



SATノーベル賞トーク  
2001年3月9日(金)開催

## 生体分子集合体の探求 - 私的見解

Aaron Klug

分子生物学者(英国)

1982年ノーベル化学賞受賞

南ア連邦生まれのイギリスの分子生物学者。ウィットウォーターズランド大学を卒業し、ケープタウン大学で学ぶ。1945~52年ケンブリッジ大学キャヴェンディッシュ研究所に留学、X線結晶学を学び、学位取得。1954~57年ロンドン大学パークベック・カレッジ研究員。1958~61年同大学ウイルス構造研究グループ主任。1978年からケンブリッジ大学MRC分子生物学研究所構造部門の部長。パークベック・カレッジ時代、パナールの指導でフランクリンとともにタバコモザイクウイルスの構造を研究し、フランクリンの死後、その分子模型を完成した。1962年、ファージの立体構造におけるサブユニットの配列について準同一モデル(quasiequivalence model)を提唱し、電子顕微鏡像からその正しさを証明した。さらにその発展として電顕像からの立体構造再構成法を開発、コンピューター解析も導入してT4ファージをはじめX線解析法では困難な各種の複雑なタンパク質分子の立体構造を解明した。これらの業績によって1982年度ノーベル化学賞を受賞した。(岩波書店・理化学辞典より)

タンパク分子やRNA分子(リボ核酸)、DNA分子(デオキシリボ核酸)などの三次元構造はX線結晶回折により解析することができますが、私は研究当初から重要なのは大規模な分子集合体の相互作用にあると考え、これに取り組んできました。今日は、大規模な分子集合体におけるタンパク質と核酸の相互作用についてのお話をさせていただきます。この研究を進めるには、物理的方法をはじめさまざまな解析手法を開発する必要がありました。じつは、私は化学の学位の他に物理学の学位もっています。

長年研究してきたタバコモザイクウイルス(TMV)は、RNAとタンパク質の集合体です。TMVは100年以上も前に分離に成功したウイルスですが、その正体は長い間謎のまま、その働きを理解できるようになったのは、わずか40~50年ほど前のことです。

タンパク質は生体分子で、化学反応や酵素反応に関係し、また構造を作るにも使われます。核酸であるDNAやRNAは情報を伝達します。ウイルスの場合、核酸が伝達する情報はウイルスの感染力です。感染力とは、ウイルスが宿主に感染して自分の複製を作り、その複製がさらに複製を作っていくことで、そのためには感染力の情報を伝達する必要があります。それを核酸が行います。

私たちがウイルス研究に従事したのは、ウイルスが核

酸とタンパク質の相互作用に関する極めて単純なモデルと考えられていたからです。後年、TMVだけでなく球形ウイルスの研究も行ふことになりましたし、その他にも、多くの単純なウイルスを研究してきました。例えば、ポリオウイルスあるいはカブ黄斑モザイクウイルス(TYMV)などの植物ウイルスです。TYMVは安全だったので研究対象としましたが、ポリオの場合は感染力があるので、取り扱いには十分な注意が必要でした。

さて、問題となったのは、なぜ小型ウイルスは棒状または球状の形状をとるかということです。その答えは、ウイルス粒子の内部構造が解明された時点で初めて明らかになりました。

### タバコモザイクウイルスの構造

TMVの電子顕微鏡写真を見ると、長い棒状粒子だということがわかります。私たちは1958年まで、TMVの外部構造について研究していました。TMVは、質量約1万7000ダルトンのコートタンパク質サブユニットの集合体です。コートタンパク質の内部にはRNAが入っています。当初、RNAは極めて単純なものと思われました。しかし、TMVの分離によってRNAが感染力という情報を伝達していることがわかりました。これは生物学史上極めて重要な発見です。1950年代半ばまではほとんどの生化学者は、タンパク質が情報を伝達すると信じていました。1957年

になっても科学雑誌「nature」には、タンパク質がいかにして自らを複製するかを示す論文が掲載されていました。しかし、タンパク質は自らを複製することはできません。タンパク質を作る遺伝情報をコードし、かつ自らの複製を行っているのはRNAまたはDNAなのです。

