

Title	Structural Analysis of Membrane Protein Complexes Based on Two-Dimensional Crystallization
Author(s)	池田, 郁子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40656
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

氏名	池田郁子
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第13966号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科物理系専攻
学位論文名	Structural Analysis of Membrane Protein Complexes Based on Two-Dimensional Crystallization (膜タンパク質複合体の二次元結晶化法に基づく構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 葛西 道生 教授 村上富士夫

論文内容の要旨

膜蛋白質は、情報伝達やエネルギー生成など多彩な働きをしているが、その機能が発現されるメカニズムを理解するために、その立体構造を知ることは非常に重要である。従って構造解析のボトルネックとなっている、膜蛋白質の結晶化の方法の確立は不可欠かつ急務と言える。

ところで、可溶性蛋白質において数千のオーダーで成功しているX線構造解析は、界面活性剤存在下でも構造の壊れない非常に頑丈な十種類程度の膜蛋白質の構造解析にも成功している。しかし、膜蛋白質はその性質上、膜に埋め込んだ二次元結晶化の方が、三次元に比べ有利と考えられる。電子顕微鏡による構造解析は、三次元結晶化の必要がないので、特に膜タンパク質にとって有効である。電子顕微鏡の場合、高分解能の構造解析には良い二次元結晶化が必須であるが、電子顕微鏡ではイメージを直接観ることが可能なため、不完全な結晶でもある程度の分解能の構造解析ができるという利点もある。そこで膜蛋白質の構造解析を目指した二次元結晶化について、研究を行った。

これまで膜蛋白質の構造解析は、もともとある生物の器官に大量に発現するものを用いてきたが、さらに構造解析の道を広げる目的で、大腸菌の大量発現系を用いた膜蛋白質の結晶化について研究を行った。すなわち、Kdp-ATPase分子について、大腸菌内膜上で大量発現した膜蛋白質を、可溶化することなく膜断片を作製し、この中で結晶化する事に成功した。この二次元結晶を用いてその構造解析を行った。さらに、分解能の高い解析に適した結晶を得るために、Kdp-ATPaseを可溶化し精製した上で、脂質二重膜に再構成することで二次元結晶を作る方法について、可溶化する界面活性剤から結晶化の条件まで様々な検討を行い、二次元結晶化に成功し、その構造を解析した。

また、Kdp-ATPaseでは、発現量が不十分で、さらに高い分解能の結晶化の試みが困難であるので、紅色光合成細菌 *Rp. viridis* のチラコイド膜に存在する光合成蛋白 RC-LH1 complex を用いた結晶化を試みた。光合成蛋白 RC-LH complex は自然に存在するチラコイド膜中で二次元結晶が観察され、これまで30 Å分解能程度の構造解析が行われているが、さらに高分解能の情報を得るために RC-LH1 complex を可溶化し二次元再構成して、高い頻度で二次元結晶が得られる条件を検討した。この結晶を極低温電子顕微鏡で観察することによって10 Å分解能の電子密度図を得ることができた。この密度図から、はじめて、LH1にある個々のサブユニットの配置、LH1リングの内側にあるRCの配置などが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

蛋白質の機能を発現するメカニズムを解析するためには、その構造解析が不可欠であるが、膜タンパク質ではこれまでほとんど成功していない。そこで本論文では、構造解析のボトルネックとなっている、膜蛋白質の結晶化の方法の確立をめざし、これまで不可能だった界面活性剤に弱い膜タンパク質や大きなコンプレックスを結晶化し、電子顕微鏡を用いて解析することに成功したことを報告している。膜蛋白質はその性質上、膜に埋め込んだ二次元結晶化の方が、X線を用いて解析する三次元結晶に比べ有利と考えられる。さらに電子顕微鏡の場合、電子顕微鏡ではイメージを直接観ることが可能なため、不完全な結晶でもある程度の分解能の構造解析ができるという利点から、これまで全く構造のわからなかった蛋白質においても、その輪郭や大きさを観察することが可能である。本論文では第一章の序論においてこういった構造解析の背景や、電子顕微鏡による構造解析の方法などを概説した後、第二から第四章において、本研究で試された三つの結晶化の方法について報告している。

従来膜蛋白質の構造解析は、もともとある生物の器官に大量に発現するものかつ、界面活性剤でも壊れない、強固な蛋白質だけで成功してきたが、さらに構造解析の道を広げるためには、それ以外の膜蛋白質に対しても結晶化の方法を開発することが不可欠である。そこで第二章ではKdp-ATPase分子について、大腸菌内膜上で大量発現した膜蛋白質を、可溶化することなく膜断片を作製し、この中で結晶化する事に成功した。そして、できた二次元結晶を用いて初めてKdp-ATPaseの構造を解析できたことを報告している。

第三章では、分解能の高い解析に適した結晶を得るために、Kdp-ATPaseを可溶化し精製した上で、脂質二重膜に再構成することで二次元結晶を作る方法について、使用する界面活性剤の種類から結晶化の条件まで様々な検討を行っている。そしてこの方法を用いても二次元結晶化を成功させ、その構造を解析している。

さらに高い分解能の結晶化を試みるために、第四章では、紅色光合成殺菌 *Rp. viridis* のチラコイド膜に存在する光合成蛋白 RC-LH1complex を用いた結晶化について報告している。光合成蛋白 RC-LH1complex は自然に存在するチラコイド膜中で二次元結晶が観察され、これまで30Å分解能程度の構造解析が行われているが、さらに高分解能の情報を得るために RC-LH1complex を可溶化し再構成して、高い頻度で二次元結晶を得ることに成功した。この結晶を極低温電子顕微鏡で観察することによって、初めて10Å分解能の電子密度図を得ている。

これらの結晶化方法の開発によって得られた知見は、今後いろいろな膜蛋白質の構造解析をする上で非常に役に立つと考えられる。従って、本論文は博士課程論文として価値あるものと認める。