

平成 25 年度

# ウシ心筋 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の 精製と 2 次元結晶化

博士 論文

兵庫県立大学大学院生命理学研究科生命科学専攻

細胞制御Ⅱ講座

前田 晋太郎

2014 年 3 月 7 日

指導教官 城 宜嗣 教授

吉川 信也 特任教授

月原 富武 特任教授

伊藤(新澤) 恭子 准教授

# 目次

## 第壹章 序論

- 1-1. ミトコンドリア呼吸鎖
- 1-2. ATP 合成酵素
- 1-3. 膜タンパク質の2次元結晶化
- 1-4. 電子線結晶構造解析

## 第貳章 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の精製法の検討

### 第壹節 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の精製法の検討

- 2-1.  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の精製
  - 2-1-1. 緒言・目的

### 第貳節 材料/過去の調製法

- 2-2. 材料/方法
  - 2-2-1. ミトコンドリア内膜小胞の精製法
  - 2-2-2.  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の可溶化
  - 2-2-3. 吸収スペクトルの測定及び濃度決定
  - 2-2-4. ATP 加水分解活性測定法
  - 2-2-5. 含有リン量測定法
  - 2-2-6. コリン定量法
  - 2-2-7. 糖定量法
  - 2-2-8. 脂質抽出と薄層クロマトグラフィー
  - 2-2-9. 脂質分注法

### 第参節 結果/新規開発した調製法

- 2-3. 新規開発した調整法
  - 2-3-1. 活性測定法の検討
  - 2-3-2. ミトコンドリア内膜小胞量
  - 2-3-3. ミトコンドリア内膜小胞の調製
  - 2-3-4. 懸濁液濃度による酵素活性の差 (1)



- 2-3-5. 酵素活性/阻害率の誤差低減
- 2-3-6. 懸濁液濃度による酵素活性の差 (2)
- 2-3-7. カラムクロマトグラフィー条件検討
- 2-3-8. 含有脂質に関する分析
- 2-3-9.  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の熱安定性

#### 第肆節. 考察

- 2-4. 考察

#### 第伍節. 結論

- 2-5. 結論

### 第参章 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の結晶化

#### 第壹節 $F_0F_1$ -ATP 構成酵素の結晶化条件の検討

- 3-1.  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の 2 次元結晶化

- 3-1-1. 緒言・目的

#### 第貳節 装置/原理

- 3-2. 装置/原理

- 3-2-1. 電子顕微鏡

- 3-2-2. 真空蒸着機

- 3-2-3. イオンコーター

#### 第参節 試薬調整法

- 3-3. 試薬調整法

- 3-3-1. 脂質調整法

- 3-3-2. 脂質使用法

- 3-3-3. 脂質溶解溶液調整法

- 3-3-4. 結晶化用透析緩衝液調整法

- 3-3-5. 3 者複合溶液調製法

- 3-3-6. 透析ボタンを用いた 2 次元結晶化方法

- 3-3-7. 結晶化用緩衝液交換方法

- 3-3-8. 電子顕微鏡観察用グリッド作製方法

- 3-3-9. 金属染色法

## 第肆節 結果/新規 2次元結晶化条件検討

### 3-4. 結果

#### 3-4-1. Negative control

#### 3-4-2. 結晶化用脂質の検討

#### 3-4-3. 脂質と複合体Vの混合方法

#### 3-4-4. インキュベーション時間の検討

#### 3-4-5. 結晶化用透析ボタンの検討

#### 3-4-6. 透析外液の金属イオン組成

#### 3-4-7. 結晶化に用いる画分の選択

#### 3-4-8. CLの添加効果

#### 3-4-9. シート状結晶の形成

#### 3-4-10. Lyso PC と透析温度変更の併用

#### 3-4-11. Lyso PC (16:0)添加に於ける再現性

#### 3-4-12. 複合体Vの2次元結晶と改善点

#### 3-4-13. 複合体Vの安定性向上

#### 3-4-14. 2次元結晶中の複合体Vが示す ATP 加水分解活性

#### 3-4-15. 結晶の保存条件

## 第伍節 考察

### 3-5. 考察

## 第陸節 結論

### 3-6. 結論

まとめ

参考文献

謝辞

## 略語一覧

NADH: 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

ATP: アデノシンサンリン酸

Na-Pi 緩衝液: リン酸ナトリウム緩衝液

K-Pi 緩衝液: リン酸カリウム緩衝液

HEPES-Na 緩衝液: ヘペスナトリウム緩衝液

EDTA: エチレンジアミン四酢酸

DTT: ジチオスレイトール

DDM: ドデシルマルトシド

DM: デシルマルトシド

PEP: ホスホエノールピルビン酸

LDH: 乳酸脱水素酵素

PK: ピルビン酸キナーゼ

TLC: 薄層クロマトグラフィー

DMPC: ジミリストイルホスファチジルコリン

CL: カルジオリピン

Lyso PC: モノアシルホスファチジルコリン

Lyso PG: モノアシルホスファチジルグリセロール

NAD<sup>+</sup>: 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

DOC: デオキシコール酸

HS 緩衝液: ヘペスナトリウムスクロース緩衝液

ADP: アデノシンニリン酸

LPR: 脂質酵素比

AMP-PNP: アデニル-イミドニリン酸

## 図番号

- Figure 1. ミトコンドリア内膜模式図 page 12
- Figure 2.  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の模式図 page 16
- Figure 3. 2次元結晶化の原理模式図 page 18
- Figure 4. 極低温電子顕微鏡写真 (播磨・理研) page 20
- Figure 5. ウシ心筋複合体Vの精製法 page 25
- Figure 6. V-630 可視吸収分光光度計 page 26
- Figure 7. ATP 加水分解活性の測定方法 page 29
- Figure 8. 含有リン量測定法 page 31
- Figure 9. コリン定量法 page 32
- Figure 10. 糖定量法 page
- Figure 11. リン脂質組成分析法 page 35
- Figure 12. 温度による ATP 加水分解活性様式の差 page 40
- Figure 13. ATP 加水分解活性算出領域 page 42
- Figure 14. 酵素量に対する減少した波長 340 nm の吸光度差 page 43
- Figure 15. ATP 加水分解活性算出領域 page 44
- Figure 16. ミトコンドリア内膜小胞沈殿 page 48
- Figure 17. ミトコンドリア内膜小胞沈殿 (アスピレーター使用) page 51
- Figure 18. Q-Sepharose カラムクロマトグラフ page 55
- Figure 19. Q-Sepharose カラム溶出後酵素と Poros-20HQ カラム溶出後酵素の吸収スペクトル (還元型-酸化型) page 56
- Figure 20. 旧溶出条件による Poros-20HQ カラムクロマトグラフ (AA95) page 57
- Figure 21. 新溶出条件による Poros-20HQ カラムクロマトグラフ (AA100) page 58
- Figure 22. 新溶出条件,2.7倍カラムベッド体積によるクロマトグラフ(AA166) page 59
- Figure 23. 溶出量変化による酵素濃度の向上 (AA159) page 60
- Figure 24. BN-PAGE によるモノマー/ダイマー構成比 (山本卒論) page 62
- Figure 25. 各温度保存による酵素活性の増減 page 66
- Figure 26. 各温度保存による阻害率の増減 page 66
- Figure 27. 光学顕微鏡と電子顕微鏡模式図 page 77
- Figure 28. 真空蒸着機 page 81

- Figure 29. 雲母版 page 82
- Figure 30. イオンコーター page 83
- Figure 31. Negative control page 89
- Figure 32. 各種結晶化用脂質構造式 page 90
- Figure 33. 各種結晶化用脂質の検討 page 91
- Figure 34. 調整法①の概略図 page 93
- Figure 35. 調整法②の概略図 page 94
- Figure 36. 調整法③の概略図 page 95
- Figure 37. 調整法④の概略図 page 96
- Figure 38. 調整法①による結晶化結果 page 97
- Figure 39. 調整法②による結晶化結果 page 98
- Figure 40. 調整法③による結晶化結果 page 99
- Figure 41. 調整法④による結晶化結果 page 100
- Figure 42. 3者複合溶液のインキュベーション時間 page 102
- Figure 43. 透析ボタンスクリーニング page 104
- Figure 44. 金属イオンスクリーニング結果 page 106
- Figure 45. Poros-20HQ カラムクロマトグラフ page 107
- Figure 46. 結晶化画分の選択 page 108
- Figure 47. ウシカルジオリピンの構造 page 109
- Figure 48. カルジオリピン添加による結晶化への影響 page 111
- Figure 49. 結晶化温度スクリーニング page 112
- Figure 50. 結晶化温度スクリーニング結果 page 113
- Figure 51. 結晶化温度スクリーニング (annealing) page 115
- Figure 52. 結晶化温度スクリーニング結果 (annealing) page 115
- Figure 53. 脂質膜中でのカルジオリピンとモノアシルリン脂質の構造 page 116
- Figure 54. モノアシルリン脂質の添加効果 page 117
- Figure 55. DMPC と Lyso PC の混合比率スクリーニング page 118
- Figure 56. モノアシルリン脂質混合比率検討 page 119
- Figure 57. Lyso PC のアシル鎖スクリーニング page 120
- Figure 58. Lyso PC のアシル鎖スクリーニング page 121
- Figure 59. 結晶化温度スクリーニング page 122
- Figure 60. Lyso PC と透析温度変更の併用 page 123

