薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (6) 585-601 (1980)

タンパク質の X 線解析とその周辺*

— 特に分子薬理学と関連して —

三井幸雄

東京大学薬学部, 〒113 文京区本郷 7-3-1

X-Ray Structure Analysis of Proteins and Its Relation to Other Fields*

— With Special Reference to Molecular Pharmacology —

YUKIO MITSUI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1,
Hongō, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

There are two different techniques for the X-ray structure analyses of materials; that for small molecules and that for macromolecules. The latter technique, is called "protein crystallography." The characteristics of protein crystallography as opposed to ordinary crystallography for small molecules are described. Some of the achievements of protein crystallography and their impact on other scientific fields are discussed, and perspectives for the possible contribution of protein crystallography to molecular pharmacology are given.

Keywords—X-ray diffraction; protein crystallography; crystal structure analysis; molecular pharmacology; protein structure; receptor; macromolecule; enzyme reaction; molecular evolution; allosteric transition

1. はじめに

X 線解析という言葉を目にした時、薬学領域ですぐ思い浮ぶのは、有機物質の構造を決める手段としてのそれであろう。たしかに、世の中への普及という観点から見れば、そういう領域が中心といえるが、学問的に見れば、X 線解析の応用範囲は、液体（水銀のようなものや、生体高分子の水溶液など）や非晶質（ガラス状の固体、生体高分子やオルガネラのゲル、ゼンイ状の高分子）にもおよんでおり、それぞれ独特の寄与をしている。また単結晶ではあるが、粉末状態のものに由来する Debye-Scherrer 環を相手にした解析も、製剤領域などで既におなじみであろう。話をいわゆる単結晶に限っても、とにかく単結晶を作る物質というのは NaCl から球状ウィルス、ミクロソームにまでおよぶ多彩なものである。

結晶（単結晶）に、原子間距離と同じ程度の波長の X 線（たとえば波長が 1.54 Å の銅の特性 X 線）をあてると、大部分の X 線は直進して結晶を素通りしてしまうが、一部のものは“回折”を起こして、入射 X 線と特定の角度をなす決った方向（NaCl では数十の方向、球状ウィルスでは数万の方向）に回折 X 線を与える。これを写真フィルムなどに記録すると、規則的に配列した“回折斑点”（反射とも呼ばれる）があらわれる。これをデフレーターで走査して、どの方向にどんな強さの X 線が回折されたかを調べる。このようにして求められた“回折強度”の平方根（に比例する量）を結晶構造因子と称するが、これは結晶構造（したがって分子構造）が分っていれば、コンピューターで簡単に計算できる。困ったことに、我々が必要としているのはこの逆のプロセスであり、これはそう簡単ではない。X 線解析の原理については成書（たとえば文献 1—3）を見ていただくとして、要するに、電子密度の算出には上に述べた結晶構造因子の他に、“位相角”の情報が必要である。測定データから失われているこの情報を、様々の手練手管によって、求めて行かなければならないのである（位相問題）。

2. X 線解析の二つの流派

単結晶の X 線解析の原理というのは、これまでに述べてきた点についていえば、どんな大きさの分子、粒子を

* 本総説は、昭和 54 年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

相手にしようとは全く同じことである。ところが実際の手法となると、対象の大きさによって大分違って来る。良く知られているように、分子量が 1000 程度までの分子の結晶構造は、かつてはもっぱら重原子法によって解かれていた。この方法では、問題の化合物の中に、その分子量に応じて、たとえば Cl, Br, I など（主として）化学反応により導入し、これらの重原子からの回折波が、他の原子群からの回折波の総和（干渉を考慮した）と同程度以上に強くなるようにしておく。そうすると、最初に重原子の位置だけを定められるので、残りの原子の位置を、漸近的に求めてゆくことが出来る。重原子法の難しさは分子量と共に増して行くので、実際には分子量が 1000 以上のものの解析に成功した例は、現在でもそう多くはない。ここ十年ばかりの間に直接法と呼ばれる、結晶構造因子や位相角の集合の間に存在する統計的な関係を利用した方法が急激に普及し、有機物の解析の主流となった。この場合にも、位相角の不確かさは、分子量と共に増してくるので、少し大きい分子になると重原子法と併用されたりする。

X 線解析のコンピューター・プログラム類は、組織化されて公開される傾向にあり、将来は結晶学者の手を離れて、それぞれの問題をかかえた化学者自身の手で行うのが主流となりそうである。そうはいっても、位相問題の解決を本当の意味で自動化することは、原理的にも容易ならぬことである。また結晶学の一種独特な概念の把握や、技術の習得には非常に時間がかかるため、結晶学に深入りした化学者は、次第に化学者ではなくなってしまっており、自己の identity の確立に悩む場合が多い。少くとも筆者には、有機物の X 線解析が、他の分析手段のようにルーチンなものになる日は意外に遠いように思われる。

X 線解析の流れの中には、ここ 15 年程で固まってきたもう一つの流派がある。この流派は、もっぱら分子量

TABLE I. List of Proteins for Which the Crystal Structure was solved at an Atomic or Near Atomic Resolution (as of 1979)

Protein	Reference
Acid protease	2
Adenylate kinase	4, 5
Agglutinine	6
Alcohol dehydrogenase	7
Aldolase	8
Apo ferritin	9
L-Arabinose-binding protein	10
L-Asparaginase	11
Aspartate carbamoyltransferase	12
Azurin	13
Bence-Jones protein	1 R
Carbonic anhydrase B	15
Carbonic anhydrase C	16
Carboxypeptidase A	17
Carboxypeptidase B	18
Chlorophyll protein	19
α -Chymotrypsin	20
γ -Chymotrypsin	21
Chymotrypsinogen	22
Concanavalin A	23, 24
Cytochrome b_5	26
Cytochrome c	27, 28, 29, 30
Cytochrome c_2	31
Cytochrome c_{551}	32
Cytochrome c_{555}	33
Cytochrome c peroxidase	34
Dihydrofolate reductase	35
EF Tu-factor	36
Elastase	37

Erabutoxin	38
Erythrocrucorin	39
Fab fragment	40, 41
Ferredoxin	42, 43
Flavodoxin	44, 45, 46
Glucagon	47
Glucose-6-phosphate isomerase	48
Glutathione reductase	49
D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	50, 51
Haemoglobin	55, 56, 57, 58
Hexokinase	59, 60
High potential iron protein	61
Insulin	2R
Lactate dehydrogenase	62
Lipase	63
Lysozyme	64, 65
α -Lytic protease	66
Malate dehydrogenase	67
Myoglobin	70, 71, 72
Neurotoxin a	73
Nuclease	74
Papain	76
Parvalbumin	77, 78
Penicillopepsin	79
Phosphoglycerate kinase	83, 84
Phosphoglycerate mutase	85
Phospholipase A ₂	86
Phosphorylase a	87, 88
Phosphorylase b	89
Plastocyanin	80
Prealbumin	90
Pyruvate kinase	91
Rhodanese	92, 93
Ribonuclease-A	94, 95
Ribonuclease-S	96, 97
Rubredoxin	98
SGPA	99
SGPB	100
SSI	104
Subtilisin BPN'	101
Subtilisin Novo	102
Subtilisin + SSI	103
Superoxide dismutase	105
Takaamylase	106
Thermolysin	107
Thioredoxin	108
Tobacco Mosaic Virus (disk)	109, 111
Tomato Bushy Stunt Virus	110
Triose phosphate isomerase	112
t-RNA	113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 3R
t-RNA synthetase	120
Trypsin	121, 122
Trypsin inhibitor (pancreatic)	123
Trypsin + pancreatic trypsin inhibitor	124, 125
Trypsin + soybean trypsin inhibitor	126

