

## 蛋白質結晶学取り組んだ最初の頃

月原 富武 (つきはら とみたけ)

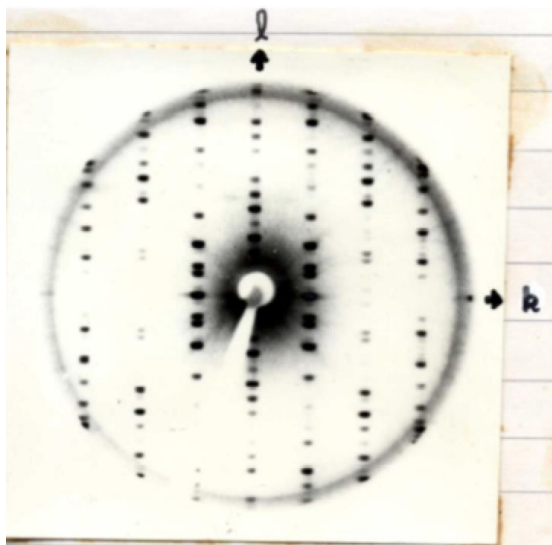
私は大阪大学薬学部でX線結晶構造解析の手ほどきを受けた後、1968年に理学研究科に進学して蛋白質研究所で蛋白質結晶学の研究を始めた。その頃、ヘモグロビン、ミオグロビンに続いてリゾチームが酵素蛋白質として初めて構造決定され、蛋白質結晶学が英国から世界に広がって行った。我が国では1960年代前半に、笹田義夫先生（阪大蛋白研、後に東工大）が英国MRCのM. F. Perutzの所で仕事をされた。帰国後、実験化学講座続8巻（1965年）に結晶化から回折実験、位相決定まで蛋白質結晶学の全容を書かれた(1)。この総説は、黎明期の蛋白質結晶学について詳しく述べられており、蛋白質結晶構造解析の理解が一層深まる内容が随所にあり、今でも推奨したい論文である。1960年代後半には、蛋白質研究所がチトクロームc、名古屋大学の坂部知平先生のグループがインスリンのX線結晶構造解析を軌道に乗せようとしていた。当時は、あらゆることを自分たちで構築しなければならない時代であった。そうした時代から1980年初頭まで、私自身が経験した今では考えられない蛋白質結晶学について、役に立つことがあることを願って述べてみよう。

### チトクロームcの結晶化

1960年代後半、蛋白質研究所では高野常広先生を中心に18リットル缶一杯のカツオの心臓からチトクロームcを10グラム以上精製し、15mlの試験管を使って硫酸塩析法で結晶化していた。細かく砕いた硫酸粉末を少しずつ加えながら蛋白質の沈殿の出方と氷上で冷やした時の沈殿の消え方を見て飽和度を推し量り、適当なところで室温に静置する。数日経つとゲル化して不透明になり、試験管を逆さにしてもこぼれない状態になる。ゲルの中から小さな核が出来てゆっくり大きくなる。大きくなるにつれて結晶の周囲が徐々に透明性を増す。結晶が十分大きく成長した時点で試験管の壁を軽く叩くと、液中に浮いていた結晶が試験管の底に落下し結晶成長が止まる。（この結晶化の過程は録画されており、高野先生にお願いしてどこかで見ることができるようになっていたと思う。）こうして大量の結晶を準備することができて、重原子誘導体の調製や回折強度測定を存分に行う準備ができた。いずれも試行錯誤によって方法を確立しなければならなかったもので、今では考えられないくらいの多くの結晶が必要であった。

### 回折強度データ収集

1960初頭までは、蛋白質結晶の回折データ収集はプレセッション写真法が一般的であった（第1図）。この方法では逆格子の形がそのまま現れるので、直ちに指数付けを行うことができる利点があるが、撮影に時間を要して強度の読み取り精度も高くなかった。徐々に線形回折計など正確に強度を測定できるカウンターによる回折データ収集も行われるようになった。蛋白質研究所でもゼネラルエレクトリック（GE）社の3軸型手動回折計があつて、1斑点ごとに結晶の方位とカウンターの位置を変えて強度を測定した。しかし、それではチトクロームcの高分解能のデータ収集を行うのは困難であり、植木龍夫先生を中心に4軸型自動回折計(AFC)を理学電気と共同で開発した。その後、このAFCは長く分子量数万以下の小さい蛋白質結晶の回折データ収集を実験室で行うために使用された。

