

学位論文題名

Development of the X-ray Diffraction Data
Collection System Using Imaging Plate(イメージングプレートを利用したX線回折データ
迅速収集システムの開発と応用)

学位論文内容の要旨

蛋白質の立体構造解析の最も有効な手段であるX線回折法は、コンピュータの急速な発展と共に、大幅な迅速化が進められてきている。現在では、X線回折に適用できる蛋白質の結晶を得てから構造解明まで、順調に進めば一年以上で行なえる場合もある。また、分子置換法を使えば1-2週間で構造を得る可能性もある。しかし、現在までに三次構造が解明された蛋白質は、一次構造の決定された蛋白質の数の50分の1しかない。この差が生物化学の多くの分野の発展を妨げている。蛋白質の化学的あるいは物理的反応を決定するのは三次構造であり、一次構造から三次構造を推定する方法は、現在のところ、確立していないからである。従って、三次構造解析法のさらなる迅速化が要求されている。

通常、X線構造解析には、結晶化；結晶学的なデータ（格子定数、空間群など）の決定；X線回折データの測定；位相の決定；電子密度図の解明；分子モデルの精密化という6つのステップがある。その内で、X線回折に適用できる結晶が得られてから、構造決定までの最も基本的な段階が良い回折データの収集である。蛋白質結晶のX線回折の特徴は、(a) 結晶水と原子の数が多いので回折強度が弱い；(b) 結晶のdisorderがあるので分解能が比較的低い；(c) 格子定数が長いので回折反射の密度が高い；(d) X線の露光による結晶の損傷が著しい等である。それらの特徴の為に、感度が良い二次元検出器を持つ迅速データ収集システムが必要とされる。その為に、我々は株式会社マックスサイエンスと共同して高感度のイメージングプレート(IP)を利用し

た三つのタイプの実験室用の自動回折計とそのソフトウェアシステム (ELMS, WELMS)を開発した。この三つのタイプの回折計は、振動フィルムタイプの DIP-100 ; 可変スクリーン付きのワイセンベルグタイプの IPD-WAS ; κ -goniometer付き、検出器-結晶距離可変の新ワイセンベルグタイプの DIP-R300である。これらのソフトウェアシステムには次の機能がある :

(1) 結晶方位の自動決定。

X線回折データ測定法には、結晶の軸立てをしない方法と軸立てをする方法の二つがある。前者はブラインドリジョンが小さい、独立なデータの測定が早い等の利点がある。後者はワイセンベルグタイプの装置に使われるだけではなく、測定したい領域を選んで測定でき、フリーデル対を同時に測定できるので重原子結晶のチェック及び異常分散の効果を正確に測定することに有効である。いずれの方法で測定しても、回折強度の積分の為には、結晶の方位を決定しなければならない。結晶方位の決定には、格子定数に基づいて、2反射法により行う。DIP-100のELMSとDIP-R300のWELMSでは、90度離れた2枚の静止写真から得られた逆空間ベクトルを使い、IPD-WASのWELMSでは、振動写真とワイセンベルグ写真から得られた逆空間ベクトルを使う。この機能を利用して回折データ測定開始までの時間を大幅に減少し、強度の積分計算にも便利になった。

(2) パラメータの精密化に対する、eigenvalue filtering法の適用。

IPに記録した回折反射の位置を計算し、その反射強度を正確に積分するためには、装置に関連する(カメラセッティング)パラメータ、各々の結晶に関連する格子定数、方位などのパラメータを正確に求めなければならない。それらのパラメータは、通常、最小二乗法により精密化される。しかし、パラメータの間の相関の為に、精密化が発散或いは間違ったパラメータに収斂することがある。eigenvalue filtering法は、最小2乗法のマトリックスのeigenvalueとeigenvectorよりパラメータ間の線形結合を求め、誤差に大きな影響を与えるパラメータのみを精密化することで、収斂を容易にする。WELMSシステムの精密化に、eigenvalue filtering法を適用することで、カメラセッティング、格子定数、結晶方位等のパラメータが正確に精密化できるようになり、また、収斂範囲も広がった。

