



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | X線溶液散乱法による蛋白質の構造研究  |
| Author(s)    | 森本, 幸生  |
| Citation     | 大阪大学, 1987, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/485">https://hdl.handle.net/11094/485</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|         |                                    |      |    |     |
|---------|------------------------------------|------|----|-----|
| 氏名・(本籍) | 森                                  | 本    | 幸  | 生   |
| 学位の種類   | 理                                  | 学    | 博  | 士   |
| 学位記番号   | 第                                  | 7634 | 号  |     |
| 学位授与の日付 | 昭和                                 | 62年  | 3月 | 26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  | X線溶液散乱法による蛋白質の構造研究                 |      |    |     |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 勝部 幸輝                   |      |    |     |
|         | (副査)<br>教授 小高 忠男 教授 寺本 明夫 教授 高木 俊夫 |      |    |     |
|         | 助教授 田中 信夫                          |      |    |     |

### 論文内容の要旨

本論文は、X線溶液散乱法を用いた結晶解析法とは異なる蛋白質分子の新しい構造研究法について、生体内電子伝達に関与したチトクロム酸化酵素およびチトクロム b c 複合体の分子形態あるいは蛋白質二次構造解析に適用した結果について述べ、以下の四章から構成されている。

第一章は、本研究手段であるX線散乱についての理論の概要について述べた。本研究では分子のより詳細な構造研究手段として、通常のX線散乱法に加え、溶媒の電子密度を変化させることによる分子内の電子密度の起伏を明らかにする方法（コントラスト変化法）を用い、その理論の概要についても述べた。

第二章では、本研究のために用いられたX線散乱実験システムおよびデータ処理の方法について述べた。小角散乱装置については、従来の装置では測定できない極低角の散乱強度を測定するため、新しい装置を設計、製作した。本装置を用いて既に電子顕微鏡等で分子形状が明らかにされた試料を測定した結果、電顕等より得られた結果と良い一致を示し、本装置の有効性が確認できた。

第三章では、第一章、第二章で述べられた理論、実験装置を用いて牛心筋より抽出した疎水性膜蛋白質であるチトクロム酸化酵素およびチトクロム b c 複合体についてのX線小角散乱実験とその結果の考察について述べた。まずチトクロム酸化酵素については、溶液中において細長い形をした二量体として可溶化していること、本酵素に結合している可溶化剤の結合部位が二量体形成時の接融部位であることを明らかにした。さらにチトクロム Cとの複合体実験より、チトクロム Cはこの二量体の両末端から約40Å入った所に結合していることを突き止めた。チトクロム b c 複合体については、溶液中において二量体を形成しておりその形状は扁平な回転楕円体で近似でき、また可溶化剤はこの回転楕円体の周辺に

結合していることを明らかにした。

第四章では、溶液散乱の測定領域を拡げ、中高角散乱領域に見られる回折図形が蛋白質分子内の内部構造によるものと考え、これらを蛋白質二次構造、超二次構造の観点から捉え検討した。これに伴って中高角散乱強度データの新しいデータ解析の方法を考案した。その結果、 $\beta$ バレルを持つ蛋白質には共通して自己相関関数  $A(u)$  の  $u = 12 \text{ \AA}$  にピークを持つことを見い出した。このピークは原子座標から計算した  $A(u)$  や原子間距離分布にも見い出されるものであった。のことより、 $\beta$ バレルを持つ蛋白質分子内には約  $12 \text{ \AA}$  離れた所に  $\beta$ ストランドがくるように主鎖が折れたたまれることが示唆された。

### 論文の審査結果の要旨

X線溶液散乱法は、溶液状態でのタンパク質の構造研究に対して有効な方法であると考えられていたが、精度の良い散乱強度測定が困難であるため、実験法や解析法の開発が遅れていた。したがって、X線溶液散乱法の開発が、タンパク質構造研究分野の一つの重要な課題となっていた。森本幸生君は、溶液中でタンパク質の形態を知るため、 $1,600 \text{ \AA} \sim 40 \text{ \AA}$  に相当する散乱角での散乱強度を十分な精度で測定しうるコンピュータ制御式 X 線小角散乱装置を開発し、これを用いて、可溶化剤にて可溶化したチトクロム酸化酵素（牛心筋から抽出）の構造解析を行った。その結果、チトクロム酸化酵素は、分子量約 300,000 の二量体として存在し、慣性半径  $53.8 \text{ \AA}$ 、分子最大長  $165 \text{ \AA}$ 、軸比 2 の回転楕円体の形態をもっていることを明らかにした。さらに、中性子散乱実験に用いられるコントラスト変化法を、チトクロム酸化酵素-チトクロム C 複合体の X 線溶液散乱実験に応用し、チトクロム酸化酵素の可溶化剤結合部位及びチトクロム C 結合部位を決定した。これは、複合体溶液にサッカロースを添加することにより、複合体と溶媒との電子密度差が変化することを利用して行っている。このようにして得た複合体の分子モデルを、半径  $12 \text{ \AA}$  の電子密度均一な球の充填モデルで表現することにより計算される散乱強度分布曲線と、実測のそれとが最良一致するよう、逐次近似法によって構造を精密化した。その結果、可溶化剤で水に可溶化したチトクロム酸化酵素は、単量体の疎水部分が互に接触するようにして二量体を形成しており、その接触部周辺に可溶剤が結合すること、また、チトクロム C はチトクロム酸化酵素の最大分子長両端から約  $20 \text{ \AA}$  離れた場所に結合することを明らかにした。この構造で、チトクロム酸化酵素の種々の物理化学的性質をよく説明することができる。本論文には、この他にイミノグロブリン M、 $\alpha$ マクログロブリン、チトクロム b c 及びそのチトクロム c との複合体の溶液中の分子形態が述べられている。本論文は、X 線溶液散乱法によるタンパク質の構造決定に対し、新しい解析法を考案し、チトクロム酸化酵素等の構造について新しい知見を得ているので、理学博士の学位論文として価値あるものと認める。