

X線結晶構造解析の発展

Development of X-Ray Crystal Structure Analysis

芦 田 玉 一
Tamaichi ASHIDA

X線結晶構造解析法は結晶構造・分子構造を決定する最も有力な方法である。この方法は、発足は約90年前であるが、とくにこの30年ほどの間に大きく発展し、低分子の原子価電子の精密解析から、分子量100万を超えるタンパク質複合体までの広い範囲を研究対象とし、また構造解析の専門研究者だけではなく、周辺の、物性、材料、化学、生物、薬学、医学、鉱物等の多くの研究者も研究手段として利用するようになった。この間のこの分野の成果を紹介し、方法の発展のあとをレビューし、将来を展望する。

キーワード：結晶構造，X線結晶構造解析，DNA 二重らせん，
タンパク質分子構造，データベース
crystal structure, X-ray crystal structure analysis,
DNA double helix, protein structure, structure database

はじめに

X線結晶構造解析は分子の立体構造を決定するもっとも有力な研究方法であり、ますますその重要性を増してきている。その成果および近年の発展の様相は目を見張るものがある。

遺伝子 DNA の二重らせん構造の発見はこの分野の成果である。DNA は部分的には周期的らせん構造(分子軸方向に周期構造をもつ1次元の結晶といえる)をとっている。J. Watson と F. Crick は二人で共同研究を進めていたが、そのうちの Crick は当時他の研究者と共同で偶然にもらせん構造の X 線回折理論も研究していた。彼等とは独立に、R. Franklin と M. Wilkins は DNA の X 線回折写真をとっていた。その回折模様は Crick 等の二重らせん構造理論の実験的証明そのものであることが解った。一方、生化学の分野からのキーとなる情報は E. Chargaff の核酸塩基間の相補性の規則(種に関わらずアデニン/チミンおよびシトシン/グアニンの比は 1 という規則)であった。Watson

と Crick が 2 本のらせんの塩基間に、アデニン-チミン間と、シトシン-グアニン間に、定型的な水素結合が形成されるとして、X 線回折写真から得られる構造パラメータなど全ての実験事実および回折理論を総合して作り上げたのが二重らせんモデルである。相補的塩基間の定型的な水素結合モデルは遺伝子としての DNA の機能および構造の最も重要な特徴を示すものであった。このモデルの素晴らしさは、化学的に特別に合理的であることと、さらに、DNA の機能、生物学的意味のほとんど(遺伝情報の読み取りや複製など)がモデルを一目見ると直ちに理解できることであった。その素晴らしさのために多くの研究者がこのモデルを直ちに受け入れたのである。分子構造と機能の関連がこれほど明白な例は他に知らない。これが実質的な現代的生物科学およびバイオテクノロジーのスタートであったといえよう。(Crick, Watson, Wilkins は 1962 年のノーベル生理学賞受賞者)

その後数年して、M. Perutz および J. Kendrew の

タンパク質ヘモグロビンおよびミオグロビンの構造解析の成功により(二人は1962年のノーベル化学賞受賞者), タンパク質そのものもX線結晶構造解析法で解析できることが明らかになった。現在, 万を超える数の種々のタンパク質—酵素, 抗体, ホルモン, 等々の精密な分子構造が明らかにされ, 科学, 生物学, 医学, 薬学等の広い分野でその基礎的情報としての評価が高い。タンパク質の構造解析はポストゲノムの呼び声が高い分野である。Perutz が後年 (1993年), 彼がヘモグロビンの研究を始めた1937年頃からの結晶解析法の進歩を巧みに纏めた一文を発表しているので, 引用してみたい。

Not in my wildest dreams did I imagine 55 years ago, either that X-ray analysis would one day pinpoint the 5000 odd non-hydrogen atoms in hemoglobin to the nearest 0.1 Å, or that this would have such wide-ranging chemical, biological and medical implications. (M. Perutz, *Structure*, Introductory Issue, 1993, p. 12)

ここまで生物科学的な面だけを述べてきたが, 物質の電子・原子的構造の情報を必要とする物性論および化学の分野でもその重要性は変わらない。もうすでに一昔あるいは二昔前になるが, 酸化物高温超電導体の開発にしのぎが削られ始めたころ, その結晶構造までもがテレビのニュースの画面に現れた時期があったことを覚えている人も少なくはないであろう。化学の分野では, イオン結合と共有結合の電子分布の違いの確認, ケイ酸塩の結晶構造解析 (X線結晶構造解析で構造が明らかになるまでこの分野は研究上の"暗黒の大陸"であった), 錯塩の結晶構造解析, 水素結合の確認, 化合物の立体配置(絶対構造)の決定, 複雑な(天然および合成)有機化合物の解析, 等々が化学の基礎・応用の研究に確固とした基礎を与えてきた。複雑な化合物でも構造を解析してくれるX線結晶構造解析法は無機化学でも有機化学でも最有力な研究方法である。

わが国ではこの分野の研究者の数は, 現在はかなり増えてきたが, かつては大きい大学に研究室が一つあるかないかというくらいの少ないものであった。欧米でも同じような状況にあった。ところがこの狭い分野で, ノーベル賞受賞者はずいぶん多いのである。文中で注記しているので注意されたい。この事実はX線結晶構造解析が科学技術の分野でとくに高く評価されていることを端的に示している。

X線結晶構造解析法は, 強力なX線源の開発と発展, 高機能の検出器の開発, コンピュータを用いた位相問題解法等を含む強力な構造解析ソフトウェアシステムの開発, 等により, とくにこの20年間の間に急激な発展を遂げてきた。本論文ではその発展の跡を辿ってみることにする。

