結晶学の原点を読む (1)

異常分散の位相問題への応用
— MAD 法の原点を読む

名古屋大学(名誉教授) 芦田玉一

Tamaichi ASHIDA: Use of Anomalous Dispersion for the Phase Angle Determination in X-Ray Crystal Structure Analysis

The two original reports [Okaya, Saito and Pepinsky: Phys. Rev. **98**, 1857(1955), and, Okaya and Pepinsky, Phys. Rev. **103**, 1645 (1956)] describing the methods involving the use of the x-ray anomalous dispersion effect for the phase angle determination in x-ray crystal structure analysis are reviewed; the former paper describes a Patterson-like $P_s(u)$ function, and the latter "New Formulation and Solution of the Phase Problem in X-Ray Analysis of Noncentric Crystals Containing Anomalous Scatterers."

入門講座「結晶学の原典を読む」の第1回目は、異常分散の問題です。現在大きな脚光を浴びる構造生物学の分野で、タンパク質結晶学は極めて重要な役割を果たしています。未知のタンパク質の結晶構造を解く、すなわち位相問題を解決するには、これまで重原子同型置換法が唯一の方法でした。これには重原子誘導体結晶の調製という試行錯誤を伴う困難なステップが、常につきまとっていました。近年のシンクロトロン放射光の出現と遺伝子工学の進歩は、この位相問題の解決に新しい道を開くことになりました。それがMAD (Multiwavelength Anomalous Dispersion) 法(多波長異常分散法)です*。シンクロトロン放射光は自由に波長を選んで異常分散を最も効果的に測定することを可能にし、遺伝子工学はメチオニンのイオウをより効果的な異常分散原子であるセレンに置き換えたセレノメチオニンを導入したタンパク質を作ることを可能にしました。その結果、重原子誘導体結晶を調製することなしに、複数の波長でセレノメチオニンタンパク質結晶の回折データを測定することで、結晶構造を解くことができるようになったのです。このようなタンパク質の結晶構造決定に画期的な進歩をもたらしたMAD法の原点は、我が国の結晶学者が大きな貢献をしたX線の異常分散に関する研究にあったのです。今回はそのような歴史的背景を踏まえて、この問題についてやさしく解説していただきました。

(編集委員会)

1. はじめに—X線の異常分散

異常分散効果を実際に利用した経験をもつ研究者でも、それを実感した人は多くはないであろう。X線フィルムを用い、鉄あるいはコバルトを(かなりの量)含む化合物の結晶の回折写真をCuK α でとると、CuK α により鉄あるいはコバルトの内殻電子の光電効果が盛んに起こり、続いてそれぞれの特性X線(FeK α , FeK β または CoK α , CoK β など)が蛍光X線として多量に発生し、フィルム一面が濃く黒くかぶる。肝心のBragg反射はその高いバック

グラウンドの上に載っているという感じの回折写真となり、かぶりが強いと構造解析に利用できるようなまともな回折強度データの測定はほとんど不可能である。一般的には、重い元素を含む結晶をその元素のX線吸収端(エネルギーが特性X線の励起電圧に等しい)よりわずかに短い波長のX線で照射したとき、その元素の内殻電子の光電効果が盛んに起こり、続いて、蛍光X線が発生することになる。これが異常分散である。このとき原子散乱因子は、異常分散のないときの因子 f_0 に実数部の補正項 $\Delta f'$ および虚数部の補正項 $\Delta f''$ が必要となり、 $f=f_0+\Delta f'+i\Delta f''=f'+if''$ の形で表されるようになる。この虚数項に対応する回折波は実数部のそれよりも $\pi/2$ だけ位相が進み、その結果、対称中心のない結晶ではFriedel則、

* W. A. HendricksonらはMAD法(Multiwavelength Anomalous Diffraction Method)としている。

図1 単位胞中の1個の原子が異常分散を行うとき（他は正常）のBijvoet Pair F_h および F_{-h} の位相平面上でのベクトル表示。 F_{hL} , F_{-hL} ：正常分散原子の構造因子の寄与； F_{hA} , F_{-hA} ：異常分散原子の f の寄与； F''_{hA} , F''_{-hA} ：異常分散原子の f'' の寄与。 F_{hL} , F_{-hL} , F_{hA} , F_{-hA} は実数軸 (r) に関して対称であり、Friedel 則が成立するが、 f'' の寄与はいずれも F_{hA} , F_{-hA} より逆時計回りに $\pi/2$ だけ位相が進んでいる。対称がこわれ、Friedel 則が破れる。(Breakdown of Friedel's law when one atom (A) in a unit cell scatters anomalously.)