- Figure 61. 結晶化温度スクリーニング (annealing) page 124
- Figure 62. Lyso PC と透析温度変更の併用 (annealing) page 125
- Figure 63. 透析温度スクリーニング (27 °C、26 °C) page 126
- Figure 64. Lyso PC と透析温度の併用 (27 °C、26 °C) page 126
- Figure 65. DMPC:Lyso PC (16:0)=10:1 (wt:wt)を用いた結晶化再現性 page 128
- Figure 66. 複合体Vの2次元結晶とその結晶から得られたFFT.スポット page 130
- Figure 67. 複合体Vの一部の2次元結晶に認められる問題点 page 131
- Figure 68. カオトロピックイオンを含まない緩衝液での結晶化スクリーニング page 133
- Figure 69. cサブユニットに結合するオリゴマイシン page 134
- Figure 70. オリゴマイシンの構造式 page 135
- Figure 71. オリゴマイシン結合型酵素と非結合型酵素の酵素活性 page 136
- Figure 72. オリゴマイシン結合型複合体の結晶化スクリーニング page 137
- Figure 73. オリゴマイシン結合型酵素と非結合型酵素の結晶パッキング想像図 page 138
- Figure 74. AMP-PNP 構造式 page 138
- Figure 75. AMP-PNP 結合型複合体Vの結晶化スクリーニング page 139
- Figure 76. 添加剤の構造式と分子量 page 140
- Figure 77. 各種化合物添加による結晶化への影響 page 142
- Figure 78. 各種界面活性剤とその臨界ミセル濃度 page 143
- Figure 79. 各種界面活性剤添加が及ぼす結晶への影響 page 144
- Figure 80. 脂質流動性の検討 page 147-148
- Figure 81. 2次元結晶中の複合体Vの活性測定法 page 150
- Figure 82. 2次元結晶中の複合体Vの活性測定結果 page 151
- Figure 83. 結晶保存条件の検討 page 153
- Figure 84. 保存結晶の安定性 page 154
- Figure 85. 複合体Vの結晶パッキングの想像図 page 155
- 
- Table 1. 3か月毎に於けるミトコンドリア量の推移 page 45
- Table 2. ミトコンドリア内膜小胞量の推移 page 46
- Table 3. 各呼吸鎖複合体の精製に用いる界面活性剤と量 page 50
- Table 4. 懸濁液濃度に対する酵素活性の推移 page 53
- Table 5. 複合体V旧溶出条件 (Poros-20HQ カラムクロマトグラフィー用) page 57
- Table 6. 複合体V新溶出条件 (Poros-20HQ カラムクロマトグラフィー用) page 58

- Table 7. 各溶出量に対する酵素濃度、比活性、阻害率、含有リン量の差 page 61
- Table 8. 各画分に於ける含有リン量 page 63
- Table 9. 各画分に於ける含有リン量と結晶形成の有無 page 63
- Table 10. 可溶化懸濁液濃度の違いによる含有リン量の差 page 64
- Table 11. 各懸濁液濃度の違いによる含有リン脂質組成 page 64
- Table 12. 複合体Vの熱安定性 page 65
- Table 13. 加速電圧と電子線波長 page 79
- Table 14. 脂質溶解溶液組成 page 85
- Table 15. 金属イオンスクリーニング page 105
- Table 16. カルジオリピン添加による酵素活性、阻害率、含有リン量の変化 page 109
- Table 17. 結晶化用透析緩衝液組成と添加剤濃度 page 141
- Table 18. 各種脂質の相転移温度 page 145

# 第壹章

## 序論



# 第壹節 序論

## 1-1. ミトコンドリア呼吸鎖

生命活動を行うに際して、生物は外界より物質を取り入れ変化させることで必要なエネルギーを獲得する。呼吸とはそのエネルギー変換系のことであり、それにより数多くの機能を有す生きた細胞はエネルギーを恒常的に維持することができる。この過程の最終段階を掌る場所が呼吸鎖であり、それはミトコンドリア内膜上に在る。呼吸鎖は、3種の膜タンパク質複合体によって構成され、種々の複合体が触媒する反応は各々複合体に対して極めて特化しておりそれと共役してプロトンを内膜から外側へ能動輸送する機能を有する。4種の複合体とは NADH-ユビキノン酸化還元酵素(複合体 I)、ユビキノール-シトクロム *c* 酸化還元酵素 (複合体 III)、シトクロム *c* 酸化酵素 (複合体 IV) である。複合体 I によって NADH が酸化され、受け取った電子はユビキノンへと伝達される。ユビキノンへと伝わった電子は複合体 III、シトクロム *c*、複合体 IV を介し最終的に分子状酸素に伝達され水が形成される。これら一連の反応によって放出されたエネルギーを用いプロトンが膜を介して輸送される。各々複合体によってプロトンが輸送され内膜を介したプロトン濃度勾配 (proton motive force) が形成される。プロトン濃度勾配として蓄積したエネルギーは  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素 (複合体 V) によって ATP 合成に費やされる。合成された ATP は以降生体内エネルギーを必要とする反応に消費される。

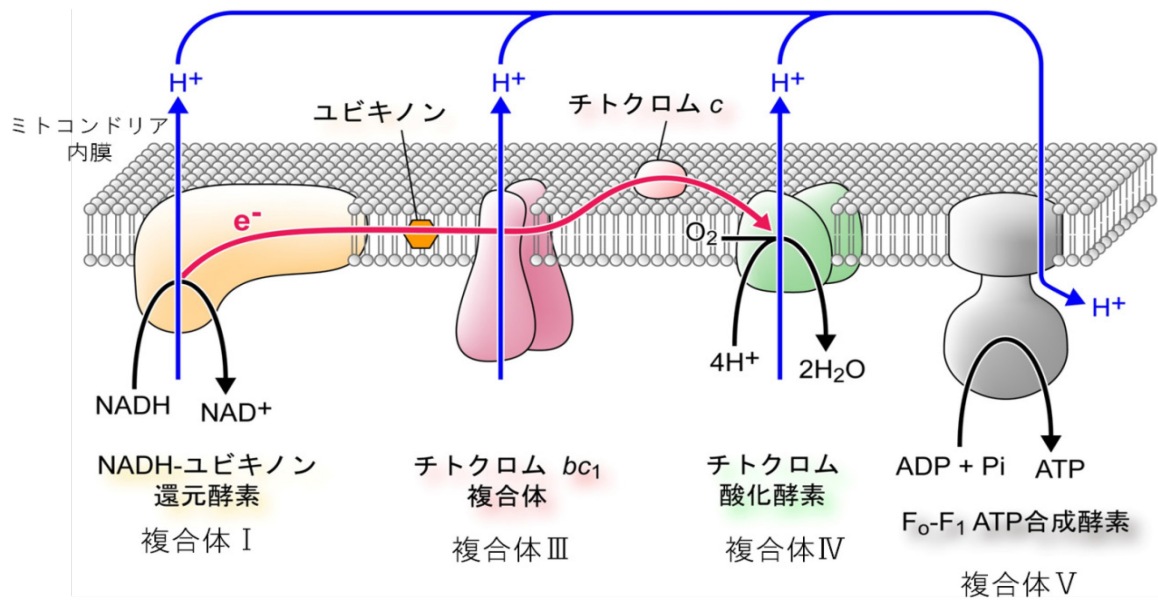


Figure 1. ミトコンドリア内膜模式図

## 1-2. ATP 合成酵素

ATP がエネルギー代謝を支える通貨として位置づけられたのは、1939 年 F.A.Lipman によってである。その ATP は遡ること 10 年つまり、1929 年に Lohman、Fiske、Subbarow によって発見された。その後、1942 年に筋肉の構成繊維を ATP 添加により収縮させることが認められ、改めて ATP がエネルギーを供給していることが確認された。細胞内のエネルギー代謝を支える ATP を合成している酵素は、ミトコンドリア内膜より突出した形で存在していることを H.Fernandez-Moran により電子顕微鏡像から発見された。その後、E.Racker、香川靖雄によって発見された酵素が ATP 合成酵素であると推定され、1963 年 M.Avron によって植物の葉緑体チラコイド膜にも同様の休場突起が見出され、先に見つかったミトコンドリア内膜上の ATP 合成酵素と共通の基本構造を持ち、プロトンの輸送と共役した ATP 合成反応する機構をもつことが判明した。まさに、その酵素が細胞内エネルギー代謝の中心的化合物である ATP のほぼすべてを供給する  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素である。1990 年前後、液胞に ATP 合成酵素が存在していることが報告され、 $V_0V_1$ -ATP 合成酵素であることが判明した。この V 型 ATP 合成酵素は、 $H^+$  を輸送する F 型 ATP 合成酵素と同型の酵素である。1994 年、J.E.Walker らによって  $F_1$  部位の X 線結晶構造解析も完成し (Abrahams et al., 1994)、1997 年ノーベル賞を獲得している。1975 年、第 3 の超界について、古細菌の ATP 合成酵素 (A 型  $H^+$ -ATPase) が存在していることが証明された。1987 年向畑恭男らに免疫化学的に、1989 年吉田賢右らに遺伝子 DNA 解析によって A 型  $H^+$ -ATPase が V 型  $H^+$ -ATPase に F 型  $H^+$ -ATPase より進化学的に近縁であることが証明された。これら研究により、 $H^+$  輸送型 ATPase の進化学的系図が明らかとなった。

$F_0F_1$  -ATP 合成酵素 (複合体 V) はミトコンドリア内膜に在る巨大膜タンパク質複合体である。電子顕微鏡を用いて観察するとミトコンドリア内膜よりロリポップキャンデーのように突出した像を見ることができる。ミトコンドリア内膜には例としてシトクロム c 酸化酵素を初めとするその他多くのプロトンポンプが存在して化学エネルギーを利用してプロトンを一方向に能動的に輸送している。その結果、膜を挟んでプロトンの濃度勾配が形成される。所謂、電気化学ポテンシャル差である。複合体 V はこのプロトンの電気化学ポテンシャル差の勾配に沿った流れを利用し ATP の合成反応を触媒している。また同時に、ATP 加水分解によって生み出されたエネルギーを利用