1. JMB, **97**, 55 (75)
 2. JMB, **99**, 583 (75)
 3. JMB, **115**, 263 (77)
 4. JMB, **114**, 37 (78)
 5. JMB, **114**, 23 (78)
 6. JMB, **111**, 439 (77)
 7. PNAS, **70**, 2439 (73)
 8. AC, **A31**, S 26 (75)
 9. N, **271**, 282 (78)
 10. JBC, **252**, 5142 (77)
 11. *
 12. PNAS, **75**, 5276 (78)
 13. JMB, **125**, 275 (78)
 14. JMB, **123**, 35 (78)
 15. PNAS, **72**, 51 (75)
 16. N New Biol., **235**, 131 (72)
 17. PNAS, **58**, 2220 (68)
 18. AC, **A31**, S 30 (75)
 19. N, **258**, 573 (75)
 20. JMB, **68**, 187 (72)
 21. B, **10**, 3728 (71)
 22. B, **9**, 1997 (70)
 23. JBC, **250**, 1513 (75)
 24. N, **259**, 406 (76)
 25. JMB, **123**, 691 (78)
 26. JBC, **250**, 747 (75)
 27. JBC, **252**, 759 (77)
 28. JBC, **252**, 776 (77)
 29. JB, **73**, 463 (73)
 30. JBC, **246**, 1511 (71)
 31. JBC, **248**, 3910 (73)
 32. PNAS, **75**, 2674 (78)
 33. PNAS, **74**, 5244 (77)
 34. JBC, **253**, 3730 (78)
 35. JBC, **253**, 6946 (78)
 36. JMB, **125**, 325 (78)
 37. JMB, **118**, 137 (78)
 38. PNAS, **73**, 2991 (76)
 39. JMB, **120**, 327 (78)
 40. PNAS, **70**, 3305 (73)
 41. PNAS, **71**, 4298 (74)
 42. JBC, **251**, 3801 (76)
 43. JB, **81**, 529 (77)
 44. JMB, **117**, 195 (77)
 45. PNAS, **69**, 3185 (72)
 46. *
 47. N, **257**, 751 (75)
 48. JMB, **109**, 475 (77)
 49. N, **272**, 120 (78)
 50. JBC, **250**, 9137 (75)
 51. N, **266**, 328 (77)
 52. N, **257**, 818 (75)
 53. PNAS, **72**, 2160 (75)
 54. AC, **A31**, S 34 (75)
 55. JMB, **97**, 237 (75)
 56. JBC, **249**, 4067 (74)
 57. JMB, **74**, 331 (73)
 58. N, **228**, 551 (70)
 59. JMB, **123**, 1 (78)
 60. JMB, **123**, 15 (78)
 61. PNAS, **69**, 3526 (72)
 62. PNAS, **70**, 1793 (73)
 63. *
 64. JMB, **130**, 231 (79)
 65. JMB, **118**, 81 (78)
 66. N, **279**, 165 (79)
 67. JMB, **72**, 577 (72)
 68. PNAS, **73**, 349 (76)
 69. JMB, **100**, 23 (76)
 70. Prog. Stereochem., **4**, 299 (69)
 71. JMB, **40**, 353 (69)
 72. N, **185**, 422 (60)
 73. PNAS, **74**, 971 (77)
 74. JBC, **246**, 2302 (73)
 75. N, **269**, 29 (77)
 76. N, **218**, 929 (68)
 77. JBC, **248**, 3313 (73)
 78. JMB, **91**, 201 (75)
 79. N, **267**, 808 (77)
 80. N, **272**, 319 (78)
 81. JMB, **112**, 183 (77)
 82. JMB, **89**, 195 (74)
 83. N, **247**, 14 (74)
 84. JMB, **84**, 585 (74)
 85. N, **250**, 301 (74)
 86. JMB, **124**, 53 (78)
 87. PNAS, **74**, 4757 (77)
 88. JBC, **253**, 1290 (78)
 89. N, **273**, 433 (78)
 90. N, **268**, 115 (77)
 91. JMB, **112**, 309 (77)
 92. JMB, **123**, 557 (78)
 93. N, **273**, 124 (78)
 94. N, **213**, 862 (67)
 95. JMB, **85**, 1 (74)
 96. JBC, **245**, 305 (70)
 97. JB, **93**, 1239 (78)
 98. JMB, **122**, 175 (78)
 99. *
 100. N, **257**, 758 (75)
 101. N, **221**, 235 (69)
 102. CSH, **36**, 107 (71)
 103. JMB, **131**, 855 (79)
 104. JMB, **131**, 697 (79)
 105. PNAS, **72**, 1349 (75)
 106. *
 107. JMB, **114**, 119 (78)
 108. PNAS, **72**, 2305 (75)
 109. JMB, **86**, 193 (74)
 110. N, **276**, 368 (78)
 111. N, **276**, 362 (78)
 112. N, **255**, 609 (75)
 113. N, **248**, 20 (74)
 114. N, **250**, 546 (74)
 115. N, **278**, 188 (79)
 116. AC, **B34**, 1529 (78)
 117. JMB, **123**, 607 (78)
 118. JMB, **123**, 631 (78)
 119. PNAS, **72**, 3402 (75)
 120. JMB, **105**, 577 (76)
 121. AC, **B33**, 1824 (77)
 122. JMB, **100**, 693 (76)
 123. NW, **57**, 389 (70)
 124. JMB, **77**, 417 (73)
 125. JMB, **89**, 73 (74)
 126. B, **13**, 4212 (74)
- 1R. L.M. Amzel, R.J. Poljak,
Ann. Rev. Biochem., **48**, 961—997 (79)
“Three-dimensional structure of immunoglobulins.”
 - 2R. T.L. Blundell, G. Dodson, D. Hodgkin, D. Mercola,
Adv. Prot. Chem., **26**, 279—402 (72)
“Insulin: The structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology.”
 - 3R. A. Rich,
Ann. Rev. Biochem., **45**, 805—860 (76)
“t-RNA: Molecular structure, sequence and properties.”

Symbol R attached to the reference number indicates review article while symbol * indicates unpublished work. Only the latest references which came to the present author's notice are cited. Hopefully the older references may be found from these. Abbreviations used for the names of the journals are as follows. JMB: *J. Mol. Biol.*, PNAS: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, AC: *Acta Crystallogr.*, N: *Nature*, JBC: *J. Biol. Chem.*, B: *Biochemistry*, JB: *J. Biochem.*, NW: *Naturwissenschaften*, CSH: Cold Spring Harbour Symposium, **36**, (1971).

が数千から数十万の分子や粒子を相手にしており、主な対象がタンパク質であるので、タンパク結晶学 (protein crystallography) と呼ばれている (誤解のないようにいっておかなければならないが、この方法論の対象がタンパク質に限られているわけではない)。この流派では、位相問題は、もっぱら重原子同型置換法 (文献 4—6) など (を参照) と称する重原子法をもっと複雑にしたやり方で解かれる。1954 年に Cambridge の Medical Research Council の M.F. Perutz は、この方法でタンパク質の結晶構造を解き得ることを予見し、実際にヘモグロビンの構造を解いて見せた。

重原子法とはやや趣を異にし、重原子同型置換法では、水銀やウランなどの非常に重い元素を含む化合物や錯塩が好んで使われる。これらを含む (数 mm から数十 mm 位) 溶液にタンパク質の結晶を浸しておくと、ある場合にはタンパク分子の特定の位置にこれらが結合し、しかももとの重原子なしの結晶と格子構造が (すなわち、タンパク分子の結晶内での packing の様子が) ほとんど変わらないようなものを作ることが出来る (重原子同型置換結晶)。もとの結晶からの回折強度と、置換結晶からの回折強度との差を問題にすることによって、運が良ければ重原子の位置を決めることが出来る。この場合には、重原子を含む結晶からの回折強度そのものではなく、もとの結晶のそれとの差を問題にするので、重原子からの回折 X 線が、タンパク質を構成する他の原子からの回折波を圧倒する必要はない (第一、そんなに重い元素などは、地球上に存在しない!)。このようにして重原子の位置の決った置換体が二種類以上得られれば、簡単な計算によって、各反射の位相角を求めることが出来る (解説 4—6) など (を参照)。重原子の回折強度への影響は、タンパク質の場合、圧倒的ではあり得ないが、実際問題としては 10% 程度以上の強度変化がないと使いものにならない。元素の重さには限りがあるから、タンパク分子が大きくなるにつれて、結晶学者は有意な回折強度差の測定に神経をすり減らすことになる。このような理由で、現在タンパク結晶学の手法が成功しているのは、大体分子量 (厳密には、非対称単位 of the molecule) が 5000 程度から 10 万程度のものである (Table I を参照)。重原子同型置換法では、問題にする分子の大きさが 1 万程度より小さくなってくると、再び成功率が低くなる。これは、分子量が下るにつれて、重原子の結合がタンパク質分子の packing に与える影響が相対的に大きくなるために、“同型な” 重原子置換体を作ることが難しくなるためである。インシュリン (分子量 5800)⁷⁾ や神経毒のエラトキシン (分子量 6200)⁸⁾ の構造解析が、共に 10 年以上の歳月を要したのは、偶然のことではない。

低分子物質に対する X 線解析法とタンパク結晶学との守備範囲の間に残るのが、中分子物質とでもいうべき分子量が 2000 から 5000 位の物質群である。幸いなことに、この領域に属する分子は世の中にあまり多くはなさそうである。たとえば ACTH のようなペプチド性ホルモンが思い浮ぶが、この類の分子は一般に結晶化しにくいようであり、またたとえ結晶化しても、結晶中での立体構造にどれ程の意味があるのか、心もとない気がする。一般に、原子間の結合距離や結合角に代表される分子構造の基本は、その分子の結晶内での環境によって影響を受けるほど弱いものではないが、振れ角 (torsion angle)⁹⁾ (または二面角 (dihedral angle)) で代表される立体構造については、そうはいいい切れない。この場合には、振れ角を規定する (ポテンシャル) エネルギーと、分子間相互作用とのエネルギーとのバランスの問題となる。たとえばモルヒネの分子の場合には、その基本立体構造は、原子間の結合によってしっかり決っているが、オリゴペプチドであるエンケファリンともなると、その立体構造は、四つのペプチド結合のまわりの計 8 つの振れ角によって (一見自由に) 変ってくる。もし、エンケファリン中のチロシンの OH が、結晶内で隣の分子と水素結合しているとすれば、その立体構造への影響は無視出来ないであろう。

アミノ酸残基が 100 以上もある、タンパク質ともなると、振れ角の組み合わせは膨大なものになって来るが、どうもこの位大きな分子になって来ると、自分自身の折りたたみによって出来る良くまとまった構造に、いろいろな安定化要因が働いている上に、結晶格子内での隣接分子との相互作用は、ほんの一部で起こっているだけなので、その影響は相対的に小さいらしい (Fig. 1 を参照)。現在では、タンパク分子の固有の構造というものは、相当に頑固なもので、結晶格子の影響は局部的なものに限られていること、したがって結晶中での構造は、溶液中でのそれと同じ活性な構造であること、がほぼ確立されたといえる (たとえば、リボヌクレアーゼ S では結晶形が違っても、ほとんど分子の構造が変わっていないことが分かりつつある)¹⁰⁾。しかし“中分子物質”については、この考え方が適用出来ない場合がありそうである。ペプチド性のホルモンであるグルカゴン (分子量 3600) の結晶構造は、Sussex 大学の佐々木ら¹¹⁾ によって解かれ、この分子の主要な部分が α -らせんであることが示された。

Fig. 1. Packing Scheme of Ribonuclease (RNase-S) Molecules (M.W. $\approx$ 13000) in the Monoclinic Crystal

Composite contours represent RNase-S molecules while the dark background represents the mother liquor (75% saturated ammonium sulfate) in the crystallization medium. One molecule of RNase-S labelled "ZA" (stressed by darker stripes pointing to the right lower corner) can be seen in the lower middle part. Another molecule labelled "ZB" (stressed by less darker stripes pointing to the right upper corner) is chemically the same as ZA but has a different crystallographic environment. The molecules ZA and ZB constitute the so-called crystallographic asymmetric unit and all the other molecules are related to either one of these two molecules through the symmetry elements labelled by 2, 2', 2₁ and 2₁'. About 50% of the crystal volume is occupied by the mother liquor. Note that the contacts between the adjacent RNase-S molecules can be seen only at very limited surfaces of the molecules (Y. Mitsui, H.W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.*, **94**, 17 (1975)).

