50年前の学生が見た蛋白質結晶学発展の歴史

北海道大学名誉教授 田中 勲

Isao TANAKA: The History of Protein Crystallography Witnessed by a Student 50 Years Ago

Protein crystallography is a field of science that has significantly developed in the last half-century. However, its amazing development has not been straightforward and has gone through many trials and errors. In this paper, we recall historical fragments of protein crystallography in the last half-century that are thought to be important for the author and are likely to be buried in its spectacular history.

1. はじめに

結晶学会から70周年記念特集号の「歴史編」として結晶学の発展を振り返る原稿を依頼されたとき、「少し古い時代の歴史なら」と断わった後に執筆させていただくことにした。本稿は、50年前に学生だった私たちの世代が見た、蛋白質結晶学の類いまれな発展の歴史の断片である。50年は蛋白質結晶学をすっかり変えてしまうほど十分長い年月だった。今日この分野に入ってきた学生にとっては、この高度に発達した蛋白質結晶学の状態があたりまえのスタート点となるわけである。その学生がこれからの半世紀を科学者として過ごすときに、これまでの半世紀の出来事が役に立つかどうかはわからない。似たような出来事は起こらないだろう。それでも「何らかの参考になれば」と思いながら作業を進めた。誌面が制限されている中での作業である。当然ながら、私の主観がおおいに入っていることを最初にお断りしておく。

2. 50年前の大学の研究室

今となっては、自分がなぜこの分野に進むことを決めたのか漠然とした記憶しかない。1970年代のはじめ、大阪大学理学部化学科で4年生になる頃、いわゆる講座配属ということで、どこかの研究室を選ぶ必要に迫られた。研究室配属のための講座訪問の1つとして蛋白質研究所の角戸正夫先生の研究室を訪れ、日本で最初の蛋白質立体構造解析を目指しているという先生の説明の、おそらくは「日本で最初の」というところに魅かれたのだと思う。特に将来に対する展望や計算があったわけではない。もちろん、この分野がその後大発展を遂げるとは想像もしなかった。いつかは自分も1つの蛋白質の立体構造を決めたいという思いだけは間違いなくあった。

角戸研究室には、当時の最先端の装置、4軸自動回折計があった。紙テープに刻まれたプログラムを読み込め

ば、自動的に回折の起こる角度を計算し、装置をその位置に持って行って、回折強度を計測してプリントアウトするという、現在なら何の変哲もない装置だが、はじめて見るその自動装置にとっても感動した。国内初の蛋白質構造解析を目指している角戸研究室は、大型計算機センターの最大のユーザーグループの1つでもあった。しかし、その計算機を使うためには、1枚のカードに1行のFortranプログラムをパンチしたカードの束を、同じようにカードにパンチしたデータの束とともに、大きな箱に詰めて計算機センターに持って行く必要があった。蛋白研があった大阪中の島から豊中の計算機センターにカードを送って、その結果が帰ってくるまで約1週間。プログラミングエラーで返ってきたら1週間が無駄になるので、皆、非常に気を遣った。

そんな時代、乏しい知識を駆使して解析のためのプログラムを作ること、あるいは4軸回折計をコントロールするプログラムを密かに解読することなど、学生の私にとっては至福の時間だった。修士論文を手書きで仕上げるのはずいぶん大変だったが、パソコンが使える現代の学生を羨ましく思う反面、考える時間も遊ぶ時間もたっぷりあった当時の状態を懐かしく思う。

3. 50年前の蛋白質結晶学

当時、立体構造が解明されていた蛋白質は、ヘモグロビン、ミオグロビン、リゾチームなど数える程しかなかった。大量発現系などない時代、当然、自然界に大量に存在する蛋白質のみが研究対象となりえた。蛋白質研究所では、かつおのチトクロームCの解析が進められていた。

蛋白質結晶学は、多くのサイエンスの中でも、この半世紀で特に著しく発展した分野であると言えるだろう。解析される蛋白質の数は指数関数的に増加していった。したがって解析された蛋白質の数を年ごとにプロット