TMVの構造は極めて単純で、理解しやすいように思われました。タンパク質サブユニットが一つずつくっついて、らせん転移のようにタンパク分子が成長すると考えられていました。しかし、ウイルスのタンパク質はRNAを認識せねばならないという生物学上の要件を考えに入れねばなりません。これには特定の認識が必要なはずで、つまり、TMVのタンパク質は、TMVのRNAとのみ相相互作用をもつはずで、

試験管にTMVから分離したタンパク質とRNAを混合すれば、24時間後に棒状のTMV粒子ができます。24時間というのは生物学においては長時間ですが、適切な条件下では、タンパク質とRNAから5～6分でTMVが形成されます。

さて、最初に気づいたことは、イオン強度によってタンパク質を簡単に分離できることです。タンパク質はRNAがなくとも自ら集まり、らせん構造を形成することもわかりました。しかし、一定の生理学的条件下では、タンパク質はらせん構造を形成せず、二層のディスク状の構造を形成します。この構造は、pH 7の場合にだけに形成されるように思え、私はこれがウイルス粒子形成の核の役割を果たすと考えました。また、この構造はRNAを認識します。そこで私たちは、このタンパク質ディスク構造を作る実験に着手し、これとRNAと混合しました。

光の散乱を使えば、タンパク質が集合体を形成する様子をたどることができます。RNAを4S（スヴェードベリ）と呼ばれる分離したタンパク質ディスクと混合した場合は、集合体の形成は極めて遅く、24時間かかります。しかし、20Sのディスクを加えると速くなります。この場合は、20Sディスクをたくさん加えるほど集合体の形成は速くなり、最終的には4分で完全な粒子形状を得ることができます。したがって、タンパク質ディスクは集合体形成の核となるだけでなく、集合作用自体にも関係することがわかりました。

また、20Sのタンパク質ディスクに異種のRNAを加えると、集めないことも明らかになりました。つまり、ディスクは相互作用すべき同種RNAとすべきでない異種RNAを識別することができるのです。また、タンパク質

ディスクが認識するのは、従来いわれていたようなRNAの先端ではなく、RNAの特定の部分であることもわかりました。その部分が集合体形成の起点になるわけです。

TMVウイルスのRNAゲノムは大変小さく、4種類のタンパク質の遺伝子しかコードされていないにもかかわらず、集合体の形成が行われます。これがどのような仕組みで行われているかの手がかりを、構造研究から得ることができました。

集合体形成に關与する遺伝子配列は、二重らせん構造のステム部分と環状構造のループ部分で構成されるステムループ構造をとります。そしてこのステムループ構造はタンパク質を認識するためによく利用されています。反対にいえば、タンパク質はステムループ構造を認識します。また、ループの先端にグアニンが五つあることにも気づきました。三つの塩基につき一つのグアニンがついているのです。タンパク質のユニットであるアミノ酸は三つの塩基の並びで決まります。したがって、これが集合体の起点のはずで、グアニン・パターンの繰り返りでタンパク質を認識する、あるいはタンパク質に認識されるのです。

私たちはX線結晶回折を使って、タンパク質ディスクの構造を調べました。ディスクの断面を見ると、化学的に同一なタンパク質のサブユニットが並んでいるのがわかります。環の中には17個のサブユニットがあることもわかります。しかし、コインを積み重ねたようにぎっしり詰まっているのではなく、隙間があり、タンパク質のポリペプチドの鎖が秩序正しく配列されていないところがあります。このために、ウイルスの真中には穴があり、その穴は柔軟なタンパク質のループにより広がられます。そしてこの穴を介してRNAとタンパク質ディスクとが相互作用し、集合体が形成されることが示されました。

次々と相互作用を起こして、集合体の形成を持続するためには、ディスクの位置をずらす必要があります。ディスクがずれると、1回転分に相当するRNAの50個のヌクレオチドがディスクにはさみ込まれループができます。50のヌクレオチド・ループとタンパク質二層ディスクの組み合わせができると、次には別のタンパク質ディスクとループの組み合わせが形成されます。このTMVのシステムを用いた植物への遺伝子組み込みも行われています。

さて、私たちが用いたタンパク質ディスクは、ウイルスの効果的な集合体形成に必要な不可欠な二つの条件を満たしています。一つは集合体形成の核となるための物理

的な条件で、二つ目はRNAの特定の認識に対する生理学的な条件です。TMVシステムを明らかにしてからすでに20年経ちますが、未だにこのように詳細に働くシステムは他にはありません。