1. 古典結晶学—X線回折発見以前

結晶学は結晶によるX線回折現象の発見により全く様相を一新した。それまでの結晶学は, 結晶内部を「見る」手段がなく, 結晶の形態に関する研究あるいは光学的性質を研究する学問であった。それでも有理指数の法則とか面角一定の法則等は古くから知られており, 19世紀の中ごろには, 「結晶は3次的に規則正しく繰り返して配列した点よりなる結晶格子モデルで表される」という考え方が確立され, さらに世紀終り頃には230種全部の空間群(結晶の対称要素の全ての組合せ様式)も決定されていた。

2. X線の結晶による回折現象の発見と初期の結晶構造解析

1895年に W. Röntgen がX線を発見した (1901年のノーベル物理学賞受賞者)。そのうちに, X線は波長が可視光線などよりずっと短い電磁波であると考えられるようになった。

M. Laue は波長の短い波が結晶に入射したとき, 規則正しい周期構造によってどのような挙動をとるかを考え, その共同研究者 W. Friedlich および P. Knipping が単結晶にX線を入射させ, 回折模様が現れることを発見した(1912年)。Laue はその回折模様を説明しようとして結晶の周期構造の周期とX線の波長との間の回折条件式を発見した (Laue は1914年にノーベル物理学賞受賞)。

この研究に触発されたのは W. H. Bragg, W. L. Bragg 父子および東大物理教室の寺田寅彦であった。Bragg 父子はX線分光計を製作し, 回折の条件式である Bragg の方程式

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad (1)$$

を発見した。ただし, λ はX線の波長, d は原子網面間の距離, θ はX線の原子網面への入射角, n は反射の次数である。この方程式はX線が結晶内の原子網面により反射されるという考えから導かれたものであり,

形は異なるが、当然、Laue の条件と等価なものである。彼らはダイヤモンドのX線回折模様を測定し、それから結晶構造を決定し、さらにNaClやKCl等の基礎的な物質の結晶構造を決定し、X線結晶構造解析の先駆者としての業績を挙げていった。その門下からは多くの優秀な結晶学者が育った。Bragg 父子は1915年に共同でノーベル賞を受賞している。

彼等はまた、1915年に結晶構造のような周期構造を表すのに、フーリエ合成が有用であることを示唆した。しかしながら、実験面と計算面の困難のために、実際の適用例が発表されたのは1928年であった。その後フーリエ合成はコンピューティングの困難にもかかわらず結晶構造解析のルーチンとしてあらゆる解析で用いられるようになった。

Bragg の初期の業績以降暫くは、決定すべき構造パラメータの少ない簡単な基礎的な無機化合物の解析が主であった。一例をあげれば、NaCl ではその高い対称性から、 Na^+ イオンは面心立方格子の各頂点と面心を占め、 Cl^- イオンは軸の中心と体心を占める（あるいはその逆）。他の構造はありえない、即ち決定すべき位置パラメータがないことになる。このような結晶に対して、少数の特徴的な回折線の強度〔構造因子、(2)式〕、結晶の対称からの原子位置の制約、原子の推定位置から計算される構造因子の大小などの比較検討から構造が決定された。極めて粗い半定量的なものではあったが、これらの研究により、無機結晶、イオン結晶、イオン結合、共有結合、などの化学構造に関する貴重なデータや構造ルールが得られた。即ち、イオン結晶には「分子」がないこと、イオンは逆電荷のイオンによりとり囲まれていること、イオン結合原子間のイオン接触点の電子密度はほとんど0であること、一方共有結合した原子の中間点の電子密度は有意に高いこと、共有結合の原子間距離に比べてイオン結晶のイオン間距離は長いこと、同一元素のイオンの大きさは結晶が異なってもまた対イオンが異なってもほぼ同じであること ― したがってイオン半径という概念が有意義なこと、等の多くの情報が得られた。イオン半径という概念は L. Pauling により与えられた。またケイ酸塩の構造の特徴が解明され、ケイ酸塩化学の発展に大きいインパクトを与えた。

Pauling (ノーベル化学賞受賞)も無機化合物の結晶構造解析から研究活動に入っている。彼自身の研究成果と他の研究者が当時までに発表していた成果の集大成が著名な“The Nature of the Chemical Bond

(1939)”である。

3. わが国の結晶学草創期

寺田寅彦は Bragg と同時期にしかし全く独立に、大きい結晶にX線を入射させ、蛍光板で回折斑点を観察し、結晶を回転すると斑点が移動することを発見し、Bragg と同様の結論―原子網面によるX線の反射として説明できる―を明らかにした。Bragg 父子および寺田の研究はいずれも1913年にNature 誌上に発表されている。しかし残念なことに寺田はX線回折の研究を中断し、他の分野に転進した。

西川正治は、寺田の研究に触発され、理研で結晶構造解析の研究に進み、発展させていった。X線のみならず、後には電子線回折の分野にも発展していった。西川は世界に先駆けて空間群理論を構造解析に応用したが、この方法はその後の構造解析方法の基礎的ルーチンとなったものである。もう一つ解析分野での重要な研究に、「異常分散効果」の研究(松川久司との共同研究)がある。結晶内の原子の配列に、対称中心、鏡面、映進面等を持たない結晶でも、ある Miller 面の回折強度とその裏面からの回折強度は通常等しい、 $|F(hk\ell)|^2 = |F(-h, -k, -\ell)|^2$ 、という Friedel 則が成立する〔式(2,3)参照〕。しかし結晶内の原子のX線吸収端に近い波長のX線を用いると、散乱過程において $\pi/2$ だけ位相のずれた成分が現れ、それを考慮しなければならない。したがって Friedel のルールが成立しないことを見出した。20年後、1950年代から絶対配置の決定が行なわれるようになったが、この現象が利用されていて、絶対配置を全く実験的に決定できるユニークな方法である。X線異常分散効果はさらに単に絶対配置の決定だけではなく、とくにタンパク質の結晶構造解析では、反射の位相の決定にも利用されるようになり、異常分散効果の利用の意義はさらに大きくなった。西川門下からはX線のグループと電子線のグループが発足した。化学分野のX線構造解析の代表的業績は仁田勇のペンタエリスリトールの解析による「正四面体炭素の確立」である。電子線回折分野の代表は、菊池正士の電子線回折の実験である。この実験では菊池線、菊池バンドが発見され、動力学的電子線回折の研究の発端となった。菊池自身は原子核の研究に転向したが、電子線回折研究グループは西川門下で大きく発展した。

