

月原富武

兵庫県立大学大学院生命理学研究科  
特任教授

ミトコンドリア呼吸鎖の構造生命科学－構造がもたらす正確さ

## § 1. 研究実施体制

### (1)「兵庫県立大」グループ

- ① 研究代表者: 月原 富武 (兵庫県立大学大学院生命理学研究科、特任教授)
- ② 研究項目
  - ・チトクロム酸化酵素(複合体 IV)の水素原子を同定できる X 線結晶構造解析とナノ秒時分割結晶構造解析によって、酸素還元とプロトンポンプ機構を原子の挙動として解明する。
  - ・NADH-ユビキノン還元酵素(複合体I)の2次元及び3次元構造解析
  - ・ミトコンドリア呼吸系構成蛋白質間の相互作用の解析

### (2)「理研」グループ

- ① 主たる共同研究者: 上野 剛  
(独立行政法人理化学研究所放射光科学総合研究センター、専任技師)
- ② 研究項目
  - ・X 線自由電子レーザーを用いて、チトクロム酸化酵素のナノ秒時分割構造解析を行うための技術開発及び回折実験を行う。

## § 2. 研究実施の概要

### I. X線無損傷結晶構造解析による複合体IVの完全酸化型の構造決定(論文1)

X線自由電子レーザー(XFEL)施設である SACLA では強力な X 線を 10 fs という極めて短いパルスの X 線を発生することができる。この新しい XFEL は反応過程を直接観測する高速時分割構造解析に道を拓く X 線である。複合体 IV でその反応過程を観測するために準備実験を進めている。高分解能の回折像が得られるのかどうか、回折強度を見積もることができるか否かなど幾つかの克服すべき問題がある。それらの問題点を克服する手始めに、チトクロム酸化酵素(複合体 IV) の X 線無損傷構造解析を行った。

チトクロム酸化酵素をはじめとするヘム蛋白質は、X 線照射によってヘム鉄が還元されることは避けられない。そのために X 線結晶構造解析によって得られた構造は X 線損傷を受けた構造の可能性がある。X 線照射後 10 fs では原子核の移動は起らない。従って 10 fs のパルス X 線によって回折強度を収集すれば X 線無損傷のデータが得られる。一方、強力な XFEL を結晶に照射すると、瞬時に結晶全体にその影響が広がると考えられていた。実際にそうした損傷が 100K でも起るか否かを酸化型チトクロム酸化酵素の結晶を用いて確認実験を SACLA で行った。その結果、1~2 $\mu\text{m}$  の大きさの X 線では、影響が回折強度の減衰として表れるのは半径 10  $\mu\text{m}$  の範囲であった。そこで 50  $\mu\text{m}$  間隔で結晶に X 線を照射する方法を採用した。

通常の X 線回折強度は回折が生じる角度領域を連続して走査し、その積分値を求めることによって計測される。10 fs のパルス光を照射する間に走査することは出来ない。そこで、0.10° 間隔で測定して、擬似的な連続走査と見なして強度を見積もることによって、1.9 Å 回折強度データ収集を行った。

構造解析の結果、活性中心には X 線損傷の影響を受けていない過酸化物(O-O)が Fe と Cu を橋渡している構造を確認した。このことによって長年懸案であった、完全酸化型の構造についての論争に終止符を打つことができた(図)。また、極低温での大きな結晶を用いた X 線自由電子レーザーによる X 線無損傷高分解能結晶構造解析法を確立することが出来た。

### II. 複合体 IV の構造研究(論文2)

複合体 I の低分解能構造解析を電子顕微鏡 2次元結晶によって行った。その結果、膜外領域の構造には2種類のコンフォメーションが存在することを明らかにした。