(3) 波長 $K\alpha_1$ と $K\alpha_2$ のsplitの問題の処理。

これは実験室のX線発生機には避けることができない問題である。我々が実験室で使っているX線の波長は $K\alpha_1$ と $K\alpha_2$ の2つの波長よりなる。低分解能でのデータ収集には問題ないが、高分解能のデータを測定する場合には、二つの波長による反射スポットの分離が無視できなくなる。ELMSとWELMSシステムの反射強度の積分計算には、スポットの分離のプロセスを導入し、データの質を改良する事ができた。

(4) κ -goniometerを利用した自動結晶軸立て機能及びコンピュータグラフィクスによる支援システム。

上述のように蛋白質回折データ測定には軸立ての方法がある。ワイセンベルグタイプのDIP-R300回折装置では、軸立ての為に κ -goniometerを利用した。 κ -goniometerは結晶の方位を自由に変えることできる上に、 χ -circleのような結晶の回りの邪魔もないので、結晶の上方に冷却等の装置を付けることができる。しかし、 κ -goniometerは動きが幾何学的に複雑であり、直観的にわかりにくい。私たちは3次元のコンピュータグラフィクスを利用して、 κ -goniometerの動きをシミュレーションし、上述(1)のプログラムと共に自動軸立てをし、データ測定開始までの時間を大幅に減少させることができた。

X線回折データ迅速収集システムの開発と共に、三つのタンパク質の構造解析を行った。この三つの蛋白質は、ハトリゾチーム、イヌリゾチームとACCデアミネースである。ハトリゾチームの3Å、イヌリゾチームの2.5ÅのデータをDIP-100で測定し、それぞれのマーキングRは7.46%と6.4%であった。イヌリゾチームとACCデアミネースの空間群と格子定数はDIP-100を利用して決定された。ハトリゾチームとイヌリゾチームの構造解析には分子置換法を利用し、ACCデアミネースには重原子同型置換法を使った。ハトリゾチームの2Å分解能での構造の精密化の結果、最終R値は20.3%に収斂した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 田中 勲

主査 教授 引地 邦男

副査 教授 新田 勝利

学位論文題名

Development of the X-ray Diffraction Data Collection System Using Imaging Plate

(イメージングプレートを利用したX線回線データ
迅速収集システムの開発と応用)

蛋白質の立体構造解析の最も有効な手段であるX線回折法は、コンピュータの急速な発展と共に、大幅な迅速化が進められてきている。現在では、X線回折に適用できる蛋白質の結晶を得てから構造解明まで、順調に進めば一年以下で行なえる場合もある。また、分子置換法を使えば1-2週間で構造を得る可能性もある。しかし、現在までに三次構造が解明された蛋白質は、一次構造の決定された蛋白質の数の50分の1しかない。この差が生物化学の多くの分野の発展を妨げている。蛋白質の化学的あるいは物理的応答を決定するのは三次構造であり、一次構造から三次構造を推定する方法は、現在のところ、確立していないからである。従って、三次構造解析法のさらなる迅速化が要求されている。

通常、X線構造解析には、結晶化；結晶学的なデータ（格子定数、空間群など）の決定；X線回折データの測定；位相の決定；電子密度図の解明；分子モデルの精密化という6つのステップがある。その内で、X線回折に適用できる結晶が得られてから、構造決定までの最も基本的な段階が良い回折データの収集である。蛋白質結晶のX線回折の特徴は、(a)結晶水と原子の数が多いため回折強度が弱い；(b)結晶のdisorderがあるので分解能が比較的低い；