したプロトンポンプとしての機能も併せ持つ。全体の構成はバクテリアからヒトまで極めて高度に保存され、大きく2つの部位に分類することが可能である。それは親水性部位  $F_1$  と疎水性部位  $F_0$  である。親水性部位  $F_1$  を構成するサブユニットは最も単純なバクテリアで  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  サブユニットであり、ATP 合成または加水分解を触媒する機能を有している。対して、疎水性部位  $F_0$  を構成するサブユニットは  $ab_2c_{8-15}$  であり、プロトンの通路となり膜を介した移送を機能とする。生体環境中で ATP 合成酵素が触媒する反応は ATP の合成反応である。しかし、その触媒機構は他の酵素と大きく異なる。ATP 合成酵素の反応機構である回転触媒説は 1981 年 P.D.Boyer によって提唱された(Boyer 1993)。その言葉が示す通り ATP 合成酵素の回転子サブユニットが固定子サブユニットに対して回転することで固定子の構造変化が引き起こされ ATP が合成されるというものである。詳細に記すと  $F_1$  に在って ATP を合成する3つの触媒部位がそれぞれ位相をずらして反応を触媒している。それぞれの触媒部位は ATP 型、ADP 型、ヌクレオチド非結合型の3種のコンフォメーションをとり、これら触媒部位がそれぞれ位相を変化させるのである。この変化は回転子  $\gamma$  サブユニットの向きによって決まり、それぞれの触媒部位はヌクレオチド非結合型  $\Rightarrow$  ADP 型、ADP 型  $\Rightarrow$  ATP 型、ATP 型  $\Rightarrow$  ヌクレオチド非結合型へと遷移することでそれぞれの触媒部位で ATP が合成されマトリックス側へ放出される。一つの触媒部位に注目するとヌクレオチド非結合型  $\Rightarrow$  ADP 型  $\Rightarrow$  ATP 型へと変化することになる。このような特異稀な反応機構は、1994年に報告された  $F_1$  の結晶構造の解明でにわかに信憑性が高まり、そして1997年、野路らによって光学顕微鏡を用いた  $F_1$ -ATPase による ATP 加水分解のリアルタイム観察により決定的となった(Noji et al., 1997)。このように複合体 V の研究は飛躍的に進歩したわけである。しかしながら、未だ理解されていない部分は多く、当然その中に全体構造も含まれる。さらに、奥深いところでは  $F_1$  と連結した  $F_0$  の関係である。上記の回転機構を持つすべての ATP 合成酵素は、回転子サブユニットの  $360^\circ$  回転に合わせて3分子の ATP を合成することができる。故に、1分子の ATP 合成に必要な回転は  $120^\circ$  である。しかし、この  $F_1$  に連結し駆動する  $F_0$  の c リングのサブユニット数は生物種によって大きく異なり最小がウシの8個(Watt et al., 2010)、最大がシアノバクテリアの15個である(Pogoryelov et al., 2009)。c リングはそれを構成するサブユニットである c サブユニットにそれぞれプロトンを結合することが可能である。つまり、ウシの場合、3分子の ATP が合成される間に8個のプロトンがマトリックス側へ流れ、シアノバクテリアであれば15個のプロトンがマトリックス側へと流される。つまり、1分子の ATP 合成に必要なプロトンはウシで2.7、シアノバクテリアで5で

ある。シアノバクテリアの5個は整数であるので納得できるが、ウシの2.7という値は納得し難い。上記の考え方は化学量論的に考えた場合であり、熱力学的に考えた場合はまた異なる(Steigmiller et al., 2008)。熱力学的に考えると、すべての複合体Vで1分子のATP合成に必要なプロトンの数は4となる。これら値の矛盾は現在も議論されている。更には、F<sub>0</sub>における固定子サブユニットと回転子サブユニットの相互作用である。回転子であるcリングは100回転/sec.のスピードで昼夜問わず回転し続けている。この極めて高速で回転する物体と固定子との相互作用はどのようなものであるか未だはっきりしていないのである。

最も高等な生物である哺乳類のウシ複合体Vは全18種のサブユニットにより構成され、それらサブユニットはミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の両者にコードされる。ミトコンドリア遺伝子にコードされるサブユニットはF<sub>0</sub>を構成するa、A6Lサブユニットのみであり、それ以外は核遺伝子にコードされる。複合体Vの分子量はあらゆる生物種に関わらず平均して60万である。これはATP合成酵素の基本単位がATP合成反応を司るサブユニットであり、これらサブユニットは生物種問わず極めて高度に保存される。対し、ATP合成に直接寄与しない補助サブユニットが複数あり、バクテリアなど下等な生物の場合基本単位としてのサブユニットのみでATP合成酵素が構成される。高等な生物の場合ATP合成に直接寄与しない補助サブユニットも含めATP合成酵素が構成される。これら補助サブユニットは極めて小さく1つの膜貫通ヘリックスをサブユニットとすることが生物種問わず分子量に大きな差が認められない理由である。複合体Vの機本単位となるサブユニットは8個あり固定子として5個(α、δ、a、bサブユニット)、回転子とし3個(γ、ε、cサブユニット)ある。複合体Vの補助サブユニット数は多く、ウシの場合OSCP、F6、d、f、A6L、i、e、g、k、(s)、IF1である。これら多くの補助サブユニットが担う役割について詳細は明らかになっておらず、正確な位置の特定にも至っていない。しかし、斜体で示したサブユニットは既に機能が明らかとなり、前者4つは複合体Vのダイマー形成に寄与し、後者は複合体Vが触媒するATP合成反応及び加水分解反応の制御に寄与する。ミトコンドリア環境中に在る複合体Vは“V字型”のダイマーを形成することが周知され、それが規則的に配列することでより高次のオリゴマーとなる(。その結果、ミトコンドリア内膜の歪みを生じさせ、ミトコンドリア内膜に特徴的な形態であるクリステを形成する(Davies et al., 2012)。クリステの形成は内膜の表面積を向上させることができ、それにより内膜中に在り機能する膜タンパク質の量が増加しエネルギー代謝回転が向上す

る。遺伝子実験技術を用いて赤で記述したサブユニット遺伝子を欠損させると、複合体Vのダイマーが著しく減少し、ミトコンドリア内膜の形態が徹底的に崩壊する。故に、複合体Vは単に ATP の供給のみを担っているだけでなく、内膜に在る膜タンパク質が機能する為の場を提供する極めて重要な酵素である。そのような極めて重要な酵素でありながら、長年にわたる組織的な努力にも関わらず全体構造は未だもって解明できていない。これは、上記したような複雑な反応機構を持つ巨大な膜タンパク質複合体であるが故である。これにより、複合体Vに対する結晶化は不可能であるとも言われている。

そこで、本研究はサブユニット欠損の全く認められない完全な複合体Vの全体構造を解明することを目的として、精製法の開発、結晶化法の開発に取り組むこととした。

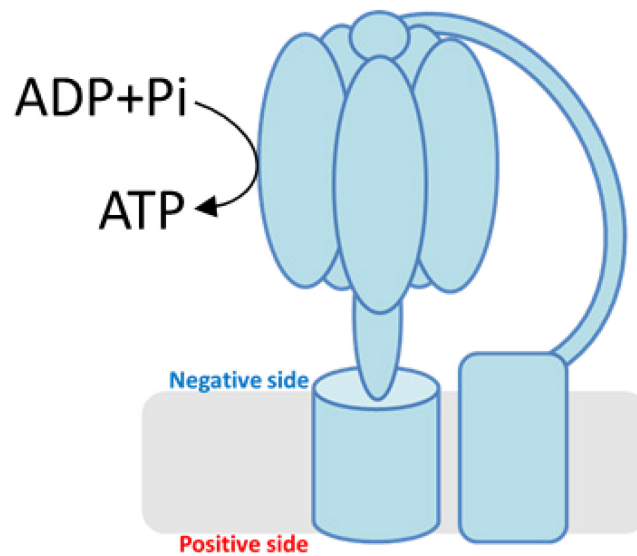


Figure 2. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の模式図

### 1-3. 膜タンパク質の2次元結晶化

生物は細胞を基本単位として形成されており、その細胞は細胞膜という脂質2重膜で囲まれている。脂質2重膜を構成する脂質分子は親水性頭部と疎水性尾部によって構成される。細胞質は極めて親水性が高いことから、細胞膜は脂質2分子が各々の疎水性部位を内側に親水性部位を外側に向けた状態で形作られる。この細胞膜に結合ないし埋もれる形で存在しているのが膜タンパク質である。現在、その細胞膜を貫通する形で存在している貫通型膜タンパク質に関しては2次元結晶の作製が成功しそこから電子線結晶構造解析によって詳細な構造が決定されている。所謂、チャネルやポンプと呼ばれ生体中で極めて重要な役割を担っている酵素である。これら膜貫通タンパク質は、脂質と同様に疎水性領域と親水性領域を持っており、界面活性剤によって脂質二重層から可溶化、つまり取り出すことが可能である。この可溶化というステップは膜タンパク質の精製において最も重要なステップであり、また同時に膜タンパク質の結晶化にも大きく影響を及ぼすこととなる。特に、界面活性剤の選択は膜タンパク質の構造を安定に維持するという点で極めて重要であり、その選択が、構造解析が成功するか否かについて重要な鍵となる。現在における結晶構造解析は、X線結晶構造解析を主流としており、界面活性剤に可溶化された酵素分子を親水性部位の相互作用によって配列した3次元的にX線を照射して構造情報を得るというものである。生体膜中に在って初めて安定となる膜タンパク質に於いて溶解した状態は不安定な状態といえる。対して、2次元結晶は膜より酵素を可溶化することなく作製できる利点を持つ。2次元結晶を用いて電子線結晶構造解析によって解かれた構造は、結晶が単層である点を最大限に生かし不要な相互作用による歪みのない膜タンパク質本来の構造である。そのような電子線結晶構造解析による膜タンパク質の2次元結晶から解かれた構造としてはバクテリオロドプシン(Mitsuoka et al., 1999)やアクアポリン(Gonen T et al., 2005)がある。前者は既に生体膜中で2次元結晶を作っていることが知られ、その2次元結晶が、イオン性界面活性剤を用いて膜融合することで大きくした後、電子線結晶構造解析されている。このように、目的とする膜タンパク質を大量に含む膜が得られれば、膜からタンパク質を取り出すことなしで2次元結晶を作製できる。しかしながら、一般的に構造を決定したい膜タンパク質は界面活性剤によって可溶化し精製する必要がある。つまり、2次元結晶を作製する場合においても界面活性剤の選択が極め

て重要な要因となる。精製した膜タンパク質を同様に界面活性剤で可溶化した脂質と混ぜて、そこから界面活性剤を透析により除去することで脂質二重層中に膜タンパク質が埋まった膜を再構成する。膜タンパク質の2次元結晶を得るためには、脂質の選択や透析温度、透析外液組成などの結晶化条件を最適化しなければならない。膜タンパク質が再構成する脂質は目的とする膜タンパク質が生体環境に在る際に生体膜を形成する脂質と同じとは限らない。故に、2次元結晶を作製したい場合、まずさまざまな脂質をスクリーニングする必要がある、用いる脂質によって必然的に透析温度を変化させる必要がある。これら結晶化条件のすべてを最適化することで初めて膜タンパク質の2次元結晶が成長する。しかしながら、やはり膜タンパク質の構造決定は安定した酵素を精製しなければならないことに留意する必要がある。(Figure 3. 日本結晶学会誌第47巻第1号 2005)

