

学位論文題名

A Study for Automatic X-ray Protein
Structure Analysis

(X線蛋白質結晶構造解析の自動化に関する研究)

学位論文内容の要旨

生体物質を研究するにあたり、その”性質”の研究と並行して、その”構造”を解析することが必要とされている。そして、毎年数多くの生体物質の構造解析が論文に報告されている。しかし、その数は、生体物質の遺伝情報の報告数から見るとまだ少ない。構造決定が非常に時間のかかる作業であることが原因である。本研究では、精密構造決定ではもっとも強力な手法であるX線結晶構造解析において、自動化がどれだけ可能であるかを述べている。

本論文は4章からなる。第1章において、X線結晶構造解析の概要を述べ、最近の新しい手法についても触れている。第2章において、X線反射情報の収集時に必要であろう幾つかのプログラムについて述べている。第3章において、X線回折の位相決定に関することを述べている。第4章において、多波長異常分散法という新しい手法による実験についての結果を述べている。以下に各章についての概要を述べる。

第2章では序論として、使用した座標系、測定装置について述べている。その他の部分は4つのセクションからなっている。X線回折実験を行い、データを収集するためには、その前に結晶の格子定数、測定座標系における方位を知る必要がある。古いスタイルの実験では、格子定数を決定するために、結晶の方位を測定座標系に合わせて設置して(軸立てをする)、何枚かの写真を撮影するという方法を用いる。しかしこの作業は時間が掛かり、また結晶のX線による損傷が大きい場合には最良の方法ではない。そこで、軸立てしていない結晶の静止回折イメージを、蛋白質結晶の場

合2枚、低分子結晶の場合10数枚撮影し、このイメージよりそれぞれの回折点の逆格子点座標を求め、格子定数、結晶方位を決定するソフトウェアを作成した。数種の低分子結晶の格子定数を決定することが可能であった。また蛋白質結晶（ヒト白血球マクロファージ遊走阻止因子）においても有効であることがわかった。しかし、このソフトウェアにより決定された格子定数は結晶の対称性を満足していないことがある。そこで、任意の格子定数からそれに対応する既約格子に変換し、この格子定数より可能なブラベ格子定数を求めるソフトウェアを作成した。また、蛋白質結晶は空気中に放置すると崩壊する。そこで、回折データ測定において結晶はガラスキャピラリーに結晶化の母液と共に封印される。そのため、データ収集時に、結晶に溶液が付き、結晶方位が多少変わることがある。その様なときに、測定時に対処する方法と測定終了時に対処する方法について述べている。

第3章において、位相決定について述べている。結晶の構造を決定するためには一つ以上の同型置換結晶を得る必要がある。同型置換誘導体を得るためには、重原子化合物溶液に結晶を浸す方法（侵漬法）と、一緒に結晶化する方法（共結晶法）が用いられる。一般に侵漬法は同型性を保ちつつ、結晶中に重原子が拡散するために、良いと考えられている（それでも完全な同型性を達成することは難しい）。しかし、その反面、重原子との結合部位に重原子が到達することが結晶格子により妨げられるので重原子は付きにくくなる。共結晶法は重原子の結合は十分に起こるが、同型性を達成することが難しい。最近、放射光により短波長でのデータ収集を行うことが計画されている。そこで、共結晶法により得られた非同型重原子誘導体を短波長（0.3Å）と吸収端付近のデータ収集を行うことによる構造解析の可能性について研究した。また、重原子位置を自動決定するソフトウェアの試作を行った。

第4章においては、セレノメチオニンを用いた多波長異常分散法による蛋白質のデータ収集を行いその結果を述べている。実験には、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）を用いた。これは、今までに構造解析されたことのない蛋白質である。ヒト白血球由来、ラット肝臓由来のものについて結晶化（NATIVE）を試み、X回折実験可能なサイズであり、またX線による損傷も少ない良好な結晶を得ることに成