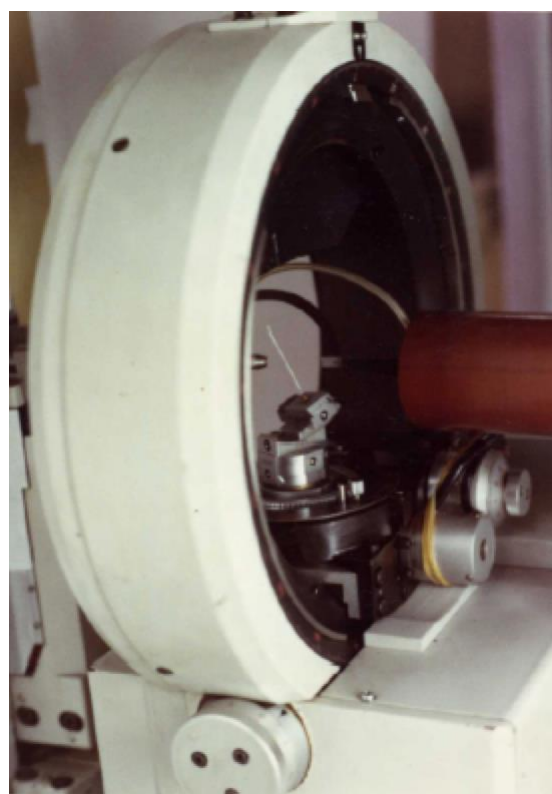


第1図 プレセッション写真 後述するスピルリナのフェレドキシンのプレセッション写真。斑点の並びに沿って指数をつけることができる。この写真を撮るためには結晶の軸をX線に対して特定の方向に向けなければならない。そのために何度も回折像を撮影して軸の方向を調整する。さらに撮影にあたっては目的の反射以外を除くために、フィルムの前面の特定の位置にスクリーンを入れる。

結晶全体にX線を照射するか、結晶の一部に当てるかということも問題になった。どの方位でも結晶全体からの回折が得られる前者の完浴法を採用した。回折強度の相対値が方位によって影響を受けることを少なくするためである。今でも中性子回折はこの方法を採用している。X線は最も強い強度が得られる波長  $1.54 \text{ \AA}$  の  $\text{CuK}\alpha$  線を使用した。しかし、この波長では、回折強度が結晶や結晶を封入しているガラスキャピラリーによる吸収の影響を強く受けるので、測定後吸収補正をしなければならない。そのために任意の方位での回折ではなく特定の結晶軸を回折計の  $\phi$  軸（結晶の回転軸）に一致させなければならなかった（第2図）。チトクロム c はアミノ酸残基数が 103 の小さい蛋白質であり、最大の格子定数も  $100 \text{ \AA}$  に満たないのであったが、a, b, c どの軸でも  $\phi$  軸に合わせて良いわけではなかった。長い軸を  $\phi$  軸に合わせると特定の方位で2つの反射が同時にカウンターに入る重なりの問題が生じた。完浴法を採用するためにビームサイズを大きくしたためである。そのた

め、最も短い c 軸を  $\phi$  軸に合わせて反射の重なりを回避した。現在は  $\phi$  軸を振動させる振動法で、結晶の一部分にX線を照射して回折データ収集が行われている。吸収の大きさは  $\phi$  の値に最も強く依存する。また、振動幅も小さいので同じイメージ内の反射はほぼ同じ  $\phi$  であると見做せて、イメージ間のスケーリングの際に実質的に吸収補正も行われているので、こうした幾何学を考慮する必要はない。ただ、格子が  $1000 \text{ \AA}$  近い場合には斑点の重なりを避けるために、こうした幾何学を考慮することは有用である。

反射強度を計数する方法にはピーク値を強度とする方法、特定の角度範囲を走査して積分値を採用する方法がある。GE社の3軸型回折計を用いて手で測定していた時はピーク値を採用していた



第2図 4軸回折計にキャピラリーに封入した結晶をセットしている。大きな白い円形の部分をXサークルと呼ぶ。キャピラリーの左側に少しだけ見えているのがゴリメーターの先端で、ここからX線が出てくる。キャピラリーを乗せているのがオメーターヘッドという部分で、2つのアークがあってキャピラリーの傾きを変えることができる。そうすることによって結晶の軸をX線に対して特定の方向に合わせることができる。