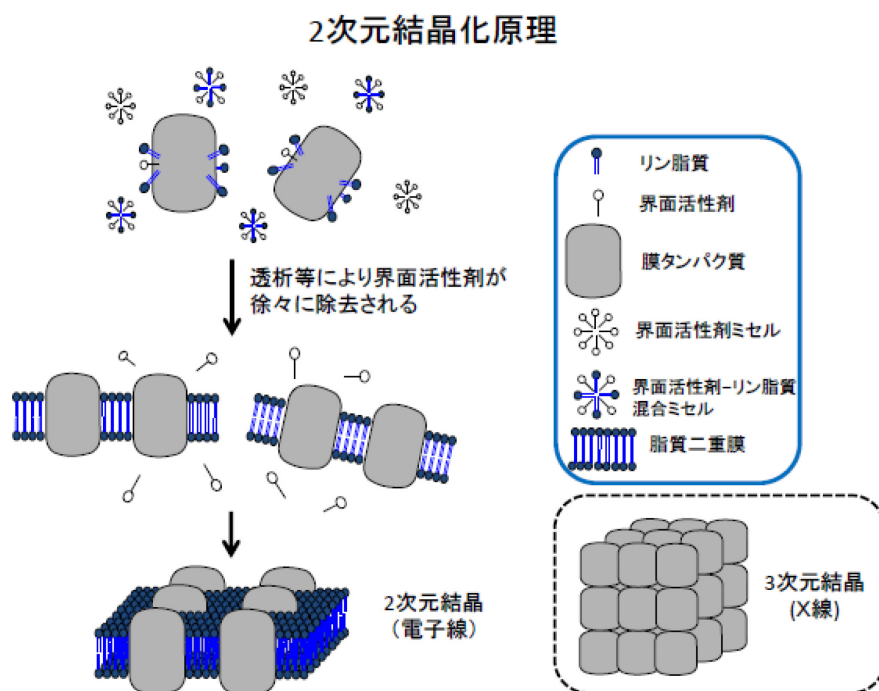


Figure 3. 2次元結晶化の原理模式図



## 1-4. 電子線結晶構造解析

電子線は X 線と比べて極めて波長が短く、X 線と比較し質量の軽い原子に対しての相互作用が遥かに強い。文献値を参考にすると約 10 万倍である。相互作用が極めて強いことを利点とし、電子線結晶構造解析は構造情報収集に用いる結晶の大きさが  $1 \mu\text{m}^2$  程度であり、これは X 線結晶構造解析と比較すると極めて小さい。結晶中において電子線回折現象に寄与する分子数はおよそ 10 万とされ、極めて高い相互作用も寄与し非常に小さいサイズの結晶からでも高分解能情報を持った回折点を得ることが可能である。しかしながら、相互作用が強さから電子線照射による試料への損傷は甚大であり、回折点の強度が急激に減衰する。そのメカニズムは電子線照射によって結晶中の共有結合が断ち切られ、それによって生じるラジカルによって周囲の試料が次々に破壊され、最終的に試料が蒸発する。つまり電子線結晶構造解析を行う為には、電子線照射による試料へのダメージを抑える必要がある。電子線による損傷を抑える為には、試料は液体エタンによって急速凍結しアモルファス氷の中に包埋され、液体ヘリウムによって冷却することが可能であるクライオステージを装着した極低温電子顕微鏡 (Figure 4) を用いて観察が行われる。電子線による試料の損傷は、低温環境下で抑えることができ、液体窒素ステージを装着する低温電子顕微鏡であればおよそ 1/10 にでき、液体ヘリウムステージを装着する極低温電子顕微鏡であれば 1/20 にまでダメージを減らすことができる。また、液体ヘリウムステージを用いることで、液体窒素ステージを用いた時と比較しておよそ 2 倍の電子線量を試料へ照射することができる。重金属を用いた染色を施さない為、得られる構造情報は、生体環境に在るときに極めて近い状態を示し、そこから解かれた構造は膜タンパク質本来の構造であるといえる。(日本結晶学会 47 44-49 2005)

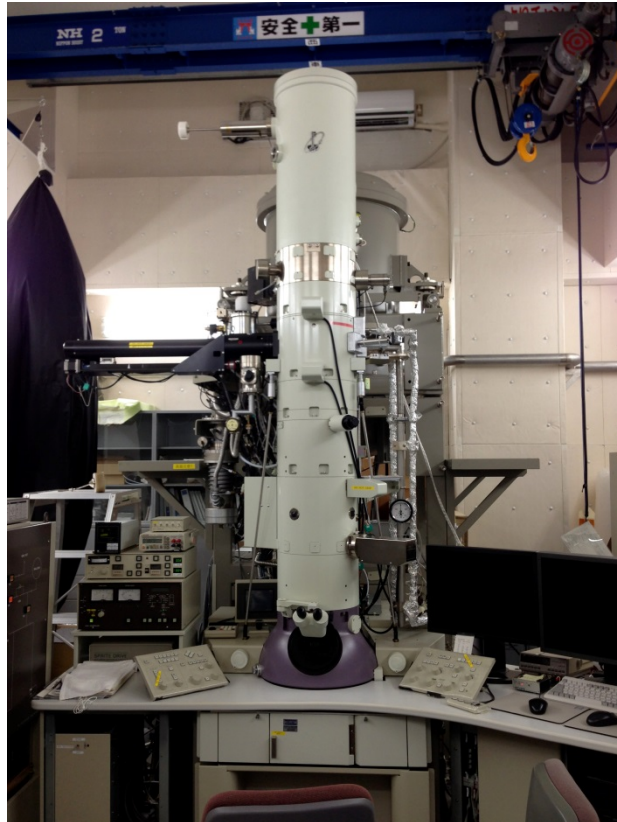


Figure 4. 極低温電子顕微鏡写真（播磨・理研）

## 第弐章

### F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の精製について

## 第壹節 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の精製法の検討

### 2-1. $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の精製

#### 2-1-1. 緒言・目的

複合体Vは極めて複雑かつ不安定であるが故に多くの研究者が組織的に全体構造解明をするべく尽力しているが未だに成功していない。所属する研究室に於いて複合体Vは複合体Iを精製する過程で夾雑物として存在していることを発見されて以来長年に亘る研究により複合体Vをウシ心筋ミトコンドリアから単離する方法を確立した(Hashimoto 1999)。精製法の確立と同時に複合体Vの全体構造解明を念頭に2次元結晶化条件の詳細な検討が行われてきた。しかしながら、こちらに関しては未だに条件の確立には至っていない。このような複雑かつ不安定な酵素の結晶化条件確立の成否は、如何に安定した酵素標品を得ることが出来るかにかかっている。

本研究目的は電子線結晶構造解析を用いた全体構造の解明であるが、それに適した標品を安定に得られる新規精製法の確立を試みた。従来精製法を用いて精製した複合体VはATP加水分解活性、阻害剤感受性共に低く、各精製に大きくばらつく結果となった。故に、結晶化を行っても精製毎に異なる結果となり、適切な結晶化条件を絞ることが出来なかった。更に酵素標品としての純度が低く、夾雑物としてシトクロム酸化酵素を少なからず含んでいた。複合体Vの純度を上げるべく、硫酸アンモニウム分画、ショ糖密度勾配遠心分離、カラムクロマトグラフィーなどを試みたが純度を上げることに成功しても酵素活性、阻害剤感受性の低下を招いた。

本章では、結晶化を行うに適した標品を得るべく新規の複合体Vの精製法開発し、その結果について記載する。

## 第弐節 材料/過去の調製法

### 2-2. 材料/方法

#### 2-2-1. ミトコンドリア内膜小胞の精製法

ウシ心臓の皮、筋、脂肪分をできるだけ取り除いた心筋を用意し、ミンチ機(日立製作所製 Meat Chopper 12RF 型)にかけ、ミンチ約 1,100 g を用意した。550 g のミンチに対して、PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) をその時の気分だけ加え、氷水 (イオン交換水) 2,875 ml, 0.2 M Na-Pi 緩衝液緩衝液 (pH 7.4) 375 ml を加え、破碎した (11,000 rpm, 5 min ; 日本精機製破碎機)。懸濁液を遠心分離し (2,800 rpm, 20 min ; 久保田製作所製大容量冷却遠心機 9810 型、RS-6600 ローター)、上清は 2 枚重ねしたガーゼで濾し、直ちに 3 N NaOH で pH を 7.4 に調整した。氷中で保存した残りのミンチ 550 g も同様に処理し、上清回収した。沈殿からミトコンドリア画分を再回収するため、沈殿に対して氷水 (イオン交換水) 3,000 ml, 0.2 M Na-Pi 緩衝液緩衝液 (pH 7.4) 375 ml を加え、破碎し (11,000 rpm, 5 min)、遠心分離した (2,800 rpm, 20 min)。上清をガーゼで濾し、氷中に保存済の上清と合わせた。集めた上清を遠心分離し (10,000 rpm, 30 min ; Beckman 社製冷却式フロア型高機能遠心機 Avanti HP-30I, JLA-10.500 ローター)、沈殿に 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) を加え、ガラステフロンポッター型ホモジナイザーを用いて繰り返しすりつぶした。10 本の超遠心チューブ (6 本; Beckman 社製 45Ti ローター、4 本; 日立社製 P45AT-548 ローター) に均等に懸濁液を入れさらに懸濁用緩衝液を超遠心チューブの首まで加え、超遠心分離した (30,000 rpm, 30 min ; Beckman 社製超遠心機 L-7 型、45Ti ローター、30,000 rpm, 30 min ; 日立)。超遠心分離後、上清は超遠心チューブを傾けて除去した。沈殿に 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) を加え、ガラステフロンポッター型ホモジナイザーを用い