(c)格子定数が長いので回折反射の密度が高い；(d)X線の露光による結晶の損傷が著しい等である。それらの特徴の為に、感度が良い二次元検出器を持つ迅速データ収集システムが必要とされる。この研究では高感度のイメージングプレート(IP)を利用した自動回折計とそのソフトウェアシステムを開発した。開発したシステムは次の機能を持つ。

(1)結晶方位の自動決定。
X線回折データ測定法には、結晶の軸立てをしない方法と軸立てをする方法の二つがある。前者はブラインドリジョンが小さい、独立なデータの測定が早い等の利点がある。後者はワイセンベルグタイプの装置に使われるだけでなく、測定したい領域を選んで測定でき、フリーデル対を同時に測定できるので重原子結晶のチェック及び異常分散の効果も正確に測定することに有効である。いずれの方法で測定しても、回折強度の積分の為に、結晶の方位を決定しなければならぬ。結晶方位の決定は、90度離れた2枚の静止写真から得られた逆空間ベクトルを使用する方法の他に、この研究では振動写真とワイセンベル

グ写真から得られた逆空間ベクトルを使う方法を新たに開発した。この機能を利用することで回折データ測定開始までの時間は大幅に減少し、強度の積分計算にも便利になった。

(2) パラメータの精密化に対する、eigenvalue filtering法の適用。
IPに記録した回折反射の位置を計算し、その反射強度を正確に積分するためには、装置に関連する(カメラセッティング)パラメータ、各々の結晶に関連する格子定数、方位などのパラメータを正確に求めなければならない。それらのパラメータは、通常、最小二乗法により精密化される。しかし、パラメータの間の相関の為に、精密化が発散したり間違ったパラメータに収斂することがある。eigenvalue filtering法は、最小2乗法のマトリックスのeigenvalueとeigenvectorよりパラメータ間の線形結合を求め、誤差に大きな影響を与えるパラメータのみを精密化することで、収斂を容易にする。このシステムの精密化にこのeigenvalue filtering法を適用することで、カメラセッティング、格子定数、結晶方位等のパラメータが正確に精密化できるようになり、また、収斂範囲を広げること成功した。

(3) 波長 $K\alpha 1$ と $K\alpha 2$ のスプリットの問題の処理。
通常実験室で使っているX線の波長は $K\alpha 1$ と $K\alpha 2$ の2つの波長よりなる。低分解能でのデータ収集には問題ないが、高分解能のデータを測定する場合には、二つの波長による反射スポットの分離が無視できなくなる。システムの反射強度の積分計算には、スポットの分離量を見積り、これを考慮する方法を考案し、特に高分解能でのデータの質を改良する事に成功した。

(4) κ -goniometerを利用した自動結晶軸立て機能及びコンピュータグラフィクスによる支援システム。

上述のように蛋白質回折データ測定には結晶の軸立てをした後に行う場合がある。ワイセンベルグタイプの回折装置(DIP-R300)では、軸立ての為に κ -goniometerを利用した。 κ -goniometerは結晶の方位を自由に交えることできる上に、 χ -circleのような結晶の回り障害物も小さいので、結晶の上方に冷却等の装置を付けることができる。しかし、 κ -goniometerは動きが幾何学的に複雑であり、直観的にわかりにくい。この研究では3次元のコンピュータグラフィクスを利用して、 κ -goniometerの動きをシミュレーションし、上述(1)のプログラムと共に自動軸立てをし、データ測定開始までの時間を大幅に減少させることに成功した。

開発したX線データ迅速収集システムは、三つのタンパク質、ハトリゾチーム、イヌリゾチーム、ACCデアミネースのデータ収集に応用された。

本論文は、イメージングプレートを利用した新しい蛋白質回折計の開発について述べたものである。開発されたシステムは、イメージングプレートを利用した初めての蛋白質回折計であるばかりでなく、上述の多くの新しい機能が組み込まれている。このシステムの開発は、蛋白質結晶のデータ収集を高速化し、また高精度のデータ収集を可能にしたものであり高く評価される。審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を得る十分な資格があるものと認めた。