

蛋白質分子の立体構造決定方法として、最近、核磁気共鳴法や電子顕微鏡などを用いる方法などが開発されつつあるが、現在では、実績もあり、また、解析精度も良いX線結晶解析法が最も有効な方法である。一般的なX線結晶解析の手順は、原理的にほとんど完成している。しかし、実際の解析に当たっては、困難な問題が山積し、他分野からの蛋白質構造解析の要求が増すにつれて、(1)結晶化や解析に時間がかかりすぎる、(2)解析結果の信頼度が不明である、(3)機能発現あるいは動的構造に対する直接的な情報が得られない、などX線結晶解析に対する問題点がいろいろと指摘されるようになってきた。そこで、これらの問題点が今日どのように解決されつつあるか、解析の手順にしたがって述べる。

蛋白質結晶とその同形置換体結晶の作製：一般的には、高分子量の蛋白質ほど大きな結晶が必要となる。今日では、必要な大きさ（分子量 20,000 程度の蛋白質で $0.3\text{mm} \times 0.3\text{mm} \times 0.3\text{mm}$ ）をもつ良質な結晶を試行錯誤の実験で得ている。最近、結晶表面への蛋白質分子の均一な供給を妨害する対流を除去するため、宇宙空間（微重力場）でリゾチームや β -ガラクトシダーゼなどを塩析法で結晶化し、地上の場合に比べて約30倍の大きさをもつ結晶を得ることに成功している。位相決定に必要な重原子同型置換体結晶の作製も、今のところ試行錯誤で検討する以外に方法がない。最近、1次構造の類似性が高い2つの蛋白質において、一方の立体構造が既知である場合、その既知構造を利用して他方の構造を解く分子置換法や、また、金属蛋白質の場合には、その分子中に存在する金属原子の異常分散効果を利用して構造を解く方法などが開発され、このような特別な場合には、重原子同形置換体結晶の作製の労から開放されるようになってきた。とくに、分子置換法は、部位特異性変異誘発による変異蛋白質の構造解析に威力を発揮するものと思われる。

回折強度データの収集：蛋白質結晶からのX線回折データの収集には1～3月の時間を要する。X線結晶解析で得られた構造は、強度データ収集に要した時間での平均構造であるといつてよい。このデータ収集時間を短縮するため、2次元X線検出器の開発が進められている。また、高輝度のX線発生機の開発も行なわれおり、最近では、シンクロトロン放射光の利用により、分単位でのデータ収集が可能になりつつある。

電子密度図の解釈と構造精密化：解析初期の電子密度分布図は解釈が困難で、時には誤った構造に導くことがある。最近、電子密度分布図を解釈して分子構造モデルを構築するのに、コンピュータ・グラフィックスが利用されるようになり、比較的短時間で正しい構造に到達できるようになってきた。電子密度図の解釈によって得られた構造はかなりの誤差を含んでいるため、その構造を精密化する必要がある。最近、ある制限下で最小2乗法を適用することによって、R因子を20%以下にまで、また、結合長及び結合角の理想値からのずれを、それぞれ100分の数Å及び数度ぐらいまでにすることができるようになり、構造の精度はかなり向上してきた。

このようにして決定された蛋白質の立体構造は、Brookhaven National Laboratory (U.S.A.) の ProteinData Bank に収録されているが、現在のところ、構造解析された蛋白質の数、また、解析に要する時間は他分野からの要求に応えるところまでにはいたっていない。しかし、最近のシンクロトロン放射光の発展により、蛋白質のX線結晶構造解析の様相も次第に変わりはじめた。その超高輝度、指向性、波長可変という特性が、微結晶による構造解析（分子量20,000の蛋白質で $0.03\text{mm} \times 0.03\text{mm} \times 0.03\text{mm}$ ）、巨大蛋白質や超分子の構造解析、さらには数秒の時間分割での回折データ収集による蛋白質の動的構造解析を可能にし、また、異常分散を利用した直接位相決定などを可能にしつつある。