すれば、80年代より前に解析された蛋白質の数は、ほとんどゼロに等しいような状態になってしまう。実際、70年代には、蛋白質構造解析の論文は、*J. Mol. Biol.* のような生化学雑誌の中に、ほかの多くの論文に混ざって、ごくたまに見られる程度だった。一般の生化学者にとっては、蛋白質の構造解析は進捗があまりに遅すぎて、共同研究を始めるのを躊躇するような科学だったと思う。

結晶学を学び始めてすぐに、結晶学には「位相問題」という難問があることを知った。しかし、蛋白質結晶については、ヘモグロビン、ミオグロビンの解析で、同形置換法が使えることが示されていた。結晶の中に重原子が染み込んで特定の位置に固定されるという、ありそうもない現象を利用して、実際にヘモグロビン、ミオグロビンの構造が解かれたのだ。そんな画期的な話を聞いたとき、そして、低分子でさえそれ以上にすばらしい解析法はないときに、それ以上のやり方で、何万とある反射の位相を決めるための方法があるとは、あるいはそれを探そうとは、夢にも思わなかった。蛋白質構造解析研究者のやるべきことは、ひたすら有効な同形置換体を探すことだと思っていた。

4. 結晶化装置の発展

今日の蛋白質結晶学の隆盛を支えている技術の1つに蛋白質の大量発現技術があるのは疑いもない事実であるが、同時に、微量結晶化技術の発展も大きい。50年前に研究室で教えてもらった蛋白質の結晶化法は、試験管の中の蛋白質溶液に硫酸アンモニウムを少しずつ溶かしていき、白濁させた溶液の中から結晶が成長するのを待つ、今で言うバルク法であった。何年か後、カバーガラスに液滴をぶら下げるハンギングドロップ法のアイデアを知ったときには感動した。

蛋白質の結晶化の成功率を飛躍的に高めたのは、90年代はじめに出現した結晶化溶液キットである。実績のある結晶化溶液組成の組み合わせを商品化したものであるが、今では多くの商品が生まれており、最初に試すべき手段となっている。結晶化がたくさんの条件を試す試行錯誤実験であることから、当然の帰結なのかもしれないが、データベースを作ることの重要性を知らされた。結晶化キットのその後の発展は、サイエンスの勝利というよりもベンチャービジネスの勝利のように思える。

近年は、微量の溶液を使って結晶化するロボット化した装置が出回っているが、ここでは故渡邊信久氏と取り組んだ結晶化チップについて少し触れたい。振興調整費の萌芽研究に採択され、ある企業と組んで3年間取り組んだ。沈殿剤を染み込ませたゲルで満たした中空糸を束にしてチップ化し、そこに蛋白質溶液を上から一滴落とすだけで、何十種類もの条件が一度に試せるという計画だった。3年間の苦勞の末に、100種類の結晶化溶液

図1 開発した結晶化チップ(2003)。(Crystallization chip developed in 2003.)

を2 cm四方のチップに封じ込めることに成功し、世界初の「蛋白質結晶化チップ」のプロトタイプ(1条件50ナノリットル, 100条件のデバイス)を完成させた(図1)。しかし、評価委員会では、実際に適用できた蛋白質がないという理由から、あまり評価されず、このプロジェクトは終わってしまった。今でも、もう少し頑張れば実用に足るものが生まれたのではないかと心の残りがあ

5. 計算機環境の発展

現代の学生は、何の違和感もなくパソコンを使って蛋白質の構造解析を行っているが、それはとてつもなくすごいことで、50年前にはまったく予想もできなかったことだ。当時から計算機は着々と進歩していたので、計算機が速くなるだろうとの予感があったのだが、思い描いていた未来は、計算を依頼したらすぐに結果が返って来る大型計算機であった。70年代の計算機センターに、今で言う「端末」が設置され、それを使ってプログラムを書いたり計算を依頼したりすることができるようになり、80年代にワークステーションや3Dグラフィクスが出現し、90年代にはそれが普及して各研究室のもつコンピュータで解析ができるようになった。メールやインターネットが普及したのもその頃である。はじめて電子メールが登場したときには、便利であることに感激しながらも、誰がお金を払っているのか、その内に有料になるのかと、もっぱら噂した。インターネットに至ってはさらに驚きで、ほとんど自分の思考を超越しているとさえ感じた。