しかし、このものの水溶液の円二色性スペクトルを見ると、タンパク質の濃度を変えるだけで α -らせんの含量が大きく変化することが観測されるという。¹²⁾ ACTH にしても、グルカゴンにしても、その効果はそれぞれの受容体との相互作用によってあらわれるに違いないが、受容体はおそらくはもっとずっと分子量の大きいタンパク質(の複合体)であろうから、これらの中分子物質の立体構造は、相互作用の相手との複合体となって始めて決まるものなのかもしれない。

このように、X 線解析の二つの流派の間にはさまれた、方法論上の盲領域が、たまたま物質としての密度の少いところであり、時に結晶構造を決めることの意味がやや疑問視されるような領域に当たっていたことは幸運とも

いえる。しかし、この中間領域の解析法についての研究もおろそかに出来ないことは、複合分子ではあるが、たとえば Sobell ら²⁵⁻²⁶⁾ によるアクチノマイシンと 2 分子のデオキシ・グアノシンとの複合体（総分子量約 1800）の解析結果や、DNA のフラグメントとしての種々のオリゴヌクレオチドの複合体の結晶構造解析が、DNA の詳細な構造と、その薬物との相互作用の様子を明らかにした功績を考えただけでも明らかである。

3. タンパク結晶学の技術的な特徴

タンパク質の結晶が、低分子物質の結晶と大きく違う点は、まず第一にその単位胞（結晶内での周期構造のくり返し単位）の体積である。これは、（空間群などが同じであるとすれば）含まれる分子の大きさに比例するから、タンパク質の場合には大体 100 倍位になる。およその目安として、有機の低分子の結晶の単位胞の大きさは、大体 $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} = 1000 \text{ \AA}^3$ の程度であるのに対し、タンパク質の場合には $50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} = 125000 \text{ \AA}^3$ の程度である。このことは、測定すべき回折斑点の総数がおおよそ 100 倍になると同時に、一つの斑点あたりの平均的回折強度が、約 1/100 に減ることを意味する。¹³⁾ しかも重原子同型置換法では、二つの別の結晶からの回折強度の微妙な差を問題にしなければならない。

一般に、回折強度の測定には、写真法と計数管法の二つの流れがあり、かつては低分子の X 線解析にはもっぱら写真法が用いられてきた。しかし、測定精度の点では計数管法の方が優れている。このため、ミニ・コンピュータで制御された自動回折計（俗に four circle と呼ばれているものがその代表である）が開発されて、タンパク質の解析はかなり楽になった。この機械は、現在では、低分子物質の解析にも広く使われており、計算機の発達と相俟って、その能率化に大きく寄与している。

困ったことに、写真法が数百万円程度の装置でコソコソと行える方法であるのに対し、自動回折計は、高度な電子回路と精密機械との組合わせであるために、数千万円の装置と、空調された実験室とを要し、その保守も簡単ではない。幸い、低分子の解析もタンパク質の解析も共通の自動回折計で行えるが（理想的には別仕様でなければならない）、いずれにしても、このような機械を半ば、自分専用に持たなければならないので、結晶学もひどく大がかりな学問になってしまったのである。ごく最近の新しい傾向として、タンパク結晶学での写真法の復活ということがある。タンパク結晶学の対象が、分子量が十万以上のものに広がるにつれて、写真法が二次元検出器（一度に多数の回折斑点を測定出来る）であることの、計数管法に対する本質的な利点が見直されて来たためである。この目的のために、撮影した写真から半自動的に、各回折斑点の強度を見つめる自動二次元フィルム・スキャナーと、これに関連したソフト・ウェアが開発され、外国では既に何人かの先駆者によって実用化されている。¹⁴⁾ この場合には、高価なのは自動スキャナーだけであり、しかも、これはいくつかのセンタ的な場所に置いてあれば済む性質のものである。筆者らも、文部省の試験研究費の助成をうけて、この方法を暗中模索し始めている。

とにかく、現状では、X 線解析は、かなりぜい沢な研究である。低分子物質の解析の場合には、周囲からの需要にもある程度応えながら、研究をすすめられるので、予算の獲得も割に楽であるが、タンパク質の解析は、とかくその研究グループの“道楽”と見なされがちなため、この点はるかに severe である。日本の現状では、よほど研究システム的に恵まれた所でもない限り、低分子の解析グループとタンパク質の解析グループとが、実験室を共有する形が無難であろう。ともあれ、最近のコンピュータ技術の進歩は驚異的なものなので、ここ十年程の間に、X 線解析にまつわる大部分の計算は、経済的にも、技術的にもあまり問題ではなくなってしまった。このことを十分に活用し、また上に述べた写真法の復活に真面目に取り組めば、タンパク結晶学を、素朴なスタイルに戻すことも可能なのではないかと、筆者は考えている。

タンパク質の結晶が、低分子物質の結晶と本質的に違う第二の点は、その結晶内の隙間が全部流動的な結晶母液で占められている点である。普通の有機物や無機物の結晶では、そのような隙間は真空であるか、たかだか数個の溶媒分子に占められているに過ぎない。このような性質のために、タンパク分子は結晶中にあっても、溶液中にあるのとさほど変らない環境にあるといえる。重原子試薬や基質アナログなどの導入を、その結晶の浸っている溶液から結晶内への拡散という独特な方法^{4,6)} で実行出来るのは、このためである。このような分子間の隙間は、タンパク質の結晶では、結晶の全体積の 40—70% をも占めている。このことは、タンパク分子が最密充填には程遠い形で pack しているということであり、実際多くの解明された結晶構造を見ると、タンパク分子の全表面の内のほんの数ヶ所だけが隣の分子と接触して、危く結晶格子を保っているに過ぎないことが分かる (Fig. 1

を参照)。“危く”という表現は主観的なものではない。タンパク質の結晶に X 線を当てていると、早いものでは数時間、おそいものでも数十時間で回折強度の減少が始まる。この放射線損傷は X 線により誘起されたラジカルによるペプチド鎖の切断の結果、結晶格子が部分的に崩壊するためであろう。実際、薄い板状の結晶を使って実験していると、X 線のあたっている部分に穴が開くことがある。回折強度の測定というのは、数千回から数万回も繰り返さなければならず、一方放射線損傷が避けられないため、一組のデータの収集に数個の結晶を要することも珍しくない。しかも、そのようなデータをいろいろの重原子置換体について(その内のいくつかの幸運なケースについて、実際に重原子の位置が決められるに過ぎない)集めなければならないから、一つのタンパク質の解析には何十個もの単結晶が必要となる。これだけの結晶を折出させるためには、少なくとも数十 mg の試料が必要である。

タンパク質の X 線解析には、長い年月を要する。今のところ、どんなに順調なプロジェクトでも完成までに 3 年は要し、手古摺れば 10 年を越えることも珍しくない。運が悪かったり、当事者が本気でなかったりすると、迷宮入りということになる。筆者の属するグループと、筆者の知る限りのいろいろなグループの内情から見て、おそらく半分以上のプロジェクトが、そういう結末に終わっている。これとは対照的に、多くの(全てではない)低分子物質の解析は 1 月から半年位で片づいてしまい、試料も、普通は 0.1 mg にも満たない一粒の結晶で十分である(ある種の epoxy 化合物の場合のように、放射線損傷がひどくて、沢山の結晶を要する例外的な場合もある)。タンパク質を解析する人々には、一種の精神修養と周囲の理解とが必要である。また長期間にわたって安定に試料を供給し、その取扱いについて助言してくれる生化学者がいないと、結晶学以前の段階で苦心惨憺する羽目になる。(筆者らの SSI の研究⁴⁸⁾では、この点に関して、大阪府大の村尾沢夫教授と京大の広海啓太郎教授の研究室からの全面的な支援を受けることが出来た)。こういうことから推察されるように、タンパク質の X 線解析と低分子物質の X 線解析とは、その原理上の近縁性にもかかわらず、実務上は、全く別個の分野であると割切ってしまった方がよいような一面を持っている。外国では、タンパク質の解析グループと低分子物質の解析グループとは全然別であることが多く、また両者が共存している場合でも、一時期に一人の研究者が両方に従事していることは稀である。我々としては、実験上はどちらか一方を専門とするにしろ、もう一方が必要となった場合には、そちらもこなせるだけの弾力性を身につけるべく、常に努力していなければならないし、またその程度のことは十分可能と考えている。

日本のタンパク結晶学が著しく立ち遅れていることが指摘されて久しい。実はこの分野は英国で発祥したため、その技術が比較的早く伝わったのは、この国との交流が緊密な米国だけなのである。今でもフランス、イタリー、スイス、東独、ソ連などの状況は、日本と大差がない。これは一つには、タンパク結晶学にまつわる職人芸的な技術が man-to-man の形でしか伝えられないほど微妙なせいである。これらの技術についての、自習が可能なほどの詳しい手引書が書かれたのは、日本では 1976 年の筆者ら⁶⁾によるものが始めてであり、国際的に見ても 1977 年に Blundell ら⁴⁾のあらわした単行本があるに過ぎない。タンパク結晶学は、長期的でしかもリスクが大きいので、技術的にも、経済的にも、心理的にも、寛大な社会的支援を必要としている。このことが、日本では容易に実現しなかったのである。筆者は、この点では相当に恵まれた環境に置かれていたし(いうまでもなく、飯高洋一教授と教室員諸氏に負うところが大きい)、1969 年から 1 年半の間、Yale 大学の H.W. Wyckoff について、この技術を身につける機会も持てた。それでも、数人の熱心な協力者と共に、タンパク質の解析を一応軌道にのせるのに 7 年もかかってしまった。振り返ってみると、1971 年にこの作業を開始した時には、ほとんど不可能のように思えたいろいろな事柄が何とか解決出来たのは、まず第一には、飯高洋一教授の築かれた土台の堅固さのお蔭であるが、この 10 年間で日本の研究環境の改善に負うところも多い。特に、科学研究費の増大と、そのプロジェクト指向性によって受けた encouragement は大きかった。こういう傾向が、今後も当分続くとすれば、日本でも段々に社会環境を理由にタンパク結晶学の遅れを弁護することは難しくなるであろう。