$|F(hkl)|^2 = |F(-h, -k, -l)|^2$ が成立しない。この一対の反射を Bijvoet (バイフット) pair と呼ぶことがある。Friedel 則は、後に与える構造因子の式 (1) で、 $f''=0$ として $|F_h|^2 = |F_{-h}|^2$ および $|F_{hL}|^2 = |F_{-hL}|^2$ を計算すれば $[h = (hkl), -h = (-h, -k, -l)]$ 、両者が等しくなることから容易に理解できる。一方、 $f'' \neq 0$ の場合も同様に後に与える (2) 式で計算して理解できるが、より直感的に理解が得られるように図1で示す。単位胞中の原子のうち1個が異常分散するものとして、構造因子を正常分散原子の寄与、異常分散原子の f (正常部分) の寄与、および異常分散 f'' の寄与の和として示す。 f'' の寄与があるために上下対称がこわれ、Friedel 則が破れることがわかる。

この異常分散効果の利用はX線による構造研究に他の方法では得られない極めて有力な手段を与えてくれる。第一は分子の絶対構造（絶対配置）の決定である。分子が対称中心あるいは鏡面对称（一般には回反軸）を持たないときに、分子はキラル（光学活性）で、その対掌体とは如何なる回転操作を行っても重ね合わせることができない（例 D-, L-アミノ酸）。キラルな分子が結晶化すると、対称中心、鏡面、映進面等がない結晶になり、Bijvoet pair の強度の測定から、分子を構成する原子の真の空間配置（絶対構造）を決定することができる。また、一般に分子やイオンが集合して、非対称中心的な極性の

ある結晶をつくると、晶癖と関連づけた真の極性構造を求めることができる（水晶の極性のある 3_1 および 3_2 ラセン、せん亜鉛鉱 ZnS、誘電体結晶など多くの例がある）。第二は、位相決定に利用しようという方法であるが、とくにタンパク質結晶解析で位相角を直接決定する MAD 法 (Multi-wavelength Anomalous Dispersion Method, 多波長異常分散法) が有力である。結晶が異常分散する原子を含むときに、放射光で、 f'' が大きくなる波長、ほとんど0になる波長、 $|\Delta f|$ が大きくなる波長等のX線で回折強度を測定し、直接解析的に位相角を決定する方法である。近年タンパク質結晶の解析スピードが飛躍的に早くなったのはこの方法に負うところが大きい、長い日時を要した重原子同型置換結晶の作製をほとんどパスできるようになったからである。

本解説では独創的な異常分散の位相問題への応用方法に関する2編の論文を読むことにする。

さて、異常分散の構造解析への利用法の研究が開始された1950年頃に、結晶学者が異常分散をどのように見ていたかをみてみよう。放射光もイメージングプレートもなく、性能の良い回転対陰極型X線発生装置も自動回折計もない1965年頃までは、回折強度の測定の最も一般的であった目視法（標準強度スケールと比較して強度を測定する方法）でも、あるいはマイクロフォトメータを用いても、かぶりの強い回折写真から回折強度を精度良く測定することは非常に困難であった。この蛍光X線を除く方法としては、(i) 多重フィルムの最も内側のフィルムは長波長の蛍光X線をほとんど吸収しているので、それを一枚棄てる方法が考えられる。しかし、フィルム1枚で $\text{CuK}\alpha$ の強度は $1/2 \sim 1/3$ となり、20～30時間つきっきりで露出してもせいぜい10時間程度の露出の弱い強度の写真しかとれないことになり、昔の貧弱な実験事情のもとでは非常に辛いことであった。(ii) Al箔を用いると長波長のX線は能率良く吸収して除くことができるが、しかし現在のような良質のAl箔が手に入るようになったのはわが国では昭和30年代後半であった。このような強度測定の難点の他にも、異常分散効果の利用にはさらにいろいろな問題があった、すなわち、(i) 異常分散が大きいほど有力であるが、 $\Delta f''$ は f_0 のせいぜい数%で、強度差、 $|F_h|^2 - |F_{-h}|^2$ (Bijvoet difference) が有意になるような高い精度で強度を測定することは、吸収の影響が大きいこともあり、一般には非常に困難であると考えられていた。とくに、X線波長が吸収端から離れると Bijvoet difference は小さくなり、測定困難であった。適当な波長のX線を利用するためにX線管対陰極の金属を種々選ぶ方法も考えられるが、当時はそう容易で有効な方法ではなかった。(なお、 Δf および $\Delta f''$ は原子核近傍の小さい空間に分布する内殻電子によるものであるから Bragg 角 2θ への依存性が小さくほとんど減衰しない。したがって高次の反射

