映し出す過程で補整はされるのですが、いずれにせよ実像が見えるということは嬉しいことです。ちなみに、X線構造解析では、試料にX線を直接あてて、実像ではなく回折パターンを解析することになります。

電子顕微鏡の大きな長所は数十ナノメートル程度の分子の姿がノイズを含みながらも見えるということです。

1980年代以降、クライオ電子顕微鏡は、これまでの透過型電子顕微鏡の測定上の短所を克服しました。一つの短所は、電子を飛ばすために真空中で観察しないといけないという点です。つまり、生体の試料を見ようと思っても、いわゆる“ひもの”状態で見ることになります。

これを克服すべく、デュボシェ氏は試料の急速凍結を行い、低温のままで放射線損傷を少なくして見ることが出来るようにする技術を開発したわけです。

また、相互作用が強いため大量の電子を一度に照射できない

产学官との連携

ので、一分子を観察した電子顕微鏡画像には沢山のノイズが含まれ、すぐに何かを観察出来た、というわけではありませんでした。違う粒子と同じ向きに観察したものをたくさん持ってきて平均化したらノイズが低減されて分子の姿が見えることになります。この短所を克服するために、ノイズを含んだ画像をたくさん集めて、どういう風にして三次元構造を再構築するかというアルゴリズムを作ったのがフランク氏です。

近年、イギリスのケンブリッジ大学において、フランク氏が作ったプログラムに様々な統計解析の手法が加えられ、解析のアルゴリズムがさらに高度化されています。そして、ヘンダーソン氏は、1975年にタンパク質の三次元構造解析を初めて行った人物です。これは非常に評価され、ノーベル賞の受賞にあたって最もインパクトが大きかった実績ではないかと思います。

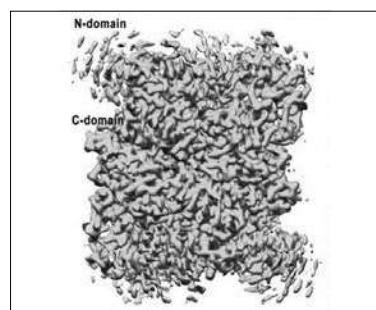
また、これまでの電子顕微鏡で低温凍結した試料を見ようとすると、わずか1秒くらいの事なのですが、見るときに凍らせた試料が溶けて試料の分子が動いてしまい、うまく見ることが出来ない、ということがあったのですが、21世紀に入って電子を実時間で測定する検出器と、照射時の動きを補正する検出器が開発されたことで、この点も克服され、クライオ電子顕微鏡による構造解析に大きく貢献しています。

ともかく、クライオ電子顕微鏡は「電子を直接観察出来る」ということで“見ること”を格段に進歩させることになったと言えます。

— 「顕微鏡」という響きから単純にものすごい倍率で拡大した画像を見るものだと思いがちでしたが、クライオ電子顕微鏡は「何枚ものノイズがある画像を集めて、ノイズを低減化して構造を見る」という仕組みだったのですね。

中迫 そうなのです。私は大阪大学の難波先生の研究室にあるクライオ電子顕微鏡を使わせてもらっています。1個のタンパク質を捉えた像はものすごくノイズが大きいのです。その中から、同じ向きを向いている画像をフランク氏のアルゴリズムを発展させたソフトウェアを用いて、回転や平行移動させるアラインメントという処理を行い、同じ画像を分類して「この画像は電子顕微鏡の中で、どちら側から電子線が飛んできて捉えたものだ」というのが導き出され、元の三次元像を構築します。

たどる段階を細かく言うともっと複雑になり、平均化されている画像でも微妙な違いがあるので一度元データに戻ってより正確性を高めたものにするなどあるのですが、私どもでも100万枚の粒子画像を使い、そこから図のような酵素タンパク質分子の三次元像を再構築しています。



クライオ電子顕微鏡による大きさ10 nmの酵素タンパク質の立体構造解析例

利点としては結晶構造に比べて自然な状態が観察可能であること、また試料を結晶化しなくてよいことがあります。結晶化するのは非常に手間がかかりますし、そもそも調べたいタンパク質の中には全く結晶にならないものがあります。

