

課題名 チトクロム *c* 酸化酵素のプロトンポンプ機構と酸化還元反応機構の解明

課題番号 2008A1719

使用ビームライン: BL41XU

大阪大学蛋白質研究所 博士後期課程 菅 倫寛

1. 研究背景

生物は好気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どこを通っ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。これらの問い合わせ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1.8Å、還元型構造で1.9Å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。

そこで本課題では放射光施設でのデータの収集方法と処理方法を工夫することで回折データの分解能を最大限に得られるような方法を開発することを目的として行った。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ で結晶格子は $a=183\text{ b}=207\text{ c}=178$ である。膜蛋白質の結晶の高分解能の回折データを得るには発散の小さい高輝度のX線が必要であり、本研究はSPring-8でしかできない。

2. 研究内容と結果

良い回折データを収集するために低分解能データと高分解能データの扱いについて検討

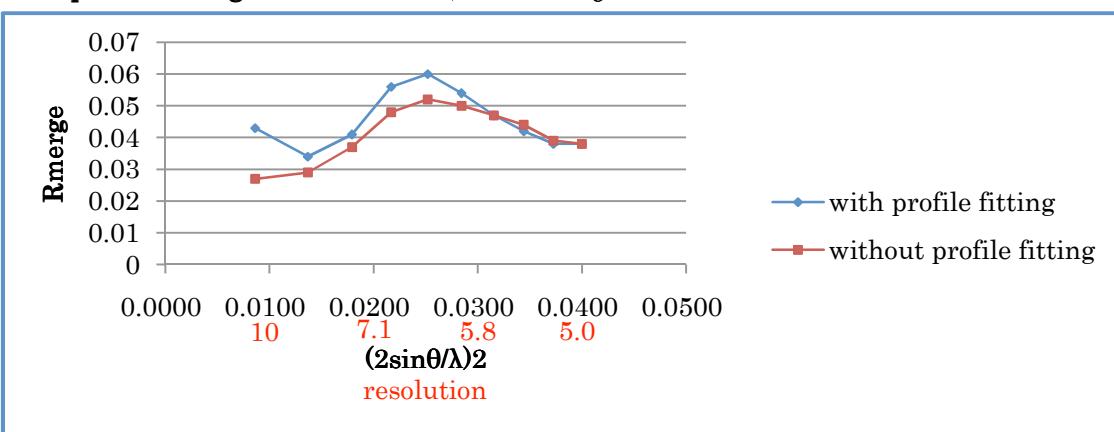
した。原子散乱因子の分布からわかるように、低分解能の反射は水素の寄与が大きく、これらの反射をいかに精度良く集めるかは重要な課題である。また高分解能の反射についても精密化に分解能をどこまで使用するか、さらに突き詰めればどの反射を使用するか、という課題がある。一般的には統計値に基づいて精密化に用いる分解能は決定されるが、多くの膜蛋白質の結晶がそうであるように、回折像に異方性が見られる場合にはこの方法は適切ではない。

2-1. 低分解能のデータの扱いについて

通常、データ収集では高分解能のデータ収集に加えて低分解能のデータ収集を別に行い、これらのデータをマージする。低角の反射は強度が大きく、精度良く測定しスケーリングすることは難しい。プログラムのデフォルト設定では反射強度の積分時にはプロファイルフィッティングが行われる。この補正は低角のデータには使用しない方がデータの精度が改善されることを見た。(図 1)

続いて積分した強度データのスケーリングする際には、通常は高分解能データも合わせて処理するが、等価な反射が大きく異なる強度をもつために全体の R_{merge} が大きくなってしまうことが多い。この問題点に対して、高分解能のデータと低分解能のデータをそれぞれ別々にスケーリングの処理を行い、処理後の各データセットの全体のスケールを `scaleit` で合わせたものを用意し、必要な低角の反射だけを高分解能データに組み入れることで R_{merge} の増加を回避することができた。

