1F0900

ウシ心筋チトクロム酸化酵素の2.0 Å分解能でのアミノ酸側鎖構造の精密化

○大床 真美子¹、中島 良介¹、水島 恒裕²、姚 閔³、山下 栄樹²、伊藤-新沢 恭子¹、吉川 信也¹、月原 富武²（¹ 姫路工大・理、² 阪大蛋白研、³ 北大・院理）

蛋白質の機能に関わる微細な構造変化を求めるためには精度の高い解析が求められる。本研究では、2.0 Å分解能でのウシ心筋由来チトクロム酸化酵素のX線結晶構造解析を行い、アミノ酸側鎖の構造精密化について検討した。本酵素は生体中で2量体を形成しており、単量体当たり20種の標準アミノ酸を含む1782残基のアミノ酸から構成されている。多量のアミノ酸を含んでいるため、本酵素のアミノ酸側鎖構造の統計を採って精密化を進めた。

本酵素のX線回折実験は、液体窒素温度に凍結した結晶を用いて低温下で行った。この実験の結果、1個の結晶から得た回折強度データを用いて解析を行い、分解能を2.0 Åにまで向上させることに成功した。

構造精密化は、Engh & Huberのパラメータを用いてプログラムX-PLORで行った。X-PLORでの精密化後のアミノ酸側鎖構造の統計の結果、Met(74残基)のS δ -C ϵ 間の距離が理想値1.79 Åに対して広い範囲に分布していることがわかった。S δ -C ϵ 間の距離に強い束縛を与えて精密化したところR factorは0.6%、freeR factorは0.3%下がり、より精密な構造を得ることができた。また分岐側鎖を持つLeu(189残基)、Thr(121残基)及びVal(113残基)のうち、tetrahedral angleが理想値と大きく異なっていたアミノ酸側鎖の χ 1、 χ 2-angleを手動修正して更にX-PLORでの精密化を行った。その結果、R factorは21.6%から20.5%に、freeR factorは24.7%から24.2%にまで下がり、tetrahedral angleの和は一定の値に収束した。

以上の結果から、1)MetのS δ -C ϵ 間の距離には強い束縛を与えた方が良く、2)tetrahedral angleは構造精密化の指標とすることができるとわかった。

M.Odoko, R.Nakashima, T.Mizushima, M.Yao, E.Yamashita, K.Shinzawa-Ittoh, S.Yoshikawa and T.Tsukihara : X-ray structural refinement of cytochrome c oxidase at 2.0Å resolution by analysis of amino acid side-chain.

1F0930

結晶酵素タンパク質の反応中間体捕捉のための顕微吸収分光計の試作

○小倉 尚志¹、村本 和優²、伊藤-新沢 恭子²、吉川 信也²（¹ 東大・院・総合文化、² 姫工大・理）

酵素反応のしくみを明らかにするためには酵素タンパク質の構造をはっきりさせることが重要である。X線構造解析により得られる立体構造は酵素反応機構解明のもとになる。酵素の反応中間体がある条件下で安定化できる場合には、静的状態に加えて反応中間体の構造をはっきりさせることは反応機構の理解に進展をもたらす。

有色酵素は反応中間体ごとに吸収極大が異なる場合がほとんどである。また、ある種の酵素の結晶は母液に基質を加えると反応する。このような酵素の結晶の反応中間体を捕捉し、X線回折実験を行うために便利な顕微吸収分光光度計を2種類試作した。それらは下記のような装置である。

（1）反応中間体の結晶を低温捕捉するための分光光度計室温で結晶母液に基質を加えて結晶酵素の反応を開始させ、目的の反応中間体の生成を吸収スペクトル的に確認後、液体窒素温度で凍結捕捉する。また、結晶酵素の偏光吸収スペクトルを測定する。

（2）低温捕捉した反応中間体結晶の吸収スペクトル測定装置小型ループに凍結された結晶を低温に保ったまま、吸収スペクトルを測定する。X線照射後、損傷の有無を調べることができる。また、キャピラリー中の結晶の吸収スペクトルを測定する。

これらの装置をウシ心筋チトクロム酸化酵素と過酸化水素との反応に応用した。その結果、共鳴ラマン分光法により鉄オキソ錯体と帰属された、酸化状態の異なる2種類の反応中間体を結晶状態で低温捕捉することに成功した。また、X線回折実験にも成功した。これらの装置は一般に有色酵素タンパク質の反応中間体を結晶状態で低温捕捉し、X線回折実験を行うのに役立つことがわかった。

T. Ogura, K. Muramoto, K. Itoh-Shinzawa, S. Yoshikawa : Development of Microscopic Spectrometer for Trapping Reaction Intermediates of Enzymes in its Crystalline State