### サブユニットの配置理論

TMVの他にも植物ウイルスはいろいろありますが、どれも数多くのタンパク質サブユニットから構成されています。これは、小さなタンパク質の遺伝子をコードするほうが経済的なためです。小さなタンパク質の複製を数多く作り、集合体形成のために何度も使うのです。この原理は、球形ウイルスにおいても当てはまります。

TMVは線対称、らせん対称となっています。同一のタンパク質単位が球形を形成する方法については、DNAの構造を明らかにしたワトソンとクリックが最初に指摘しています。彼らは球形ウイルスのシェルも対称性をもっていると述べたのです。

さて、カブ黄斑モザイクウイルス (TYMV) の構造を、X線回折と電子顕微鏡を使って解いてみると、その球形の構造は180単位、つまり180個のタンパク質のサブユニットでできていることがわかりました。互いに等価かほぼ等価の相互作用をもつ必要がある180単位を、どのように配置すればよいのでしょうか。そもそもウイルスは、自由エネルギーが最小になるように構造形成されます。そこで、私は同僚のキャスパーとともに、何百というサブユニットをもつウイルス粒子が、いかに集合するかという理論体系を導き出しました。

正二十面体の対称性を有し、各面を3単位で構成し合計60単位、つまり60個のサブユニットで構成しているのが、正二十面体球状ウイルス集団の中で最も単純なものです。これは5回転、3回転、2回転の回転対称軸をもっています。ポリオウイルスのコートタンパクが構成されるときには、60のサブユニットがこのように配置します。

180個の同一のタンパク質のサブユニットでできているTYMVの場合は、3単位で構成される60のグループと考えることができます。但し、全く等価な配置、相互作用というわけにはいきません。というのは全く等価な結合のためには60単位を越えられないからです。180単位の場合は、3回転対称軸のまわりは6単位からなる環で、5回転対称軸のまわりは5単位からなる環で構成されます。この配置によるタンパク質のゆがみはほとんどないにもかかわらず、かつてはタンパク質の結晶学者から疑惑の目を向

けられていました。タンパク質には柔軟性がないと考えられていたからです。実際には、物理学者がいうように、タンパク質にはかなりの自由度があり、相手に合わせて形態を変えることができます。なぜなら、構造が閉じるとエネルギーを最小限に抑えられるからです。

### 三次元イメージの再構築法

さて、TMVよりもはるかに大きなウイルスであるヒト乳頭腫ウイルスには、多くのサブユニットがあります。このウイルスはDNAウイルスですが、感染力の情報を伝達するDNAは存在しません。電顕画像では、タンパク質シェルは白くうつり、一部は空洞になっていますが、これら二つのフィールドを取って、20度に傾けてみると、パターンが変化します。これは染色剤が粒子全体を覆っている証拠です。さて、電子顕微鏡は焦点深度が深いため、視線の高さにあるすべてのものは平面に投影されます。しかしながら、電子は当然多重散乱します。このウイルスは直径が約500オングストロームですが、私たちはこのサイズの試料での電子の多重散乱を確認することができました。

電子顕微鏡で見る画像は現物の平面投影されたものです。かつて私たちはウイルス構造のモデルをいろいろと作っては傾け、電顕画像の変化を説明できるかどうか検討していました。そして、試料を連続的な角度で傾けることによって、どんなものの三次元構造でも得ることができるというスキームにたどり着きました。これは、ウイルスの投影をフーリエ解析することにより三次元イメージを構成する「イメージ再構成法」というものです。現在ではこの方法は、生物系の構造を解くためにいろいろと用いられています。

これは、X線CTスキャナーの原理といえます。コンピュータで自動制御されるこのX線装置も同じ方法で作動します。私たちの論文は1968年1月に発表されましたが、同じ年の8月に、ロンドンAMIのアームズフィールドが立体構造再構成法の特許を取得しました。当時の私たちは特許取得にはあまり注意を払うことがなく、単に研究成果を出版しただけですが、彼はX線とCTスキャナーの両方のオペレーティングシステムの特許を確保しました。しかしそれはまさしく私たちの原理に基づいていました。