でも Bijvoet difference が減衰せず、有効に利用できる反射が多くなるという有利な点もある。) (ii) 異常分散原子を含む結晶による X 線の吸収は大きく、良い回折データを得るためには、精度の良い吸収補正が欠かせない。(iii) 重原子を含む化合物の結晶構造決定では強度測定の精度の点から軽い原子のパラメータの精度良い決定は困難であり敬遠されていた(解析は少数の投影面の反射データだけで行うのが一般的であり、精度の良い構造解析を実行することは困難であった)。(iv) 一般に投影面の反射では Friedel 則が成立する場合が多く、異常分散効果を利用するためには、三次元のデータを測定する必要があったが、それには大きい労力と時間を要し、極く少数の研究者が試みるだけであった。

2. 異常分散応用の初期の研究

このように異常分散効果の利用には幾重にも不利な条件が重なり、1930 年頃の西川正治らおよび Coster らによる ZnS (せん亜鉛鉱) の異常分散効果による極性構造の見事な研究は知られてはいたが、その後 20 数年間は、多くの結晶学者は異常分散はむしろ厄介な問題であるとして、この種の結晶は敬遠されていた。研究環境の特に悪かった戦後の日本だけではなく、欧米でも似たような状態であった。大先達の W. L. Bragg や D. C. Hodgkin も異常分散効果が明瞭に現れた X 線回折写真を実際に見るまでは、異常分散効果は小さく測定不能で、有効に利用できるようになるとは考えていなかったのである。¹⁾

このような時期に先駆的な研究を始めたのはオランダ Utrecht 大学の Bijvoet らのグループである。²⁾ 1949 年に異常分散効果の利用により絶対構造が決定できることを示し、続いて酒石酸 (NaRb 塩) およびイソロイシン (HBr 塩) の絶対構造を報告した。わが国でも、当時大阪市立大学の斎藤喜彦らが 1955 年に D-[Co(en)³]³⁺ の絶対構造を報告した。³⁾ ただしこれらの研究は、異常分散を位相問題解決に応用したものではなく、通常の方法で構造を決定し、次いで Bijvoet difference の大きい数個の反射の大小と構造因子計算値の大小を比較して絶対構造を決定するという、現在もよく用いられている方法によるものであった。

3. 異常分散の位相問題への応用

実際に異常分散効果を系統的に位相問題の解法に用いようとした最初は、1955 年に Pennsylvania State University (PSU) 物理教室の(故)岡谷美治、斎藤喜彦、(故)Ray Pepinsky が提案した Ps(u) 関数である。⁴⁾ 当時 Ray Pepinsky 教授は世界で有数の大きな研究グループを組織し、低分子の X 線結晶解析および強誘電体結晶の構造および物性研究の分野で活発な研究活動を展開していた。その研究陣の主力は日本人であった。今は故人の Pepinsky 先生と

岡谷先生の追悼文⁵⁾で当時の研究室の様子的一端が窺えよう。その中で岡谷先生は X 線結晶構造解析グループのリーダーとして活躍しておられた。そこへ上述のように異常分散の有用性に着目しておられた斎藤先生が加わられたのが契機となり、異常分散の応用の研究が始められたのである。1955 年に Okaya, Saito, Pepinsky は Bijvoet difference を係数としたパターンソン関数様の関数である Ps(u) 関数を提案した。⁴⁾ これは理論的に極めて見事なものである。続いて翌 1956 年に Okaya, Pepinsky は Bijvoet pair の測定値と位相角の間の関係を示す方程式を導き、それを解いて位相角を得るために主として異常分散を利用する方法を提案した。⁶⁾ その方法はまったく今日の MAD 法そのものである。この解説は後者の論文を読むことが主題であるが、異常分散の研究が Ps(u) 関数を生み、さらに発展して MAD 法につながっていったものである。以下は論文の要旨と筆者のコメント(コメントと断っている)である。

3.1 Ps(u) 関数

Phys. Rev., 98, 1857-1858 (1955).