ですりつぶした。懸濁量は、沈殿量から推測して 320~360 ml 程度とし、この懸濁液をミトコンドリア内膜小胞懸濁液とした。

## 2-2-2. $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の可溶化

11% (w/v)DOC(デオキシコール酸ナトリウム) (pH 8~9)をミトコンドリア内膜小胞懸濁液 1 l に対し 66.125 ml となるように、また、20 % (w/v) DM (デシルマルトシド)を終濃度が 0.4 % (w/v)となるように 30 秒かけてゆっくりと加え、酵素を可溶化した。直ちに終濃度が 7.2 % (w/v)となるように塩化カリウムを加えた。氷中で攪拌し、溶解したのを確認後、遠心分離 (39,000 rpm, 50 min, 6 本 Beckman 社製 45Ti ローター用)して、上清を回収した。0.2 % DM, 0.05 % DDM, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 2 mM  $MgCl_2$  を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8)に 2.0 M, 1.1 M, 1.0 M, 0.9 M sucrose を加えたものをそれぞれ調製しておいた。遠心チューブに 2.0 M を 8 ml (9.92 g)、1.1 M を 5 ml、1.0 M を 15 ml、0.9 M を Beckman の遠心チューブには 13 ml、日立の遠心チューブには 12 ml のせて、sucrose の段階的濃度勾配を作製した。この上に遠心後の上清を、0.1 mM DTT、0.1 mM EDTA、0.2 % DM、2 mM  $MgCl_2$  を含む 40 mM HEPES-Na (pH 7.8)で 1.5 倍に希釈したものを 24 ml のせ、遠心した (39,000 rpm, 15.5 hour, accel slow, brake slow)。遠心後、遠心チューブの底から約 4 ml ずつ分取し、各分画 10  $\mu$ l を用いて活性測定を行い(ATP 加水分解活性、後述)、活性の高い画分を集めた。この画分を超遠心チューブ (Beckman 社製 45Ti ローター用)に均等に分け、2 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8)を遠心チューブの首まで入れ、遠心分離した (35,000 rpm, 15 min)。上清を 150 mM sucrose, 0.2 % DM, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8)で平衡化した Poros-20HQ カラム ( $\phi$ ;26 mm、 $l$ ;50 mm) に吸着させ、塩化カリウム濃度 400 mM までの直線的濃度勾配によって溶出させた。カラムの  $A_{280\text{ nm}}$  の吸光度より得られたピークから複合体 V 画分を判断し、画分ごとに集め、2 mM  $MgCl_2$ 、0.5 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) 800 ml に対して 20 分の透析 (分画分子量約 14,000 ; Viskase 社製透析用セルロースチューブ UC20-32-100)を 3 回繰り返した。透析後、限外濾過 (画分分子量 200,000 ; 東洋濾紙社製ウルトラフィルター43 mm)によって濃縮

したものを最終標品とした。最終標品はエッペンドチューブに小分けし、液体窒素で凍結後、-80 °Cで保存した。

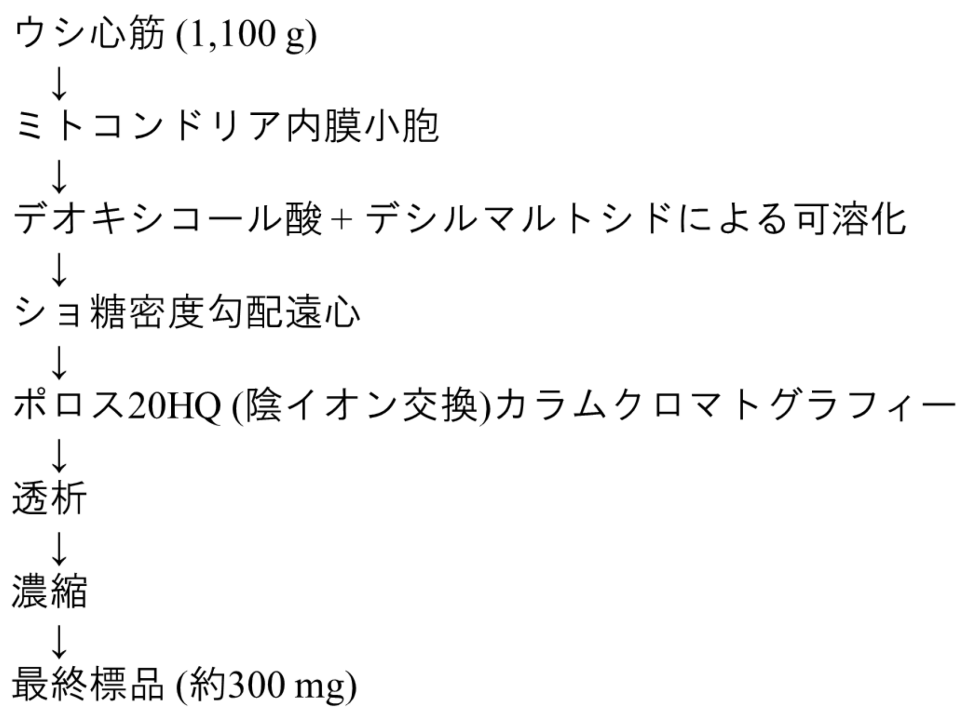


Figure 5. ウシ心筋複合体Vの精製法

### 2-2-3. 吸収スペクトルの 定及び濃度決定

0.2 % DM, 0.1 mM DTT/EDTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>を含む40 mM HEPES-Na緩衝液 (pH 7.8) 1000 μl を 1 cm×1 cm の石英セルに加えた後、酵素標品 20 μl をセルに加え全量を 1020 μl にし、セル中で静かに転倒攪拌した。その後、石英セルを可視吸収分光光度計（日本分光社製 V-630 BIO spectrophotometer）のセルホルダーにセットしスペクトル測定モードで 250 nm~700 nm の吸収スペクトルを測定した。測定温度は 20°Cで行い、分光光度計は少なくとも 1 時間前には立ち上げ重水素ランプを温める必要がある。

濃度決定は、278 nm と 700 nm の吸光度差に複合体Vの分子吸光係数 1.52 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> と希釈倍率 51 を掛けて濃度を算出した。濃縮後の複合体Vは、気泡が発生しやすい特徴がある。その為、酵素標品を石英セルに加えた後 700 nm の吸光度が 0.270-0.280 の範囲で安定するまで待つ。



Figure 6. V-630 可視吸収分光光度計



## 2-2-4. ATP 加水分解活性 定方法

ATP 加水分解活性は、NADH の酸化にともなう 340 nm の吸光度の減少を測定し酵素活性とした。反応は、1 cm×1 cm の石英セル内で行い反応温度は、 $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ とした。測定用緩衝液は 0.2 % DDM, 100 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM PEP, 2.5 mM ATP, 200  $\mu\text{M}$  NADH を含む 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8)とし、反応液の組成は全量を 2110  $\mu\text{l}$ とした。あらかじめ PEP<sup>\*</sup>, ATP<sup>\*\*</sup>, NADH<sup>\*\*\*</sup>はそれぞれ 250 mM, 250 mM, 20 mM となるように 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM KCl を含む 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8)を加え調製しておき、上記の終濃度となるように石英セルに加えた。反応溶液は測定ごとに調製し、石英セル内でスターラーを用いて攪拌し常に反応温度が一定に保たれるように留意した。そこに 10 mg/ml LDH<sup>\*\*\*\*</sup>を 20  $\mu\text{l}$ , 10 mg/ml PK<sup>\*\*\*\*\*</sup>を 20  $\mu\text{l}$  添加した。添加後吸光度の減少が認められなくなるまで約 5 分待った。その後、複合体 V 標品を 10  $\mu\text{l}$  添加し、反応を開始させた。340 nm での吸光度の減少を測定し、酵素を加えて 20 秒後の吸光度と 80 秒後の吸光度から  $\Delta\text{Abs}_{340}/\text{min}$  を求め、 $\epsilon_{340\text{ nm}}=6.22\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  を用いて酵素活性を求めた。また、エタノールに溶解した 20 mM オリゴマイシンを終濃度が 20  $\mu\text{M}$  となるように反応溶液にあらかじめ加え、同様に測定を行い、酵素の阻害活性を求めた。(Chang et al., 1973)

\*PEP 和光純薬工業社製の PEP (code No. 164-14761) 250 mg を 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) 4.85 ml で溶かし、200  $\mu$ l ずつエッペンドルフチューブに分け、液体窒素で凍結し、-80 °C で保存しておいたものを使用した。

\*\*ATP SIGMA 社製の ATP (code No.A-2383)を約 20 mg ずつ小分けし、測定当日に 250 mM となるように 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8)で溶解した。溶解後は、常にアイスボックスに入れ低温室で保管した。

\*\*\*NADH SIGMA 社製の NADH (code No. N-8129-100 mg)を 2-5 mg ずつ小分けにしておき、測定当日に 100 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8)で 20 mM になるように溶解させたものを使用した。

\*\*\*\*LDH オリエンタル酵母社製の LDH (code No. 46580002) 10,000 U が 2 ml の緩衝液に溶けた状態で届くので、そこへ 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8)を 860  $\mu$ l 加え、85  $\mu$ l ずつエッペンドルフチューブに分け、液体窒素で凍結し、-80 °C で保存しておいたものを使用した。

※調整の際は必ず氷上で行う。

\*\*\*\*\*PK SIGMA 社製の PK (code No. P9136-1 kU)を 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) 1 ml に溶かし、80  $\mu$ l ずつエッペンドルフチューブに分け、液体窒素で凍結し、-80 °C で保存しておいたものを使用した。