仁田はその後大阪大学で結晶構造解析の講座を主宰した。現在国内で有機化合物や生体高分子の構造解析

のグループが多く育ってきているが、そのほとんど全ては、遡れば、仁田研出身者に至る。一方東京大学理学部では、伊藤禎市が鉱物の構造解析の講座を組織し、大きい成果を挙げていった。

4. 結晶構造解析法の概要

方法の発展をレビューする前にまず結晶構造解析法のあらましを述べよう。

結晶は原子、イオン、分子等が構成する構造単位(単位胞)を、空間の3方向に周期的に平行移動で積み上げた周期構造である。単位胞の各辺はベクトル a, b, c で表す。その長さは小分子では数Å～数十Åである(1 Å = 10⁻⁸ cm)。このような、周期構造をもつ結晶に1 Å程度の波長を持つX線を入射させると、3次元的に離散的な方向にX線回折現象が示される。この幾何学的条件は、Laue および Bragg の式 [(1) 式] により与えられるが、単位胞ベクトル (a, b, c) および原子網面を表す Miller 指数 (hkl) の関数である。この回折の幾何学的条件には、個々の原子の位置座標は直接には関係がない。原子の配置に関係があるのは、回折波の強度 I である。強度 I は、

$$I(hkl) = F(hkl) \cdot F^*(hkl) \quad (2)$$

と表される。 $*$ は共役複素数を示す。 $F(hkl)$ は結晶構造因子と呼ばれ、原子の座標の関数である。回折波の数は最も簡単な結晶でも100個くらいから通常は数千個、タンパク質結晶では数万個～10万個にもなる。結晶構造因子は、

$$F(hkl) = \sum_j f_j \exp [2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] \quad (3)$$

で表される。この式で、 f は各原子のX線散乱能、 x, y, z は単位胞内の原子の座標で、単位胞の辺 a, b, c をそれぞれ1と規格化した少数で表し、添え字 j は単位胞内の j 番目の原子であることを示す。実際にX線を散乱するのは電子であり(原子核はほとんど関与しない)、その散乱能を原子ごとにまとめたのが f である。構造因子が複素数であることは、回折波が電磁波で、それを表すためには振幅 $|F(hkl)|$ と位相 $\phi(hkl)$ の二つのデータが必要であることに対応している。そこで測定した全ての $F(hkl)$ を用いてフーリエ合成

$$\rho(xyz) = (1/V) \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \cdot \exp[i\phi(hkl)] \cdot$$

$$\exp [-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (4)$$

を行なうと、結晶単位胞内の電子密度分布が得られる。 ρ は原子が存在する点でだけ有意の値をもち、その極大点を原子核の位置とすればよい。結晶構造因子は複素数で、実数部分 $A(hkl)$ 、虚数部分 $B(hkl)$ は、

$$\begin{aligned} A(hkl) &= \sum_j f_j \cos [2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)] \\ B(hkl) &= \sum_j f_j \sin [2\pi(hx_j + ky_j + lz_j)] \end{aligned} \quad (5)$$

と表せる。フーリエ合成に必要な位相 $\phi(hkl)$ は

$$\tan\{\phi(hkl)\} = B(hkl)/A(hkl) \quad (6)$$

で表される。振幅、 $|F(hkl)|$ はX線回折計あるいはX線回折写真で回折X線の強度から求められる。しかしその位相 $\phi(hkl)$ は測定することはできない。したがって、回折実験が成功しても直ちに結晶内の原子配置(結晶構造)が得られるわけではない。良い結晶が得られて、X線実験が成功しても、直ちに結晶構造の決定に成功することにならないのはこのせいである。これを「位相問題」という。結晶構造解析は、結晶化—X線回折実験—構造決定—結果の評価、という4ステップに分けられる。そのなかで結晶構造解析法の最大の問題が位相問題であった。

5. 結晶解析の発展 — 1930年代

1930年代後半になると、単位胞内の原子のやや多い有機化合物の結晶も解析の対象に取り上げられるようになり、またフーリエ合成が一般的に応用されるようになった。一方、方法論では、Patterson 関数が提案され、位相問題の解決に向かって大きい進展があった。

Patterson 関数： この関数はフーリエ合成 (4) 式の係数に (2) 式の回折強度(観測値)をそのまま用いて合成される。位相を用いないからそれだけ情報量が少ないが、回折実験終了後直ちに計算できることが特徴である。この関数は、電子密度分布 $\rho(xyz)$ と $\rho(-x, -y, -z)$ のコンボリューションで、結晶単位胞内の原子間ベクトルをベクトル両端の原子の原子番号の積を重みとして与えてくれる。実際には原子の電子雲は広がりを持っているのでその間のベクトルは大きい散漫なピークとして現れる。また、単位胞内の原子数の二乗個のベクトルが同じ体積の空間内に現れ、また有機化合物では原子番号の近い(X線を散乱する核外電

子の数があまり変わらない) C, N, O 等の原子が主であるから、その解析は特殊な場合を除くと一般にはほぼ不可能である。しかしながら、C, N, O, H の中に少数の重原子が含まれている場合の Patterson 関数では、その重原子間のベクトルは原子番号の積を重みとしてもつから、他の軽い原子間の多くのベクトルのなかでも容易に識別でき、その座標が決定できる場合が多い。これは構造解析の大きい手がかりを与えてくれる。なお、結晶内で対称関係にある原子間のベクトルが集まる断面, Harker section, が重要な情報を与えてくれる場合もある。