論文要旨: 異常分散を含む F_h , [$h \equiv (hkl)$, $-h \equiv (-h, -k, -l)$] を用いた Patterson 関数を作る。

まず、構造因子は、

$$F_h = \sum_j (f_j' + if_j'') \exp 2\pi i h \cdot r_j \quad (1)$$

と表される、ここで、 $h \cdot r_j \equiv hx_j + ky_j + lz_j$ と略記した。したがって、

$$\begin{aligned} F_h^2 = F_h \cdot F_h^* = & \sum (f_j' f_i' + f_j'' f_i'') \cos 2\pi h \cdot (r_j - r_i) \\ & + \sum (f_j' f_i'' + f_j'' f_i') \sin 2\pi h \cdot (r_j - r_i) \end{aligned} \quad (2)$$

となる。求和は j と i のすべての対について行う。そこで F_h^2 を係数とする二つの関数を作成する。

$$\begin{aligned} P_c(u) &= \sum F_h^2 \cos 2\pi hu = \sum' (F_h^2 + F_{-h}^2) \cos 2\pi hu \\ P_s(u) &= \sum F_h^2 \sin 2\pi hu = \sum' (F_h^2 - F_{-h}^2) \sin 2\pi hu \end{aligned} \quad (3)$$

New Method in X-Ray Crystal Structure Determination Involving the Use of Anomalous Dispersion

Y. OKAYA, Y. SAITO,* AND R. PEPINSKY

X-Ray and Crystal Structure Laboratory, Department of Physics,
The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania
(Received April 27, 1955)

WHEN incident x-rays strike a crystal, and the wavelength of the x-rays is just shorter than a resonance level of a particular atom in the crystal, the radiation

ただし, $h_u = h_u + k_v + l_w$, Σ' は逆空間の 1/2 についての求和を示す. この二つの関数は異常分散効果を含む F_h^2 を係数とする Patterson 関数 $P(u)$ の実数部分と虚数部分に対応している. すなわち

$$P(u) = P_c(u) - i P_s(u) \quad (4)$$

である. $P_c(u)$ は偶関数で通常の Patterson 関数とほぼ同じである, ただし, $(f_j' f_i' + f_j'' f_i'')$ に対応する高さのピークが座標点 $\pm u = \pm (x_j - x_i, y_j - y_i, z_j - z_i)$ に現れる. 一方, $P_s(u)$ 関数は奇関数で, $(f_j' f_i'' - f_j'' f_i')$ の高さのピークが点 u に, 負の $-(f_j' f_i'' - f_j'' f_i')$ のピークが点 $-u$ に現れる.

$P_s(u)$ 関数では, 同種の原子間ベクトルは現れない. また異種でも異常分散しない原子間のベクトルも現れない. 異常分散する原子としない原子の間 (あるいは $\Delta f''$ が異なる原子間) のベクトルのみが現れる. 単位胞中の 1 個の原子 m のみが異常分散するとすると,

$$\begin{aligned} f_j' &= f_j, f_j'' = 0 & (j \neq m) \\ f_j'' & (= f_m'') \neq 0 & (j = m). \end{aligned}$$

$P_s(u)$ 関数には高さ $f_j f_m''$ のピークが $(x_j - x_m, y_j - y_m, z_j - z_m)$ に現れ, $-f_j f_m''$ のホールが $-(x_j - x_m, y_j - y_m, z_j - z_m)$ に現れる. もし空間群が P_1 であれば, (負のホールを無視すれば) 原点に異常分散する重原子をおいた (絶対) 構造がそのまま現れる. また, ピークの数が少ないのが $P_s(u)$ 関数のもう一つの大きい特徴である. 単位胞中に N 個の原子があれば, 通常の Patterson 関数 $P(u)$ には ($P_c(u)$ にも) N^2 個のピークが現れるが, $P_s(u)$ 関数では, n 個が異常分散する原子であるとして, $n(N-n)$ 個のピークと同数のホールが現れるだけである. 一般に複雑な構造でも n は数個であるからピーク数は N の数倍で, N^2 よりも圧倒的に少ない. P_1 以外の空間群でも, 異常分散原子が非対称単位中に一個であれば, $P_s(u)$ 関数に minimum function 法などを適用して, 構造決定は容易であろう. なお, 正のピークと同数の負のホールが存在し, 両者が偶然に重なる場合もある. しかしながら, 通常の Patterson 関数と同様の "sharpening" により重なりを減少させることができよう. このようにして異常分散原子を含む対称中心をもたない結晶の位相問題をほぼ解決することができた.

