

Title	還元型チトクロームC（カツオ心筋）のX線結晶構造解析（6Å分解能）
Author(s)	杉原, 耿雄
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30079
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 6 】

氏名・(本籍)	すぎ 杉 原 耿 雄
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1921 号
学位授与の日付	昭 和 45 年 3 月 30 日
学位授与の要件	理学研究科高分子学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	還元型チトクローム C (カツオ心筋) の X線結晶構造 解析 (6Å 分解能)
論文審査委員	(主査) 教授 角戸 正夫 (副査) 教授 森本 信男 教授 田所 宏行

論 文 内 容 の 要 旨

生体が必要とするエネルギーの大部分は、ATPの加水分解の際に放出される自由エネルギーによりまかなわれるが、ATPの合成は基質レベルリン酸化反応と呼吸鎖リン酸化により行われる。呼吸鎖リン酸化反応では、基質からの電子は生体内の呼吸鎖、すなわち電子伝達系内の多数の電子伝達成分の間を逐次移動して、最終的な電子受容体である酸素を還元するので、この過程で伝達成分間のいくつかの酸化還元反応とリン酸化とが共役しATPが合成される。チトクロームCは、ヘムCを補欠分子族とする、分子量約13,000の塩基性蛋白質であり、電子伝達系の1成分である。電子伝達の過程で、ヘムC中の鉄は2価—3価の状態をくりかえすが、原子価の変化にともなって蛋白部分のコンホメーションやヘムの蛋白部分に対する方向が変わることが、旋光分散、円二色性、熱安定性、pH安定性、蛋白分解酵素や化学修飾に対する抵抗性、その他種々の性質の相違から示唆されてきた。しかし分子の形や大きさ、コンホメーションの具体的な相違は明らかにされていない。2つの酸化状態のチトクロームCの構造をX線回折により明らかにすることは、ATP合成や電子伝達のメカニズムをさぐる上で、また、その構造を同じヘム蛋白質ではあるが分子状酸素を運搬・貯蔵するヘモグロビン・ミオグロビンの構造と比較する意味で、興味深い。チトクロームCは動物の心筋に比較的多く含まれており、カツオの心臓を原料とし、まず還元型チトクロームCを解析の対象とした。ごく最近、馬心筋から抽出した酸化型チトクロームC結晶の構造がX線回折により2.8Å分解能のレベルで明らかにされ、ヘムの環境や蛋白質部分のコンホメーションの特徴が明らかにされた(Dickersonら)。カツオのチトクロームCの立体構造の解明は更に種による構造の差を明らかにする意義も含んでいる。チトクロームCの抽出は主としてMargoliashらの方法により、結晶化は萩原らの方法に従って行った。還元型結晶は橙赤色板状結晶で空間群は $P2_1Z_12_1$ 、格子常数は $a=57.54$, $b=84.71$, $c=37.74\text{\AA}$, $z=8$ である。