が、AFC ではより正確な強度を見積もることができる積分法を採用した。走査方法では $\omega$ 軸と $2\theta$ 軸を連動して走査する $\omega/2\theta$ 走査法と、 $2\theta$ を固定して $\omega$ 軸を走査する $\omega$ 走査法が検討された。重原子誘導体ではモザイク幅が大きくなり、 $\omega/2\theta$ 走査法では反射の重なりの問題が深刻になる。(回折計の幾何学等及びモザイクの詳細は注釈を参照してください。)そこで、モザイク幅が変化しても正しい強度が得られる $\omega$ 走査法を採用した。現在の振動法でのイメージ間で強度を足し合わせる方法は3次元の積分が行われており、理想的な積分法である。ただ、ピーク値だけでも結構まともな強度測定になっていたことは、現在取り組んでいるX線自由電子レーザー(XFEL)による静止法による回折強度データ収集法の開発の際にも念頭に入れている。

プロトタイプのAFCは紙テープ制御であった。結晶を回折計に乗せて方位を調整して格子定数等を決める。それらをコンピュータに入力して任意の反射の4軸の設定角を計算し、その値を紙テープに出力した。紙テープを回折計側で読み込ませて4軸角を設定し強度を測定した。後にコンピュータから直接回折計を制御するようになり随分楽に測定できるようになった。その後、このAFCは急速に普及して低分子用に利用者を拡大した。しかし、原理的に0次元の計数装置であり、蛋白質の分子量が大きくなるにつれて測定効率が低下する弱点が深刻になる。そのため、大きな蛋白質では振動写真法が主流になった。

## 構造解析プログラム

重原子同型置換法の原理は確立されていたが、位相の確率分布を求める際の誤差の取り扱い、重原子パラメータの精密化の際の反射データごとの重みなど未確立であり、個々の蛋白質で検討しなければならぬことが多くあった。こうしたことを検討しながら位相決定のためのプログラム開発が、芦田玉一先生を中心にして行われた。毎週の雑誌会は殆どが位相決定法に関する原論文の紹介であった。当時、大阪大学では豊中に大型計算機センターがあり、研究所のあった中之島からは学内便でプログラムとデータがセットになったカードを

送ると、1~2日後に計算結果が返ってきた。大型といえども、今日感覚では主メモリーも恐ろしく小さく、計算速度も遅いものであった。そのために電子密度計算も任意の間隔でなく特定の間隔に限定して行った。三角関数は計算機に組み込まれている関数を使うと時間がかかるので、前もってテーブルを作っておいてそのテーブルから引き出した。より一般性のあるプログラムシステムの構築も視野にあったと思うが、何よりもチトクロムcの構造解析を早く成功させることが優先された。等高線を作図するプロッターではなく、電子密度値を印字したものをもとに手で描いた。こうして作成した等高線に基づいて阪口健一技官に協力してもらって作った2つの木のモデル蛋白質研究所の玄関にある(第3図)。一つは6Å分解能でもう一つは4Å分解能のモデルである。6Å分解能のモデルでは、計算間隔を適切な値に選択できなかったために水平方向と垂直方向での縮尺にずれがあり、少し縦長になっている。4Å分解能の時にはほぼ一致させる計算が可能になり、正確なモデルになっている。

## 重原子誘導体

蛋白質研究所での大学院時代に、揺籃期の蛋白質結晶学をじっくり学ぶことができた。チトクロムcの構造解析で私が最も貢献できたと自負しているのは、 $K_3UO_2F_5$  修飾が良好な重原子誘導体となることを見つけたことである。当時、重原子誘導体としては $K_2PtCl_4$ が見つかったが、Ptそのものの電子密度に異方性が高くて良質の重原子誘導体結晶ではなかった。これはよくあることで、PtがMetのSの2つの孤立電子対に50%ずつの確率で入るためである。私はフローセルという装置を作って重原子誘導体を検索した。その装置のキャピラリーに結晶をいれて外から重原子試薬溶液を流し込みながら、回折像の変化を調べた。重原子を流すことによって変化の可能性があるかと判断すると、5Å分解能のデータを収集し、ネイティブ結晶との差のパターソン関数を計算した。チトクロムcの結晶は溶媒含量が40%に満たない隙間の少ない結晶である。それでも3分以内に外の溶媒が内部