コメント: $P_s(u)$ 関数はこのように理論的には見事なものであるが, 実際に応用するとなるとやや非力であり, 他の手段, 例えば重原子法あるいはイメージ・シーキング法などで解けなかった構造がこの関数を利用して初めて解けたという例はほとんどみられない. これが $P_s(u)$ 関数が実用面であまり注目されなかった理由である. ただし, X 線回折強度測定の精度がさらによくなると, より複雑な構造に $P_s(u)$ が威力を発揮するようになるのでは

ないかと期待している. なおつい最近, Woolfson らは $P_s(u)$ を生体高分子結晶の解析に応用することを試みている.⁹⁾

この論文は "Letter to the Editor" で, 要旨のみの簡単なものである. Pepinsky, Okaya は続報¹⁰⁾でとくに $P_s(u)$ の実際の適用法についての詳しい議論を報告している. すなわち, (i) 大きい f'' を利用するための重原子の種類と適当な特性 X 線の選択 (対陰極金属の交換), (ii) 結晶の整形と吸収補正の必要性, (iii) 異常分散原子が存在するときの, Friedel pair の強度測定による対称中心の有無の判定, (iv) 異常分散原子の位置決定に, 波長を選んで異常分散効果のない回折データを測定し, $P - P_c(u)$ 関数 [異常分散原子のピークの高さは $(f_j' f_i'' + f_j'' f_i') - f_o f_o'$ に対応する, P は異常分散のない Patterson 関数] を作成すれば有効な場合もある, などであるが, とくに注目すべき点は, (v) $\Delta f'$ および $\Delta f''$ の波長による変化を利用することにより同型置換法と同様の手段を適用することができ, それも重原子置換が必要ないので, "precise multiple isomorphism" の利用が可能である, という点である. これは MAD 法の基本的な利点である. このようにして, 異常分散効果の応用の研究は $P_s(u)$ から必然的に次の論文で提案される個々の反射の位相角の直接決定法に発展していったのである.

なお, $P - P_c(u)$ 関数は ΔI を係数とする Patterson 関数であるから, $(\Delta F)^2$ を係数とするものとは異なり, さほど有効ではない. ただし, X 線波長を選んで異常分散がゼロのデータを測定し, Patterson 関数を作成するというアイデアはこれが初めてであった. ちなみに, タンパク質結晶解析の $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ を係数とする差 Patterson 関数の有用性が報告されたのは数年後の 1958 年であり,¹¹⁾ 異常分散に着目した $(|F_{PH}| - |F_P|)^2$ を係数とする Patterson 関数の提案は 1961 年である.¹²⁾

3.2 異常分散効果を含む位相直接決定法

Phys. Rev., 103, 1645-1647 (1956).

論文要旨: この論文では異常分散原子を含む結晶で, 異常分散原子の位置が決められたとき, それを利用した位相決定のための基礎方程式を導いている. 次にそれを解くために利用できる手段として, 重原子同型置換法, あるいは異常分散零となる波長の X 線を選択して用いる方法, などが論じられている.

NEW FORMULATION OF THE PHASE PROBLEM

当時は異常分散が必ずしも一般に良く理解されているという時代ではなかったので, 丁寧に議論が進められている. しかしここではそれを厳密にトレースする必要

はないと思われるので結論を述べたい. 構造因子を実数部と虚数部を用いて,

$$I = |F_h|^2 = F_h \cdot F_h^* = (A_h + iB_h)(A_h - iB_h) = A_h^2 + B_h^2 \quad (5)$$

New Formulation and Solution of the Phase Problem in X-Ray Analysis of Noncentric Crystals Containing Anomalous Scatterers*