Bragg 角の小さな反射 ($\theta < 10^\circ$) のうち, h が奇数の反射は系統的に弱く, 低分解能の解析では, 近似的に $P22_12_1$ の対称性をもつものとして扱うことができる。本解析では, $P22_12_1$, $a=28.77$, $b=84.71$, $c=37.74\text{\AA}$, $z=4$ とみなした。反射の位相を決めるには少くとも 2 つの重原子同型置換体が必要であるが, $K_3UO_2F_5$ と K_2PtCl_4 が良い置換体を作ることがわかった。格子常数の変化は 0.3 %以内である。Cu-K α を用い, シンチレーションカウンタを備えた 4 軸型自動回折計で ω スキャン法により強度測定を行った。生の結晶と重原子置換結晶について各々 2~3 回, 独立な反射 (hkl) と ($\bar{h}kl$) を測定した。まず, 対称心をもった 2 次元データを用いて ($|F_{PH}| - |F_{PL}|$)² を係数とする差のパターンから, 重原子の位置を決定した。白金の (x, y) 座標は 6 \AA データのみからでは決定できなかったため, 4 \AA の (hko) 反射を用いて決定した。ウランの場合は Major Site 以外に Minor Site がある。2 つの重原子の位置を共通の原点に結びつける問題は Cross-difference Fourier 合成により解決した。続いて位置座標, 重原子占有率, スケール因子などを最小 2 乗法により精密化し, その値を用いて電子密度投影図を作ったが, 1 つの分子をとりだすことはできなかった。更に 3 次元データを用いて精密化した後, 各反射について, 位相の正しい確率を $0\sim 360^\circ$ まで 5° おきに計算し, Centroid Phase を決定した。位相角の誤差の余弦の平均値は 0.69 である。この位相を用いて 3 次元電子密度を計算した。電子密度の標準誤差は $0.05 e/\text{\AA}^3$ である。電子密度は $F(000)$ を入れると $0.12\sim 0.82 e/\text{\AA}^3$ のはんいであり, これは他の蛋白質の低分解能の結果と comparable である。 $0.47 e/\text{\AA}^3$ 以上の所から等高線を引くとペプチド鎖のつながったものとなる。2, 3ヶ所をのぞくと, 分子ははっきりとピックアップできる。形は C 軸方向にのびた回転楕円体に近く, $25\times 25\times 35\text{\AA}$ であり, 馬の酸化型チトクローム C の $25\times 25\times 35\text{\AA}$ と良くにている。分子内にはかなり大きい空洞があり, 分子の長軸に沿って約 22\AA の長さのさけめが走り, その他にも直径約 10\AA の 2 個の卵形の口が開いている。重原子の位置はすべて分子の表面にあることから, 分子内部は疎水基で埋められていると思われる。ヘムの位置ははっきりと確認できなかったが, 電子密度の最も高い所と, 馬のチトクローム C のヘム鉄の位置とが大体一致しているので, 多分そこがヘムであろう。ペプチド鎖はたどることはできなかったが, Gross Structure は馬のそれとよく似ている。このことはヘムの酸化還元によって, 蛋白部分のコンホメーションはあまりかわらないということを示している。この結論は旋光分散, 円 2 色性, 重水素置換速度などからも支持される。

論文の審査結果の要旨

杉原君の研究は, 当研究室 (角戸研) における主計画研究として行なわれた主題の全研究室員による協同研究を分担したものである。

本研究は大略次の 5 段階に区分することができる。

- (1) チトクローム C の動物種の選定, チトクローム C の抽出のための諸研究
- (2) チトクローム C の X 線回折用結晶の製造, 同結晶の重原子同型置換体の製造のための研究
- (3) 蛋白質の構造解析全体に関する計算機プログラムの開発

(4) X線回折実験及構造解析の実行

(5) 結果の考察

以上の内容をもつ本研究のうち、杉原君は特に(1)、(2)の大部分を担当し、また(3)、(4)に対しても全体の研究完成のための重要な貢献を与えたものである。したがって同君の論文は実際的には上述の内容のほとんどすべてを含んでいる。

試料チトクロームCは小笠原系カツオの心臓約 500kg から主として Margoliash の方法で抽出し、精製の後7%溶液に硫酸、アスコルビン酸を加え pH 8.2~8.5 溶液からチトクロームC還元型結晶化を行った。この還元型の良質結晶成長法については多くの新しい知見を得、大きい進歩を与えた。

次に重原子を含む錯体溶液への結晶浸漬法によって重電子還元結晶を作製し、多数の試行の中から Pt, Hg, U を含む同型結晶を得た。解析には特に良質の Pt 置換体が用いられた。

以上の実験から得られた生結晶、Pt-結晶、U-結晶を用い、X線回折写真、回折計による強度データの集収、整理を行い、結晶諸定数、構造因子を算出した。結晶は空間群 $P2_12_12_1$, $z=8$ でその約35%の溶液を含んでいる。

解析は差のパターンによる重原子位置の決定、その精密化を行い、重原子の相対位置の決定の後、これらの位相を用いて蛋白質自身の“best phase”とその“figure of merit”を算出し、 $d > 6\text{\AA}$ 範囲の独立の反射約300個を用いて3次元フーリエ合成を行ない、電子密度図から分子モデルを作製した。分子の形状の大要はウマの酸化型のものに似ており、従来考えられていたほど骨格自体の大きな変化はないことがわかった。分子は $25 \times 25 \times 35\text{\AA}$ 程度の大きさで、長径の方向に中央に巾 $5 \sim 10\text{\AA}$ 、長さ約 20\AA 近い割れ目があり、この割れ目の壁面にはほぼ平行にヘムが附着していることがほぼ確実となった。

以上解析精度としては 6\AA 程度であったが、本研究は日本で最初に行なわれた蛋白質結晶解析であり、しかも、その分子形態に興味をもたれていたチトクロームC還元型の構造の大要を明らかにし、今後の精度解析実施への道を開いたことに重要な意義がある。よって杉原君の論文は理学博士の学位として十分価値あるものとして認められる。