

Title	High-resolution X-ray crystal structure analysis of bovine H-protein and the treatment of diffraction data
Author(s)	Higashiura, Akifumi
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/1069">http://hdl.handle.net/11094/1069</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	ひがし 東 浦 彰 史
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24124 号
学位授与年月日	平成22年6月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科高分子科学専攻
学位論文名	High-resolution X-ray crystal structure analysis of bovine H-protein and the treatment of diffraction data (Bovine由来H-proteinの高分解能X線結晶構造解析とその回折強度データの取り扱い)
論文審査委員	(主査) 教授 中川 敦史 (副査) 教授 青島 貞人 教授 栗栖 源嗣 教授 山本 仁

### 論文内容の要旨

近年、X線結晶構造解析によって得られる蛋白質の立体構造の分解能は高輝度かつ低発散角のシンクロトロン放射光の建設、高感度・大面積の検出器の開発、放射線損傷を軽減するための極低温でのX線回折実験の導入、様々な結晶化方法の改良や構造精密化等のアルゴリズムの改善などにより徐々に向上している。分解能の向上に伴い、異方性温度因子の導入、蛋白質主鎖・側鎖のマルチコンフォメーションや溶媒分子のモデル化など、精度の高い構造精密化を行うことが可能となる。高分解能回折強度データを用いた精度の高い構造精密化により、その電子数の少なからX線結晶構造解析では観測が困難であるとされている水素原子の電子密度を観測することも可能となる。現在、蛋白質の立体構造のデータベースである Protein Data Bank にはX線結晶構造解析により決定された立体構造が2010年4月現在約60,000件登録されている。しかし、原子分解能である1.0 Å分解能を超える立体構造の登録数は全体の約0.6%程度であり、0.9 Å分解能を超える立体構造に至っては全体の約0.2%に過ぎない。1.0 Å分解能から0.9 Å分解能へと分解能が0.1 Å改善されることにより、測定可能となる回折強度のデータ数は約1.4倍となり、より正確な構造精密化が可能となる。以上のように、高分解能での立体構造解析の優位性は明らかであるが、その構造解析例が極端に少ないのが現状であり、より多くの高分解能でのX線結晶構造解析の例が望まれている。本研究では蛋白質の高分解能X線結晶構造解析の方法論の確立を目指し、高分解能でのX線結晶構造解析を行い、その回折強度データの取り扱い方法の最適化を行った。

高分解能X線結晶構造解析のモデル蛋白質としてグリシン開裂酵素系の構成蛋白質である Bovine 由来 H-protein を用いた。大腸菌発現系により大量に得られた H-protein を高純度に精製し、ミクローニング法を用いた結晶化によって高分解能のX線回折を生じる結晶を再現性よく得ることに成功した。高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory のビームライン BL-5A でX線回折実験を行い、0.88 Å分解能のX線回折強度データを収集し、bovine 由来 H-protein の構造決定に成功した。この立体構造は報告されている他の種由来の H-protein の中で最も高い分解能であった。得られ

た高分解能の電子密度では約40%の水素原子を観測することができた。ここで得られた最終構造を用いて、回折強度データの取り扱い方法の最適化を行った。回折強度データの最適化に際して、水素原子の可視化率を利用したデータの評価方法を提唱し、従来の方法では判別できなかったデータの優位性を明らかにすることが可能となった。さらに、高分解能のX線結晶構造解析において、低分解能領域の回折強度データが水素原子の可視化に重要であることを定量的に示すことに成功した。

### 論文審査の結果の要旨

近年の蛋白質X線結晶構造解析における様々な方法論の進歩に伴って、1Åを超える超高分解能の立体構造解析が行われるようになってきた。分解能の向上に伴い、異方性温度因子の導入、蛋白質主鎖・側鎖のマルチコンフォメーションや溶媒分子のモデル化など、精度の高い構造が得られるようになり、さらに蛋白質の動的な構造情報も得られるようになってきた。しかし、現時点では、原子分解能である1.0 Å分解能を超える立体構造の蛋白質立体構造データバンク(PDB)への登録数は全体の約0.6%程度であり、0.9 Å分解能を超える立体構造に至っては全体の約0.2%に過ぎない。超高分解能の構造解析例が非常に少ない最大の理由は超高分解能の回折点を与える良質の結晶を得ることが困難なためであるが、それに加えて、検出器のダイナミックレンジなどの技術的な限界により、超高分解能の回折強度データを高精度に収集・処理することが難しく、データの精度を定量的に判断する手法が確立されていないという問題もあった。

本研究では、グリシン開裂酵素系で働く蛋白質 H-protein の0.88Å分解能の構造解析を行った。この構造解析を通して、0.9Åを超える超高分解能の回折強度データ収集を行い、さらに水素原子の可視化率を指標とすることにより回折強度データの精度を正しく判断することができることを示した。これに加えて、水素の可視化を基準とした回折強度データの評価方法により、高分解能のX線結晶構造解析において、高分解能領域の回折強度データのみならず、低分解能領域の回折強度データが水素原子の可視化に重要であることを定量的に示した。

本研究は、単に1つの蛋白質の超高分解能の構造解析に成功したというだけでなく、超高分解能の構造解析に必要な高精度なデータ処理方法を確立したという点が重要である。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。