に浸み込む。この結晶では  $10\text{\AA}$  より低い分解能の斑点の強度は溶媒領域の電子密度の変化と共に変化するので、 $10\text{\AA}$  より低角側の反射強度の変化で溶媒が置換される様子を観測できた。修士課程2年の時、重原子検索実験を毎日繰り返していたが、回折強度変化があっても低分解能側だけとか、同型性が崩れるなどで、良好な重原子誘導体を見つけることができないまま12月末になった。小さい蛋白質は隙間が小さいために良好な重原子誘導体を作るのが難しいことが多いのである。初期の蛋白質構造解析では、できるだけ小さい分子量の蛋白質が研究対象にされたこともあって、いづこも重原子誘導体調製に苦労することが多かった。

修士論文のためのデータを得るために、冬休みを返上して重原子誘導体検索を行っていた。大晦日に  $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$  誘導体がこれまでにない良さそうな回折プロフィールを示した。急遽、GE社の3軸

手動回折計で回折データを収集するための設定角を計算しようとしたが、休み中で建物が冷え切って部屋の温度が低くて計算機が起動しなかった。計算機室にガストーブを持ち込んで数時間かけて  $20^\circ\text{C}$  以上にして、やっとの思いで計算機を起動した。設定角を計算して、100反射弱の2次元(0kl)の  $5\text{\AA}$  分解能の反射強度を測定し、ネイティブ結晶との差のパターソン関数を計算した。等高線を引いて確かに特定の位置に重原子が入っていることを確認できた時には、とくに元日の朝になっていた。この上ない喜びに浸った元日であったことは、今でも鮮明に覚えている。修士論文は、 $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$  誘導体を見つけたという内容だけで書いた。その後  $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$  は私にとってはマジック試薬で、フェレドキシン、ウイルス(SBMV)等使った結晶で100%成功している。しかし、その後ウランが核燃料物質であることから使用しなくなった。



第3図 チトクロムcの木製モデル カツオの心臓の還元型チトクロムcのモデルであり、左側は  $4\text{\AA}$  分解能、右側は  $6\text{\AA}$  分解能の電子密度に基づいて作成した。  $4\text{\AA}$  分解能のモデルで赤く塗っている部分はヘムである。赤色と黄色の球はそれぞれ導入した重原子Pt, Uの位置を示している。両者で見る方向が少し違っている。そのために  $4\text{\AA}$  分解能のモデルではPtが隠れている。



現在は SeMet 置換が普及して重原子試薬を浸漬させる重原子同型置換法は余り使われていない。扱う蛋白質が大きくなるほど重原子誘導体を調製するのは容易であることが忘れられている。SeMet 蛋白質の大量発現に苦勞している話を聞いたときに、なぜ重原子誘導体を調製しないかと思うことが多い。

## 鳥取大学

1970 年代初頭、鳥取大学には勝部幸輝先生がおられて天然物の X 線解析を行っておられた。その助手にならないかと角戸正夫先生から話があった。よく考えて蛋白質の X 線結晶構造解析をやっけて良いというお話を頂いたので決心し、博士課程を2年で中退して 1971 年 1 月に鳥取大学工学部に助手として就職した。任期のないポジションであり、これでじっくり蛋白質結晶学の研究をして一生食べていけると思い大変嬉しかった。しかし、1971 年当時研究条件は殆ど整っておらず、周囲の先輩もどなたも私が蛋白質の研究を鳥取で行うことが出来るとは考えておられなかった。

鳥取大学に就職する時に、当時阪大理学部にいた吉川信也さんに、チトクロム c の相手であるチトクロム酸化酵素の構造解析をやりたいと相談した。それがどんなに難しいことか十分に理解していたわけではない。ただ、大学院時代に蛋白研の生理機能部門の談話室で友達とお茶（お酒だったかも）を飲んでいた時に、佐藤了先生が「これからは膜蛋白質、蛋白質間相互作用だ」と2つのキーワードをあげられたことがいつも頭にあった。1962 年に米国ジョンソン研の米谷隆先生が結晶の写真を報告されているが、回折像は撮っておられず、吉川さんの所でもまだ精製法が確立されていなかった。結晶化に取り組むにはまだ早いので待っておれ、しばらくは別のことをやるようにということで、阪大理学部の松原央先生と神戸山手女子短大の新勝光先生を紹介して貰った。そこで、フェレドキシン(Fd)-フェレドキシン還元酵素(FNR)複合体の X 線結晶構造解析をすることにした。最初は冷室も遠心機も無い状態であったが、クロマト用の低温チャンバーは機械工場の指導のもと自分達で作り、