重原子法: Patterson 関数で重原子の座標が得られると、それを用いて、(3)式で構造因子を計算し、その位相を第一近似の位相とする。これは、軽い原子の(3)式への寄与が小さく、またお互いに相殺することも多いので、予期以上に良い結果を与えてくれる場合が多い。第一近似の位相と振幅は観測値を用いて(4)式でフーリエ合成を行なうと、当の重原子に加えて、軽い原子の一部あるひは大部分が現れる場合が多い。必要ならば現れた軽い原子も計算に加えて、構造が決定できるまでこの操作を繰り返す。これが重原子法として、1970年代まで、とくに複雑な有機化合物の解析によく用いられた方法である。

重原子を含まない結晶: 重原子を含まない結晶では、分子構造に特徴がある場合、結晶の単位胞あるいは対称に構造を制約するような特徴がある場合などのほかは構造決定は極めて困難であった。原子数が10個くらいまでの分子ならば Patterson 関数を詳細に調べることで構造解析に成功することもあったが、これはむしろ例外的であったといえよう。この事情は直接(位相決定)法が発展するまで続いた。とくに対称中心をもたない結晶では1970年代前半、著名なプログラム MULTAN が利用できるようになるまで続いた。

重原子同型置換法(対称中心がある結晶): 1930年代に一つだけ他に比べて異常に大きい有機化合物の構造が解析された、フタロシアニンの金属錯体である。フタロシアニンでは数種の異なる金属を分子中心に含む同型の結晶が得られた。その結晶で、フタロシアニン分子の中心が単位胞の原点(対称中心)にあり、この場合は構造因子(3)式の虚数項が0となり、実数項だけとなるので、位相は 0° または 180° だけに限られる。そこで同型結晶の回折強度を比較することにより多くの位相が得られ、フーリエ合成により構造が決定できた。この方法は後にタンパク質の構造決定に用いられた多

重原子同型置換法と原理は同じである。ただしタンパク質結晶では対称中心はなく、位相は $0^\circ \sim 360^\circ$ のすべての値をとりうるので、複雑な計算が必要である(後述)。

タンパク質結晶のX線回折実験: 英国で J. Bernal と D. Hodgkin (後年、ビタミン B_{12} , ペニシリン, インシュリンなどの解析でノーベル化学賞受賞) の二人が1930年代前半に、ペプシン結晶のX線回折写真を取り、タンパク質結晶の特徴を調べた。(i) タンパク質結晶も簡単な化合物の結晶と同じように規則正しい結晶格子を作っている。ただし規則性はやや劣る。(ii) タンパク質結晶は多量の水(平均50%)を含み、乾燥すると結晶が崩れる。キャピラリーに母液と一緒に封入すれば崩壊を防ぐことができる。この二つの特徴はタンパク質結晶構造解析を実行する上でとくに注意すべき重要な点である。1937年に Perutz がヘモグロビンのX線研究を始めたが、その Perutz 自身が「位相を決定して構造を決定する可能性がある」ことを見つけるまでにはまだ17年も必要であった。

6. 1940年代

第2次世界大戦中は科学研究は低迷していた。しかしながら戦後すぐに、方法論では二つの重要な進展があった。1948年に位相問題の発展の緒口となる研究、不等式法が現れた。構造因子の振幅間の不等式関係を発見し、それを利用して位相を決定し、構造決定に成功した、実用的な直接(位相決定)法の最初の論文である。構造因子間の種々の関係式を利用して、統計的、解析的に位相を決定する方法を直接法といっている。1950年代前半に直接法の重要な論文が発表されるが、その嚆矢となるものであった。

1949年 J. Bijvoet はX線異常分散効果を利用して絶対構造が決定できることを示した。その後徐々に絶対構造の決定が増加し、この効果の利用の重要性が認識されるようになった。

7. 1950年代

方法論では、構造因子間の関係式を利用して位相を決定する直接法の発展と、タンパク質結晶の位相決定法としての重原子同型置換法の確立が大きい進展である。一方、解析の成果としては、Pauling の α ラセンと β シート構造の提案、Watson & Crick の DNA の二重らせん構造の提案、Perutz & Kendrew のタンパク質ミオグロビンおよびヘモグロビンの結晶(分子)構造の決

定があった。方法論は後に述べることにする。

なお異常分散効果を直接に位相決定へ応用する方法の研究も始まっている(岡谷美治, 齋藤喜彦ら)。後に、この方法は発展して、タンパク質への応用で大きい成果を挙げることになる。

Pauling は共同研究者が精力的に進めたアミノ酸や小さいペプチドの結晶構造の解析データを基礎にして、タンパク質の基本構造として α らせんおよび β シート構造を詳しい構造パラメータ値も含めて提案した。水素結合も含めて、一見非常に合理的な巧みなモデルである。これはモデルであったが、タンパク質で最初に解析されたミオグロビンおよびヘモグロビンでは、数本の α らせんが組み合って立体構造を作り上げていること、その構造パラメータは全く Pauling の予想値どおりであることが解った。その後、多くのタンパク質で α らせんと β シート構造が最も基本的な構造単位であることが分かった。

Perutz および Kendrew のミオグロビンおよびヘモグロビンの結晶構造解析は彼らのグループが開発した多重重原子同型置換法を利用したものである。最初のタンパク質結晶の解析で、タンパク質の分子構造が原子レベルで解析できることを立証したものである。これを契機にしてタンパク質結晶学が始まった。

7.1 重原子同型置換法

先に述べたように、タンパク質結晶は平均50%の水(母液)を含んでいる。1954年 Perutz は研究を始めてから17年も過ぎて「適当な重原子(化合物、例えば水銀化合物)を選べば、結晶単位胞内のタンパク質分子の配置を変えず結晶の同型性を保ったまま、単位胞内の特定の位置に溶媒を置換して重原子を導入することができ、X線回折強度を有意に変化させること、さらにこの現象を利用すれば位相決定が可能であること」を示した。この方法を重原子同型置換法という。その後数年の間にこの方法は解析的に系統化され、ミオグロビンおよびヘモグロビンの解析に応用され、最初のタンパク質結晶解析の成功につながったのである。実際の位相決定には最低2個の重原子同型置換結晶が必要で、それを多重重原子同型置換法という。以後現在に至るまで、タンパク質結晶の位相決定は本質的にこの方法でおこなわれている。

