

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 -

Molecular Regulation in Biological Macromolecular Assemblies

- Structure-Function Relationships of Respiratory Complexes -

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00503)

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

コアメンバー

長谷 俊治 大阪大学蛋白質研究所・教授

吉川 信也 姫路工業大学理学部・教授

山崎 俊夫 大阪大学蛋白質研究所・助教授

山下 栄樹 大阪大学蛋白質研究所・助手

山本 雅貴 理化学研究所・研究員

島田 秀夫 慶應義塾大学医学部・助教授



1. 研究目的

この研究では、第3世代放射光施設である Spring-8 に巨大な生体超分子複合体のための構造解析ビームラインを建設し、超分子複合系の立体構造決定を行い、その動きの仕組みを明らかにすることを目的に、以下の研究を実施した。

- (1) 生体超分子構造解析ビームラインの建設
- (2) チトクロム c 酸化酵素の高分解能構造解析に基づいた酸素還元、プロトン輸送機構の解明
- (3) ウシ肝臓の 20S プロテアソームの X 線結晶構造解析
- (4) 分子量が7000万をこえるイネ萎縮ウイルスの結晶構造解析
- (5) NMR 構造解析法の開発

2. 研究成果概要

2.1 Spring-8 生体超分子構造解析ビームラインの建設

平成 8~10 年の3年間で Spring-8 の BL44XU に生体超分子構造解析に特化した挿入光源ビームラインを建設した。この施設では受光装置としては CCD とイメージングプレート(IP)の両方を使用できるようにした。CCD は全体の大きさは 210mm x 210mm で 0.069 mm の間隔で読み取り、データの記録は 5 秒以内に完了する。データの処理は D*TREC 及び MOSFILM の両方で行うことができる。IP は直径 400mm 読み取り間隔は 0.11 mm で、全体を読み取るのに約 5 分を要するが、格子定数が 1000 でも高分解能の回折データ収集を行うことができる。データ処理は HKL-2000 と MOSFILM の両方で行うことができる。

2.2 ウシ心筋のチトクロム酸化酵素の X 線結晶構造解析

酸化型結晶は常温で 2.3 Å、還元型は常温で 2.35 Å、アジド酸化型は常温で 2.9 Å、

CO 化還元型は常温で 2.8 Å 分解能の構造決定を行なった。酸素還元中心には酸化型では過酸化物が Fe, Cu に配位し両者を橋渡ししている。一方、完全還元型では空になっている。両者の構造を比較すると、酸素還元中心以外にもサブユニット I の Asp51 付近に主鎖を含めた大きな構造変化が有ることが判明した。Asp51 の側鎖は酸化型では内部に埋もれていて COOH の状態になっている。一方、還元型ではこの側鎖は分子表面に露出しており、水素イオンが解離した COO⁻になっていると思われる。

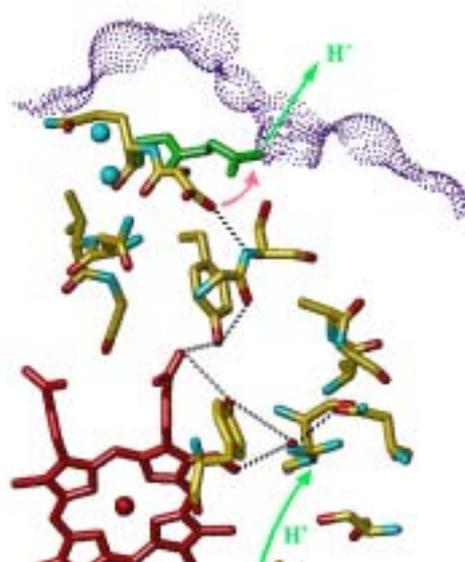


図1 酸化還元に伴う構造変化によってプロトンが輸送される仕組み

アジド酸化型ではアジドが Fe, Cu に配位している、CO 化還元型では CO が Fe に配位している。Asp51 の構造に関しては、アジド酸化型では酸化型と同じで、CO 化還元型では還元型と同じ構造であり、Asp51 の構造は酸素還元中心の配位子には依存しないで酸化状態によって決まる。この酸化還元

伴う Asp51 の構造変化がプロトンポンプの役割を果たしているのであろう (図 1)。

2.3 イネ萎縮ウイルスの X 線結晶構造解析

ab initio 構造解析法を開発し、重原子誘導体や類似の構造モデルなしに構造解析を行うことができるようにした。このウイルスは、分子量が 7000 万をこえる 2 重殻の 2 重ラセン RNA ウイルスである。約 500 個の結晶を使って 3.5 Å 分解能の回折強度データを収集し、780 個の外殻サブユニットと 120 個の内殻サブユニットからなるウイルス全体の構造決定に成功した。構造に基づいてサブユニット間相互作用を解析し、階層的な構造形成の機構を明らかにすることができた。