遠心機は農学部の設備を借りた。生物学的に重要な結晶を作れば何とかなるだろうと楽天的に取り組んだ。Fd-FNR 複合体の調製は新先生に鳥取まで指導に来て頂いてホーレンソウを用いて行った。数年間学生と一緒に試行錯誤したが、結晶を選ぶに到らなかった。

そうしているときに松原先生からスピルリナの 2 鉄フェレドキシンの結晶が出来たので見に来いという連絡があり、早速阪大に行って当時大学院生の長谷俊治先生が作った結晶を頂いて帰った。タイミング良く勝部先生がプレセッションカメラを科研費で購入されたので、空間群決定など予備実験は十分行うことが出来た。回折強度データ収集は蛋白研の安岡則武先生に便宜をはかって頂いて、AFC で収集した。当初、回折強度は紙テープにも出されたが、そのまま鳥取大学では読むことができなかつたので、紙に印字されたものを鳥取に持って帰り、紙テープに打ち込んだ。位相決定用のコンピュータは TOSBAC-3400 という主メモリーが 8K words (1 word = 64 bits) のテープコントロールのものが1台、鳥取大学共通の設備としてあった。今では誰も想像できないでしょうが、そろばんで計算していたことを考えれば不可能なわけではなく、上手にプログラムを書いて  $K_3UO_2F_5$  誘導体によって異常散乱を利用した単一重原子同型置換法で位相決定を行った。研究の殆どの時間は計算プログラム書きに費やしていた。このコンピュータは共通設備で、運用はオペレータの勤務時間中に限られていて仕事はかどらなかつた。しかし、大口ユーザーであったことで、特別に夜間使用を許可してもらって、[2 鉄 2 硫黄]フェレドキシンの活性中心の構造を決定することができた。これを論文にし (2)、構造解析に見通しを付けた。当時鳥取大学では勝部教授、月原講師、福山恵一助手の体制であった。天然物化合物の研究が中心であった勝部先生と福山先生もフェレドキシンの仕事をしてくれるというので、思い切って2年間米国パデュー大学に留学した。その間、福山先生を中心にした緻密な構造解析によって 2.8 Å 分解能の構造を得て、Nature 誌(1980 年)に掲載された (3)。

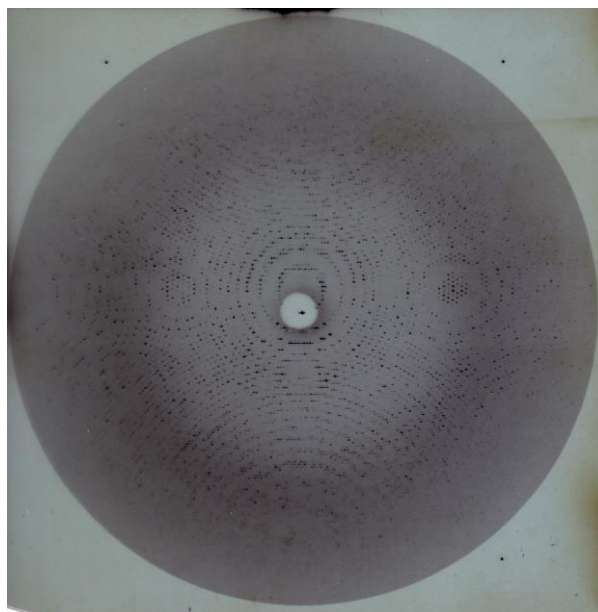
## パデュー大学

フェレドキシンの構造解析である程度自信がついた頃、チトクロム c 酸化酵素はフェレドキシンよりも1桁以上大きいので、より大きな蛋白質複合体の構造解析を行う能力を養う必要性を痛感していた。田中信夫先生の紹介でパデュー大学の M. G. Rossmann 教授のところへウイルスの構造解析を行うことにした (1978-1980 年)。そこで最初に意外であったのは回折データ収集が古典的な写真法であったことである。しかし、分子量がフェレドキシンの百倍を超える巨大なウイルスでは、反射数は分子量に比例するので1斑点ずつ正確に測定するカウンター法では対応できないことは一目瞭然であった (第4図)。パデューでもっとも嬉しかったのは、義務から完全に解放されて24時間研究のことだけであったこと、お金の心配をしなくて良いことであった。