7.2 直接法

現在、単位胞内の原子数数百個までの結晶の位相決

定の最有力手段は直接法である。最初に構造因子間の簡単な関係式の例を挙げよう。簡明にするために、単位胞の原点に対称中心がある結晶を考える。その系では座標 (xyz) および $(-x, -y, -z)$ を同種の原子が占めるので、(5)式ではその二つが打ち消しあって構造因子の虚数項 $B(hkl)$ は0となり、 $A(hkl)$ だけになる。位相は 0° または 180° のいずれかに限られることになる。さて、そこで $F(100) = \sum_j f_j \cos [2\pi 1 \cdot x_j]$ が異常に大きいとする、そのためには x_j すべてが0または全てが0.5に近い値をとればよい、前者では $F(100)$ の位相は $\phi(100) = 0^\circ$ 、後者では $\phi(100) = 180^\circ$ である。同様に $F(010)$ も非常に大きいとする、この場合は y_j 全てが0または全てが0.5に近い値をとればよい、前者では $\phi(010) = 0^\circ$ 、後者では $\phi(010) = 180^\circ$ である。さらに、 $F(110)$ も非常に大きいとしよう。この3個の構造因子が共に非常に大きいために、 (x_j, y_j) の全てが (i) (0, 0); (ii) (0.5, 0.5); (iii) (0.5, 0); (iv) (0, 0.5) のうちのどれか一つの近傍にあればよいことになる。このとき (i) および (ii) では $\phi(110) = 0^\circ$ 、(iii) および (iv) では 180° である。この三者の位相の関係を調べると、(i) ~ (iv) いずれの場合でも、

$$\phi(110) = \phi(100) + \phi(010) \pmod{2\pi} \quad (7)$$

が成立することが分かる。この関係式は結晶に対称中心がない全く一般の場合にも拡張できて、三つ組反射 $F(H), F(K), F(H+K)$, [簡明のために、 $(H) \equiv (hkl)$, $(K) \equiv (h'k'l')$, $(H+K) \equiv (h+h', k+k', l+l')$ と略記する]、が共に非常に大きいときに関係式

$$\phi(H+K) \sim \phi(H) + \phi(K) \pmod{2\pi} \quad (8)$$

が高い確率で成立することが示される。一つの $\phi(H+K)$ の右辺に適合する $\phi(H)$ と $\phi(K)$ の組が複数個あれば、平均値を取ればより確率が高くなる。これが直接法の代表的な関係式であるが、その他に結晶の対称から位相に制限が加わることもあり、さきの不等式関係も含めて多くの有力な関係式が開発された。実際の適用に際しては(8)式だけではなく、他の多くの有力な関係式が組み合わせて用いられる。このように直接法の基礎はできたが、その実際的应用には大量のデータ処理が必要で、コンピュータの発展を待たなければならなかった。直接法の発展には複数の研究者が貢献し

たが、そのうち、J. Karle および H. Hauptman の二人がノーベル化学賞を受賞している。D. Sayre は(8)式の発見者でその貢献も二人のノーベル賞受賞者のそれに劣るものではない。

8. 1960年以降の発展

1960年代になると、コンピュータも徐々に利用できるようになり、後半にはコンピュータ制御のX線自動回折計も利用できるようになった。1980年以降になると、コンピュータはいよいよ発展し、パソコンで、構造解析ができるようになった。一方、放射光X線が開発され、付随して高機能の測定装置も開発整備され、結晶学の環境は大きく変化してきた。ソフトウェアの面では、直接法の発展で、かなり複雑な分子も解析できるようになり、化学の3本柱、構造、物性、反応のうち構造だけではなく、それ以外の反応および物性の研究を目的とした結晶構造解析も多くなってきた。例えば、結晶内での化学反応トレースと反応機構の研究、精密電子密度分布の研究による分子構造理論や分子物性・結晶物性との関連の研究、電気的および磁気的物性との関連、分子構造と薬理との関連等々である。

では、1960年ごろから現在までの発展をトピックスに分けて述べよう。

8. 1 結晶解析とコンピュータ

現在では、結晶構造解析の分野よりもコンピュータをもっとよく利用する分野は多くなってきたが、電子計算機発展の初期の時代、あるいは、大型電子計算機万能の時代(1955～1985年頃)に、コンピュータをもっともよく利用した分野の一つは結晶構造解析の分野である。結晶構造解析分野の発展はコンピュータの発展とほぼ平行して実現してきた。コンピュータが利用できるようになるまでは、前に示した(3) および(4)式の計算を実行しなければ全く構造決定ができないので、種々の工夫を組み込み、簡略化した式を用いたりして細々と研究を行っていた。戦後まもなくの1947年には、米国 Pennsylvania State Univ. の R. Pepinsky という結晶学者自身が(4)式のフーリエ合成(2次元の)を行なうという一つの目的で、巨大なアナログ型の電子計算機を作った。何万本という真空管を用いたものであったが、フーリエ係数をメータ上に設定すると、直ちに構造(電子密度分布図)の投影図がブラウン管上に描かれるというもので、全世界の結晶学者が羨ましがったものである。それほどまでに、コンピュータ

の利用が切実な願望であったわけである。筆者自身も1960年にその研究室で研究に参加することになり、自分が決定した構造の見事な図がブラウン管上に現れるのを見たときは感激したものであった。

