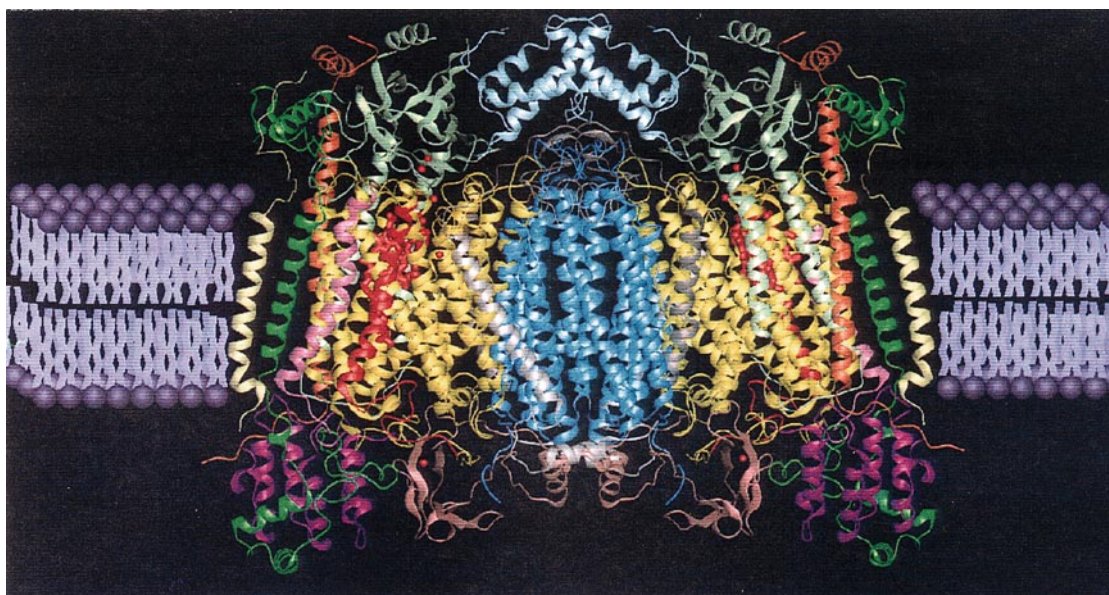


Molecular Regulation in Biological
Macromolecular Assemblies
生体超分子系における分子制御機構
—呼吸鎖複合体の構造と機能—

プロジェクトリーダー 月 原 富 武

大阪大学 蛋白質研究所 教授



1. 研究の目的

これまでに数千に及ぶ蛋白質の立体構造が決定されて、それらが人工の化学物質では真似できない優れた機能が如何にしてもたらされているのかを知ることができました。これらの成果は、新しい蛋白質の設計にも活かされています。

ところが、細胞内には単独の蛋白質分子では達成することができない、極めて高度に制御された反応系が数多くあります。この高度な制御を突き詰めてみると、多様な分子で構成される超分子複合体に行きつきます。例えば、遺伝子複製系、蛋白質合成系、エネルギー変換系など、生命活動の根幹を担うシステムの主体はすべて超分子複合体であり、生命現象の理解を深めるためには、これらの超分子複合体の立体構造を明らかにしなければなりません。X線結晶構造解析によって、高度な制御の分子機構を解明するのがこの研究の究極の目的であります。

生体超分子複合体は分子量が数十万から数百万にという極めて大きいために、従来のX線回折実験設備では、構造決定を行うのが困難であります。幸い我が国には世界最高の性能の放射光X線を発生することが可能なSPring8があります。この施設に巨大な生体超分子複合体のX線回折実験用に優れた性能をもつビームラインを建設し、この分野の研究の突破口を開きます。

この研究は、研究対象を蛋白質から複合体の構造に広げることによって、幾多の生命現象の謎を解明することに貢献できるものです。

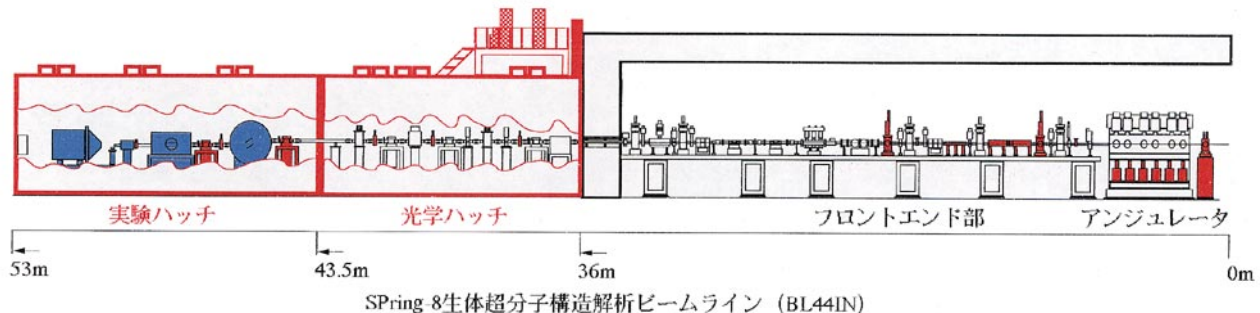


2. 研究の内容

生体超分子複合体構造解析ビームラインを建設し、呼吸鎖膜タンパク質複合体、リボソームやウイルス等の超分子複合系の立体構造決定を行なうことによって、生命現象の根幹を担っている高度に制御された反応系の動作機構を原子レベルで解明します。