Rossmann 教授の所では T=3 ウイルスである SBMV の  $3.5\text{\AA}$  分解能構造決定が不成功で、もう一つ重原子誘導体を探し、 $2.8\text{\AA}$  分解能の構造解析を行う方針を立てたところであった。当時、重原子誘導体検索には撮影に時間が掛かるプレセッション写真法が適用されていて、1イメージの撮影に数日要していた。それを正確に配向させた振動写真法で1日以内に行うことを提案したが、「きけない、しゃべれない奴が何を言っているのだ」と言う雰囲気でも誰にも相手にされなかった。しかし、その方法で K3UO2F5 誘導体を作り、良い誘導体の可能性があることを実際に示した頃から信用してくれ始めて、仕事が随分やりやすくなった。とは言ってもこの誘導体が実際に使えるかどうかはフルセットのデータを収集しなければならない。それには、通常1年以上かかる。常温で回折実験を行うために1個の結晶で1照射すれば結晶は劣化する。

(凍結結晶で回折実験が最初に行われたのは1990年代半ばにリボソームに適用されたのが最初である。) 振動幅 0.5 度、全部で最低 90 度分、180 枚測定しなければならない。1照射毎に結晶

を取り替え、前の結晶に対して正確に次の角度領域になるように結晶の配向を合わせなくてはならない。この結晶の方位調整に1日、1枚の写真撮影に1日かけて、2日で1枚取るのが優秀なポストドクの仕事であった。これでは留学期間中に仕事が終わらない。そこで3枚の静止写真で、現像時間も入れて4時間で精密に結晶の方位を調整し、20



第4図 Southern Bean Mosaic Virus の  $2.8\text{\AA}$  分解能の振動写真。回転対陰極発生装置に2枚の全反射ミラーを装着して焦点を絞ったX線を用いて20時間照射、 $0.6^\circ$  振動で撮影している。チトクロム c やフェレドキシンの回折像を見慣れていたのが最初にこの写真を撮ったときは、それなりのカルチャーショックを覚えた。しかし、チトクロム c やフェレドキシンの回折像撮影の際に苦労した軸たては、ウイルスでは斑点が密にあるために容易であることにすぐ気がつき、写真法によるデータ収集は以外と難しくなかった。

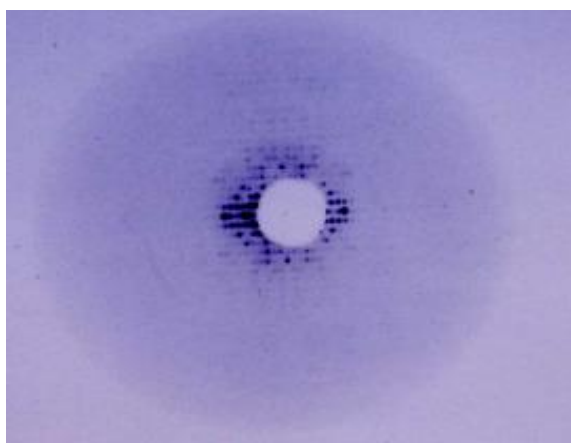
時間で1枚の振動写真を撮る計画を立てて、実行した。この辺は日本で結晶学の経験を積んでいたもので自信があった。1週間に6枚、 $3.0$  度分撮った。全く無駄がなければ30週で実験が完了することになる。実際には撮り直しや  $0.5$  度振動の他に低分解能用の  $1.0$  度振動のデータも収集したので、1年近くかかった。私が撮影した回折像は、ポストドク仲間では今は回折像の処理プログラムの作成者としても著名な Andrew G. W. Leslie が毎日1枚ずつ処理して、回折像の状況を知らせてくれた。