(3)、(4)式の計算は今ではパソコンでも短時間でできるが、決定した構造の精度を上げて信頼できるデータにするためには、

$$\Delta = \sum [(1/\sigma^2) \{ |F_o(hkl)| - |F_c(hkl)| \}^2] \quad (9)$$

を最小にする最小自乗法を適用することが必要であった。ここで、 $F_o(hkl)$ は構造因子の観測値、 $F_c(hkl)$ は

(3)式による計算値、求和は観測データ全て(通常数千個)について行なう。調節すべきパラメータは(3)式に含まれるすべてのパラメータ、即ち、単位胞内全原子の位置パラメータ、(熱)振動パラメータ等で、簡単な化合物の結晶でも数百個になる、即ち数百次のマトリックスを解くことになる。関数が線型ではなく周期関数であるので、収束には何回もサイクルを繰り返す必要があり、1980年頃の大型計算機でもかなりのCPUタイムを使っていた。

1966年にわが国の大学で初めて大型電子計算機 HITAC5020 が東京大学に設置された。われわれ結晶学のグループはその数年前から、必要なプログラムを外国研究者から輸入したり、自分たちで独自のものを作成したりして、プログラムを整備していたが、1967年には主要なプログラムのコードと使用法を纏めて出版し、全国の研究者の利用に供した。その後他の大学に大型電子計算機センターができ、このプログラム群は多くの大学でも発展整備され、長く用いられた。

この分野では、これまでに述べたいろいろな計算は現在では全くルーチンの計算となっている。解析法で、残るバリアは位相を如何にして求めるかであったが、これも直接法の発展により、ほぼ解決したといえる。

結晶構造解析が成功すると、貴重な多量のデータが得られる。単位胞中の全原子の3次元座標値とその標準偏差、結合距離、有意な非結合原子間距離、水素結合に関する幾何学的データ、単位胞のパラメータ、対称等である。構造が複雑になるほど、得られた結果の整理、表示、図示も重要な問題であり、その整理にもコンピュータが欠かせない。構造を立体図で描くプログラム(ORTEP という名前で著名)は早くも1965年に作成され広く利用されている。さらに、タンパク質も含めて、分子構造やその特徴を巧みに図示するいろいろ

なソフトウェアが開発され、今ではそれを用いて描かれた分子の図がテレビのコマーシャルでもよく見られる。タンパク質結晶の構造解析では低分子のそれと比べて、観測データ数も、原子数も共に一桁以上大きいだけに、計算量も莫大である。

結晶構造の論文を出版する代表的なジャーナルは国際結晶学連合 (IUCr) が出版する *Acta Crystallographica* Section B および C である。10年程前から論文投稿にあたっては指定された format でデータを IUCr 事務局にメールで送り、データの不備、相互矛盾、必要なデータの欠如等種々の観点から徹底したチェックが行なわれ、必要な追加修正を要求される。チェックと修正が終わって始めて論文は審査にまわされる。本文も図もメールで送れる。現在他のジャーナルも、例えばアメリカ化学会誌 (JACS) 等のレベルの高いものも、論文投稿にあたってはこの IUCr のチェックシステムにパスすることを条件にしているものが多い。パスしたデータはデータベースに送られ収録される。結晶構造解析の分野はこのように論文出版にコンピュータを援用するだけではなく、データの系統的チェックにより、データの質の向上に努力し、成果を挙げている。

8.2 直接法

1960年ごろになると対称中心のある結晶では直接法の利用が多くなってきた。前に述べたように、対称中心があると、位相は 0° か 180° に限られるが、これは問題を大いに簡単にしてくれる。原子数の少ない結晶では、コンピュータの利用が不自由なときでも、直接法が試みられることがあった。しかしながら、対称中心がない結晶では、難しい問題であり、この方法が有力かどうかさえも大いに疑問であった。ところが、1960年代後半になると、I. Karle (ノーベル賞受賞者 Karle の夫人) が対称中心のない複雑な結晶への応用成功例を数多く報告するようになり、直接法が複雑な分子の対称中心のない結晶にも大いに有効であることが認識されるようになった。

M. Woolfson は直接法の発展に初期から貢献していたが、共同研究者と直接法をコンピュータを駆使して完全自動化することを計画し、自動化に対する多くのバリアを巧みに解決し、著名なプログラムシステム MULTAN を1972年に発表した。(8)式を適用して位相決定を始めるには、まず適当な幾つかの $\phi(H)$ と $\phi(K)$ が必要であるが、彼らはスタートに有効な複数の反射に可能な仮想的な位相の組を与え、全ての組の位相を

求め、そのなかから解に近いものを選び出すという方法を採用した。このプログラムは極めて有力であることが直ちに明らかとなり、世界中で用いられるようになった。とくに、X線結晶構造解析が、それまでは少数の専門家だけが利用できる方法であったのを、より多くの研究者が利用できる[大衆的な]方法にした画期的なものであった。

その後他の研究者も加わって直接法はさらに発展を遂げ、かなり複雑な結晶でもほぼ自動的に解析が成功するようになり、現在に至っている。X線自動回折計が自動解析計に進化できたのはこのソフトウェアを採用することができたからである。I. Karle と Woolfson の直接法発展への貢献も素晴らしく、ノーベル賞受賞者のそれに匹敵すると評価されている。

このように直接法で多くの低分子の位相問題はほぼ解決し、一方ずっと大きいタンパク質等の生体高分子結晶には重原子同型置換法がある。その中間の原子数数百個の結晶では位相問題はまだ困難なものも多い。数は多くはないが、残された問題である。

8.3 結晶化

現在では(超)強力なX線源や高機能の測定機器の開発により、従来は全く解析の対象にできなかったような小さい結晶でも回折データが得られるようになった。結晶の中身(化合物の種類等)により、また構造解析の目的により、必要とする結晶の大きさや外形、あるいは質、などには大きい差がある。分子構造を見る(単結合と二重結合が区別でき、C, N, O 原子が認識できれば良い)だけという解析であれば、 $0.1 \sim 0.3$ mm 角くらいの単結晶で、ルーチンの自動回折計でも充分高い精度の結果が得られる。もっと小さい単結晶でも、例えば 0.01 mm 角程度の結晶でも解析は可能である、ただしルーチンの測定機器では難しく、放射光X線の利用が必要であろう。原子価電子の分布状態を測定する等の精密な解析を目的とする場合は、結晶のサイズ・形に特別な配慮が必要である。