様々の困難にもかかわらず、国内でも国外でもタンパク質の結晶学を目指す人々の数は増えこそすれ、一向に減っていない。これは、一つには、結晶学自身の理論的、技術的な発展の前線がタンパク結晶学に関連している場合が多いことから、方法論指向の結晶学者にとって非常に魅力があるせいである。また、タンパク結晶学の与える情報の莫大さと、その周辺の科学、特に分子生物学、分子薬理学への波紋の大きさととは大きな魅力である。次節では、この点について概観してみたい。

4. タンパク結晶学の成果とその波紋

タンパク結晶学の最初の成果は、1958年の Kendrew ら¹⁵⁾ によるミオグロビンの解析であり、これに Perutz らによるヘモグロビンの解析が続いた。その後深刻なスランプが続き、一時はこの二つのタンパク質だけが特別に幸運なケースだったのではないかと思われたほどであるが、1967年までにリゾチーム、リボスクレアーゼの構造が明らかにされ、続いてキモトリプシン、カルボキシペプチダーゼ、インシュリン、チトクローム *c* などの分子量 3 万程度までのタンパク質の構造が続々と明らかにされた（これらの古典的なタンパク結晶学の成果については Dickerson ら¹⁶⁾ による絵入りの楽しい解説がある）。タンパク質の構造解析は、依然としてどのグループにとっても困難な仕事ではあるが、もはや scientific challenge とはいえない。

タンパク結晶学の成果は、各原子の xyz 座標として公開されるのが普通である。Brookhaven National Laboratory が編集している Protein Data Bank は、世界中で解析された約五十種のタンパク質の原子座標を集大成したもので、日本からのデータとしては、阪大・蛋白研のカツオのチトクローム *c*¹⁷⁾ と当研究室によるタンパク性プロテアーゼ・インヒビター SSI (*Streptomyces subtilisin inhibitor*)^{18,19)} とが含まれている。この Data Bank は、現在阪大と東大の大型計算機センターにコピーが登録されており、一定の手続を経れば誰でも使えるようになっている。タンパク質の場合には、低分子物質の場合と異なり、各原子の座標を（結晶軸と適当に関係づけられた）Å 単位の直交座標系で表現する習慣なので、たとえば二つの原子の間の距離は、ピタゴラスの定理で簡単に求めることが出来る。原子価角や振れ角ともなると簡単なプログラムでも組まないと大変であるが、そのような計算のためのプログラム群を開発して公開しているところもあり、²⁰⁾ 筆者自身も開発しているので、²¹⁾ 要望があれば、出来るだけ協力したいと考えている。タンパク質の構造というのは、どんなに局部的に見ても非常に複雑なので、その図形表示、特にステレオ・ペアーとしてのそれが必須である。この目的のために、たとえば東大および名大の計算センターには NAMOD²²⁾ と称する簡単なプログラムが登録されている。筆者らも独自のものを開発した。²³⁾ タンパク質の構造解析のプロセスは非常に複雑であるが、その結果は極めて単純明快であるので、今後薬学領域でもこれらのデータが十分に活用されることを期待したい。

さて、あまりに技術的な面に深入りしてしまったが、これまでのタンパク結晶学の成果と、その周辺領域とのかかわり合いなどについて、以下数項目に絞って簡単に述べてみたい。

4.1 タンパク質の二次構造、三次構造の確立と分子進化論への寄与 タンパク質のいろいろなレベルでの構造を表現するのに、ポリペプチド鎖に沿ったアミノ酸残基の配列を一次構造、このポリペプチド鎖が作る α -らせんや β -構造などの立体構造を二次構造と呼ぶ習慣である。二次構造部分と、それらをつなぐポリペプチド鎖とが折りたたまれて形成するさらに高次の立体構造を三次構造と呼ぶ。一本のポリペプチド鎖が、このようにして作るサブユニットがいくつか集ってオリゴマー・タンパク質を作る場合には、その会合の様式を四次構造と呼ぶ。タンパク質の基本二次構造については、主に 1950 年代に、アミノ酸の結晶構造などにもとづいて、沢山の構造が提唱された。これらのモデルの検証が、センイ状タンパク質についての X 線センイ写真²⁷⁻³¹⁾ や赤外吸収スペクトルによって行われたが、これらの論争に決定的な断を下したのは、ミオグロビンを始めとする初期のいくつかの球状タンパク質の解析結果である。結局 Pauling の α -らせん（とその近縁構造としての 3_{10} -らせん）と β -構造だけが残った。

余談であるが、今のところタンパク質以外の生体高分子の唯一の解析例である転移リボ核酸の X 線解析³²⁾ によって、今まで X 線センイ写真法²⁷⁻³¹⁾ によって、多分に試行錯誤的に推定されて来た核酸の基本構造のうち A 型と呼ばれる二重らせん構造が実在することが証明された。もう一つの基本構造である B 型構造 (Watson-Crick が DNA のセンイ写真にもとづいて提案した右まきの二重らせん構造) は、A 型の場合と違って対応する単結晶の解析例がない。このため、本質的に間違っている可能性もあるとさえいわれ、近年二本のリン酸エステル鎖が互いにかみ合っていない新型のモデル³³⁾ が提唱されたりしている。ごく最近には、MIT の A. Rich ら³⁴⁾ がデオキシのヘキサヌクレオチド d(CGCGCG) の作る二重らせんの単結晶を解析した結果、Watson, Crick の B 型構造とは全く異なる左まきのらせん構造が発見された。私見では、この新型のモデルというのは論拠不十分であり、多分誤りであるが、後者は純然たる実験事実であるので、DNA の二重らせん構造が、少なくとも部分的に塩基配列に依存した構造変化を起こしていることは、たしかのように思われる。

さて、三次構造についていえば、ミオグロビンの構造を見ただけでも、そのあまりの複雑さに人々は困惑した

のである。それ以後に解析された他のタンパク質も、一々全然別の構造をとっていたので、混乱はますますひどくなって、未だに収まっていけないといえる。筆者らの SSI の三次構造も、今までに解かれたどのタンパク質の構造とも似ても似つかないものであった。現在、この混乱を整理する一助として、複雑な三次構造を二次構造の組み合わせとして、やや過剰に単純化して記号表示する方法が流行し（たとえば Levitt ら⁷¹⁾）ある程度の役割を果たしているが、三次構造についての一般的なルールを確立するには程遠い状態である。そもそも本当の意味で独立なタンパク質の構造などは、40 種類程度しか分っていないのである。この意味では、タンパク質の立体構造の解明という仕事は、まだ枚举の科学の段階にあり、手当たり次第に立体構造を解明するという態度さえも正当化される状態である。

解析されたタンパク質が、一々全然別の構造をとっていたというのは、全く別種のタンパク質の間についていえることであって、たとえばキモトリプシン、トリプシン、エラスターゼなどのように、一次構造上からその類縁性のはっきりしたセリン・プロテアーゼ類では、予想通り本質的に同じ立体構造をとっていた。ここ数年の間には、さらに、これら哺乳類由来のプロテアーゼと微生物由来のプロテアーゼ (α -リティック・プロテアーゼ、*Streptomyces griseus* protease A など、trypsin-like enzyme と呼ばれている) との間の立体構造の強い相関も明らかにされた。³⁵⁾ これら二群のセリン・プロテアーゼ類の一次構造上のホモロジーは十数%程度に過ぎず、これらの間の分子進化上の関連は、立体構造の解明によって始めて確立されたといえる。現在では、分子進化の過程で、アミノ酸配列よりも立体構造の基本パターンの方が、より頑固に保存されるとする作業仮説が、段々有力となってきている。立体構造の解明は、各タンパク質の分子進化上の位置づけ、したがって分類、したがってその由来する生物の分類に対する最も信頼出来る方法ということになりそうである。

セリン・プロテアーゼには、上に述べた（広義の）トリプシン族のほかに、サブチリシン族と呼ばれる細菌だけに見出される一群の酵素がある。その代表であるサブチリシン BPN' の構造解析を行った Kraut らは、その全体的な立体構造がトリプシン族のそれとは全く異なるにもかかわらず、活性中心を構成する重要なアミノ酸側鎖（有名な電荷リレー系³⁶⁾を含む）の配置において非常に似ていることを見出した。このことは、全く異なる二つのタンパク質が、ある共通の機能（この場合には、タンパク質の分解）を目指して(?)分子進化を繰り返している内に、機能上重要な部分だけが酷似した構造に収束的に分子進化 (convergent evolution) した例として考えられており、³⁷⁾ 分子進化の機構を考える上での大きなヒントとなった。反対に、一つの共通の祖先タンパク質が分子進化の過程で、次第に異なった立体構造をとり、ときには機能的にも別のことを実行するようになる例は沢山知られている (divergent evolution)。ところが、この進化の度合いが段々と激しくなってきた、しかも機能だけは元通りであったとすると、あるタンパク質の現状が convergent evolution の結果なのか、divergent evolution の結果なのか、わけが分らないことになってしまう。放線菌からとれる SSI の反応部位（阻害対象であるセリン・プロテアーゼの活性中心と結合するアミノ酸数残基からなる部分）の一次構造と、哺乳類の膵臓由来の PSTI と呼ばれるプロテアーゼ・インヒビター（全体のアミノ酸配列は似ても似つかないものである）のそれとの高度のホモロジーの問題³⁸⁾ は、上のような悠遠な問題を提起した一例である。この問題に科学的に答えるには、もっと多くの生物に存在する類縁のタンパク質の立体構造を決めるしかないであろう。タンパク結晶学が取り上げなければならない材料は実に多いのである。