2.8Å分解能のデータ収集が完了し、重原子同型置換法による位相決定はボスが担当した。次はウイルスの対称性を利用した平均法による電子密度の精密化である。それを私が担当したが、2.8Å分解能になりコンピュータ容量の限界を超えて、それまで使っていた3.5Å分解能用のプログラムでは実行不可能であった。3.5Å分解能用のプログラムを作成し、Assistant Professor になって独立していた Jack Jhonson と議論した結果、プログラムを修正して直径約 30cm の大きさの磁気テープを10数本使えば可能であることが判った。プログラムを根本的に作り替えて臨むか、プログラム修正で10数本のテープの交換という労力によって対処するかを選択であったが、躊躇せず労力によって解決する道を選択した。約200メートル離れた計算機センターに磁気テープ10数本を1日1サイクルの計算を行う度に運ぶのである。私にとって最も大きな問題は、計算の時に計算センターのアルバイトの担当者が磁気テープの順番を間違えずに掛けるという厄介な仕事をしてくれるかどうかということであった。この件については、センターの最大の利用者である Rossmann が直接センターに掛け合ってくれて、センターが特段の配慮をして実施してくれることになった。こういう不細工な戦術をとる私の考え方は Rossmann の考え方とは必ずしも一致しなかったが、理解してくれた。しかし、今振り返ってみると、なんとかモデル作成はできる程度に電子密度は改善されていたが、平均法による精密化が十分収束するだけのサイクル数は行えていなかった。その後の高速化されたコンピュータによる計算では、完全に収束させるには数100サイクルは必要であることが判った。しかし、当時のコンピュータの性能では無理であった。今日ではコンピュータの進歩があつて、膨大な繰り返し計算を行うことが可能になり、ウイルスでは重原子誘導体を用意しなくても平均法のみによって構造決定が可能になっている。2.8Åの構造解析を Nature 誌(5)に掲載されるめどが立って2年間の留学期間を終えた。2年間で日本にいる時の10年分の仕事をした感じであった。また、10年を超える研究の集大成の時期にチームに加

わることができ、優れた研究者仲間と一緒に研究が出来たことは何よりの幸運であった。いかなる巨大な蛋白質の結晶構造解析を行う自信もついた。

## チトクロム c 酸化酵素

パデュー大学に留学することになった頃チトクロム c 酸化酵素は、吉川さんが甲南大学理学部で反応機構の研究を続けると共に精製法の改善に取り組んでいた。鳥取大学で FNR やフェレドキシンと一緒にやっていた小川恵三さん（阪大薬学部の博士課程）にも協力して貰って、吉川さんの所で結晶化も始めた。小川さんが何回か結晶らしいものの回折像を撮ろうとしたが成功しなかった。1980年2月に帰国して、その春甲南大学の冷室でキラキラした輝きを見たときの感動は今でも鮮明である。顕微鏡下で結晶であることを確認できたが、濃縮法による塩溶領域（塩析とは異なり塩濃度の低いところ）での結晶化であるために、微妙な条件の変動によっても結晶が溶けてしまった。回折像を撮るのにも随分苦労した。吉川さんや甲南大学の学生さんがバスで鳥取まで結晶を運んで来て、実験室のプレセッションカメラで回折像の撮影を試みた。最初は結晶をキャピラリーの中に入れることもなかなか出来なかった。鳥取まで運んでいる途中で結晶が消えることも何度かあった。徐々に結晶の取り扱い方に習熟して、何とか空間群を決



第5図 ウシ心筋のチトクロム c 酸化酵素結晶のプレセッション写真。最高 10 Å の斑点が見える。塩溶領域での結晶化されており壊れやすい結晶であったが、良質の蛋白質を精製できている証拠となった。

めることが出来る回折像を撮影できたのは 1983 年であった (第 5 図)。その後、1993 年の末に 2.8 Å 分解の回折像を得て約 1 年かけて構造決定を行った。1995 年に活性中心構造(5)、1996 年に全構造(6)、1998 年に H-パンプトンポンプ機構(7)について報告した。その後、反応中間体や高分解能の構造解析、部位特異的変異体の機能解析等によって H-パンプ説の正当性を示してきた。現在は、新しい X 線自由電子レーザー (XFEL) によって高速時分割 X 線結晶構造解析によって、酸素還元・プロトンポンプ機構の全容の解明を行っている(8)。後になれば、随分無駄なことをして時間がかかってしまったことが多くあり、反省することが多い。しかし、新しいことに挑む際には無駄も覚悟で取り組むことも必要ではないでしょうか。