新しい発見が思いがけないことから生じるのは、科学において重要なことです。ウイルス構造に関する研究が、最終的にX線CTスキャナーを生み出すなどと、誰が考え

ていたでしょうか。

## クロマチンの構造と単位

染色体を構成するクロマチンの研究を始めたのは、私たちがウイルスの研究を通して電子顕微鏡やX線結晶学、生化学的手法を使って、大規模な構造を解析する手法を開発することができたからです。これらの手法を使えば、DNAとタンパク質の複合体であるクロマチンの構造を解析でき、その基本単位についても言及できると思っただけです。染色体を見ると、DNAがヒストンと呼ばれるタンパク質と相互に作用していることがわかります。化学分析から、ヒストンはH1、H2A、H2B、H3、H4の5種の成分から構成されていることが知られています。化学的手法を使って染色体からヒストンを取り出してみると、大きなタンパク分子であることがわかります。

クロマチンの構造解析で私たちが発見したのは、DNAの二重らせんがヒストンを用いた巧妙な方法で小さなスペースに詰め込まれ、解かれたときの1万倍に凝縮されていることです。折りたたみのレベルには階層がありますが、最初のレベルはヒストン・オクタマーと呼ばれ、H2A、H2B、H3、H4がそれぞれ2分子ずつ、計八つのタンパク分子がスプール(ヒストンコア)を形成し、DNAがこのスプールに2巻きした状態です。この2巻きしたDNAの外側に5番目のヒストンH1がきてこれに封をします。

ヒストン、それに2回巻き付いたDNA、そこから次のヒストンへと伸びるDNAの三つの部分を合わせてヌクレオソームと呼び、これがクロマチンの基本単位となっています。H1はヌクレオソームの2回転構造に封をするだけでなく、H1分子自体が互いに作用を及ぼし合い、その結果、私たちがソレノイドと呼ぶ、非常に密にヌクレオソームが並んでいるらせん構造を形成します。これが折りたたみの次のレベルです。ソレノイドは直径300オングストロームのファイバーあるいはフィラメントで、ソレノイドの形成によりDNAは約1000倍に凝縮された構造となります。

私たちはどうやってこのような構造を見出すことができたのでしょうか。染色体は、分子量が何百万ダルトンと大変大きなものです。そこで、私たちは酵素を用いて染色体を切断してクロマチンの断片にし、扱いやすくかつ溶けやすくしました。そしてこれからH1を取り除き、低塩状態にすると、四つのヒストンに覆われたDNAの1片が現れます。塩濃度を上げるにつれて、天然塩である

塩化ナトリウムが直径300オングストロームのファイバーあるいはフィラメントに凝縮し始め、反復構造があるのが見えてきます。我々はこの動きを結晶学ではなく、X線回折によって、細胞核と抽出した物質の両方で追跡しました。同僚であるロジャー・コンドール博士との共同研究を通して、反復するクロマチン内ヌクレオソームを発見しました。

さて、H1の役割を見てみましょう。H1を取り除くと、ヌクレオソームは不安定になります。高い塩濃度下でも、ヒストンが取れて、ヌクレオソームは曲がりくねってしまい、きちんとした構造を形成しません。したがって、H1は高次の折りたたみ構造形成の仲立ちをしています。

私たちは、二次元結晶を形成しているヌクレオソームの電子顕微鏡写真を、三次元イメージ再構成法によって分析し、ヒストンあるいは粒子が二つの部分で構成されていることを見出しました。また、ヒストンタンパク質を結晶化して、そのタンパク質の配列と、DNAの巻きを収める正確なうねを発見して、画像を作り上げました。これには中性子散乱や回折など、コントラストによってDNAとタンパク質とを区別することのできる手法も用いました。私たちの作った画像を見ると、H3、H4が最初の四量体を形成し、DNAの1巻きと相互作用することがわかります。そしてDNA二重らせんは、一つの面にH2AとH2Bの二量体を付け、背面にもう一つの二量体を付けることによって2巻きとなり、ヒストンオクタマーを形成していることが明らかになりました。また、H1がヌクレオソームを安定させていることもわかりました。

さて、私たちは、クロマチンをヌクレオソームに分解する酵素の条件をコントロールすることによってヌクレオソームの結晶化を実現しましたが、これは当時の生化学者にとって非常な驚きでした。核内物質はあたかもボウルの中のスパゲッティのようなものなので、結晶化できるような秩序だった配列があるとは信じられていなかったのです。

