



Title	X-ray Structure Analysis of Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex
Author(s)	Kawamoto, Masahide
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3109894
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	かわもと まさひで 河 本 正 秀
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 2 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	X-ray Structure Analysis of Bovine Heart Mitochondrial Cytochrome <i>bc₁</i> Complex (ウシ心筋のチトクロム <i>bc₁</i> 複合体の X 線構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福山 恵一 (副査) 教 授 長谷 俊治 教 授 月原 富武

論 文 内 容 の 要 旨

チトクロム *bc₁* 複合体はミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖電子伝達酵素複合体のひとつである。この酵素は 4 つの酸化還元中心を持ち、哺乳類のものでは互いに異なる 11 個のサブユニットから構成される分子量約 23 万の膜タンパク質超分子複合体である。この酵素は呼吸鎖においてユビキノールからチトクロム *c* へ電子を伝達し、それに共役してミトコンドリア内膜を介した水素イオンの能動輸送を行う。この電子伝達と水素イオンの能動輸送の共役機構の解明には、酸化還元中心の位置などの立体構造に基づく情報が不可欠である。そこでこの酵素の立体構造決定を目的とし、ウシ心筋のチトクロム *bc₁* 複合体の結晶化及び X 線結晶構造解析を行った。

ウシ心筋チトクロム *bc₁* 複合体はいくつかのグループで結晶化されている。当研究グループでは、リン酸カリウム緩衝液系 (pH8.0) で沈殿剤としてポリエチレングリコール 4000 を用いることで六角柱状の結晶を得ることに成功している。しかし回折強度の分解能が 7 Å 程度と低く、酵素の精製ロットによっては多結晶や X 線回折能をほとんど示さない結晶しか得られないなど、得られる結晶の質に問題があった。そこでより良質の結晶を得るために本酵素の結晶化条件の検討を行なった。2 価金属陽イオンの結晶化に対する効果を調べたところ、亜鉛イオンが結晶化に非常に有効であることがわかった。結晶化溶液に添加物として亜鉛イオンを加えることで、酵素の精製ロットに依らず外形の整った単結晶を得ることができた。高エネルギー物理学研究所放射光実験施設 BL 6 A に設置された巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いて、この結晶の回折強度データを収集した。亜鉛を加えた結晶では、亜鉛を加えない結晶で見られた異なる精製ロット間での結晶の同型性の違いが若干減少していた。また回折強度の分解能が 5 ~ 6 Å と向上していた。

この亜鉛存在下での結晶を用いて浸漬法による重原子誘導体結晶の調製を試みた。重原子試薬の種類や濃度、時間などの浸漬条件を変えて重原子誘導体結晶を調製し、それらの X 線回折実験と回折強度測定を行なった。0.5mM リンタングステン酸溶液を含む溶液に 2 時間浸漬した結晶は、ネイティブ結晶よりも高い 4 ~ 5 Å 分解能の回折を示した。この「リンタングステン酸」処理を回折強度測定や重原子誘導体結晶の調製の前処理として行なうことで、より高分解能の回折強度の収集ができると期待された。しかし、「リンタングステン酸」処理した結晶はネイティブ結晶よりもモザイク幅が高くなり、十分な精度で回折強度を収集することはできなかった。

これらの回折強度データを用いて差パターン関数を計算した結果、テトラキス (アセトキシ水銀) メタンとヘキサモリブド塩酸の 2 種類の重原子溶液に浸漬した誘導体結晶について、重原子由来と思われるピークを得ることがで

きた。D-フーリエ合成を用いて水銀化合物、モリブデン化合物ともに3コの結合位置を特定できた。重原子パラメータの精密化と位相の計算をプログラムパッケージ PHASES を用いて多重同型置換法により行なった。8 Å 分解能までの6074回折点について位相を計算した。このときの平均の Figur of merit は0.429であった。ネイティブ結晶と誘導体結晶の間で同型性が完全には保たれていなかったため、計算された位相の精度が低く、得られた電子密度図からは分子領域を判別することはできなかった。そこで電子密度修飾法による位相改良を試みた。

電子密度修飾法のうち、溶媒平滑化法と非結晶学的対称分子平均化法を併用して改良を行なった。この酵素は電顕観察からダイマーを構成しているとされている。また結晶の V_m 値や自己回転関数の計算結果から、この酵素は結晶の非対称単位中に2分子（1ダイマー）存在することが示唆されている。まず多重同型置換法で得られた電子密度に対して溶媒平滑化法を適用した。溶媒平滑化後の電子密度図では結晶中での分子領域を判別することができた。この電子密度図から1ダイマーと思われる部分を切り出して、それをP1結晶格子として F_c を計算し、自己回転関数を計算した。この結果から非結晶学的2回軸の方向を決定することができた。この値を用いて非結晶学的対称分子平均化法と溶媒平滑化法を並行して行なった。この位相改良の結果、R値は0.453から0.310まで減少し、ダイマーを構成する2分子間の相関係数は約0.7となった。

電子密度修飾法による位相改良後の電子密度図から得られた酵素の構造は、松下国際研の秋葉らによって報告されているウシ心筋チトクロム bc_1 複合体の13 Å 分解能低温氷包埋電顕解析から得られた構造と非常に似ており、現在その構造比較を行なっている。

論文審査の結果の要旨

本研究では、ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達複合体であるチトクロム bc_1 複合体をとりあげ、この複合体のX線解析に適した結晶、およびその重原子誘導体を調製した。さらにこれらのX線回折データの解析から8 Å 分解能の電子密度を得ることに成功した。以上のように本論文は、本酵素複合体の立体構造を明らかにすると共に、エネルギー変換機能の解析のための、今後のより高分解能解析の基盤を作ったことで、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。