1F0915

ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶の1.8 Å分解能データ収集

○青山 浩¹、平田 邦夫²、山下 栄樹²、月原 富武²、加藤 博史³、大床 真美子³、村本 和優³、伊藤-新沢 恭子³、吉川 信也³（¹ 理研・生体物理化学、² 阪大・蛋白研、³ 姫工大・理）

チトクロム酸化酵素の酸素還元と水素イオン能動輸送機構を、明らかにするためには、最終的には水素の原子座標を求めることができるほどの高分解能構造解析が必要となる。低温X線回折実験は、高分解能データ収集に有効であり、また反応中間体を低温で固定して構造解析するためにも不可欠な手法である。

我々は、これまでの低温実験で、2.0 Å分解能のデータ収集に成功しているが、この実験は非常に再現性に乏しく、2.0 Å分解能のデータ収集ができたのは、ただ一回だけであった。また凍結させた結晶は、全て同型性がなく、露光時間をのばし、複数の結晶から得られた反射を足し合わせることができなかった。

そこで、低温実験条件を詳細に検討した。これまででは、不凍剤にグリセロールを使用して、液体窒素中に直接結晶を投入する直接法で凍結を行っていたが、クライオ装置の気流による凍結に切り替えたところ凍結結晶間で同型性が得られ、凍結による結晶の損傷も明らかに減少することがわかった。しかしこれだけでは、2.0 Å以上の回折点は得られなかったため、グリセロール以外の不凍剤による凍結を試みた。その結果エチレングリコールを不凍剤に用いると、再現性よく1.8 Å以上の回折点が得られることが明らかとなった。

SPRing-8の大阪大学蛋白研ビームライン(BL44XU)で、回折実験を行ったところ1.65 Å分解能の回折点が確認され、100-1.8 Åの範囲で観測された反射数が3,614,983個そのうち独立な反射数は604,170個、 R_{merge} は7.0%、完全性は99.2%というデータ収集に成功した。現在精密化を行っており、発表では1.8 Å分解能の構造についても報告する予定である。

H.Aoyama, K.Hirata, E.Yamashita, T.Tsukihara, H.Kato, M.Odoko, K.Muramoto, K.Itoh-Shinzawa, S.Yoshikawa : Data collection of bovine heart cytochrome c oxidase at 1.8Å resolution

1F0945

ウシ心筋チトクロム酸化酵素反応中間体の結晶の作成

○村本 和優¹、小倉 尚志²、青山 浩³、山下 栄樹⁴、月原 富武⁴、伊藤-新沢 恭子¹、吉川 信也¹（¹ 姫工大・理、² 東大・院・総合文化、³ 理研・生体物理化学、⁴ 阪大・蛋白研）

チトクロム酸化酵素における酸素還元反応では活性中心に結合した酸素1分子が水2分子に変化する。この反応過程には、活性中心の酸化状態や結合している分子種の異なる複数の中間状態が存在することが、分光学的研究等により明らかにされてきた。その結果、これまでに各反応中間体の構造として幾つかのモデルが提唱されてきている。更に、電子やプロトンの移動がどの反応中間体の形成に共役して起こっているのかは現在も多くの議論がされている。反応中間体のうちPならばF型は、完全酸化型との差スペクトルを測定した場合にそれぞれ607 nmならびに580 nmに吸収極大を示す特徴を持つ。P型は還元型の活性中心に酸素が結合した結果生じると考えられ、F型はP型の活性中心に更に1電子が移動したことにより生じると考えられている。活性中心に結合している分子種の同定は現在も課題となっている。最近のX線結晶構造解析の結果からは、完全酸化型、完全還元型、阻害剤結合型の酵素立体構造が決定され、酵素の酸化状態の変化に伴う構造変化が示されている。本研究では、P型およびF型反応中間体の立体構造をX線結晶構造解析により明らかにすることを目的として、それぞれの結晶標品の作成を行った。酸化型酵素に過酸化水素を添加した場合、過酸化水素の濃度に依存してP型、F型が生成されることが知られている。そこで、結晶母液中に過酸化水素を添加し、結晶の吸収スペクトル変化を測定した。測定には新しく開発した顕微分光装置を使用した。その結果、P型およびF型に特徴的な吸収を持つ結晶標品が得られ、それらを用いてX線回折データの収集を行った。現在、構造解析を進めるとともに、反応中間体結晶標品の分光学的性質の解析を行っている。

K. Muramoto, T. Ogura, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tsukihara, K. Itoh-Shinzawa, S. Yoshikawa : The crystals of bovine heart cytochrome c oxidase in catalytic cycle.