## 亜鉛フィンガータンパクと遺伝子の発現

遺伝子は正しい時に、正しい場所、正しい組織で発現されなければなりません。このためには、転写と呼ばれる大変精巧な仕組みを必要とします。遺伝子が発現されるためには、DNAの配列が転写因子のタンパク質によって読み取られなければなりません。この因子と酵素の働きのもとにDNAからRNAが作られます。



しばらく前に私は、亜鉛フィンガータンパクと呼ばれるタンパクのある種類を発見しました。これは転写因子で、DNAの情報を読み取ります。また、バイオテクノロジー的方法で遺伝子のスイッチを入れたり、切ったりするのも活用できるタンパク質でした。

転写因子3A (TF3A) も亜鉛フィンガータンパクの一つで、米国のロジャーによって確認されています。これは特定の遺伝子の正確な転写開始のための因子です。その遺伝子はカエルから発見されたもので、因子Aをもっています。ブラウンズ研究所は、この因子Aは遺伝子のスイッチを入れるのに必要なことを明らかにしました。遺伝子のスイッチはDNAの制限領域にあり、TF3Aタンパクはこの領域に結合しなければなりません。私たちが着目したのはこの点でした。

当時、私は活性クロマチンに関心がありました。先ほどお話ししたのはバルクのクロマチンで、DNAは隠れていました。しかし、クロマチンのDNAはヌクレオソームの外側に巻き付いているのでDNAの配列を認識する分子に接近することが可能です。そこで何が起きているかを、私たちは見極めることにしました。そして、すぐにTF3Aが反復単位からできており、反復単位に折りたたまれたタンパク質の鎖がDNAを認識することがわかりました。同じような働きをする転写因子は、まだ誰も見つけていません。

DNAを認識するTF3Aのタンパク鎖は、その反復配列ゆえに構造的にも識別しますが、アミノ酸配列を変えることによって化学的識別もします。したがって、これは化学的識別を生み出すためのモジュラーシステムで、それぞれの単位がDNA配列の部分配列を認識することがで

きます。

亜鉛フィンガータンパクによるDNAの認識の仕組みを説明しましょう。このタンパクでは、亜鉛はタンパクの構成成分であるアミノ酸のうちのシステインあるいはヒスチジンと結合しており、残りのアミノ酸はループ構造になっています。タンパク質上の三つの位置にある各アミノ酸が、DNAの一つの塩基と1対1で相互作用し、DNAを認識します。じつにシンプルで美しいシステムです。

もし、DNAのある箇所を認識するような亜鉛フィンガータンパクを設計したいと思うなら、このシンプルな認識原理を使って、DNAのその箇所の配列を認識することのできるアミノ酸の組み合わせを探せばよいことになります。この方法で遺伝子発現のスイッチを入れたり、切ったりすることができるようになりました。このように単純な仕組みでDNAを認識する調節因子は他にはありません。

最近、亜鉛フィンガータンパク質を使いエイズ・ウイルスであるHIVのプロモーターのスイッチを切ることに成功したという研究成果が出ています。HIVはRNAを遺伝子としていますが、そのプロモーターのある制御領域はLTR(long term repeat)と呼ばれています。私たちが行ったのは、ストレッチA、ストレッチA'、ストレッチB、およびその他のストレッチを認識し、それと結合するような亜鉛フィンガータンパクを設計することでした。私たちは様々なフィンガーの組み合わせを作って、実験してきました。

こうしてカエルのDNAを対象とした実験系は、HIV発現の阻害の研究へとつながりました。分子生物学における研究のこつは、結果を導き出すことのできるような実験系を選ぶことだと思います。現実には、どの実験系がいいのか、結果がどうなるのか、わからない場合が多くあります。しかし、好奇心があれば、研究を続けていくことができるでしょう。

研究は一種の探検だと思います。私たちの探検の中にはすでに終わったものもあれば、他の人たちによって引き継がれたものもありますし、まだ手がけているものもあります。継続中のものは今よりもっとよい成果を出せればと思っています。そして、HIVのような重要なケースにおいては、遺伝子のスイッチを確実に切ることができるようにしたいと願っています。

(2001年3月9日実施) SAT