4.2 酵素の反応機構に関連して ある酵素の結晶構造が決まると、それに対する基質アナログやインヒビターの結合の様子は、差フーリエ法⁴⁻⁶⁾ という比較的簡単な方法で調べることが出来る。もちろん、基質そのものを結合させても良いのであるが、酵素は、大抵結晶の中でも“生きて”いるので、反応が進んでその生成物の一部だけが酵素上に残ることになり、結果的には同じことである。基質そのものや、反応中間体が酵素表面上に実在する時間は、普通には極めて短く、一方 X 線解析は、一組のデータの収集に少くとも数時間を要する本来 static な方法なので、そのようなものを見ることは出来ない。基質の一部、またはその誘導体の結合状態からの類推に頼らざるを得ないため、X 線解析が出来たからといって、酵素の反応機構がビタリと分るなどというものではない。そもそも、分子量が数万から数十万もある酵素の巨体の中で、反応の肝腎な部分は、プロトン一個の移動というようなミクロなことなので、精度的に見ても無理なのである。

プロテアーゼの場合には、それらの高分子性のインヒビター（タンパク性プロテアーゼ・インヒビター³⁹⁾）が、それ自身タンパク質でありながら、インヒビターであるという面白い性質を持っているため、これとプロテアー

ゼとの複合体の構造を解くことによって、反応中間体の状態を static に見ることが出来る。このトリックを使った研究がトリプシン^{40,41)} カルボキシペプチダーゼ⁴²⁾ などについて行われている。筆者らの SSI も、細菌性のセリン・プロテアーゼであるサブチリシンに対するタンパク性プロテアーゼ・インヒビターであって、サブチリシンの反応機構の幾何学を知るために、SSI・サブチリシン複合体の X 線解析⁴³⁾ を進めつつある。

X 線解析が行われても、沢山の問題が残るということばかりを強調したが、もちろん、酵素の活性中心の全ぼうを、(それ程の精度はないにしても) 目のあたりに出来るという点では、X 線解析は強力である。リボスクレアーゼの場合^{44,45)} のように、龐大な化学的データ⁴⁵⁾ が蓄積されていた場合にも、X 線解析の結果を待って始めて、それらを整理、統合して一つの image にまとめ上げることが可能となった。P. Boyer の "The Enzymes" シリーズに見られるように、現在では、X 線解析の出来ている酵素については、結晶学者の書いた一章が必ず総説の一部に含まれている。

X 線解析と関連して、反応機構の解明が、もっとも徹底的に行われたのは、 α -キモトリプシンとサブチリシンに代表されるセリン・プロテアーゼ類^{46,47)} であり、これに次ぐものとしてリゾチーム、リボスクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼがあげられよう。セリン・プロテアーゼについては、前記のタンパク性インヒビター (トリプシン・インヒビター) との複合体の研究が最も説得力があるようであり、現在反応機構をめぐって紛糾中のカルボキシペプチダーゼについても、そのタンパク性インヒビター (ポテト・インヒビター) との複合体の研究が進行中である (Lipscomb ら)⁴²⁾

すでによく知られたことではあるが、ここで、主として X 線解析の立場から、酵素の反応機構について示唆された事柄を整理してみよう。筆者の仕事との関連から、例としては主にセリン・プロテアーゼ^{47,48)} とリボスクレアーゼ^{44,45)} とをとりあげることにする。今では陳腐な言い草であるが、これらの成果がもたらした最も重要な認識は、“酵素反応も有機化学の反応と本質的に変らないプロセスであって、少なくともこの点に関しては、生物特有の神秘などは無い”ということである。このことが、有機化学に与えた刺激が、いわゆる biomimetic chemistry の隆盛を招いたことは良く知られている。

(1) 酵素の活性中心は、タンパク質の表面のくぼみであって、電氣的にも対応する電荷と相補的になっている場合が多い。酵素の原子模型の表面を眺めていると、ちょっとしたイオンの付着しそうな、電氣的に相補的なサイトなどはいくらでもあるように見えるが、実際には、適切にくぼんだ特定の場所以外には付着しないものである (たとえば、硫酸イオンの場合のリボスクレアーゼの P_1 サイト)^{44,45)} このことは結合による表面積の減少ということ (暗に疎水結合を考えている) が、小さなイオンのような場合でさえも大事なことを示している。活性中心には、反応の主役としての官能基 (セリン・プロテアーゼの場合の“活性セリン”など) があり、これと他のいくつかの反応に不可欠な官能基 (セリン・プロテアーゼの例では、活性セリンに近いヒスチジン、アスパラギン酸各一残基、これら三つが組合わさって、いわゆる電荷リレー系を構成していることになっている) があって、これらは分子進化上も非常に頑固に保存されている。セリン・プロテアーゼの電荷リレー系は、細菌から哺乳類に至る数十億年を通じて保存されてきたことが、X 線解析の結果から明らかである。

(2) 基質が大きい場合 (リボスクレアーゼの場合のオリゴスクレオチド、プロテアーゼの場合のオリゴペプチド、リゾチームの場合のオリゴサッカライドなど) には、酵素表面との相互作用は、触媒サイト (catalytic site) から相当遠いところにまで拡がっている (たとえば、サブチリシンの S_4 サイト⁴⁸⁾ は約 15 Å 離れている)。オリゴスクレオチドやオリゴペプチドの場合のように、基質の側に周期的な側鎖の出っ張りがある場合には、これらを取るポケット状のくぼみ (何々サイトと呼ばれるもの) が酵素表面に並んでいる。セリン・プロテアーゼの場合には、このようなポケットの数は約 6 個もあって互に約 4 Å ずつ離れている。リボスクレアーゼのポケットは B_1 , B_2 サイトの 2 個 (約 10 Å 離れている) だけであるが、これ以外にもやや非特異的な結合サイトがありそうである (酵素表面の正電荷を持った側鎖によるリボ核酸の負電荷との相互作用)^{49,50)}

(3) これらのポケットには、結合する相手の幾何構造に対する要求が非常に狭量なものから寛大なものまでの variety があり、酵素反応の特異性は主としてこれによって決まる。特異性の高いポケットを特徴づけるものとしては 1) せまい、あるいは特異な形をしたくぼみ、2) 基質との間の特異な水素結合を可能にする官能基の存在、3) 基質の電荷と相補的な電荷の存在、などがあげられよう。リボスクレアーゼの B_1 サイト (ピリミジン塩基に特異的) は 1) と 2) との条件を満たしており、トリプシンの S_1 サイト⁵¹⁾ (アルギニン、リジンに特異的) に

は 3) の条件 (アスパラギン酸—189 の負電荷の存在) が当てはまり、1) の条件もある程度満されている (細長いポケット). 寛大なポケットの例としては、リボスクレアーゼの B_2 サイト (塩基非特異的) があげられる. 実際、このポケットはプリン塩基が入ってもまだ余裕がある程大きなものであり、2) や 3) に該当する特異的な相互作用はないようである. セリン・プロテアーゼの場合にも、キモトリプシンやサブチリシンの S_1 サイト⁵¹⁾ は、トリプシンの S_1 サイトよりもはるかに寛大であり、これらのプロテアーゼの基質特異性をゆるいものにしてゐる. また、トリプシンでも、特異性決定サイトである S_1 サイト以外のサイト、特に S_1' , S_2' サイト⁵¹⁾ は寛大なポケットである.

(4) このような多数の結合サイトによる、酵素・基質複合体の安定化の結果、酵素の触媒サイトと、基質の反応部位とは、ある一定の geometry に固定される. このため、酵素反応は、溶液内でその反応の主役たちが自由に出会った場合とは比較にならない効率をもって進む.

(5) 基質の側についていえば、上にのべた “一定の geometry” は、おそらく反応中間体の geometry に似たものであり、かくして、酵素表面では反応中間体に関連した (ポテンシャル) エネルギーのバリアーが著しく低められていると考えられる.³⁶⁾ ただし、これらのことは、X 線解析の結果を参照しているにしてもいわば “見てきたような話” なのであり、前にも述べた X 線解析の本質的に static な性格上、そのようなものが直接見られるわけではない. たとえば、リゾチームに結合したポリサッカライドの切断部位に ハーフ・チェア形のヘキソース環があらわれるという話³⁸⁾ も、切断部位の前後各々 3 つのサイトに結合した糖鎖の模型を組んでみると、どうしてもそういうことになるという意味にすぎない. もっとも、プロテアーゼとそのタンパク性インヒビターとの複合体の場合には、そのような中間状態が安定に存在していると思われるふしがある. München の Huber ら⁵²⁾ はトリプシンとウシ膵臓トリプシン・インヒビターとの複合体の精密解析を押し進めた結果、反応中間体としての四面体型中間体 (tetrahedral intermediate)⁵³⁾ に近い構造が見えたことと主張している.