(1) 生体超分子複合体用 SPring-8ビームラインの建設

このビームラインは格子定数が2000 Åの結晶で2.5 Å分解能の回折実験が行えることを目指して建設しました。現在イメージングプレート回折計(D ± P-2040)とCCD回折計PX210を併用して生体超分子結晶の回折データ収集を行っています。



(2) ウシ心筋の呼吸鎖複合体のX線結晶構造解析

40種以上のサブユニットで分子量80万のNADH脱水素酵素、8種以上のサブユニットで分子量25万のチトクロムbc1複合体、13種26サブユニットで分子量41万のチトクロムc酸化酵素の3種の膜タンパク質複合体は電子伝達や酸化還元反応の触媒と同時に、プロトンの能動輸送を行います。これらの呼吸鎖複合体のうち当面は、以下の複合体の結晶構造解析を行います。

チトクロム酸化酵素の酸素還元とプロトンの能動輸送のメカニズムを解明するために、酸化型酵素及び還元型酵素の2.3 Å分解能、CN化型酵素、CO化型酵素、アジド化型酵素の2.8 Å分解能、低温酸化型酵素の1.9 Å分解能の結晶構造解析を行います。

ウシ心筋のNADH脱水素酵素の精製は極めて困難であるが、最近結晶化に供することのできる試料を精製するのに成功した。結晶化と結晶構造解析を行います。

(3) ウシ肝臓のプロテアソーム

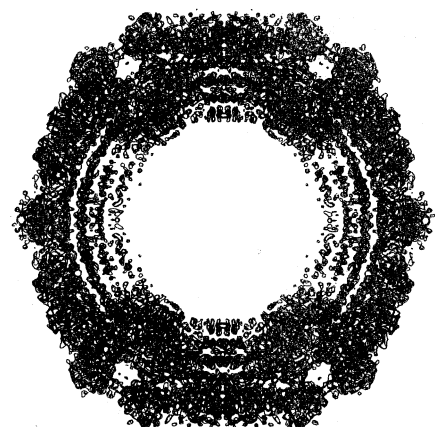
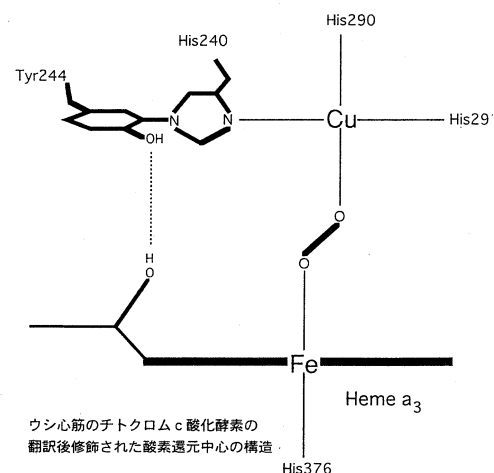
この酵素は14種28サブユニット、分子量が約75万の超分子複合体です。高等生物のプロテアソームとしては初めてウシ肝臓の20Sプロテアソームの結晶化に成功しました。高エネルギー研での実験によって高分解能の回折像を与えるものであることを確認しています。その後、フランスのESRFにおいて、2.4 Å分解能の回折強度を部分的に収集することができました。完全な強度データを収集し、細菌の酵素を利用した分子置換法によって結晶構造解析を行います。

(4) リボソームの結晶化とX線結晶構造解析

長年の研究の結果、60S及び40Sリボソームサブユニットを大量に精製する方法を確立することができました。これらを結晶化しその結晶構造解析を行います。超好熱菌の70Sリボソームの良質の結晶を得ることができました。この構造解析が進行中です。

(5) イネ萎縮病ウイルス

このウイルスの分子量は7000万で、今まで構造解析されたものを遥かに越えるものです。現在低分解能の結晶構造解析に成功しており、ウイルス中で層状構造をしている核酸を見い出しました。右の図は13 Å分解能の電子密度の断面です。内側にある3層がRNAを示しています。このことは、まったく予期していなかったもので、その機能上の意味を明らかにすることは極めて、重要になってきています。この結晶は少なくとも3.5 Å以上の分解能の回折像を与えることを確認しています。3.5 Å分解能の結晶構造解析を行い、新しい核酸の構造と機能の役割を解明します。



3. 研究の体制等

期 間：1996年10月～2001年3月

構 成：プロジェクトリーダー1名、コアメンバー3名、研究協力者13名（内日本学術振興会研究員3名）で構成されています。その他、下記の研究室に属する大学院学生が多数この研究に参加しています。

実施場所：この研究の主拠点は大阪大学蛋白質研究所ですが、SPring-8（理研）と姫路工業大学理学部吉川研究室の協力を得てプロジェクトを進めています。13種26サブユニットからなるウシ心筋のチトクロムc酸化酵素