YOSHIHARU OKAYA AND RAY PEPINSKY

X-Ray and Crystal Structure Laboratory, Department of Physics, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania

(Received June 6, 1956)

Use of anomalous dispersion in x-ray analyses of nonsentric crystals reduces the problem of phase determination for any given structure factor to the choice between two possible roots of two simultaneous quadratic equations. This assumes that anomalous scatterer positions have been established by classical techniques. Selection of the correct root is aided by: the $P_s(u)$ function of Okaya, Saito, and Pepinsky; heavy atom or isomorphous replacement techniques; or the linear inequalities of Okaya. Given moderately accurate structure factor amplitudes $|F_h|$ and $|F_{-h}|$, the phase problem is solved for noncentric crystals containing anomalous scatterers; and the absolute configuration of the structure is obtained as a by-product of the direct analysis.

INTRODUCTION

OKAYA, Saito, and Pepinsky¹ and Pepinsky and Okaya² have developed a method for determina-

$\rho(r)$ represents the density distribution of scattering material. We consider the crystal to be composed of normal and anomalously scattering atoms and write

と表し、また、 F_h を異常分散原子（原子散乱因子を $f + if''$ で表す）の寄与 F_h^{as} と正常に回折する原子の寄与 F_h^{ns} の和とする。後者の実数部と虚数部については、

$$\begin{aligned} A_h^{ns} &= A_{-h}^{ns} \\ B_h^{ns} &= -B_{-h}^{ns} \end{aligned} \quad (6)$$

の関係、すなわち Friedel 則、 $|F_h^{ns}|^2 = |F_{-h}^{ns}|^2$ が成立するが、 A_h^{as} および B_h^{as} については同様の関係は成立しない。以上の記号法を用いて、Bijvoet pair の強度を示す二つの基本的な関係式、

$$\begin{aligned} |F_h|^2 &= (A_h^{as} + A_h^{ns})^2 + (B_h^{as} + B_h^{ns})^2 \\ |F_{-h}|^2 &= (A_h^{as} - A_h^{ns})^2 + (B_h^{as} - B_h^{ns})^2 \end{aligned} \quad (7)$$

が得られた。これは二元二次連立方程式で、 $|F_h|^2$ および $|F_{-h}|^2$ は観測値であり、 A_h^{as} 、 A_{-h}^{as} 、 B_h^{as} 、および B_{-h}^{as} の4個は異常分散原子の位置（絶対配置が必要）から計算できる構造因子への寄与である。残る二つ A_h^{ns} と B_h^{ns} が未知数で、この連立方程式だけでは2組の根、

$$A_h^{ns} \text{ (I), } B_h^{ns} \text{ (I), および } A_h^{ns} \text{ (II), } B_h^{ns} \text{ (II)}$$

が得られ、いずれが真の根であるかは決められない。この関係は図2で位相平面上に図示されている。この図はタンパク質結晶学者がよく目にする位相図とは感じが異なる。よく見るのは構造因子をベクトルで表しているが、図2では実数部と虚数部に分けて作図されている。(a) は半径 $|F_h|$ 、(b) は半径 $|F_{-h}|$ の円が描かれている。点E およびE'が解Iに対応し、点FおよびF'が解IIに対応する。(コメント：解が二つあるのは、(7)式の2つの二次式に

対応する2個の円の交点が一般には2個あることに対応する。あと一つ情報があり、円がもう一つ描ければ、2個の交点のどれかと交わり、それが解となる。)

METHODS FOR SOLUTION OF THE PHASE AMBIGUITY

二つの根のどれが解であるかを決定するためには、幾つかの方法が考えられる。

1. F_h^{as} が十分に大きければ、IまたはIIのどれかはおそらく F_h^{ns} が不合理な値をとることになり、除外されるであろう。(コメント：低分子の結晶では十分にあり得よう。ただし、タンパク質結晶では一般に $|F_h^{ns}| \gg |F_h^{as}|$ であるから、ほとんどありそうもないケースである)

2. 入射X線の波長を変えて、異常分散効果をなくすると、 A_h^{ns} と B_h^{ns} は変わらないが、 A_h^{as} と B_h^{as} は異常分散のない A_h^{ha} および B_h^{ha} (haはheavy atom) となる。これで3個めの方程式が得られ、解が得られる。

