

課題名 生体超分子チトクロム酸化酵素の高分解能 X 線構造解析

課題番号 2007A1841 利用ビームライン BL41XU

大阪大学蛋白質研究所所属 博士後期過程 2 年 菅倫寛

1、目的および背景

生物は好气的条件下では呼吸によってエネルギーを得ている。ミトコンドリア内では 40% 以上という極めて高いエネルギー変換効率 ATP の合成が行われている。チトクロム酸化酵素はミトコンドリア内の呼吸鎖末端に位置する巨大膜蛋白質で、このエネルギー産生を担う精密に制御された分子装置である。

チトクロム酸化酵素は呼吸から得た酸素分子を水分子に還元し、それに伴ってプロトンをマトリクス側から膜間空間へとポンプする。このプロトンの能動輸送によって形成されるプロトンの濃度勾配は ATP 合成酵素が ATP を合成する駆動力となる。本酵素は 1995 年に我々のグループによって世界で初めてその X 線立体構造が解明され、現在も世界中で精力的に研究されている。

本酵素の現在の最大の争点はそのプロトンパスにある。酸素が水分子に還元される際に消費されるプロトンと能動輸送されるプロトンとがそれぞれどこを通過して運ばれてくるのか。また本酵素内のヘムで引き起こされる酸化還元反応がどのようにしてプロトンポンプを駆動させるのか。これらの問いに対する多くの実験的証拠を我々は X 線構造解析から得ている。

プロトンポンプのメカニズムを完全に解明するには、ポンピングに寄与するカルボキシル基とヒスチジン鎖のプロトン化・脱プロトン化状態を直接判別することが最も直接的で説得力がある。ただし分子量限界と蛋白質を構成するサブユニット数の多さから中性子線結晶構造解析での判別は不可能である。そこで本研究では X 線構造解析を用いて、これらのアミノ酸の水素原子の電子密度を直接観測することを目的としている。

本研究の最大の課題は、高分解能の X 線データが必要とされることである。我々は酸化型構造で 1.8Å、還元型構造で 1.9Å と膜蛋白質としては屈指の高分解能の X 線構造を得ることに成功しているが、水素原子の電子密度は大変小さいのでこの分解能では不十分である。

そこで本課題では X 線データの分解能を向上させるために、結晶の周りの溶媒を抜き取り、溶媒の寄生散乱を減らすことでバックグラウンドの低いイメージデータを得ることを試みた。

2、実験・解析方法

2-1、結晶の準備

以下のような手順で結晶の準備を行った。まず結晶周りの溶媒を取り除いた状態で結晶を凍結させるため、最初に結晶の相対湿度を決定した。相対湿度は以下の式で定義される。
(参考文献より)

$$\text{相対湿度} = \exp \{ a_w b_w [(T_{dp} - T_{cr}) / (b_w + T_{dp})(b_w + T_{cr})] \} \times 100\%$$

(ここで $a_w = 17.5043$, $b_w = 241.2K$, T_{dp} : dew point, T_{cr} : temperature of crystal)

結晶周りの相対湿度の調節は Rigaku の Free Mount System を用いた。相対湿度が等しい時、結晶周りの溶媒が除かれても結晶から溶媒が失われることがないため、乾燥によるダメージが結晶に起きない。クライオプロテクタントをソーキングした結晶を用いて決定した結晶の 15°Cでの相対湿度は 85%-88%であった。

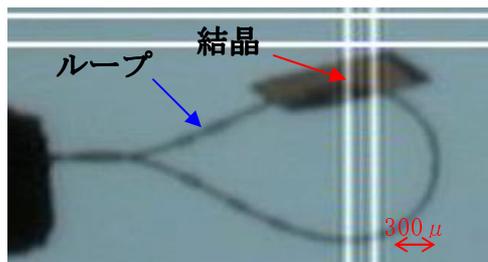
続いて結晶周囲の相対湿度を 85%-88%に保った状態で結晶周囲の溶媒を抜き取り、素早く凍結した。(図1) 溶媒を取り除いた結晶では分解能を低下させることなく、溶媒領域のバックグラウンドを下げることに成功した。(図2) そこで凍結した結晶を用いて X 線回折実験を行った。