※調整の際は必ず氷上で行う。

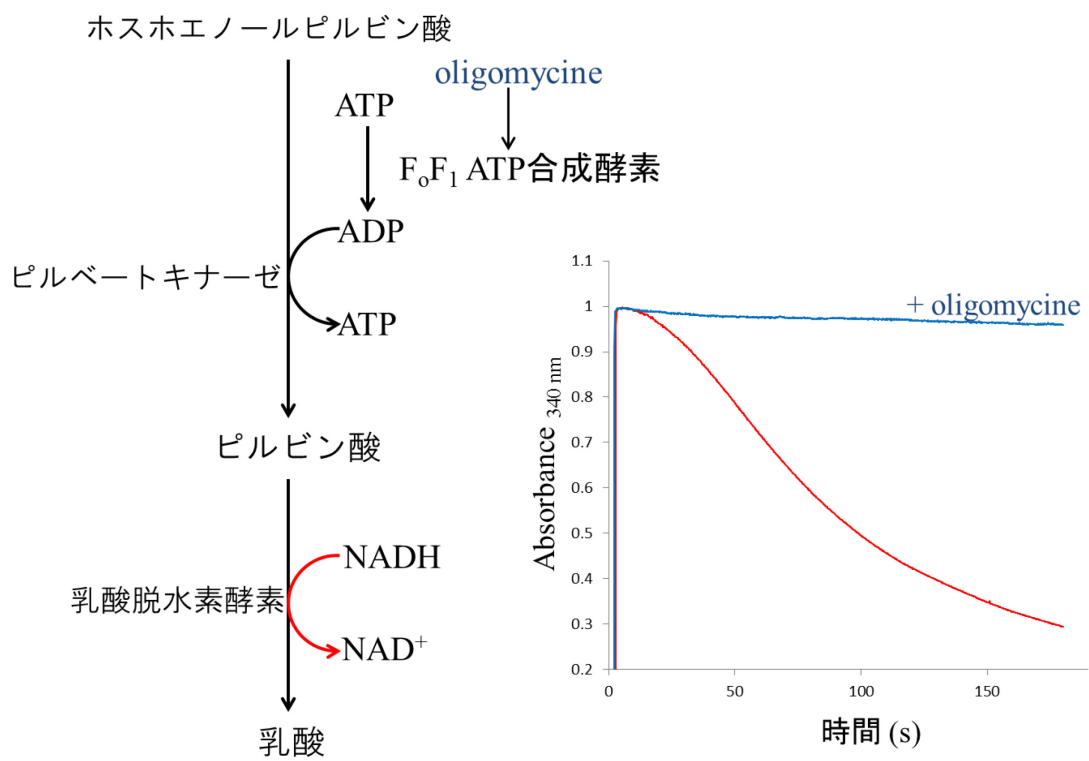


Figure 7. ATP加水分解活性の測定方法

## 2-2-5. 含有リン量 定法

0.5 mM リン酸水素 2 カリウム水溶液を 0、40、80、120、160、200  $\mu\text{l}$  ずつ試験管に取り milli Q で全量を 200  $\mu\text{l}$  としたものを標準試料とした。酵素標品の定量的場合、酵素の量を変化させたものを、3 点または 4 点試験管に取り milli Q で全量を 200  $\mu\text{l}$  とした。脂質の抽出、TLC による分離を行い、それぞれのスポットから回収し、有機溶媒を気化させた試料には milli Q を 200  $\mu\text{l}$  加えた。標準試料及び各試料に 60 % 過塩素酸を酵素標品の定量や標準試料には 500  $\mu\text{l}$  ずつ、TLC からかきとり、抽出したものには 250  $\mu\text{l}$  加え、ガラス玉で試験管の口を塞ぎ、155  $^{\circ}\text{C}$  のヒートブロック中で 2 日間以上無色透明になるまで加熱し湿式灰化した。冷却後、0.22 % モリブデン酸アンモニウムを 2.4 ml ずつ、アミドール試薬(アミドール 0.5 g を 20 % 亜硫酸水素ナトリウム 50 ml に溶解し濾紙で濾過したもの) を 100  $\mu\text{l}$  ずつ加え、ガラス玉で試験管の口を塞ぎ、100  $^{\circ}\text{C}$  のヒートブロック中で 12 分間加熱した。氷水で冷却後室温に戻し、830 nm の吸光度を測定した (V-630 BIO spectrophotometer 日本分光社製)。

精製酵素		0.5 mM NaHPO <sub>4</sub>	Milli Q
		μl	μl
↓ 耐熱性試験管に右表に準じて 標準試料と試料を入れる。		0	200
		40	160
	↓ 500 μl過塩素酸を入れる	80	120
		120	80
		160	40
	200	0	
↓ 155°C 3日間加熱			
精製酵素		精製酵素	Milli Q
		μl	μl
↓ 0.22%モリブデン酸アンモ ニウム2.4 ml加えた後、アミ ドール100 μl入れる。		2	198
		6	194
		8	192
	↓ 100°C 12 min加熱	16	184
		32	168

830 nm吸光度測定

Figure 8. 含有リン量測定法

## 2-2-6. コリン定量法

和光純薬株式会社製のリン脂質 C-テストワコーを使用した。キットの付属品である 3 mg/ml のリン脂質基準液を 4、8、12、16、20  $\mu\text{l}$ 、酵素標品は 2、6、8、16、32  $\mu\text{l}$  試験管に取り、すべての試験管にキットの付属品である緩衝液と発色剤を混ぜた発色液を 3 ml ずつ加えた。攪拌後、37  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間インキュベートした。その後、600 nm の吸光度を測定した（V-630 BIO spectrophotometer 日本分光社製）。

精製酵素 ↓ 耐熱性試験管に右表に準じて 標準試料と試料を入れる。 ↓ 発色液を 3 ml 加える。 ↓ 37 $^{\circ}\text{C}$ 以上 5分間反応 ↓ 600 nm吸光度測定	3 mg/ml 塩化コリン $\mu\text{l}$	Milli Q $\mu\text{l}$
	4	36
	8	32
	12	18
	16	14
	20	10
	精製酵素 $\mu\text{l}$	Milli Q $\mu\text{l}$
	2	38
	6	34
	8	32
	16	14
	32	8

Figure 9. コリン定量法

## 2-2-7. 糖定量法

試験管に 200  $\mu\text{l}$  ずつ Milli Q を量りとり 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 % DM 溶液をそれぞれ 10  $\mu\text{l}$  ずつ加えたものを標準試料とした。測定試料も同様に、Milli Q を 200  $\mu\text{l}$  量りとり、試料を 10  $\mu\text{l}$  加えた。これら標準試料及び測定試料に 5 % フェノール溶液を 200  $\mu\text{l}$  ずつ加えた後、97 % 濃硫酸を 1 ml ずつ加え攪拌し、20 分静置後 485 nm の吸光度を測定した (V-630 BIO spectrophotometer 日本分光社製)。

精製酵素		20 % DM $\mu\text{l}$	Milli Q $\mu\text{l}$
↓ 耐熱性試験管に右表に準じて 標準試料と試料を入れる。		0	200
		10	190
	↓ 5 % フェノールを 200 $\mu\text{l}$ 加えた後 濃硫酸 1 ml 加える。	20	180
		30	170
		40	160
↓ 20分静置			
↓ 485 nm 吸光度測定	精製酵素 $\mu\text{l}$	Milli Q $\mu\text{l}$	
	10	190	
	20	180	
	30	170	
	40	160	
	50	150	

Figure 10. 糖定量法

## 2-2-8. 脂質抽出と薄層クロマトグラフィー

蓋つき試験管（ねじ口試験管 マルエム社製）を試料数用意する。1 試料につき 10 mg のタンパク質を用いる。試料に抽出溶媒 1 ml（クロロホルム：メタノール：アンモニア=65: 2: 33）、Milli Q 0.5 ml 加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌を行う。その後、スイングバケット式遠心分離機で遠心分離を行う（2800 rpm 15 min）。パスツールピペットを用いて下のクロロホルム層を抽出し、別の蓋つき試験管に入れる。上層に再度抽出溶媒を 1 ml 加える。再度ボルテックスミキサーで攪拌後遠心分離を行い下層のクロロホルムを回収する。1 度目のクロロホルムと 2 度目のクロロホルムを合わせた後遠心分離を行う。上層のごみを取り除き、湯煎を行いながら Ar ガスもしくは N<sub>2</sub> ガスでクロロホルムを完全に揮発させる。クロロホルムが揮発すると抽出した脂質がフィルム状になる。そこに、新しいクロロホルムを 20  $\mu$ l 入れ脂質を溶解させる。15 cm $\times$ 15 cm に切断した薄層プレート（TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> メルク社製）にキャピラリーを用いてスポットする。1 次元展開溶媒はクロロホルム：メタノール：H<sub>2</sub>O：NH<sub>3</sub>=6: 4: 0.3: 0.2 を用いて薄層プレートの 9 割ほど展開する。1 次元展開後直ちに 2 次元展開溶媒（クロロホルム：メタノール：Milli Q：酢酸=75: 22: 3: 0.1）に入れ展開する。同様に薄層プレートの 9 割ほど展開させ終了後鉛筆で展開溶媒の先端に線を引く。完全に乾燥後、0.005 % プリムリン溶液につける。この溶液がない場合、ストック 0.1 % プリムリンを 20 倍にアセトンで希釈それを Milli Q を使い重量比 4:1 で混ぜる。プリムリンが乾燥したら 365 nm の光で観察する。1 日乾燥後、鉛筆でスポットを○で囲む。それぞれのスポットをスパチュラーのヘラ部分で掻きだす。掻きだしたものはふた付きの試験管に入れ、抽出溶媒（クロロホルム：メタノール=2: 1）を 1 ml 加える。ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌後、スイングバケット式遠心分離機で遠心分離を行う（2800 rpm 15 min）。上清をパスツールピペットで吸い取り耐熱試験管に入れ、Ar ガスを吹き付け乾燥させる 200  $\mu$ l Milli Q 入れ、過塩素酸（code No.26502-85、ナカライテスク社製）を 250  $\mu$ l 入れ 155  $^{\circ}$ C に熱し加熱消化する。