図 1: profile fitting あり・なしでの低角の R_{merge} の分布



2-2. 高分解能のデータの扱いについて

チトクロム酸化酵素の結晶を用いて 1.5\AA 程度の回折データを収集した。しかし 1.7\AA より高分解能の反射強度は弱く、回折イメージにも異方性がみられた。 R_{merge} の値や $I/\sigma(I)$ などの統計値から判断されるデータの分解能は 1.7\AA であった。そこで得られたデータの処理方法の工夫と精密化に使用する反射を選択することで回折データの改善を試みた。

低強度の反射強度を正確に求めるために、反射のスケーリングとアベレージングには負の強度として観測された反射も加えた。その結果全体の R_{merge} と $I/\sigma(I)$ は見かけ悪くなった。次の `truncate` の過程では回折像の異方性を考慮して Willson 統計に従った補正是

外した。この時点で負の強度を持つ反射は除かれ、統計値を悪くしていたと考えられる反射のほとんどは取り除けた。続いて 2.0\AA 以上の反射が $F/\sigma(F)$ が(i)5 以上、(ii)3 以上 5 未満、(iii)1 以上 3 未満、(iv)1 未満のデータセットを用意し、精密化後の構造の理想的な構造からの角度と結合長のずれ(角度と結合長の r.m.s.)が最小になる分解能をそれぞれのデータについてもとめた。その結果 $F/\sigma(F)$ の大きさが(i)5 以上の反射は 1.56\AA まで、(ii)3 以上 5 未満の反射は 1.68\AA まで、(iii)1 以上 3 未満の反射は 1.74\AA まで(iv)1 未満の反射は 1.76\AA まで精密化に使用できると判断された。(図 2) これらの反射を用いると精密化の結果は改善した。また得られた σ_a の重みをかけた $2f_o-f_c$ の電子密度も明らかに良好であった。

(図 3)