3. この(2)に似た方法で、異常分散原子を正常の散乱能(f)が大きく異なる原子で同型置換する。ただし厳密な同型性が必要であり、それによって、重原子の座標は不変であり、また元来の正常分散原子の寄与 F_h^{ns} も不変である。やはり第3の方程式が得られ、解が決定される(コメント：この(2)および(3)がMAD法そのものである)。

4. 最も有力な方法は、 $P_s(u)$ 関数を応用して、とくに異常分散原子の周辺の部分構造が得られたときに、それを計算に入れるとIとIIのどれを選ぶかがわかる場合が多いであろう(全構造が得られれば本論文の方法は必要ない)。

5. 対称中心のない結晶に対する岡谷の線型不等式法も有用であろう(コメント：対称中心のある結晶に対する、岡谷、仁田の線型不等式はよく知られていた。しかし対

(a) SOLUTIONS FOR h

(b) SOLUTIONS FOR $-h$

図2 測定値 $|F_h|$, $|F_{-h}|$, および計算値 A_h^{as} , B_h^{as} , A_{-h}^{as} , B_{-h}^{as} から得られる A_h^{ns} , B_h^{ns} の解IおよびII (Geometric representation of solutions for A_h^{ns} and B_h^{ns} ; from Okaya and Pepinsky: Phys. Rev. 103, 1646 (1956).)

称中心のない結晶に対する線型不等式は予告はされたが、論文発表はされていないようである)。

DISCUSSION

位相角決定には一般には3個の(重原子)同型置換結晶が必要である。しかしながら、重原子のイオン半径の差や熱振動のために、原子の位置が微妙にずれ、厳密な同型性を保持することが困難であることがよく知られている。ところが上記の(2)の異常分散を利用する方法は、一つの結晶を用いるので厳密な同型性を保証するものであり、極めて有用な方法である(コメント: MAD

法の有利な点が指摘されている)。

同型性の良い結晶を作成する有力な方法は、Pepinskyの“crystal engineering”である。この方法は、有機イオンを適当なサイズと電荷の金属の錯イオンとの塩にして結晶化させる方法で、主に有機イオンと錯イオンの配位子がパッキングを制御するために、構造解析に適した同型性の良い同型置換結晶が得られることが多い(コメント: この時すでに“crystal engineering”という術語が用いられている)。

対称中心のない結晶構造の決定は一般に対称中心がある結晶よりはるかに困難であった。しかしながら、 $Ps(u)$ 関数と本論文の方法を利用することにより、異常分散原子を含む対称中心のない結晶構造の直接的な決定ルートが得られたことは興味深いことである。当然ながら、絶対構造も同時に得られる。異常分散がなければ、方程式は一つの式となり、位相に関する情報はまったく得られない。また3個の同型置換結晶も異常分散がなければ絶対構造は与えない。異常分散の重要性がよくわかる。

異常分散効果を含む F_h と F_{-h} を用いて電子密度分布 $\rho(r)$ を計算すると、実数部と虚数部が現れ、後者は異常分散原子の散乱能の虚数部を表す。真の電子密度分布を計算するためには、異常分散効果($\Delta f'$ および $\Delta f''$ の寄与)を除いた構造因子を用いなければいけない。

経験によると、通常の大きさ(複雑さ)の結晶構造決定には多重フィルム法と目視法による強度測定で十分な精度の強度が得られる。しかしながら、計数管による強度測定が望ましい。さらにより複雑な構造の決定、とくに $Ps(u)$ 関数および本論文の方法を利用するためには、計数管による測定が必要である。

コメント: この論文では、異常分散効果を利用する位相決定においては、厳密な同型性と、高い精度の回折強度測定を必要とすることが強調されている。これは、3個の円が一点で交わるための必要条件であるが、Blow, Crick¹³⁾が、種々の誤差、すなわち、同型性のずれに起因する誤差、強度測定の誤差、重原子の構造因子への寄与の計算における誤差、などを考慮にいれて“位相の確立分布”という概念を提案したのは数年後の1959年のことであるから、必然的な見解であった。