2.4 ウシ肝臓の 20S プロテアソームの X 線結晶構造解析

高等生物のプロテアソームは $(\alpha_{1-7})_2(\beta_{1-7})_2$ の 14 種 28 サブユニットからなる超分子複合体である。細菌の 20S プロテアソームは $(\alpha_7)_2(\beta_7)_2$ 2 種 28 サブユニットで、酵母は高等生物と同じタイプである。細菌と酵母の酵素は共にドイツのグループによって結晶構造解析が行われている。高等生物では細胞周期の調節や免疫提示などに深く関わっており、構造決定を強く要請されている酵素である。ほ乳類のプロテアソームとしてはじめて構造決定に成功した (図 2)。この構造から新しい活性部位も明らかになった。

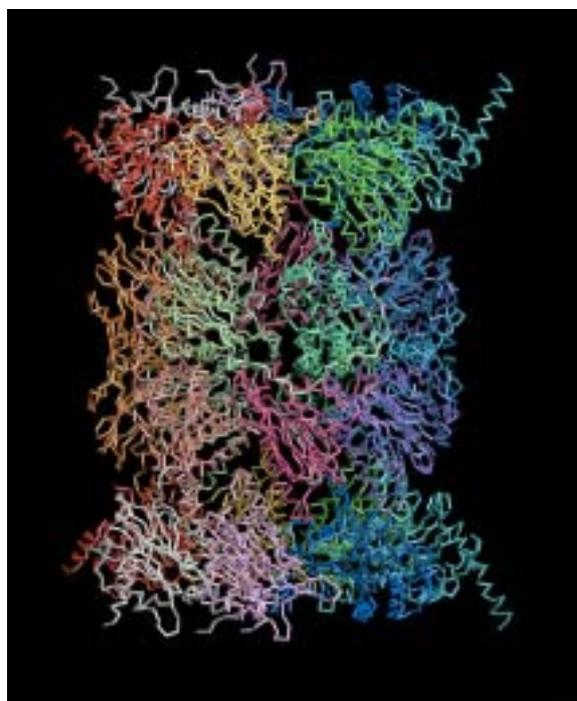


図 2 ウシ肝臓の 20S プロテアソーム

3. 結論

あらゆる生体超分子複合体の回折強度実験が可能な施設である Spring-8 生体超分子構造解析ビームラインを完成させることができた。対称性を利用した新しいウイルスの

構造解析法の開発に成功した。チトクロム酸化酵素の構造研究では、酸素還元とそれに同期したプロトンポンプの機構を示すことができた。イネ萎縮ウイルスの高分解能構造決定により、その自律的構造形成の機構が明らかになった。高等動物の 20S プロテアソームの構造決定に成功し、新しい活性部位も見つかった。これらの分子量は 40 万、7000 万、70 万であり、X 線結晶構造解析は分子量限界が無くなった。

主な発表論文

- (1) S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M. Fei, C. Peters Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki and T. Tsukihara: Redox-Coupled Crystal Structural Change in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase, *Science*, 280, 1723-1729(1998).
- (2) T. Tsukihara and S. Yoshikawa, Crystal Structural Studies of a Membrane Protein Complex, Cytochrome c Oxidase from Bovine Heart, *Acta Crystallogr.*, A54, 895-904 (1998).
- (3) T. Tomizaki, E. Yamashita, H. Yamaguchi, H. Aoyama, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono and S. Yoshikawa, Crystal Structure Analysis of Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å Resolution, *Acta Crystallogr.*, D55, 31-45(1999).
- (4) H. Naitow, Y. Morimoto, H. Mizuno, H. Kano, T. Omura, M. Koizumi and T. Tsukihara, A Low Resolution Crystal Structure of Rice Dwarf Virus Determined by *Ab initio* Phasing, *Acta Crystallogr.* D55, 77-84 (1999).
- (5) M. J. Fei, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, H. Yamaguchi, T. Tsukihara, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima and S. Yoshikawa, X-ray structure of azide bound fully oxidized cytochrome c oxidase from bovine heart muscle at 2.9 Å resolution. *Acta Crystallogr.*, D56, 210-211 (2000).
- (6) Masaki Unno, Tsunehiro Mizushima, Yukio Morimoto, Yoshikazu Tomisugi, Keiji Tanaka, Noritake Yasuoka, and Tomitake Tsukihara, The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution, *Structure* (2002) in press.