功した。これと同時に、メチオニンをセレノメチオニンに置換した蛋白質の結晶化 (S E) 実験を行い、同様の条件で N A T I V E 結晶と同型の結晶を得た。先のソフトウェア等により、これらの格子定数、空間群を決定した。非対称単位に含まれる分子数の少ないラット肝臓由来六方晶型の結晶を多波長異常分散法実験に用いた。データの収集のほとんどは高エネルギー物理学研究所の放射光実験施設で行った。モノクロメータは S i (1 1 1) 面を用いた。データ収集に先立ち、結晶からの蛍光 X 線を測定し、吸収端付近のデータ収集波長を決定した。最終的に 0.900、0.973、0.981、1.100 Å の 4 波長それぞれにおいてデータ収集を行った。データ収集は、結晶の c 軸を測定装置の回転軸に合わせ、1 枚のイメージにバイフット対が同時に記録される条件で、巨大ワイセンベルグカメラとイメージングプレートを使用して行った。予想される強度変化と実際の強度変化の比較より、測定時のノイズの影響が大きいことがわかった。これらのデータを用いて計算した差パターンマップ (各種 S E データと N A T I V E の差) とバイフット差パターンマップ (S E、0.973 Å) は共通のピークを持っていた。これらより、セレン原子の位置を 4 個決定することに成功した。予想されるセレン原子は 1 2 個であり、残りのセレン原子位置は決定されていない。セレン原子の異常分散効果による強度変化は小さく、これを正確に見積もることが非常に重要である。今回は、非対称単位に 1 2 個のセレン原子を含んでおり、そのために差パターソンの解釈を困難にしていると考えられる。今回の実験では蛋白質の位相を決定することは出来なかったが、ここで得られた経験はこれ以後の結晶構造解析の自動化に役立つものと期待できる。

付録 1 として、格子定数決定ソフトウェアにより格子定数を決定した低分子の構造について述べている。

付録 2 として、第 3 章で議論している重原子位置自動決定のためのソフトウェアを載せている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 引 地 邦 男
副 査 助 教 授 佐 々 木 直 樹

学 位 論 文 題 名

A Study for Automatic X-ray Protein Structure Analysis

(X線蛋白質結晶構造解析の自動化に関する研究)

生体物質を研究するにあたり、その”性質”の研究と並行して、その”構造”を解析することが必要とされている。毎年数多くの生体物質の構造解析が論文に報告されているが、しかしその数は、生体物質の遺伝情報の報告数から見るとまだ少ない。構造決定が非常に時間のかかる作業であることが原因である。本研究では、精密構造決定ではもつとも強力な手法であるX線結晶構造解析において、自動化がどれだけ可能であるかを述べている。本論文は4章からなる。第1章において、X線結晶構造解析の概要を述べ、最近の新しい手法についても触れている。第2章において、X線反射情報の収集時に必要となる幾つかのプログラムについて述べている。第3章において、X線回折の位相決定に関することを述べている。第4章において、多波長異常分散法による実験についての結果を述べている。第2章は4つのセクションからなっている。X線回折実験を行い、データを収集するためには、その前に結晶の格子定数、測定座標系における方位を知る必要がある。古いスタイルの実験では、格子定数を決定するために、結晶の方位を測定座標系に合わせて設置して(軸立てをする)、何枚かの写真を撮影するという方法を用いる。しかしこの作業は時間が掛かり、また結晶のX線による損傷が大きい場合には最良の方法ではない。そこで、軸立てしていない結晶の静止回折イメージを、蛋白質結晶の場合2枚、低分子結晶の場合10数枚撮影し、このイメージよりそれぞれの回折点の逆格子点座標を求め、格子定数、結晶方位を決定するソフトウェアを作成した。数種の低分子結晶の格子定数を決定することが可能であった。また蛋白質結晶(ヒト白血球マクロファージ遊走阻止因子)においても有効であることがわかった。しかし、このソフトウェアにより決定された格子定数は結晶の対称性を満足していないことがある。そこで、任意の格子定数からそれに対応する既約格子に変換し、この格子定数より可能なブラベ格子定数を求めるソフトウェアを作成した。また、蛋白質結晶は空気中に放置すると崩壊する。そこで、回折データ測定において結晶はガラスキャピラリーに結晶化の母液と共に封印される。そのため、データ収集時に、結晶に溶液が付き、結晶方位が多少変わることがある。その様なときに、測定時に対処する方法と測定終