本論文を読むと、タンパク質結晶のことはOkaya, Pepinskyの念頭にはまったくなかったらしいことが明らかである。しかしながら、MAD法を初めとして現在タンパク質結晶の解析に用いられている異常分散の利用法のほとんどの基本的なアイデアが具体的に述べられていることは特筆すべきことである。タンパク質結晶解析において、異常分散の位相決定への応用に関してはNorthの1965年の論文¹⁴⁾が最初となっている。これは具体的な手順と実際の応用を伴ったものであり、当然である。しかしながら、Okaya, Pepinskyの本論文がMAD法のオリジ

ナルとして評価され引用されるべき論文であることは間違いない。実際にはほとんど無視された形になっているが、これは、タンパク質位相問題との関連が述べられていなかったため、および、提案が時期的に早過ぎてタンパク質結晶学者に注目されなかったためであろう。論文は *Physical Review* という物理系の雑誌で発表されたが、タンパク質の結晶解析の初期の研究者には Bragg を初めとして物理学者が多く、彼らの目に触れなかったとは考えられない。ただし、Okaya, Pepinsky という著者名からは低分子の結晶構造解析とか X-RAC が頭に浮かび、タンパク質結晶解析に有力なアイデアが提案されていることに気づく研究者がいなかったのであろうか。Perutz らが重原子同型置換法がタンパク質結晶構造解析に有効であると報告したのは 1954 年のことであり、Kendrew らが初めてのタンパク質のミオグロビンの 6 Å 分解能の構造を報告したのはさらに数年後の 1958 年のことであった。1955 年頃に、重原子同型置換法がタンパク質結晶解析で大きな成果を挙げるようになる、と期待あるいは予想していたのは、Perutz および Kendrew の他に何名いたであろうか？当時タンパク質結晶解析に志向していた訳ではない Okaya, Pepinsky が 1956 年の論文でタンパク質結晶構造解析の重原子同型置換法についてまったく触れなかったのは当然のことであった。しかしながら、極めて残念なことではある。

最後に岡谷美治先生について一言述べておきたい。先生は研究生生活のほとんどをアメリカで過ごされたので、わが国の研究者にはあまり知られていない。詳しくは本誌の追悼文^{6), 7)}を読まれたい。直接法の岡谷・仁田の線型不等式、 $\Psi(u)$ 関数、各種計算機プログラムの作成、世界最初の計算機制御の自動回折計の作製、研究室内外各種

機器の計算機による有機的制御の試み、など多くの先端的、独創的な業績が知られている。常に結晶学の最先端を進まれた研究者であった。

文 献

- 1) D. C. Hodgkin: in "Anomalous Scattering", (ed. S. Ramaseshan and S. C. Abrahams) p. iii (foreword), Munksgaard, Copenhagen (1975).
- 2) J. M. Bijvoet: *Nature*, **173**, 888 (1954).
- 3) Y. Saito, K. Nakatsu, M. Shiro and H. Kuroya: *Acta Crystallogr.*, **8**, 729 (1955).
- 4) Y. Okaya, Y. Saito and R. Pepinsky: *Phys. Rev.*, **98**, 1857 (1955).
- 5) 芦田玉一: 日本結晶学会誌, **36**, 333 (1994).
- 6) 星埜慎男: 日本結晶学会誌, **39**, 211 (1997).
- 7) 小村幸友: 日本結晶学会誌, **39**, 212 (1997).
- 8) Y. Okaya and R. Pepinsky: *Phys. Rev.*, **103**, 1645 (1956).
- 9) H. Quan and M. M. Woolfson: *Acta Crystallogr.*, **A45**, 794 (1989).
- 10) R. Pepinsky and Y. Okaya: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **42**, 286 (1956).
- 11) D. M. Blow: *Proc. Roy. Soc.* **A247**, 302 (1958).
- 12) M. G. Rossmann: *Acta Crystallogr.*, **14**, 383 (1961).
- 13) D. M. Blow and F. H. C. Crick: *Acta Crystallogr.*, **12**, 794 (1959).
- 14) A. C. T. North: *Acta Crystallogr.*, **18**, 212 (1965).

プロフィール

芦田玉一 Tamaichi ASHIDA
〒465-0064 名古屋市名東区大針 1-299
1-299, Oobari, Meito-ku, Nagoya 465-0064
Tel/Fax : 052-703-2046
最終学歴：大阪大学理学部化学科
1960～62年ペンシルベニア州立大学Pepinsky研究室で結晶解析の研究に従事
専門分野：X線結晶学
趣味：読書、囲碁、ゴルフ、草花栽培