(6) 基質が酵素の表面に固定されるとき、基質の側に自由があれば、酵素表面の地形に合わせた形に直されて結合すると思われるが、ときには基質が酵素表面のいくつかの残基の形や位置を変えることもあり、誘導適合 (induced fit) と呼ばれている. たとえばサブチリシンの場合には、 S_4 サイトのチロシン-104 のフェノール環が、基質の結合に伴って、 α -炭素と β -炭素を結ぶ結合のまわりに数十度回転することが、X 線差フーリエ法でたしかめられた. S_4 サイトは、反応部位からは遠いので、反応基への直接の影響はないと思われるが、このような仕組みの存在理由があるとすれば何であろうか? 一般に、単なる基質の結合ということは、割に簡単に起こるが、反応が進むための必要条件である “正しい” または “生産的 (productive) な” 結合が起こるためには、いろいろな条件が満たされなければならない. 誘導適合も、良い加減な (上の例では、チロシン-104 を動かすだけの力のない) 結合を排除するための、一段とこみ入った仕組みであろうか? 酵素によっては誘導適合が反応に直接関係すると思われる場合もある. たとえばリボスクレアーゼでは、基質の結合に伴って、ヒスチジン-119 のイミダゾール環が数十度回転するが、この側鎖は脱離グループに、プロトンを供与する役割を果していると考えられる. つまり、この場合は誘導適合は、基質の “生産的な” 結合を可能にすると同時に、反応基としての正しい位置づけにも必要らしいのである.^{44, 45)} いわゆるアロステリック・エフェクターの結合に伴う誘導適合の例で、X 線解析的に詳しく解明されたものはまだないようであるが、この場合にも似たようなことが起こって、それが引金となって、連鎖反動的に微妙な構造変化が遠くまで伝わるものと思われる. 薬理学でいう antagonist と agonist との違いも、単に結合するだけのものと、連鎖反応を起こすに足る “正しい” 結合をするものとの違いであろうか?

4.3 タンパク・タンパク相互作用とタンパク質の四次構造 四次構造の立体化学の問題に一般的に答えることは至難のわざである. 何故ならば、この問題の基礎となるデータとしては、約十種のオリゴメリックな (多量体) タンパク質 (ヘモグロビン、コンカナバリン A, SSI など) および酵素 (いくつかのデヒドロゲナーゼの類、ヘキソカイネース、フォスフォリレースなど) の例と、異種タンパク質間の複合体 (前記のセリン・プロテアーゼ類と、そのタンパク性インヒビターとの複合体についての三例の解析に限られている. SSI とサブチリシンとの複合体の解析⁴³⁾ もその一例である) の例があるだけだからである. これらの系でのタンパク質・タンパク質の境界面を詳しく調べれば調べるほど、頭がまとまらなくなってくる. しかし、ある種の好んで用いられる接触パターンがあるらしいことは、SSI 分子中のサブユニット・サブユニット境界と、コンカナバリン (機能的には SSI と何の関係もないタンパク質である) 分子中のダイマー・ダイマー境界とに、互に 30° 傾いた β -シート同志

の重ね合わせという共通のパターンが見られることから推察される。⁵³⁾ SSI の境界面の見せてくれるもう一つの面白い特徴は、一つの長く突出したアルギニン側鎖と、この先端を受け入れるために作られたかのようなポケット状の構造(相手側のサブユニットの表面にある)である。このような鍵と鍵穴式の手本のような機構も、タンパク質同志の特異的な会合の様式を規定する一つのやり方らしい。⁵³⁾

四次構造の問題で、機能的に見てもっとも重要なのは、その境界構造のアロステリック効果による変化の問題であろう。この意味では Perutz によるヘモグロビンの研究が最も徹底している。彼の提出した機構⁵⁴⁾ は、必ずしも全面的な支持を得ているわけではないが、とにかく、一つのサブユニットにアロステリック・イフェクター(ヘモグロビンの例では酸素分子)が結合することにより、そのサブユニット自身の構造(三次構造)が変化し、この変化は比較的小さいものであるにもかかわらず、何らかの機構によって、四次構造(すなわちサブユニットの会合様式)の変化としては、ずっと大きいものに増幅されるという機構(ヘモグロビンの場合、酸素分子の結合に伴い、T 構造から R 構造への変換が起こるが、この際 α サブユニットと β サブユニットとからなるダイマーがもう一对のダイマーに対して、角度にして約 15° も動くことが、結晶構造解析により実証されている)が、どうやら一般に存在するらしい。このような現象は、たとえばアセチルコリン受容体の複合タンパク質系⁵⁵⁾ で、結合部分へのアセチルコリンの脱着が、イオノフォア部分でのイオン透過性に直ちに影響するというような形で、分子薬理学の領域でも重要な役割を果たしているはずである。その機構が、いつまでも“何らかの機構で”であってはならないであろう。

さらにいえば、四次構造形成の機構の問題は、生体の中の種々の構造物(オルガネラ)の構築という面から見ても極めて重要なものである。現在では、オリゴマー酵素の形成や、タンパク性サブユニットの集合体としての繊毛、^{56,57)} 鞭毛の形成、リボソーム、簡単なウィルスなどのタンパク・核酸複合体の形成なども、本質的には、タンパク分子の結晶化の過程と同じプロセスによっていると思われる。⁷²⁾ 正しい形態の作り損い、機能障害につながるのが普通であり、このプロセスに薬物分子が干渉するということもあり得るであろう。

四次構造形成の機構を、全般的に原子のレベルで明らかにし得る唯一の方法は結晶の X 線解析である。しかし、生体高分子の複合体とか、もっと進んで高次構造体とかいわれるものの解析は、結晶学者にとっては全く頭痛ものである。こういうものの分子量は 5, 6 万から数十万にも達するので、3 節でのべたように、回折斑点の数、平均的回折強度、結晶の放射線損傷、重原子の位置決定の容易さなど、どの角度から見ても不利な条件ばかりだからである。しかし、世界の最先端は、最近ついにある種の植物ウィルス (Tomato Bushy Stunt Virus)⁵⁸⁾ の原子レベルの構造にまで到達し、その中でのタンパク・核酸相互作用の様子を明らかにしつつある。また予備的な解析ではあるが、染色体の構造研究の決定打として期待されているものに、Medical Research Council の A. Klug ら⁵⁹⁾ によるヌクレオソームの単結晶の研究がある。これらのグループは、その目的のための新しい理論や測定機の開発をも辞さない、真に革新的な人々に支えられており、今のところは誰にでも簡単に真似出来るような仕事ではない。

問題の対象が素材としての生体高分子の一つ一つを離れて、これらの高次の複合体に拡がるにつれて、電子顕微鏡の射程に入ってくる。A. Klug らは 15 年程前から、同じ(同類の)構造物の種々の角度からの電顕写真を“合成”して、ちょうど低分解能の X 線解析の結果に相当するような三次元的なイメージを浮き上らせる方法(電顕像の三次元再構成)を考えた。この方法は、特に対象とする構造がらせん対称を持っている場合に成功をおさめ、ある種の植物ウィルスやバクテリオ・ファージ、鞭毛、アクチンなどの表面構造を親しみ易い形で表現出来るようになってきた。電顕像の解析は、単結晶の X 線解析の場合と違って、対象が周期的に配列している(すなわち結晶化している)ことを要しないので、膜上に不規則に分布した受容体タンパク質等にも応用し得る。また X 線解析と違って、対象が大型化しても解析の難しさにあまり差がないから、今後ますます盛んになるであろう。日本でも既にこの技術を軌道にのせているグループがあり、⁶⁰⁾ この分野の特集号も出されている。しかし、電顕像というのは、やや極端に言えば、ミイラ(試料を乾燥させて真空中に置かなければならない)に、重原子の造影剤(これがないとコントラストがつかない)を吹きつけて撮ったデス・マスクのようなものである。結晶の場合と比べて 1) *in vivo* の環境に程遠い、2) 分解能が悪い(せいぜい、X 線解析の場合の $6 \text{ \AA}$ 分解能程度である)、3) 最も本質的な点として、造影剤の入りこめる範囲の表面構造が分かるだけで、内部に閉じこめられた空間や、構造体内部の構造(構成生体高分子の二次、三次構造)は分からない、という欠点を持っている。⁶¹⁾

結晶学が安心して城をあけわたせるような手法ではないのである。

そうはいっても、原理的に結晶化するわけのないオルガネラが沢山存在することも事実である。膜の中に存在する形での種々のタンパク質（複合体）もそうであるが、たとえば T4 ファージ（多面体形の頭に、棒状の尾部と、末端の髯とがついた例の有名な構造のもの）が結晶化するわけがないのは自明である。結晶化するはずだといわれながら、どうしても結晶化しないものもある（リボソームなど）。こういうものの構造に我々はどう立向ったら良いのだろうか？

電顕像そのものの技術の向上と、上に述べたその再構成法の併用により、もう少し詳しいイメージを得ることは可能かもしれない。また、最近では、溶液の中性子散乱を利用して、（特異的に重水素化した）サブユニットの全構造中での位置づけを行う功妙な方法もあらわれてきた。⁶²⁾ Bifunctional な試薬を利用して近接サブユニット同志を同定する古典的方法も依然として盛んである。局所的な情報、特にその状態変化を追うだけならば、スピン・ラベル、蛍光などを代表とする様々の分光学的な方法のほうが、鋭敏でもあるし、時間依存の現象も追えるし、それで十分でもあろう。単結晶の X 線解析で得られるような、全体的で詳細な情報は、あきらめるべきなのだろうか？

筆者は次のように考える。たとえば、薬物の受容体（一例として acetylcholine regulator⁵⁵⁾）は、一般には、数個から数十個のタンパク性のサブユニットの複合系であろう。その複合系が全体として大体どんな形で、その中のいろいろのサブユニットの中のどれがその薬物 (acetylcholine) の結合部分 (acetylcholine receptor⁵⁵⁾) であり、どれがその刺激の結果の表現部分 (acetylcholine ionophore⁵⁵⁾) であるか、というようなことは X 線解析以外の方法で決める（電顕、分光学などの生物々理的方法と、純然たる生化学によって決められるであろう）。もし、この受容体全体が高い対称性を持っていて、いわゆる結晶学的な非対称単位が存外小さいとすれば、このものを結晶化して、丸ごと解析することも夢ではないだろう。これは、もちろん、最も望ましい正統的な方法ではある。しかし、受容体の対称性が低い場合、特に結晶化しない場合には、否応なしにそうなるのであるが、最も重要と思われる部分（一つのサブユニットまたはせいぜい 2, 3 のサブユニットの複合体、これでも総分子量 10 万前後である！）のみを取り出して結晶化し、構造解析を実行するというだけでも良いのではないだろうか？