計算機の高速化はある程度予想されていたので、50年前には蛋白質の構造はその内には計算で予測できるようになるだろうと漠然と思っていた。しかし現時点でも、蛋白質の立体構造をアミノ酸配列情報のみから計算で求めることは依然として難しい。その一方で、解析法が進歩することに伴って、蛋白質の基本構造の多くが決定され、立体構造予測は既知の構造を参照することで信頼度の高いものが得られるようになっている。発展の順序がこのようになるとは思ひもかけなかった。もちろん「蛋

白質の構造は有限である」と言われる日が来ることも予想していなかった。

6. 蛋白質結晶学を変えた理論

重原子同形置換法はネイティブの結晶と、それに重原子を入れた重原子同形置換体の結晶の両方の回折強度から重原子の位置を決め、それを基にネイティブ結晶の位相を求める方法である。その理論を少しかじればすぐにわかるように、ネイティブ結晶と同形置換体結晶は、重原子が入っているということのほかには、構造がまったく同じであることを前提としている。蛋白質の構造はもちろんのこと、結晶の周期性（すなわち格子定数）が変化してしまうと、その前提が崩れてしまう。しかし、重原子を入れて、格子定数が変化しないことなどほとんどありえない。何とか近似的な同形置換結晶を得て、位相を計算して電子密度が得られたとしても、はじめから蛋白質の鎖を追えるような電子密度が得られることはまずない。その段階で計算機を使ってやれることは、昔は、ほとんどなかった。したがって、「その電子密度はひとまず置いておき、次の重原子同形置換体を探す」、そんな状態がずっと続いていた。きれいな電子密度が得られない理由は、非同形性から来る誤差、重原子位置の不正確さ、回折強度測定誤差などいろいろ考えられて、つまりは、「蛋白質結晶学は誤差の大きい科学だから」と納得するしかなかった。現在の知識で振り返れば、きれいな電子密度が得られなかった理由は、ほぼ間違いなく、位相が不正確だったからであろう。

この状況を変えたのは電子密度改良技術（あるいは位相改良技術）である。きっかけとなった論文はB. C. Wangによるものである（B. C. Wang: *Methods Enzymol.* **115**, 90-112 (1985)）。そのアイデアは電子密度からノイズを消去することから始まる。その方法は非常に簡単だが、この論文のもたらした影響を過小評価すべきではない。当時、非対称単位に複数の分子が含まれている場合、それらの分子の電子密度を重ね合わせることで電子密度が飛躍的に改良されることはよく知られていた。しかし、その方法は一般性に欠けた。それに比べてB. C. Wangの方法は、分子領域と溶媒領域との境界を（客観的に）決めた後、分子領域で負の電子密度を与える部分をゼロに置き換え、溶媒領域は一定の大きさに（平滑に）するものであり（これを合わせてnoise filteringと呼んだ）、その効果は小さかったが一般性があった。その電子密度を逆フーリエ変換することで逆空間の位相改良につなぐ。こうして実空間の電子密度改良と逆空間の位相改良を交互に繰り返し行うことで、一種の精密化サイクルを回すことができた。この方法が成功を収めて以降、電子密度の改良法は、最尤法も組込みながら、さまざまな新しい方法が生み出されていき、これによって蛋白質結晶学は

変貌した。

同じ頃、放射光が使えるようになってMetをSe-Metに置き換えた蛋白質を使い、Seの吸収端前後の、異常散乱効果の異なるいくつかの波長で回折データを集めれば、多重同形置換法と同じ原理で解析ができることが示され（多波長異常散乱法：MAD法）、その方法（Se-MAD法）が、事実上、蛋白質の汎用的解析法となるまでに、そんなに時間はかからなかった。実際、圧倒的なスピードで解析例が増えていった（I. Tanaka: 日本結晶学会誌 **57**, 155-162 (2015)）。