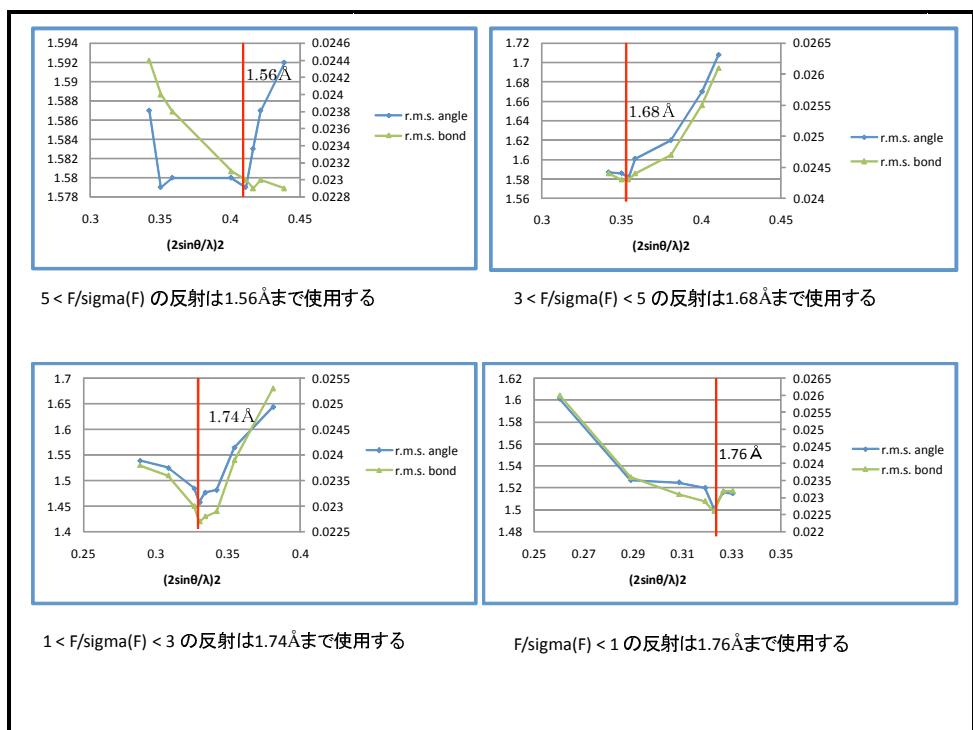


図 2: 精密化後の座標の結合長と結合角の理想的な構造からのずれ

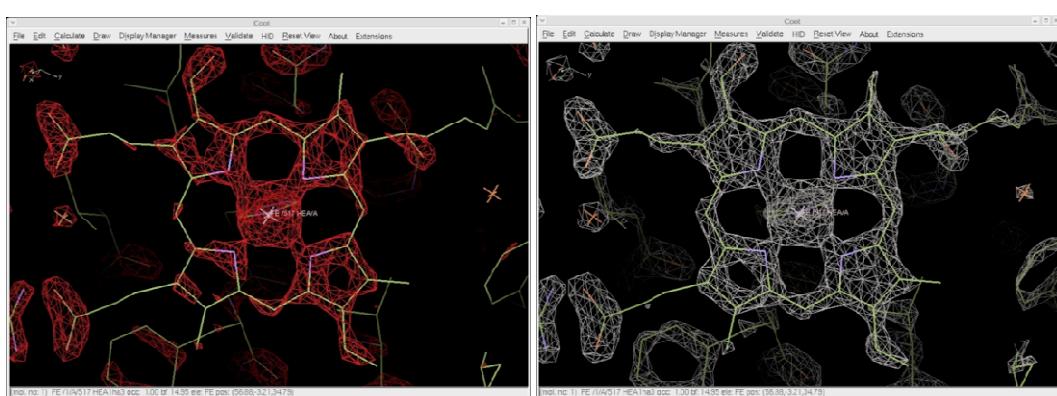


図3 : σ a の重みのかかった 2fo-fc マップ

左は反射の選択前の 1.56Å データ (5.79σ , $1\sigma=0.174\text{e}/\text{\AA}^3$)、右は選択後の 1.56Å データ (5.20σ , $1\sigma=0.186\text{e}/\text{\AA}^3$)

3. 今後の研究展開

今後は現在構造解析中のデータを用いてチトクロム酸化酵素のプロトン化状態を決定する方法を開発していく予定である。プロトン化状態に敏感な反射だけを選び、R 因子計算を行うことで判断するためのプログラムの開発を行っている。最終的には 1.5Å 分解能程度の回折データでプロトン化状態を判別する方法を開発したい。

4. 現状に対する優位性、新規性、期待される効果

本研究では低分解能の反射の積分方法に改善の余地があることを示し、新しい低角データのスケーリングの方法を提案した。その結果低分解能の反射強度が従来の方法よりも正確に見積もることができることを示した。また高分解能の反射の選択から、回折データの分解能を決定する新たな指標を提案した。この指標に基づいて得られた回折データでは従来の方法に比べて電子密度に改善が見られた。これらの回折データの収集と解析方法は多くの超分子複合体の結晶について適応可能である。

5. 研究の実施体制

本研究は月原富武教授の指導のもとに実施した。また実験に使用した結晶は吉川信也教授と新澤・伊藤恭子助教に準備いただいた。また回折実験は BL41XU で行い、清水伸隆氏にサポートしていただいた。これらの方々に深く感謝する。

6. 成果発表 (国際学会、国内学会でのポスター発表)

M. Suga, K. Ito-Shinzawa, H. Aoyama, E. Yamashita, S. Yoshikawa, and T. Tsukihara.

『IUCr2008』, Osaka, (August 2008)

M. Suga, K. Ito-Shinzawa, H. Aoyama, E. Yamashita, S. Yoshikawa, and T. Tsukihara.

『EBEC2008』, Dublin, (July 2008)

M. Suga, K. Ito-Shinzawa, H. Aoyama, E. Yamashita, S. Yoshikawa, and T. Tsukihara

第 46 回生物物理年会, Fukuoka, (December 2008)