タンパク質結晶は、その体積のほぼ50%が非晶性の水でできている。したがってそれだけX線散乱能が小さいので、精度良いデータを測定するには大きい結晶を必要とする。しかしながら放射光を用いると、ずいぶん小さい結晶でも、迅速に多くのデータを測定することができるようになった。従来のように大きい結晶が必ずしも必要ではなくなったので、結晶化条件の探索時間が大幅に短縮され、タンパク質結晶化の問題

の重要性がやや緩和されたことになる。解析の対象にできるタンパク質の種類が増えたことにもなる。

なお、一時はほとんど顧みられることがなかった粉末写真法が、構造解析にも予期以上に有力であることが分かり、Rietveld 法などの解析方法やソフトウェアが整備開発されてきた。結晶-測定機器の間の距離を大きくし、回折X線を測定機器の受光面で収束させると、良質の回折データが得られるようである。近い将来には、小分子の解析は粉末法で充分可能ということになりそうである。そうなれば、X線結晶構造解析法はずいぶん簡単になり、分光学的方法と同じくらい、手軽なルーチン法として利用されるようになると期待される。単結晶構造解析に必要な大きさの単結晶は得られなくても微小な結晶性粉末が得られる物質は多い。この種の化合物はこれまでは解析の対象にできなかったのであるが、粉末法を用いると構造解析が可能になってきたのである、それだけ研究の対象が広がったことになる。

8.4 X線回折実験

近年のこの分野の発展は目覚ましい。かつてはワイセンベルグカメラ法が主であったが、1970年ごろから所謂4軸型自動回折計(当時はミニコンによる制御)が主流となり、単結晶構造解析のルーチン的方法となった。この自動回折計は構造解析ソフトウェアの発展に伴い、現在は自動解析計に進化してきている。

20年程前から、(超)強力なX線源である放射光(SOR) X線が利用できるようになった。さらに、イメージングプレート(IP)、位置敏感型比例計数管(PSPC)、電荷結合素子(CCD, charge-coupled device)のような高機能の測定機器の開発により実験が、容易に、高速になった。一方放射光X線の平行性がよく、従来より高角度の回折波まで測定でき、より高分解能の解析が可能になってきた。低分子の精密構造解析(電子密度分布の研究など)やタンパク質の解析ではとくに有利な点である。

X線の異常分散効果の利用が解析に有力であるが、以前は実質的にCu $K\alpha$ とMo $K\alpha$ の二つの波長しか利用できなかったもので、その利用は限られていた。ところが、放射光では適当な波長のX線を選択利用できるので、異常分散効果はより広く利用されるようになった。

結晶相反応のトレースも時間分割実験で試みられ、成果が上がるようになった。この目的では一つのセッ

ティングで多くの回折点が観測できるラウエ法(結晶は静止させておくが、連続波長X線を用いるので、回折条件を満足する回折点が一時に多く観測できる)も有効に用いられるようになった。10年くらい前までは構造解析といえば単結晶で単色X線を用いるのが定法であったが、実験環境の大きい改善につれて、一時は全く顧みられなかった粉末法やラウエ法などが改めて有力な方法として復権してきたのである。

放射光X線の実現が、X線結晶学に革命的といえるほど大きいジャンプ台を与えたことが分かる。

8.5 低分子の結晶構造解析

低分子の解析で興味あるトピックスに、小さい基本的な分子あるいは(遷位)金属原子およびイオンの原子価電子分布の研究があり、理論との対比など大きい成果をあげている。共有結合電子対、孤立電子対、d電子分布等に関する多くの情報が報告されている。有意義な成果を挙げるためには高次の反射の回折強度測定(同じく放射光が有効である)、精密な吸収補正を可能にするような結晶の整形および吸収補正の精度、さらにX線消衰効果の補正等の細かい作業が必要である。一方、結晶性を保ったまま固相反応を行なう系も見つけられ、解析研究の対象となり、反応論に資する多くの興味ある情報が得られている。これまでは時間単位の反応に限られていたが、放射光を用いると、より速い反応も対象とできるようになった。

8.6 タンパク質結晶構造解析

ヘモグロビンおよびミオグロビンの解析の後、タンパク質の解析は全世界で始めは1年にひとつくらいのスローペースで基礎的な酵素結晶の研究が行なわれた。しかし、1980年代後半から解析例が等比級数的に増加してきた。既に述べてきたように回折強度測定のハードウェアの発展により、高分解能の精度の高いデータが短時間で測定できるようになったことによる点も勿論大きい。方法論の発展およびソフトウェアの発展も大きく貢献している。位相決定・精密化、フーリエ図解釈とモデル作成、分子置換法[解析するタンパク質が構造既知のタンパク質と同じ(あるいはよく似た)ドメインを含むときに、それを利用して位相決定する方法]、など、構造解析の各ステップのソフトウェアの発展も目覚しく、多くのステップが経験の浅い研究者でも実行できるようになってきている。解析がスピードアップされ、また解析精度の向上も著しい。

放射光X線が利用できるようになるまでは、結晶がX線障害を受けて劣化し、次々と多くの結晶を交換して測定する必要があった。一セットの回折強度の測定に、数個の結晶を消費していたのが、放射光が利用できることで、1個ですむようになり、これは単に結晶の数だけの問題ではなく、多くの誤差の原因が減少し、回折強度の測定精度が著しく向上した。また、放射光の優れた平行性を利用すると、従来より高次の反射強度が測定でき、2~3割も高い分解能の解析ができるようになった。結晶によっては、X線を収束して用いることもある。このようにして信頼性の高い構造が得られるということだけではなく、場合によっては、以前はデータの質・量が不十分なために解析できなかった結晶が解析可能になったというものも多く見られるようになった。ハードの面からの構造解析のスピードアップも著しい。この分野では坂部知平のワイセンベルクカメラの開発による貢献が大きい。