ところで、B. C. Wangの方法は、もともと単一同形置換法（SIR法）や単波長異常散乱法（SAD法）が、理論上もっている位相のambiguity（正と偽の2つの解を区別できないということ）を克服するための方法として発表されたものである。実際、位相改良技術を使えば、多波長データを集めるまでもなく、単波長データで構造が解けるということが徐々に認識されていった。ビームラインやその他の実験手法が洗練されたこともあって、2000年代の中頃には、Se-SAD法がSe-MAD法に代わって汎用法としての地位を占めるに至った。異常散乱原子の吸収端が通常のエネルギー領域から離れすぎているためにMAD法が使えないような場合でも、SAD法は適用できる。実際、蛋白質に含まれるS（核酸の場合はP）の異常散乱を利用して解析が可能であることが示され、その解析例も、少しずつではあるが、増えてきた。この方法（S-SAD法）は、ネイティブ蛋白質の結晶をそのまま利用できるもので、そのことを強調してnative-SAD法とも呼ばれる。50年前の学生が夢見た蛋白質構造解析法が現実のものになろうとしている。

7. 蛋白質回折データ収集法の変遷

蛋白質結晶学の発展に最も大きく寄与したものを1つ挙げるなら、それは、もちろん放射光となるだろう。80年代に第2世代の放射光施設ができ、90年代には挿入光源を備えた第3世代の施設ができ、その度にX線は桁違いに強くなった。科学の世界では、3桁違えばイノベーション（革命的变化）が起こるそうだが、X線分野では、それが少なくとも2度起こったことになる。そのたびに結晶学は大きく変わったが、ここではX線源の発展に伴って変わっていった回折光を記録する方法に焦点をあてる。

先に書いたように、1970年代初頭、蛋白質研究所には4軸回折計が導入されていたが、これは日本の研究室では例外的に恵まれた状態で、一般には、（低分子結晶の）回折データを収集するためには、X線フィルムを重ねて使う多重フィルム法が使われていた。シンチレーションカウンターを使った4軸自動回折計は、X線フィルム法より圧倒的に感度が高い。しかし、反射を1つずつ精度

よくとっていくこの方法は、低分子結晶のデータ収集には理想的であっても、逆格子が密で、時間とともに壊れていく蛋白質結晶にとっては、必ずしも理想的とは言えなかった。4軸回折計の欠点は、1反射ずつしか記録できない非効率性と、特に高角の反射では近傍の反射との分離が難しいことにあった。X線フィルムは、感度こそ落ちるが、二次元検出器として記録するので、一度にたくさんの反射が記録でき、また近傍の反射と分離して記録することも比較的易しい。特に格子が大きい場合には、このメリットは大きかった。このため、欧米では、比較的早い時点で、蛋白質結晶の回折データ収集は、一見、前近代的なX線フィルムを使って行われるようになっていた。

80年代半ばになって放射光が普及し、また巨大蛋白質が解析の対象になってくると、4軸回折計の欠点はますます鮮明になってきた。その頃になると日本でもようやくX線フィルムへの回帰が始まった。特筆すべきは、坂部カメラ（巨大ワイセンベルグカメラ）である。坂部知平先生設計の、この装置は、結晶軸を立て、多層スクリーンを入れてデータをとるように開発されたものだったが、欧米でスクリーンレスでのデータ収集法を経験した者たちは、坂部カメラを、スクリーンを入れずに使った。スクリーンを入れることのメリットは、反射の重なりがなくなる、指数付けがしやすい。そしてもちろん、バックグラウンドが減少することにある。一方で、効率の面では、結晶軸を立てずに、スクリーンレスで記録したほうがずっとよい。80年代半ばに、富士フイルムが医療用に開発したイメージングプレート（IP）がX線回折データ収集に使えることがわかったと、坂部カメラにIPをマウントして、スクリーンレスで使うデータ収集法が確立した。この方法は、日本で生まれた世界的なデータ収集技術として日本の蛋白質結晶学を牽引した。

一方、世界的には、マルチワイヤ型の検出器、TV型検出器、CCDなど、さまざまな検出器の開発が続けられ、現在の光子計数型検出器へと続く。IPの欠点は、X線フィルムと同様、いったん蓄積したデータを後で読み

出すための時間を要することにある。第3世代の放射光施設が建設され、放射光がさらに高輝度になると、読み取りに時間がかかるIPが放射光で使われることはなくなった。またデータ読み出しが高速になるにつれて、1フレームの回転角は短くなっていった。第3世代放射光の低エミッタンス特性とも相まって、S/Nは飛躍的に改善され、極微小結晶を使つてのデータ収集が可能になった。1フレームの回転角を短くすると、部分反射が増えることが問題とされた時代を知っている者にとっては隔世の感がある。

