



Title	Development of new program to acquire X-ray diffraction data free from the radiation damage
Author(s)	平田, 邦生
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45091
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	平 田 邦 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 18221 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 12 月 22 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	Development of new program to acquire X-ray diffraction data free from the radiation damage (X 線による損傷を抑えた回折強度データ収集のためのプログラム開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 月原 富武 (副査) 教 授 福山 恵一 教 授 中川 敦史 助教授 楠木 正巳

論 文 内 容 の 要 旨

ウシ心筋由来チトクロム酸化酵素の研究では、活性中心 heme_{a3}-Cu_B 間の配位子の化学種について様々な議論があり、構造解析でそれを決定する試みが重要となっていた。

最近、SPring-8 BL44XU (蛋白質研究所ビームライン) において本酵素の酸化型結晶に放射光を露光するとその結晶吸収スペクトルが変化することが確認された。この変化は、本酵素の活性中心あるいは他の部位での微小な構造変化も可能性として秘めていた。これまでの本酵素の酸化型結晶構造はいずれも放射光施設 (Photon Factory (筑波) 及び SPring-8) で収集したデータから得ていたため、本来の酸化型の結晶構造を観測していない可能性があった。我々は放射光による損傷のない酸化型結晶構造を得るために、極低温下に結晶サンプルにおいてデータ収集、波長を短くしてデータ収集、ラジカルスカベンジャー共存下でのデータ収集を行ったが吸収スペクトル変化は抑えることができなかった。

そこで、結晶の吸収スペクトル変化を最小限に抑えるために結晶に対する露光時間を抑えてデータ収集を行うことを考えた。結晶に対する放射光の露光時間を通常の (5 sec./0.5 deg.) から (1 sec./0.6 deg.) に抑え、1 度 X 線を照射した結晶からは 2 度とデータ収集をしないという実験を計画した。この方法で X 線による損傷を最小限に抑えた本酵素の酸化型結晶構造を得ることを目指した。

この方法を用いるにあたって 2 つの問題点が浮上する。1 つ目の問題点は、1 つの結晶から得ることのできる一枚の回折強度データの振動領域が、不連続であるため、構造解析に必要な完全反射強度が、極端に減少すること。2 つ目は、隣接した振動領域のデータを利用して結晶パラメータを精密化する従来法を用いることが、不可能であること。これらの問題点を解決するプログラム SCLONE を開発し、構造解析を行った。

開発したプログラム SCLONE を用いて、1 秒露光 1 枚のイメージを複数の結晶から得てデータを処理した結果、176 枚の独立した振動領域の回折強度データから結晶構造を得ることに成功した。この酸化型結晶構造は分解能 2.6 Å で決定され、その電子密度図から heme_{a3} と Cu_B の間に過酸化物が存在していることがわかった。この過酸化物は、これまでに決定されていた酸化型結晶構造の中にも存在しており、X 線による損傷によってその結晶構造が変化することがないことが示唆された。さらに、X 線による損傷を受けた過酸化物の電子密度を、放射光の露光時間の違いに

よって定量的に検討したところ、X線の露光時間が延びれば延びるほど、過酸化物の電子密度は低くなっていくことが判明した。

論文審査の結果の要旨

平田君の論文は、蛋白質結晶がX線損傷を受ける場合、その影響を最小限に抑えた回折強度測定を行い、そのデータ処理を行うプログラム開発に関するものである。通常、回折強度データは1個の結晶で連続した振動範囲を寄せ集めて収集している。X線損傷を避けるため1個の結晶で狭い範囲の1枚の振動写真を撮り、多数の結晶を使って強度を記録し、互いに独立な回折イメージを処理するプログラムを開発した。

チトクロム酸化酵素の酸化型結晶はその活性中心にある化学種が何であるかが、大きな問題になっていた。また、この酵素はX線を当てるとスペクトルが変化することも確認していた。そこで、多数の結晶を用いて、データ収集を行い、このプログラムを使用してX線損傷を受けていない構造では、活性中心にはパーオキシドがあることを決定した。よって、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。