

**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 2007B1665 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 3 年 菅倫寛**

## 1、目的および背景

生物は好氣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で 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。また本酵素内のへむ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。通常水素原子観測に用いられる中性子線結晶構造解析での判別は分子量限界から不可能である。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 線データ収集である。我々は酸化型構造で 1.8 Å、還元型構造で 1.9 Å と膜蛋白質としては高分解能の X 線構造を得ることに成功しているが、この分解能での水素原子の電子密度観測はできなかった。

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スクリーニングを行った。

## **2、実験**

### **2-1、回折実験とスクリーニング**

回折実験は BL41XU で行った。1.5Å 以上の高分解能データ収集を目的として、百個以上の結晶の分解能を調べ、良質な結晶を探した。

## **3、結果**

今回のビームタイムでは試料の精製の時期が悪く期待していたほどの分解能の結晶が得られなかった。分解能の良い結晶でもせいぜい 1.8Å 程度であった。

## **4、考察**

今回のビームタイムでは目的の分解能のデータを得ることができなかったが、結晶のばらつきを考慮すると多くの結晶をスクリーニングして良いデータを収集することは今後も必要であると考えられる。今後は結晶化条件などの検討を行い、今よりも質の良い結晶を得られるようにしたい。

## **5、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。