2-2、回折実験

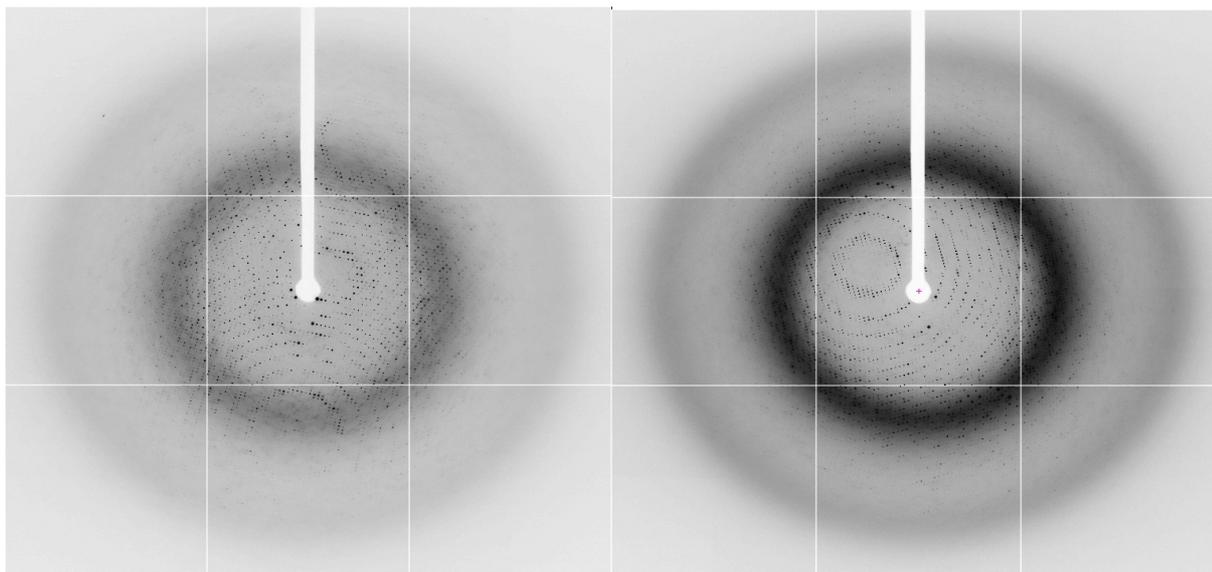
X 線回折実験は全て BL41XU で行った。データ収集に最適な露光時間を決定した。データセットは(a)結晶内の一箇所測定できる標準的な測定方法の条件と(b)結晶内で逐次 X 線の照射箇所を変えた長時間露光の実験条件を設定した。(表1) ここで(a)の条件は結晶の質と分解能を大まかに決める目的で設定し、(b)の条件は X 線損傷を避けて高分解能データを収集する目的で設定した。結晶まわりの溶媒を取り除いた結晶を用いてデータを収集し、比較のために通常の方法で結晶を凍結させたものを reference のデータとして用いた。データ収集後、データの統計値を比較した。(表 2-a, 2-b) データの解析は Denzo/Scalepack を用いた。