また、例えば大腸菌のタンパク質は培養をして試料を大量に作るのですが、大腸菌が持つタンパク質分解酵素が少しでも残っていると不安定なタンパク質が切られてうまく実験が出来ない、など試料を準備するのに様々な手間や注意すべき問題があります。そうしたことが簡略化されるところは、電子顕微鏡は利便性に優れている点になります。

— クライオ電子顕微鏡の問題点もあるのでしょうか。

中迫 やはり全てに万能であるということではなく、顕微鏡も“試料を選ぶ”面があり、うまくいかないことが多いこともあります。使いながら明らかになってきました。

产学官との連携

生命になぜ水が必要なのか?物理や化学の面での根拠は希薄です。ナノよりも一段階小さなレベルで、その研究に取り組んでいます。



一例として、水はご存知のように H_2O という化学式で酸素原子を持っているわけですが、電子は酸素によって跳ね飛ばされにくい、そのため酸素原子が観察しにくいことが判つてきました。X線解析の場合だと酸素原子がX線を跳ね飛ばすので、比較的はっきりと分かるのですが、同じ解像度でもクライオ電子顕微鏡だとそれはならないわけです。ですので、測定手法によって得られる解析結果も違うので、そういった点に注意しながら、また解析方法を試行錯誤しながら研究を進めております。

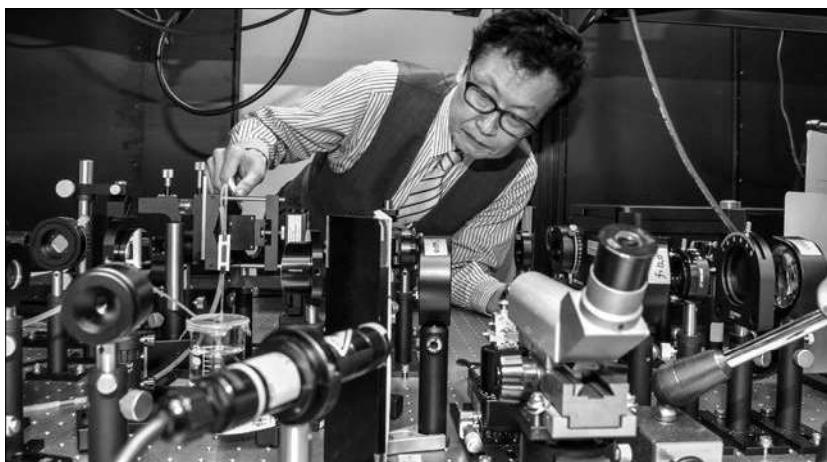
あと、やはり費用は膨大になるので、持ちたいと思ってもな

かなかそうはいかないという面はどうしてもあります。高額である理由が、生体分子を撮ると言うことで全てのスペックが高度化されていて、いわゆる普通の電子顕微鏡と共に部品や装置がないと言っていいほどのレベルです。例えば試料を扱う部分にしてもロボットが搭載されていて、試料に電子波が照射されて撮影されたら交換して、ということを自動で繰り返してくれるような仕組みで、あらかじめ照射の場所などをセットしておけばあとは全部やってくれるというような仕組みになっています。昔だったらX線結晶解析でもそうだったのですが、フィルムで撮影したものを現像と

いう作業があったのですが、そういうものが全て電子データになっているわけなので大きく変わりました。

—電子顕微鏡だけでなく、今は電子化されていても、先生が研究を始めたひと昔前は想像出来ないほど大変だったことは数々あったと思われます。

中迫 おっしゃる通りです。例えば今、タンパク質の周りの水分子のイメージングなどもコンピューターで再現出来ていますが、以前はありませんので、ひとつひとつ手で模型を作って構造の可視化を試みていました。994あるアミノ酸をひとつひとつ置いていって3ヶ月も掛かった仕事は、ごく普通にありました。今では、こうした面は随分楽になったと思います。



蛍光時間分解測定装置を調整中の中迫先生

次号「科学の峰々」では引き続き、
中迫雅由先生
「生命になぜ水が必要なのか」
生体タンパク質分子の構造解析で
生命の根源活動に迫る(下)
をお話いただきます。