5. 今後の見通し 一特に分子薬理学に関連して一

“生物の生物たるゆえんは、素材としての低分子や高分子が作る集合のありようにこそあり、素材の素性をあまりに分析的に見て行けばしよせんは、ただの物理や化学に堕してしまう云々……”。たしかにその通りである。安易な素材分析主義は、特に結晶学者に見られがちな通弊であり（3 節で述べたような、いろいろな技術的制約のやむを得ない結果である場合が多いのであるが）、我々は特に自らをいましめねばならない。しかし、上に述べたような主張も、素材分析主義の行き過ぎに対する警告のようなものであって、正気の人なら、素材の研究の必要を軽視するということはあるまい。DNA の複製の機構一つをとっても、核酸塩基間の水素結合というあれ程にミクロなことが、生物の本質にかかわっているのである。薬物受容体についても同じことである。少なくとも、薬物の結合サイトでの鍵と鍵穴の関係が、具体的にどんな様相を帯びているかを、我々は知る必要がある。

最近の medicinal chemistry の隆盛に伴い、筆者も、薬物の構造と活性との相関 (structure and activity relationship (SAR)) や、その統計的な取扱い (quantitative SAR (QSAR)) の話や、新薬開発の苦心談などをいくつか見聞いた。⁶³⁻⁶⁵⁾ 成功した新薬の開発は、有機化学者や薬理学者の執念と、優れた直観に支えられていること、ある種の QSAR が見事な成功を収めていること、などが印象に残った。また薬物と受容体との相互作用のモデルとして、タンパク結晶学の明らかにした、酵素（キモトリブシンなど）とその基質との相互作用の立体化学が、陰に陽に利用されていることに感銘を受けた。⁶⁶⁾ 現在の構造活性相関論は、もっぱらその薬理作用発見のきっかけとなった薬物（リード化合物）と、その改良を目指して合成された沢山の誘導体の間での構造、物性と活性との相関を求めることに拘けられている。⁶⁷⁾ これは、薬物受容体というものが、一番進んでいる分野でも、未だ化学的に完全に characterize されたとはいえない状況と、開発の現場での切実な要請とを考えれば当然のことであり、少なくとも実利面では永久に存在価値を持ち続けると思われる。このアプローチが、思い切って現象論的であるために、薬物の性質の中で、受容体との相互作用ばかりでなく、作用点へ到達するまでの透過の問題や、副作用の問題までも包括して論じられる点は非常に強味である。しかし、酵素の活性中心での、鍵と鍵穴の立体化学に、のめり込んでいる馬鹿正直な人間としては、やはり受容体は単離されて、結晶化されねばならないと感ずるので

ある。

薬物の受容体といっても、その実体はいろいろであろう。一番簡単なのは、その薬物が代謝拮抗剤の場合である。この場合には、話は 4-2 節に述べた酵素表面の鍵と鍵穴の関係に尽きるであろう。抗菌剤のような場合には、同じ系列の酵素の、宿主と微生物との間での微妙な鍵穴の違いが治療成績に大きくひびくわけであるから、出来れば、両方の酵素の構造を知りたい。まえにサブチリシンの研究で言及した Kraut ら^{67,68)} は、dihydrofolate reductase (DHFR) を使って、実際にそのような研究を実現しつつある。DHFR は、いわゆる one carbon fragment の素材であるジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する酵素であり、その阻害剤は、各種の抗菌剤、制癌剤として実用化されている。Kraut ら^{67,68)} は、まず手始めに、大腸菌の DHFR の構造解析を行い、次に制癌剤 methotrexate (葉酸のアナログである) の、これに対する結合の様子を調べた。次のステップでは哺乳類の DHFR を手がける計画のようである。このように、薬理作用上重要な酵素に着目して、その結晶構造を解くというのが、タンパク結晶学者の寄与し得る一つの方法であろう。それには、どんな酵素に着目すれば良いのか、その酵素はどこで研究されているのか、等々の具体的な情報を、とかく自閉症的になりがちな結晶学者に教えてくれる先見の明を持った人々が必要である。

もっと受容体らしい受容体となると、たとえばアセチルコリン受容体⁵⁵⁾ やステロイド・ホルモンの受容体⁶⁹⁾ ということになるが、これらはずっと大きな複合タンパク系である。しかし、前節でも述べたように、結晶学の対象としては、必ずしも最初から intact な受容体全体を狙わなくても良いのではないだろうか？

Intact ということを厳密に言えば、膜構造から切り離すこと自体が大変な攪乱であろう。たとえば、薬物の結合部分を含む受容体の破片の研究だけでも、構造活性相関の研究を非常に筋道のたったものに変えるであろう。たしかに、これでは、intact な受容体の持っていた重要な性質、すなわちその薬物が結合したことによる刺激を他所へ伝えて、そこで何か別の機能を発揮する仕組みについては、多くを語れないであろう。しかし、その薬物の、おそらくはアロステリックな効果によって引き起こされる、サブユニットの三次構造の変化と、その四次構造への影響（解析の対象としている破片の範囲内での）を結晶学的に明らかにすることは可能である。そのような構造的基礎の上に、たとえばスピン・ラベル法による ESR のデータなどを使って、組み上げられた intact な受容体の動作機構ならば、ずいぶんと説得力に富んだものとなるだろう。

受容体というものが、調節酵素 (regulatory enzyme) と非常に似た機構で動作するのではないかという説があるが、⁵⁵⁾ そういう酵素についての結晶学的研究は既に存在している。Harvard の Lipscomb ら⁷⁰⁾ によるアスパーテート・トランスカルバモイレースと CTP との系の研究が、それである。アロステリック・イフェクター CTP (受容体の場合の agonist になぞらえられる) の結合によって、この酵素を構成する 6 つのサブユニットの形成するリング状の構造が大幅に変るという驚くべき結果が、過去十年間の血のにじむような努力によって、ようやく明らかになって来た。

しかし、結晶学の当事者としては、複雑な感懷を持たざるを得ない。というのは、これらの仕事がどんなに大変なものであったかを、我々は熟知しているからである。単なる基質アナログやインヒビターの結合の場合と違って、アロステリック・イフェクターの結合は、その三次構造への drastic な影響を反映して結晶格子を破壊してしまう。このため、イフェクターの結合していない状態の酵素と、結合している状態の酵素とを、各々別々に結晶化して（一見無関係な結晶系、格子定数となるのが普通）、これらを全く独立に構造解析する（すなわち、手間が 2 倍になる）羽目になるということが、これらの先駆者の経験から明らかになったのである。これは、現在のタンパク結晶学のレベルでは、どのグループにとっても極めて消耗なことである。このため、世界的に見ても、タンパク結晶学者は、いま若干ひるんでいるというのが正直なところである。

単なる鍵と鍵穴の話だけで満足するにしても、各々の薬物の改良に実際に資するためには、二、三の代表的な受容体の研究から引出された一般論だけでは不十分で、結局はそれぞれの対応する受容体の（少くとも部分的な）構造を明らかにしなければならないだろう。これらのことを考えれば、タンパク結晶学をもっと手軽なものにするための、結晶学自体の進歩というものが、薬学にも大に関係があることが理解されよう。低分子物質の X 線解析を手軽にするための結晶学の進歩ということについては、既に薬学領域全体に深い理解があると思われる。そこで、もう一步を進めて、X 線解析のもう一つの流派であるタンパク結晶学にも目を向けていただきたいのである。

本文中にしばしば引用されているように、筆者らによる今回の受賞業績自身については、既に色々の形で発表しているので、今回はあえて一般論に重点を置き、特に分子薬理学との関連について考えてみた。このため、相当地に背のびした内容となってしまった。誤っている点は、読者諸賢からの御批判によって直したいと考えている。また話が非常に広いために、まともな文献引用は、あきらめざるを得ず、筆者らの仕事の周辺に偏った引用となってしまった。御容赦いただきたい。終りに、筆者の研究を指導し、支えて来られた東大・薬学部の飯高洋一、坪井正道両教授と両教室の多数の協同研究者の方々にお礼申し上げる。