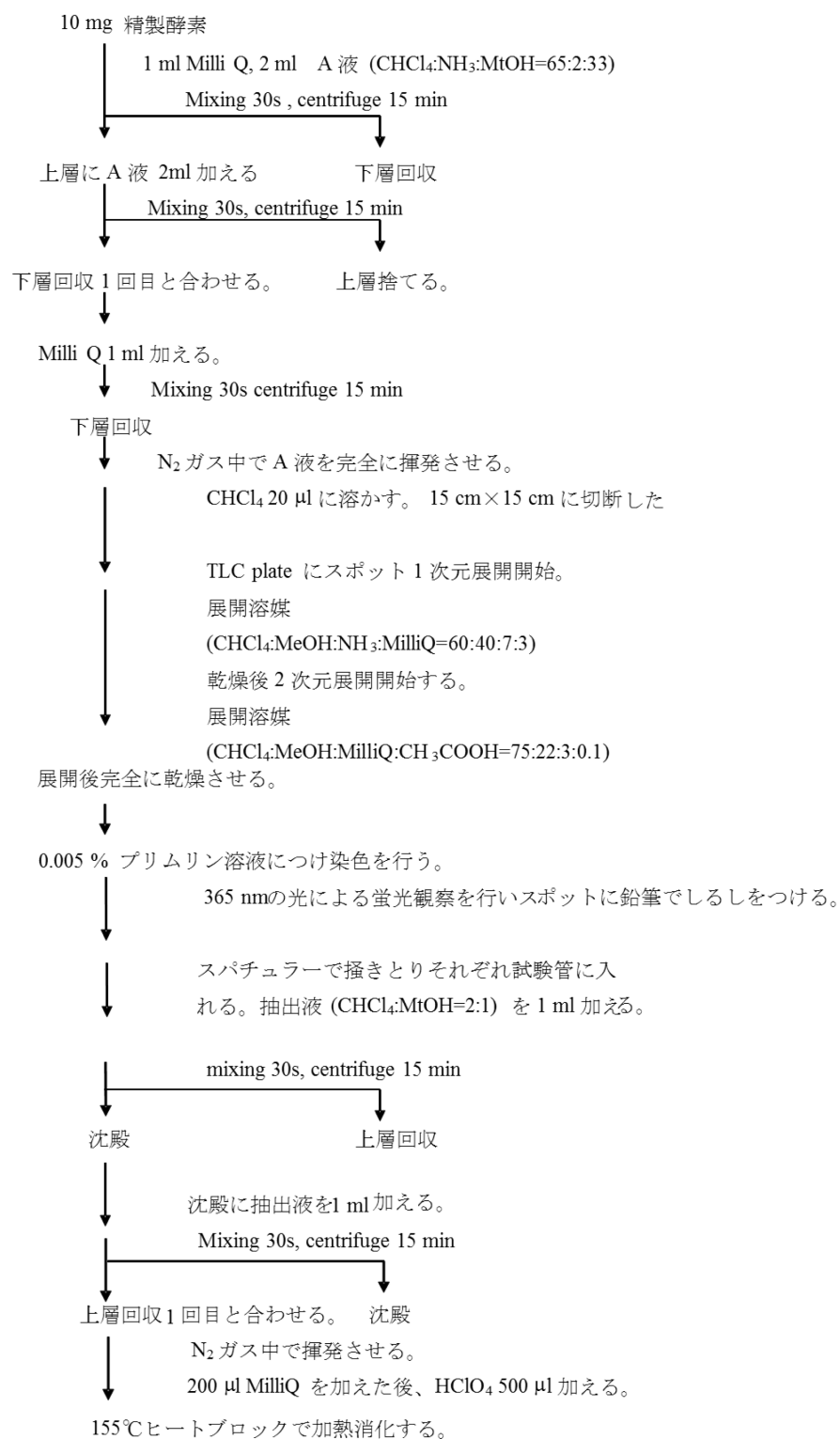


Figure 11. リン脂質組成分析法

## 2-2-9. 脂質分注法

100 mg DMPC (SIGMA) Pcode;1001547885

50 ml ナスフラスコを新しいクロロホルムで2回洗浄する。Ar ガスを吹き付け乾燥させ、ゴム栓で蓋をする。-80°Cで保存しておいた脂質をデシケーターに入れ常温になるまで待つ。100 mg DMPC (SIGMA 社製の脂質の場合)、ナスフラスコに脂質を入れたら直ちにクロロホルムを2 ml 入れる。この時、元瓶はクロロホルムで洗わない。脂質が完全に溶解したら250 µl マイクロマンで410 µl ずつ1 ml ガラス製バイアル瓶に入れすぐに Ar ガスを入れ密封し、シーリングテープで使用するまで封をする。濃度は、コリン定量により決定し、その濃度を脂質濃度として扱う。

25 mg CL (フナコシ社製) Avanti order;219614 12/13/2012

CLはクロロホルムに溶解しガラス製アンプル瓶に密封されて手元に届く。その為、ダイヤモンドカッターでアンプル瓶に傷をつけ口を割り300 µl ずつ1 ml ガラス製バイアル瓶に入れ分注する。濃度は測定不可能であるため、記載されている通り10 mg/ml として扱う。

Lyso PC (Avanti 社製) Avanti order;217248 10/18/2012

50 ml ナスフラスコを新しいクロロホルムで2回洗浄する。Ar ガスを吹き付け乾燥させ、ゴム栓で蓋をする。-80°Cで保存しておいた脂質をデシケーターに入れ常温になるまで待つ。25 mg Lyso PC (Avanti 社製の脂質の場合)、ナスフラスコに脂質を入れたら直ちにクロロホルム1.25 ml、メタノール1.25 ml 入れる。Lyso PCは、親水性が高い為クロロホルムのみでは絶対に溶解せず必ずクロロホルム:メタノール=1:1 で溶解すること。脂質が完全に溶解したら250 µl マイクロマンで300 µl ずつ1 ml ガラス製バイアル瓶に入れすぐに Ar ガスを入れ密封し、シーリングテープで使用するまで封をする。濃度は、コリン定量により決定し、その濃度を脂質濃度として扱う。

Lyso PG (Avanti 社製) Avanti order;231480 9/12/2013

50 ml ナスフラスコを新しいクロロホルムで2回洗浄する。Ar ガスを吹き付け乾燥させ、ゴム栓で蓋をする。-80°Cで保存しておいた脂質をデシケーターに入れ常温に

なるまで待つ。25 mg Lyso PG (Avanti 社製の脂質の場合)、ナスフラスコに脂質を入れたら直ちにクロロホルム 1.25 ml、メタノール 1.25 ml 入れる。Lyso PC は、親水性が高い為クロロホルムのみでは絶対に溶解せず必ずクロロホルム:メタノール=1:1 で溶解すること。脂質が完全に溶解したら 250  $\mu$ l マイクロマンで 300  $\mu$ l ずつ 1 ml ガラス製バイアル瓶に入れすぐに Ar ガスを入れ密封し、シーリングテープで使用するまで封をする。濃度は測定不可能であるため、記載されている通り 25 mg/ml として扱う。

## 第参節 結果/新規開発した調製法

### 2-3. 新規開発した調製法

#### 2-3-1. 活性 定法の検討

##### (i) 新規活性測定法の開発

最初に記述することは複合体Vの活性の測定法についてである。複合体Vはミトコンドリア内膜、リポソームなど脂質2重膜中など膜電位（ここでは proton motive force である）がある環境でのみ ATP 合成反応を触媒する。膜電位がない環境では ATP 加水分解反応を触媒し、その活性はオリゴマイシンによって阻害される。本研究に於いても、この ATP 加水分解活性とオリゴマイシン感受性をそれぞれ測定し、精製酵素を評価する指標としている。複合体Vを評価するための指標である酵素活性は複雑な反応系を用いるために、正確に測定することは測定者の高い技術を必要とする。

ATP 加水分解反応を直接測定することは困難なので NADH が  $\text{NAD}^+$  へと酸化される際に消失する波長 340 nm の吸光度から算出する (Figure 12)。測定は容量 3 ml の 1 cm 角の石英キュベットを用いる。石英キュベットに活性測定用 (detergent 有り) 緩衝液を 2 ml とスターラーバーを入れる。そこに、20 mM に調整した NADH を最大容量 100  $\mu\text{l}$  のピペットマンで 20  $\mu\text{l}$  量り取り、ピペットマンのチップに付着した余分な NADH をキムワイプでふき取った後キュベット内に添加した。次に、250 mM に調整した ATP を同じマイクロピペットを用いて 20  $\mu\text{l}$  量り取り、キムワイプでチップの外側をふき取った後キュベット内に添加した。次に、250 mM に調整した PEP を同じマイクロピペットを用いて 20  $\mu\text{l}$  量り取りキムワイプでチップの外側をふき取った後キュベット内に添加した。従来の方法は、LDH 続いて PK を添加し酵素活性を測定していたが、新規の方法では先にオリゴマイシンを添加して阻害活性を測定する。その為、最大容量 10  $\mu\text{l}$  のマイクロマンを用いて 20 mM になるようにエタノールに溶解したオリゴマイシンを 2  $\mu\text{l}$  量り取り、キムワイプでチップの外側をふき取った後キュベット内に

添加した。オリゴマイシンを添加した後に 10 mg/ml になるように調整した LDH を最大容量 100  $\mu$ l のマイクロピペットを用いて 20  $\mu$ l 量り取り、キムワイプでチップの外側を拭き取った後キュベット内に添加した。次に、10 mg/ml になるように調製した PK を同じマイクロピペットを用いて 20  $\mu$ l 量り取り、キムワイプでチップの外側をふき取った後キュベット内に添加した。PK をキュベット内に添加すると複合体 V を添加していないにも関わらず 340 nm の吸光度の減少が認められた。これは、不安定である ATP が凍結・溶解などによって分解し生じた ADP が PK によってリン酸化される際にこの反応が進行したものであり、複合体 V の添加はこの吸光度の減少が収束するまで不可能である。5-10 分ほどで吸光度の減少が完全に停止する為、停止確認後デジタル温度計を用いてキュベット内の温度が  $20 \pm 0.1$  °C であることを確認する(複合体 V の活性の測定温度については下記に詳細を記す)。最大容量 25  $\mu$ l のマイクロピペットを用いて 10  $\mu$ l の精製酵素を量り取り、チップの外側をふき取った後キュベット内に添加し測定を開始する。経験上、複合体 V の溶液は非常に気泡が発生しやすい性質を持つ。その為、マイクロピペットを用いて採取する際、極めて微細な気泡が多く入る。そこでピペッティングを数回繰り返し、気泡を完全に排除してからキュベット内に添加するように留意する必要がある。以上が新規に開発した活性測定法である。