3、結果

<図1> 結晶周りの溶媒を取り除いてマウントした結晶の写真

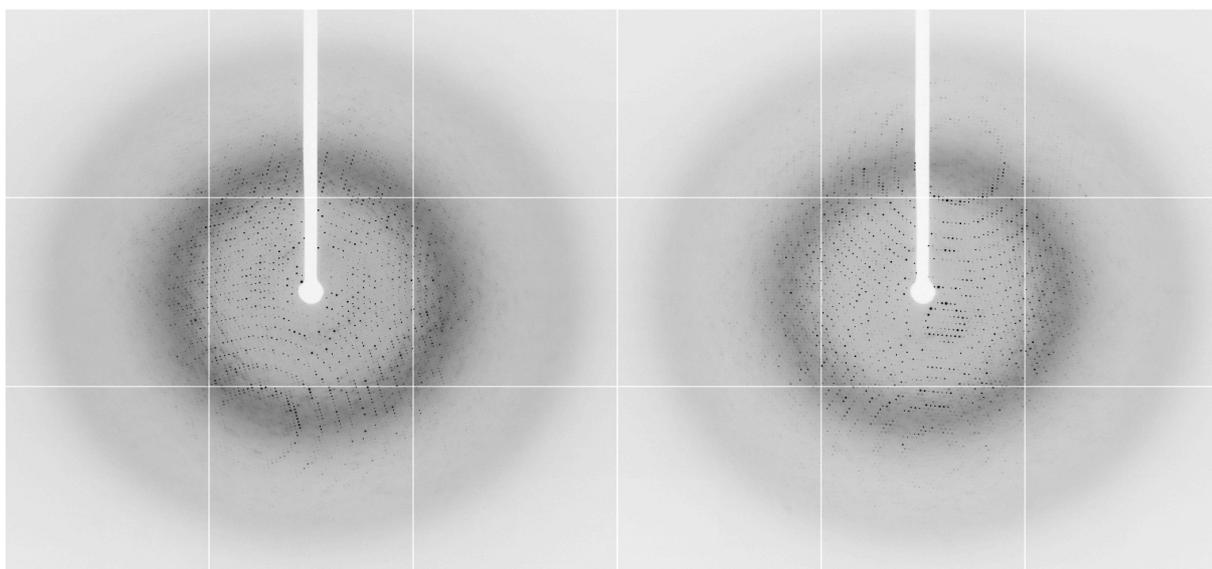


<図2>回折写真 (a-1,2: 結晶まわりの溶媒を除いたもの b-1,2: 通常の方法で凍結したもの。a-1とb-1、a-2とb-2の結晶面は同じにしている。a-1, b-1はループ面に垂直方向にX線を当てている。a-2, b-2はa-1, b-1からphiをそれぞれ90度回転させ、ループ面に平行な方向からX線を当てている。結晶の大きさはほとんど同じである。回折写真は全て同じコントラストレベルで表示させた。溶媒を通過するX線の経路が長いとき、イメージのバックグラウンドの低下が見られた。)



(a-1)結晶まわりの溶媒を取り除いたもの

(b-1)通常の凍結方法



(a-2)結晶まわりの溶媒を取り除いたもの

(b-2)通常の凍結方法

通常測定の実験条件 (standard) と高分解能データ収集時の実験条件 (high resolution) は以下の通りである。

<表 1>実験時の実験条件

	standard	high resolution
Detector	ccd (adsc Q315)	ccd (adsc Q315)
wavelength / Å	0.9	0.9
oscillation range / degree	0.3	0.3
number of images	300	450
number of images in each spot	300	40-60
Camera distance / mm	280	260
exposure time / s	1.0	5.0
Attenuator (µm)	0	0

それぞれのデータの統計値を示す。高分解能データでは溶媒を用いた結晶を2つ用いて、2データセットを収集した。太字は解析に使用できる分解能のめやすである。

<表 2-a>実験結果の統計値 (standard)

o89_26_9_ref (reference data)

Resolution	I/sigma	Rmerge	Completeness	chi*2	reflections	Redundancy
200 - 4.09	23.91	0.041	64.7	1.20	19,842	2.8
4.09 - 3.25	21.02	0.054	66.7	1.45	20,282	2.7
3.25 - 2.84	14.98	0.065	67.7	0.99	20,565	2.6
2.84 - 2.58	10.06	0.080	68.6	0.73	20,779	2.5
2.58 - 2.39	6.34	0.114	69.3	0.63	20,997	2.5
2.39 - 2.25	4.25	0.157	69.2	0.57	20,956	2.4
2.25 - 2.14	2.91	0.218	69.2	0.55	20,898	2.4
2.14 - 2.05	2.05	0.302	69.7	0.54	21,077	2.3
2.05 - 1.97	1.41	0.410	68.7	0.50	20,798	2.3
1.97 - 1.90	0.93	0.571	66.4	0.47	20,067	2.2
200 - 1.90	11.63	0.068	68.0	0.80	206,261	2.5

o89_26_8_rf88 (溶媒なし)

resolution	I/sigma	Rmerge	Completeness	chi*2	reflections	Redundancy
200 - 4.09	25.12	0.053	59.0	1.46	17,872	3.1
4.09 - 3.25	19.78	0.054	62.4	1.10	18,784	2.9
3.25 - 2.84	11.52	0.073	64.0	0.72	19,254	2.7
2.84 - 2.58	6.43	0.117	65.2	0.59	19,498	2.6
2.58 - 2.39	3.76	0.187	65.9	0.54	19,741	2.5
2.39 - 2.25	1.39	0.279	66.5	0.50	19,886	2.4

2.25 - 2.14	1.50	0.403	67.0	0.49	20,083	2.3
2.14 - 2.05	1.10	0.503	66.9	0.47	20,011	2.1
2.05 - 1.97	0.71	0.630	63.6	0.43	18,983	1.9
1.97 - 1.90	0.45	0.825	52.2	0.42	15,657	1.6
200 - 1.90	9.97	0.074	63.3	0.75	189,769	2.4

通常の測定条件では reference データの方が良い分解能であった。溶媒を取り除いたデータは reference データに比べると R_{merge} の増加が見られた。

