



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Strategy of Crystallization of Membrane Protein Complex, Cytochrome bc1 Complex from Bovine Heart  |
| Author(s)    | 村上, 聰  |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39954">https://hdl.handle.net/11094/39954</a>  |
| 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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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         | むら かみ さとし<br>村 上 聰  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (理学)   |
| 学位記番号      | 第 12964 号   |
| 学位授与年月日    | 平成9年3月25日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>理学研究科高分子学専攻   |
| 学位論文名      | Strategy of Crystallization of Membrane Protein Complex, Cytochrome bc <sub>1</sub> Complex from Bovine Heart<br>(膜タンパク質複合体, ウシ心筋チトクロム bc <sub>1</sub> 複合体の結晶化) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 月原 富武  |
|            | (副査)<br>教授 田代 孝二 教授 福山 恵一 助教授 松浦 良樹   |

### 論文内容の要旨

生体物質の立体構造を決定する方法は、核磁気共鳴法 (NMR) や電子顕微鏡による 2 次元結晶の電子線回折法など幾つかが存在するが、扱える生体分子の大きさの限界が無いことや、得られた 3 次元構造の精度などの点において、X 線結晶構造解析が最も優れた方法である。昨今のコンピュータ技術の進歩やシンクロトロン放射光の利用など、X 線結晶構造解析法の技術的な進歩には目を見張る物がある。しかし、他の方法と比べ結晶化と言う困難な過程があり、この方法の弱点になっている。将来もこの方法が立体構造研究の中心的方法であり続けるかどうかは、結晶化に関する標準的な手法が確立されるかどうかにかかっている。とりわけ膜タンパク質の結晶化の成功例については光化学系光反応中心などのほんの数例にすぎず膜タンパク質の結晶化法については全く確立されていない。しかし生体内で重要な機能を担うタンパク質の多くは膜貫通型の膜タンパク質であることも多く、膜タンパク質の標準的な結晶化法の確立が待ち望まれていた。そこで、膜タンパク質であるチトクロム bc<sub>1</sub> 複合体を例とし膜タンパク質結晶化の方法の確立を目指した。

膜タンパク質複合体であるチトクロム bc<sub>1</sub> 複合体はミトコンドリアの内膜に存在するサブユニット数 11、補欠因子として 2 種類 3 個のヘム、1 個の [2Fe2S] クラスターを含む分子量約 25 万の膜貫通型膜タンパク質複合体である。本酵素は基質であるユビキノールからチトクロム c への電子伝達と共にミトコンドリア内膜を介したプロトンの能動輸送を司る呼吸酵素で、細胞のエネルギー変換において重要な役割を持つ。この酵素の持つ機能の本質的解明を目指し多くの構造解析が成されてきたが、全てのサブユニットを含む分子全体の原子レベル分解の回折能を持つ結晶は未だ得られていないかった。

本研究では、ウシ心筋からカラムクロマトグラフィーを用い、塩溶塩析のみで精製し、非イオン性界面活性剤であるシュウクロースモノカブレートで安定化させ、再結晶を行うことにより純化した標品を用い、バッチ法で結晶化を行ったところ、回転対陰極 X 線発生器を用いて、3 °C で 2.8 Å 分解能の回折を示すチトクロム bc<sub>1</sub> 複合体の結晶を得た。この結晶には 11 個全てのサブユニットが含まれており、今までに報告のある結晶の中で最高の分解能を持つものである。

bc<sub>1</sub> 複合体の結晶化に影響を及ぼす様々な要因を調べた結果と先に構造解析された姫路工大吉川教授によるチトクロム c 酸化酵素の結晶化におけるスクリーニングの結果とを考え合わせて、最も結晶化に影響を及ぼす要因は以下の 3 項目であることを結論づけた。

- 1) タンパク精製に使う材料、組織の選択。
- 2) 標品の純度、安定性に関する精製法と界面活性剤の選択。
- 3) 結晶化方法。

これらの概念は膜タンパク質の結晶化に広く応用可能であると期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

村上君の論文はウシ心筋のチトクロム $bc1$ 複合体の結晶化に関するものである。この蛋白質では最も分解能の高い結晶を得るとともに、膜蛋白質複合体の結晶化の新しい手法を開発した。この研究は膜蛋白質複合体のX線結晶構造解析の可能性を拓げる優れた研究であり、この論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。