引用文献および注

- 1) 斎藤喜彦, “化学結晶学入門,” (共立全書 207), 共立出版, 東京, 1975
- 2) 斎藤喜彦, 岩崎 準, 新関暢一, “実験化学講座 続 8,” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1965, pp. 43—185.
- 3) 岩崎 準, 丸茂文幸, 笹田義夫, “新実験化学講座 6, 基礎技術 5 構造解析,” 日本化学会編, 丸善, 東京, 1975, pp. 27—256.
- 4) T.L. Blundell, L.N. Johnson, “Protein Crystallography,” Academic Press, New York, 1977.
- 5) 飯高洋一, “タンパク質化学 3,” 安藤鋭郎, 今堀和友, 伊勢村寿三, 早石 修編, 共立出版, 東京, 1972, pp. 215—293.
- 6) 森田雄平, 三井幸雄, “生化学実験講座 1, タンパク質の化学 III,” 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京, 1976, pp. 7—115.
- 7) M.J. Adams, E.N. Baker, T.L. Blundell, M.M. Harding, E.J. Dodson, D.C. Hodgkin, G.G. Dodson, B. Rimmer, M. Vijayan, S. Sheat, *Nature* (London), **224**, 491 (1969).
- 8) B.W. Low, H.S. Preston, A. Sato, L.S. Rosen, J.E. Searl, A.D. Rudko, J.S. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2991 (1976).
- 9) たとえば, 原子 A, B が結合していて, 原子 C が A に, D が B に結合しているとする. 結合 AB を軸とする Newman 投影に於て AC と BD がなす角がこれである. この角度の十の向きは適当に約束しておかなければならない.
- 10) K.T. Nakamura, Y. Urata, Y. Iitaka, F. Sawada, Y. Mitsui, *J. Biochem.*, **83**, 1239 (1978).
- 11) K. Sasaki, S. Dockrill, D. Adamnak, I.J. Tickle, T.L. Blundell, *Nature* (London), **257**, 751 (1975).
- 12) G.D. Fasman, 私信.
- 13) 実際には大粒の結晶を使うことにより, 低分子物質の場合の 10 分の 1 程度にふやすことができる.
- 14) “The Rotation Method,” edited by U.W. Arndt, A.J. Wonacott, North-Holland Publish. Co., New York, 1977.
- 15) J.C. Kendrew, G. Bodo, H.M. Dintzis, R.G. Porrih, H.W. Wyckoff, D.C. Phillips, *Nature* (London), **181**, 662 (1958).
- 16) R.E. Dickerson, I. Geis, “The Structure and Action of Proteins,” W.A. Benjamin Inc., London, 1969; 山崎 誠ほか訳 “タンパク質の構造と作用,” 共立出版, 東京, モダンバイオロジーシリーズ, 1972.
- 17) N. Tanaka, T. Yamane, T. Tsukihara, T. Ashida, M. Kakudo, *J. Biochem.*, **77**, 147 (1975).
- 18) Y. Satow, Y. Mitsui, Y. Iitaka, *J. Biochem.*, **84**, 897 (1978).
- 19) Y. Mitsui, Y. Satow, Y. Watanabe, Y. Iitaka, *J. Mol. Biol.*, **131**, 697 (1979).
- 20) 郷 信広, “タンパク質原子座標の情報処理プログラムシステム I, II,” 特定研究「学術情報」PSPCS 作成グループ, 1978; 郷 信広他, 蛋白質・核酸・酵素, **23**, 1336 (1978).
- 21) 三井幸雄, 渡辺祐一, “タンパク質専用幾何構造計算プログラム PBOND,” 1978.
- 22) 別府良孝, “タンパク質用図形表示プログラム NAMOD,” 1976.
- 23) 三井幸雄, 渡辺祐一, 浦田幸秀, 中村和郎, “タンパク質の図形表示のためのプログラム STDRAW, LSFIT の開発,” 第 6 回生体分子の討論会 (大阪) 予講集, p. 15, 1979.
- 24) S.C. Jain, H.M. Sobell, *J. Mol. Biol.*, **68**, 1 (1972).
- 25) H.M. Sobell, S.C. Jain, *J. Mol. Biol.*, **68**, 21 (1972).
- 26) 飯高洋一, “微生物のつくる生理活性ペプチド, 蛋白質・核酸・酵素臨時増刊,” 共立出版, 東京, 1976, p. 229.
- 27) 飯高洋一, “X 線解析 (物理測定技術 2),” 飯田修一, 大野和郎, 神前 熙, 熊谷寛夫, 沢田正三編, 朝倉書店, 東京, 1966, pp. 325—385.
- 28) 三井幸雄, “物理的測定 1 (統生物物理学実験講座 1),” 田仲二朗, 和田昭允編, 吉岡書店, 1967, pp. 43—60.
- 29) 森川耿右, 三井幸雄, “核酸実験法 (下) (蛋白質核酸酵素別刷),” 石浜 明, 岡崎令治, 京極好正, 西村暹編, 共立出版, 東京, 1973, pp. 204—218.
- 30) 三井幸雄, “タンパク質化学 3,” 安藤鋭郎, 今堀和友, 伊勢村寿三, 早石 修編, 共立出版, 東京, 1972, pp. 169—215.
- 31) R.E. Dickerson, “The Proteins,” ed. by H. Neurath, II, Academic Press, New York, 1964, pp. 603—778.

- 32) F.L. Suddath, G.J. Quigley, A. McPherson, D. Sneden, S.H. Kim, A. Rich, *Nature* (London), **248**, 20 (1974); J.E. Ladner, A. Jack, J.D. Robertus, R.S. Brown, D. Rhodes, B.F.C. Clark, A. Clark, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **72**, 4414 (1975).
- 33) G.A. Rodley, R.S. Scobil, T.H.T. Bates, R.M. Lewitt, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2959 (1976).
- 34) A.H.J. Wang, G.J. Quigley, F.J. Kolpak, J.L. Crawford, J.H. vanBoom, G. van der Narel, A. Rich, *Nature* (London), **282**, 680, (1979).
- 35) G.D. Brayer, L.T. Delbaere, M.N.G. James, *J. Mol. Biol.*, **131**, 743 (1979).
- 36) D. Blow, T. Steiz, *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 63 (1970).
- 37) J.D. Robertus, E.A. Alden, J.J. Birktoft, J. Kraut, J.C. Powers, P.E. Wilcox, *Biochemistry*, **11**, 2439 (1972).
- 38) Y. Mitsui, Y. Satow, Y. Watanabe, S. Hirono, Y. Iitaka, *Nature* (London), **277**, 447 (1979).
- 39) M. Laskowski, Jr., T.W. Sealock, "The Enzymes," ed. by P.D. Boyer, Academic Press, New York, 1971, III, pp. 375—474.
- 40) A. Rühlmann, P. Kukla, P. Schwager, K. Bartels, R. Huber, *J. Mol. Biol.*, **77**, 417 (1973).
- 41) D.M. Blow, J. Janin, R.M. Sweet, *Nature* (London), **249**, 54 (1974).
- 42) W.N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 277 (1980).
- 43) S. Hirono, K.T. Nakamura, Y. Iitaka, Y. Mitsui, *J. Mol. Biol.*, **131**, 855 (1979).
- 44) 三井幸雄, 蛋白質・核酸・酵素, **17**, 117 (1972).
- 45) F.M. Richards, H.W. Wyckoff, "The Enzymes," ed. by P. Boyer, vol. 4, Academic Press, New York, 1972, pp. 647—806.
- 46) J. Kraut, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 331 (1977).
- 47) 三井幸雄, 化学と工業, **32**, 407 (1979).
- 48) 三井幸雄, 渡辺祐一, 広野修一, 蛋白質・核酸・酵素, **24**, 14 (1979).
- 49) Y. Mitsui, K.T. Nakamura, Abstracts of the International Summer School of Biophysics, Kobe, p. 74, 1978.
- 50) Y. Mitsui, Y. Urata, K.T. Nakamura, M. Irie, *Biochem. Biophys. Acta*, **535**, 299 (1978).
- 51) プロテアーゼの場合, 基質としてのペプチド鎖上の切断されるペプチド結合から数えて C 末端側の残基を順に $P_1', P_2' \dots$ 残基と称し, N-末端側の残基は $P_1, P_2, \dots$ 残基と称する. これらの残基を収容する酵素表面上のポケットを, 夫々 $S_1', S_2' \dots$ サイトおよび $S_1, S_2 \dots$ サイトと称する. プロテアーゼの場合には, そのアミノ酸特異性は, 主として S_1 サイトによって決る.
- 52) R. Huber, W. Bode, *Acc. Chem. Res.*, **11**, 114 (1978).
- 53) 池中徳治, 三井幸雄, 飯高洋一, 広海啓太郎, "蛋白質の分子集合と機能," 浜口浩三, 小池正彦, 徳重正信編, 学会出版センター, 東京, 1979.
- 54) M.F. Perutz, サイエンス, 1979 年 2 月号, p. 16.
- 55) T. Heidmann, J. Changeux, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 317 (1978).
- 56) 友枝宗光, 三井幸雄, "細菌の解剖—分子レベルからみた回譜—," 水島昭二, 三浦謹一郎編著, 講談社サイエンティフィック, 東京, 1979, pp. 129—134.
- 57) Y. Mitsui, F.P. Dyer, R. Langridge, *J. Mol. Biol.*, **79**, 57, (1973).
- 58) S.C. Harrison, A.J. Olson, C.E. Schutt, F.K. Winkler, G. Bricogne, *Nature* (London), **276**, 368 (1978).
- 59) J.T. Finch, L.C. Lutter, K. Phodes, R.S. Brown, B. Rishton, M. Levitt, A. Klug, *Nature* (London), **269**, 29 (1977).
- 60) 若林健之, 蛋白質・核酸・酵素, **19**, 352 (1974).
- 61) Y. Mitsui, Y. Takeda, *Advances in Biophysics*, **12**, 1 (1979).
- 62) D. Engelman, P. Moore, *Scientific American*, **235**, No. 4, 44 (1976).
- 63) "薬物の構造活性相関, 化学の領域増刊 122 号," 構造活性相関懇話会編, 南江堂, 東京, 1979.
- 64) A. Albert, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **11**, 13 (1971).
- 65) M.S. Tute, *Adv. Drug Research*, **6**, 2 (1971).
- 66) C. Hansch, *Adv. Pharmacol. Chemotherapy*, **13**, 45 (1975).
- 67) D.A. Matthews, R.A. Alden, J.T. Bolin, D.J. Filman, S.T. Freer, R. Hamlin, M. Poe, M. Williams, K. Hoogsteen, N. Xuong, J. Kraut, *Science*, **197**, 452 (1977).
- 68) D.A. Matthews, R.A. Alden, J.T. Bplin, D.J. Filman, S.T. Freer, R. Hamlin, W.G.J. Hol. R.L. Kisliuk, E.J. Pastore, L.T. Plante, N. Xuong, J. Kraut, *J. Biol. Chem.*, **253**, 6946 (1978).
- 69) B.W. O'Malley, W.T. Schrader, *Scientific American*, **234**, 32 (1976).
- 70) H.L. Monaco, J.L. Crawford, W.N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 5276 (1978).
- 71) M. Levitt, C. Chothia, *Nature* (London), **261**, 552 (1976).
- 72) 文献 53) の中の徳重正信の論文, pp. 124—150, 今堀和友の論文, pp. 205—225 など.