<表 2-b> 実験結果の統計値 (high resolution)

o89_26_9_ref (reference データ)

resolution	I/sigma	Rmerge	Completeness	chi*2	reflections	Redundancy
200 - 3.99	29.65	0.047	97.5	1.58	32,320	3.5
3.99 - 3.16	26.95	0.056	96.1	1.83	31,626	3.4
3.16 - 2.76	19.75	0.072	94.1	1.50	30,931	3.3
2.76 - 2.51	13.53	0.085	93.3	1.09	30,594	3.1
2.51 - 2.33	8.77	0.116	93.9	0.96	30,724	3.0
2.33 - 2.19	5.92	0.154	94.5	0.86	30,952	2.9
2.19 - 2.08	3.99	0.217	96.4	0.80	31,542	2.8
2.08 - 1.99	2.90	0.288	97.2	0.78	31,851	2.7
1.99 - 1.92	1.63	0.393	94.2	0.65	30,781	2.4
1.92 - 1.85	0.85	0.589	89.4	0.56	29,251	2.2
200 - 1.85	16.03	0.067	94.6	0.57	310,571	2.9

o89_26_8_rf88 (溶媒なし)

resolution	I/sigma	Rmerge	Completeness	chi*2	reflections	Redundancy
200 - 3.99	29.69	0.055	96.7	1.92	31,816	3.6
3.99 - 3.16	27.34	0.055	93.9	1.70	30,634	3.4
3.16 - 2.76	19.52	0.068	92.3	1.37	29,987	3.3
2.76 - 2.51	12.92	0.088	91.4	1.11	29,735	3.2
2.51 - 2.33	7.95	0.122	91.9	0.90	29,876	3.2
2.33 - 2.19	5.16	0.169	92.1	0.81	29,912	3.1
2.19 - 2.08	3.42	0.237	93.9	0.72	30,468	3.0
2.08 - 1.99	2.43	0.322	94.4	0.70	30,591	2.9
1.99 - 1.92	1.38	0.454	92.3	0.59	29,962	2.7
1.92 - 1.85	0.74	0.695	89.2	0.53	28,966	2.5
200 - 1.85	17.08	0.070	92.8	1.10	301,947	3.1

o89_26_16_rf85 (溶媒なし)

resolution	I/sigma	Rmerge	Completeness	chi*2	reflections	Redundancy
200 - 3.66	28.60	0.064	96.2	2.68	40,585	3.3
3.66 - 2.91	24.28	0.080	93.5	3.05	39,192	3.0
2.91 - 2.54	16.26	0.097	92.2	2.20	38,563	3.0
2.54 - 2.31	9.59	0.134	93.1	1.63	38,834	3.0
2.31 - 2.14	5.69	0.188	94.4	1.24	39,475	2.9
2.14 - 2.02	3.51	0.268	96.7	0.94	40,346	2.8
2.02 - 1.91	1.89	0.388	95.2	0.72	39,681	2.6
1.91 - 1.83	0.92	0.628	91.4	0.58	38,111	2.3
1.83 - 1.76	0.62	0.852	87.9	0.50	36,621	2.2
1.76 - 1.70	0.49	0.948	77.9	0.47	32,485	2.0
200 - 1.70	17.52	0.080	91.9	1.59	383,893	2.7

溶媒を取り除いたことで分解能が改善されることはなかった。溶媒を取り除いたデータは reference データに比べると Chi*2, R_{merge} の増加が見られた。

4、考察

今回の実験において、結晶まわりの溶媒を取り除いて凍結させることでバックグラウンドを低くすることに成功したが、分解能の改善には不十分であった。その理由として1つは溶媒を取り除いた状態では結晶が凍結時の急激な温度変化によるループの伸縮の影響を受けている可能性が考えられる。実際に収集したデータでは結晶のモザイク幅は reference のデータとそれ程変わらなかったが、いくつかの結晶ではモザイク幅が大きくなる傾向がみられた。またもう1つの理由として X 線の通過する経路の中で溶媒の占める割合が大きい時のみバックグラウンド低下に効果があるので(図2の a-1,b-1)、データセット全体では分解能の改善にそれ程大きく寄与していないことが考えられる。今後は結晶の相対湿度を変化させて結晶を dehydration することで分解能の向上を図りたい。

5、参考文献

Reiner Kiefersauer, Manuel E. Than, Hoger Dobbek, Lothar Gramer, Marcos Melero, Stefan Strobl, Joao M. Dias, Tewfik Soulimane and Robert Huber (2000). J. Appl. Cryst. **33**, 1223-1230

6、謝辞

本課題は月原富武教授の指導のもとで行われた。月原富武教授に感謝します。また結晶を準備していただいた伊藤・新澤恭子先生、吉川信也教授にも感謝します。実験のサポートをしていただいた BL41XU のビームラインの清水伸隆氏にも感謝します。