## あとがき

1980 年代前半まで、私に限らず我が国で蛋白質の X 線結晶構造解析を行っていた研究者は誰も計算プログラム作りに没頭していた。しかし、構造解析ソフト開発のエキスパートを生み出すことはなかった。この原因の一つは、構造解析結果は高く評価されるが、方法の開発者が評価される機会が少なく、方法の開発に没頭していると昇進の機会が少ないことであった。もう一つは積極的な異分野 (特に計算科学) との連携が弱く広くユーザーに使われる普遍性のあるプログラムを作りきれなかったことにある。(低分子結晶構造解析では優れたプログラム体系が作られた。) これらは今日でも克服されていない弱点である。XFEL や中性子、電子顕微鏡などによる構造研究の新しい展開が期待される今日、我が国においても回折データ処理及び構造解析のソフトウェア開発を一層推進させる必要性を痛感している。

### 注釈 4 軸回折計とモザイク幅

4 軸回折計はこのシリーズの福山恵一先生の文章の第 1 図にある。結晶による回折斑点が生じるためには結晶を X 線に対して特定の方向に向けなくてはならない。向きを変える操作としてよく使われるのがオイラー角 ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) である。4 軸回折計

はこのオイラー角を採用し( $\alpha, \beta, \gamma$ )に対応する角を ( $\omega, \chi, \phi$ )としている。4 軸角の残りの  $2\theta$  はカウンターの位置を決める角である。回折が生じる中心の位置では  $\omega = \theta$  となるので、3 軸回折計では  $\omega$  軸と  $2\theta$  軸は常時 1:2 になって連動して動くようになっている。

$\omega/2\theta$  走査では  $\omega$  軸と  $2\theta$  軸を連動して走査する。逆格子原点と逆格子点を結ぶ線に沿ったプロファイルが得られる。例えば(h00), (0k0), (00l), (nh nk nl)などのプロファイルがチャートに現れるので重原子誘導体検索に便利であった。

$\omega$  走査ではカウンターの位置  $2\theta$  を固定して  $\omega$  軸を走査する。これは逆格子原点と逆格子点を結ぶ線分を半径とする円弧に沿ったプロファイルが得られる。構造解析の対象にしている結晶は完全な一つの結晶ではなくて、ほんの少し向きが違う小さな結晶の集まりであり、モザイク結晶と呼び、向きの違いの大きさをモザイク幅と呼ぶ。 $\omega$  走査法ではこのモザイク幅の大きさが直接プロファイルに現れる。蛋白質の結晶ではその大きさは 100 分の数度から 1 度を超えるものもある。モザイク幅が小さいほど良い結晶である。

## 文献

- (1) 笹田義夫、角戸正夫、実験化学講座(続) 8 巻、450-506 (1996).
- (2) T. Tsukihara *et al.*, *J. Biochem.*, **84**, 1645-1647 (1978).
- (3) K. Fukuyam *et al.*, *Nature*, **286**, 522-524 (1980).
- (4) C. Abad-Zapatero *et al.*, *Nature*, **286**, 33-39 (1980)..
- (5) T. Tsukihara *et al.*, *Science*, **269**, 1069-1074 (1995).
- (6) T. Tsukihara *et al.*, *Science*, **272**, 1136-1144 (1996).
- (7) S. Yoshikawa *et al.*, *Science*, **280**, 1723-1729 (1998).
- (8) K. Hirata *et al.*, *Nature Methods*, **11**, 734-736 (2014).



月原富武先生ご略歴

- 1967年3月 大阪大学薬学部製薬化学科卒業  
1969年3月 大阪大学大学院理学研究科高分子学専攻  
終了  
1969年4月～1970年12月 同上博士課程に在学  
1971年1月～1973年1月 鳥取大学工学部工業  
化学科助手  
1973年2月～1978年3月 鳥取大学工学部工業  
化学科講師  
1978年4月～1991年3月 鳥取大学工学部工業  
化学科助教授  
(1978年2月～1980年2月 パデュー大学ロスマン  
教授の元で在外研究)  
1991年4月～1995年3月 徳島大学工学部生物  
工学科教授  
1995年4月～2008年3月 大阪大学蛋白質研究所  
教授  
2008年4月～現在 兵庫県立大学大学院生命理学  
研究科 特任教授  
大阪大学蛋白質研究所 客員教授