8. 消えていく歴史の断片

この50年で蛋白質結晶学の方法論はすっかり様変わりした。今では結晶さえ得られれば、構造は決まったようなものだ。放射光施設で回折データを取り、プログラムに通せば空間群も格子定数も、さらには電子密度や分子骨格さえも得られてしまう。当然ながら、蛋白質結晶学は、この現状に向かって一直線に進んできたのではなく、埋もれてしまった多くの試行錯誤を踏み台にしてきた。本稿では華々しい歴史に埋もれてしまいそうな断片にも光をあてながら、その発展を振り返った。

技術の発展とともに一世を風靡した装置すら消えていくのは致し方ない運命である。そのような装置の例を1つ挙げるなら、躊躇なくプレセッションカメラを挙げたい（図2左）。プレセッションカメラは、蛋白質結晶の格子定数や空間群を決めるのに、また同形置換体を探すためにも、長い間、なくてはならない装置であった。今ではほとんど使われていないだろう。全国に何台残っているか知らないが、ぜひとも後世に残して欲しいカメラである。プレセッションカメラは逆格子の形をそのまま見ることができる。可能なら、このカメラを使って晶系や空間群を自分で決めてみるがいい。例えば、空間群 $P2_12_12_1$ の結晶の0層を撮れば、点群（ラウエ群） mmm に由来する2つの鏡映面と、2種類の 2_1 らせんの消滅則が見える（図2右）。 $P4_12_12$ の結晶の $(hk0)$ 面には、消滅則に加えて、点群 $4/mmm$ の、4回軸と2種類の鏡映面がきれいに

図2 プレセッションカメラとそれを利用して撮影した $(h0l)$ 面の回折写真（空間群 $P2_12_12_1$ ）。（A precession camera and a photo of $(h0l)$ plane.）

見える。逆格子や点群が、文字どおり、見えるのである。私の場合はワイセンベルグカメラだったが、4年生のときにそれを使って、あるペプチド結晶の空間群 $P4_12_12$ を決定したときの達成感は今でも忘れられない。私にとって結晶学の最初の成果だったのだから。

9. おわりに

この分野で50年間研究を続けて、現時点の技術で物事の限界を決めてはいけなことを学習した。われわれは1人で科学しているのではない。ほかの科学分野、さらには科学者以外も含めた人類全体の英知で、世の中は発展していく。自分が今日できないことが、明日にはどこかで可能になるかもしれない。蛋白質結晶学の技術も、他分野の発展、他分野のアイデアから生まれたものがほとんどである。計算機、放射光、遺伝子工学、情報処理技術など、その例は枚挙にいとまがない。日本の大学の研究室の1つの大きな問題は、他分野との情報交換の機会が少ないことにある。それもあって大学の研究室に入ると、学生の視野は、途端に小さくなりがちである。積極的に他分野にも興味をもち、他分野の社会に溶け込んで欲しい。そして、必ず打開策が生まれることを信じて、未来に続く大きな研究に挑んで欲しい。

この50年間で技術は一変したが、一方で、文化や伝統と呼ばれるものは、世代が変わってもあまり大きく変わらないことも学んだ。50年前、欧米の進んだ科学は科学雑誌でしか知ることができない時代、欧米へ行って勉強することは科学者になろうとする若者の夢だった。近年、外国に留学しようとする若者が減少しているという。50年前と異なり、日本の大学の研究環境は欧米と肩を並べている。インターネットが発達している時代、わざわざ外国に行かなくても、情報の最先端にいることは可能であろう。しかし、他国の、特に近代科学が生まれた国の、文化や伝統を体験することは、我が国の科学を考える上でおおいに役立つと思う。日本の若者が、大志をもって世界に羽ばたき、世界をリードする日が来ることを願いながらこの稿を終える。

プロフィール

田中 勲 Isao TANAKA
北海道大学名誉教授
Professor Emeritus, Hokkaido University
e-mail: tanaka@castor.sci.hokudai.ac.jp
専門分野：蛋白質結晶学