タンパク質結晶の位相決定に用いる多重重原子同型置換法は少なくとも2種の重原子同型置換結晶を必要とする。それも重原子が異なっても単位胞中の同じ位置を占めるものであってはならない。ところがこの同型置換結晶の作成が一般に困難で、通常数ヶ月以上の長期間の作業を必要とし、これが解析への重大な律速段階であった。また多量の結晶-試料を必要とする作業で、微量しか得られないタンパク質では困難な問題であった。しかしながら、重原子同型置換結晶が1個でも、とくに異常分散が利用できる場合はより精度良く、位相決定できることがわかってきた。重原子を含む結晶で、その重原子の異常分散項の大きい波長および小さい波長の(放射光)X線を選択して回折強度が測定でき、実質的に「多重」をバイパスできることがわかった。タンパク質自体が重原子を含む場合は、全く同型置換結晶なしに構造が決定される例も増えてきた。タンパク質結晶の解析では異常分散効果を利用する実験がほとんどルーチンとなり、解析を容易にし、この面でもさらにスピードを大きく向上させた。

貴重なタンパク質で天然からは微量しか得られないような場合は、遺伝子組換えの技術を応用して必要な量を確保する例も多い。また、重原子が含まれていないタンパク質で、例えばメチオニン側鎖の硫黄原子をセレン原子で置換し(セレノメチオニンにする)、その異常分散効果を解析に利用するなどの方法も行なわれている。この場合もタンパク質調整に遺伝子組換えの技術が応用される。

タンパク質結晶の解析で重要な進展の一つに疎水性のタンパク質の結晶化・構造解析、および、(解析するタンパク質の)大きさへの挑戦がある。タンパク質解析の初期は結晶化の容易な親水性の小さいタンパク質が主で、結晶化が難しい疎水性タンパク質は一般に大きいこともあり、あまり試みられなかった。しかし疎水性タンパク質には膜タンパク質等の重要な機能をもつタンパク質が多く、重要な研究対象であった。その結晶化には界面活性剤などが用いられる。この種のタンパク質の解析で著名なものには、光合成反応中心タンパク質複合体(J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michelは共同でノーベル化学賞受賞)、チトクロムc酸化酵素(月原富武ら、分子量50万に近い巨大な複合体タンパク質)などがある。

タンパク質結晶構造解析であと一つ興味あるテーマは酵素反応のトレースである。結晶は多くの溶媒を含むので、その相を通じて基質が活性中心へ移動し、結合し、生成物が活性中心から離れていく様子をトレースできる可能性がある。この趣旨の研究も実際に放射光を用いてスタートしている。酵素反応の研究と応用に大きい成果を与えることが期待される。

タンパク質結晶学の環境は10数年前から一変してしまった。解析の、高速化、高精度化、自動化に向かって急速に進歩している。より大きいタンパク質、より大きい高次構造体(例、リボソーム)等の解析、結晶内での酵素反応のトレース等も進行中である。

8.7 結晶解析とデータベース

結晶構造解析の分野は、物質の基礎的な貴重なデータの集積が多く、コンピュータの利用が早かっただけに他の分野に先駆けてデータベース化が計画された。主なものはCSD (Cambridge Structure Database), PDB (Protein Data Bank), ICSD (Inorganic Crystal Structure Database), CRYSTMET (Metal Crystallographic Database) 等がある。CSDは既に1965年にCambridge Crystallographic Data Centerでスタートしている。有機化合物(有機金属化合物を含む)の結晶構造データを収集している。書誌情報および立体構造数値データを含み、最もよく知られ、よく利用されているデータベースである。利用のためのユーティリティ・ソフトも便利なものが多く開発され、利用に供されている。「8.1 結晶解析とコンピュータ」で述べたデータチェックにパスしたデータはこのデータベースに収容される。現在10万を超える結晶のデー

タが収録されている。グラフィックス画面による検索も可能である。PDB は Brookhaven National Laboratory で1977年にスタートした。タンパク質のほかに、DNA, RNA, ウイルス, 糖類の構造が登録されている。生体高分子構造の論文発表に際しては、ほとんどの学術雑誌がデータの PDB への登録を義務付けている。登録に際してはやはりチェックが行なわれ、質の向上が図られている。便利な各種ユーティリティ・ソフトも多く開発され、利用されている。国内では阪大にコピーが置かれていて、それを利用できる。現在 (2001年10月) 16,358件のデータが収録されている。タンパク質結晶学者だけではなく、その周辺分野および応用分野からの商用利用も多い。

9. おわりに

結晶構造解析は、つい20年程前までは専門研究者だけの分野であった。しかし現在すでに、低分子、タンパク質を問わず、構造解析を研究手段としている研究者の内訳は、専門研究者よりは、他分野から自己の研究対象の構造研究手段として用いている研究者の方が多くなっていると考えられる。物性研究, 化学, 生物学, 医学, 薬学, 鉱物学, 金属学等の物質を扱う学問および技術分野で結晶構造解析法の重要性はますます増すことになる。結晶構造解析はこれからがいよいよ活躍の本番といえよう。

最後に、ここでは紹介できなかったこの分野でのノーベル賞受賞者を記しておく、G. Natta (新しい触媒を用いた立体規則性高分子の重合法開発と基礎的研究, 立体規則性高分子の構造決定); O. Hassel (分子の立体配座の概念の導入と解析); W. Lipscomb (ボランの構造に関する研究, 酵素の結晶構造解析); A. Klug (結晶学的電子分光法の開発と核酸・タンパク質複合体の立体構造の解明)。

参考文献

1. *Fifty Years of X-ray Diffraction*, P.P. Ewald ed., Oosthoek's (1960).
2. 日本の結晶学 - その歴史的展望 -, 日本結晶学会, (1989).