#### (ii) 活性測定温度の検討

複合体 V の活性測定温度は、過去から現在まで一貫して 20 °C で行なわれている。しかしながら最適結晶化温度は 27 °C であり文献値では 30 °C である (Buchanan et al., 1996)。そこで、20 °C と 27 °C で活性測定を行い比較すると 27 °C では複合体 V が変性していることを示す結果となった。対し、20 °C では安定して酵素活性が測定可能であることが判明した。

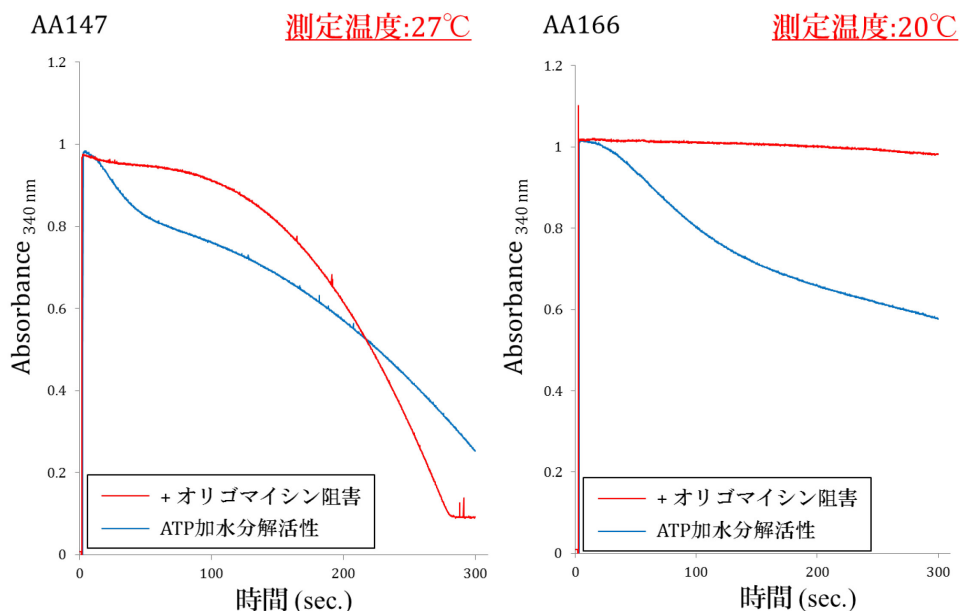


Figure 12. 温度による ATP 加水分解活性様式の差

(左) 定温度 27 °C,

赤:オリゴマイシン添加による阻害活性 青:ATP 加水分解活性

(右) 定温度 20 °C,

赤:オリゴマイシン添加による阻害活性 青:ATP 加水分解活性

### (iii) 酵素活性の算出方法

上述した新規の方法を用いて精製した複合体Vが触媒する ATP 加水分解を測定した結果、3段階の反応過程があることがわかった。第1段階は、凸型曲線であり徐々に反応速度が増加していく。第2段階は直線的であり反応速度が一定となる。第3段階は凹型曲線であり、徐々に反応速度が減少していく。ここでは、第1段階を加速期、第2段階を定速期、第3段階を減速期と呼ぶ。一般的に酵素活性を算出する場合、最も活性が高い初速から算出する。しかしながら、複合体Vに於いては初速よりも定速期で最大速度に達する。故に、活性を算出するときは定速期を選択することとした。実験結果から反応開始後20秒ほどで定速期に達するため反応開始20秒から1分間の吸光度差を求め、そこから算出することとした。この方法によって正しく活性を算出

できることを証明する為、酵素量を変化させて測定を行ったところ加えた酵素量に比例して吸光度の減少が見られた。故に、この方法による活性算出に支障なしと結論付けた (Figure 13)。複合体Vが触媒する ATP 加水分解反応は減速期で収束に向かう。酵素活性が収束に向かう理由は、一般的に酵素が希薄濃度となったことによる変性や生成物による阻害効果 (プロダクトインヒビション)などが挙げられるが、ATP 加水分解反応中の定速期に ADP を最終濃度 2.5 mM となるように加えることによって加水分解反応速度が更に向上した。この反応系は PK の基質である ADP が複合体Vによって生成されると、直ちに PK によってリン酸化され ATP となる。同時に PK によって PEP は脱リン酸化されピルビン酸となりその後、LDH によって乳酸となる。その際に NADH が酸化され  $\text{NAD}^+$  となる。この反応が、ADP を過剰量加えたことによって高速で進行したため NADH が急速に酸化され吸光度が減少したと考えられる。ここから考えると、活性測定に用いる複合体Vが触媒し生じた ADP の濃度は今回行った実験で添加した ADP と比べると希薄であり、この程度の ADP であれば PK によって瞬時にリン酸化され再度 ATP となると考えられる。つまり、この反応系に於いては ADP 産生によるプロダクトインヒビションはない。次に、複合体Vが変性したことによって酵素活性が収束したことについてであるが、活性測定後反応溶液を用いて再度 ATP 加水分解活性を測定したところ ATP 加水分解に伴う NADH の酸化とオリゴマイシンに対する感受性が認められたことから、上記の理由は考えられない。この点から、複合体Vを構成する酵素活性を調整・制御するサブユニットが機能したことによると考えられる。

精製番号:AA155 (07/09/2013)

—: オリゴマイシン阻害活性  
—: ATP加水分解活性

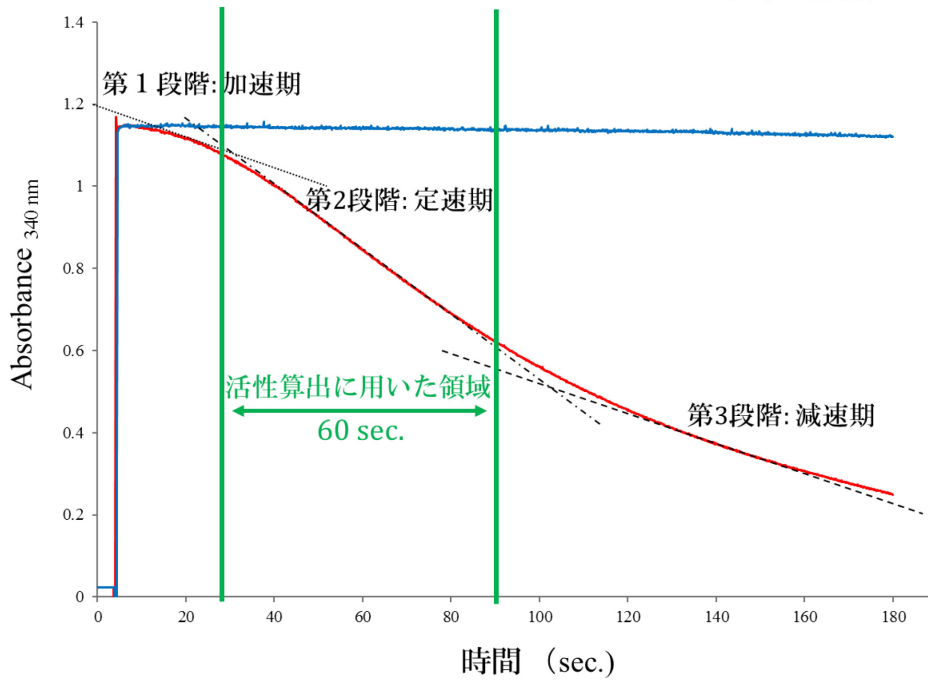


Figure 13. ATP 加水分解活性算出領域

赤:ATP 加水分解活性 青:オリゴマイシン添加による阻害活性

反応液組成:40 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.2 % DDM,  
200 μM NADH, 2.5 mM ATP, 2.5 mM PEP, 20 μg LDH, 20 μg PK, 10 μl 複合体 V

測定温度:20 °C



精製番号:AA148(05/09/2013)

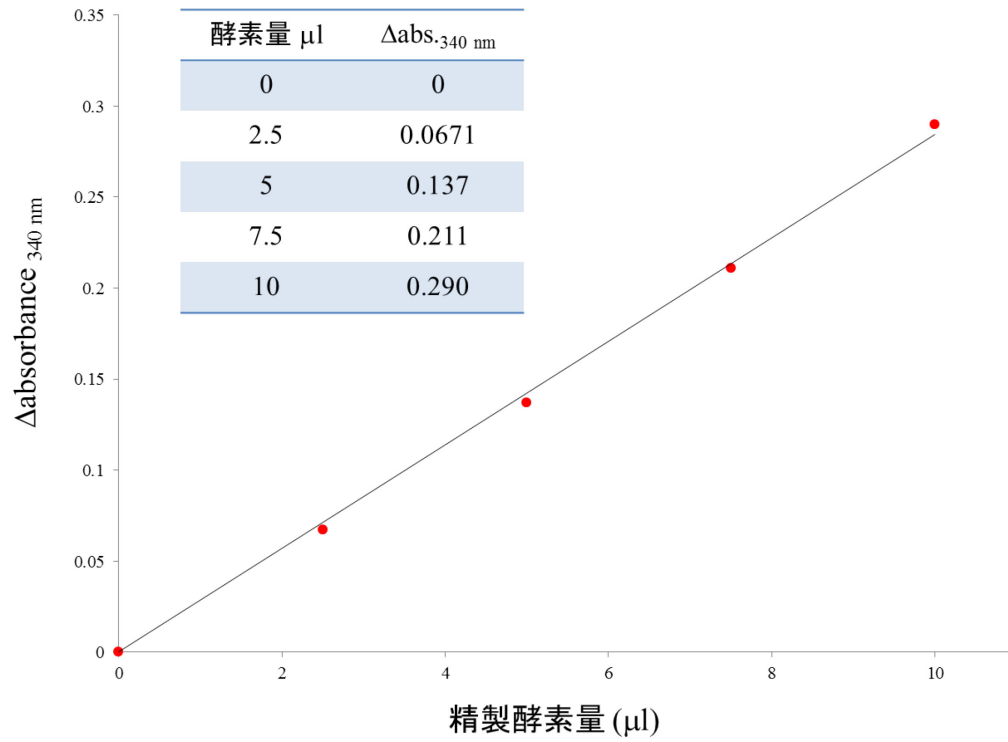


Figure 14. 酵素量に対する減少した波長 340 nm の吸光度差  
横軸: 酵素量 ( $\mu\text{l}$ ) 縦軸: 吸光度差

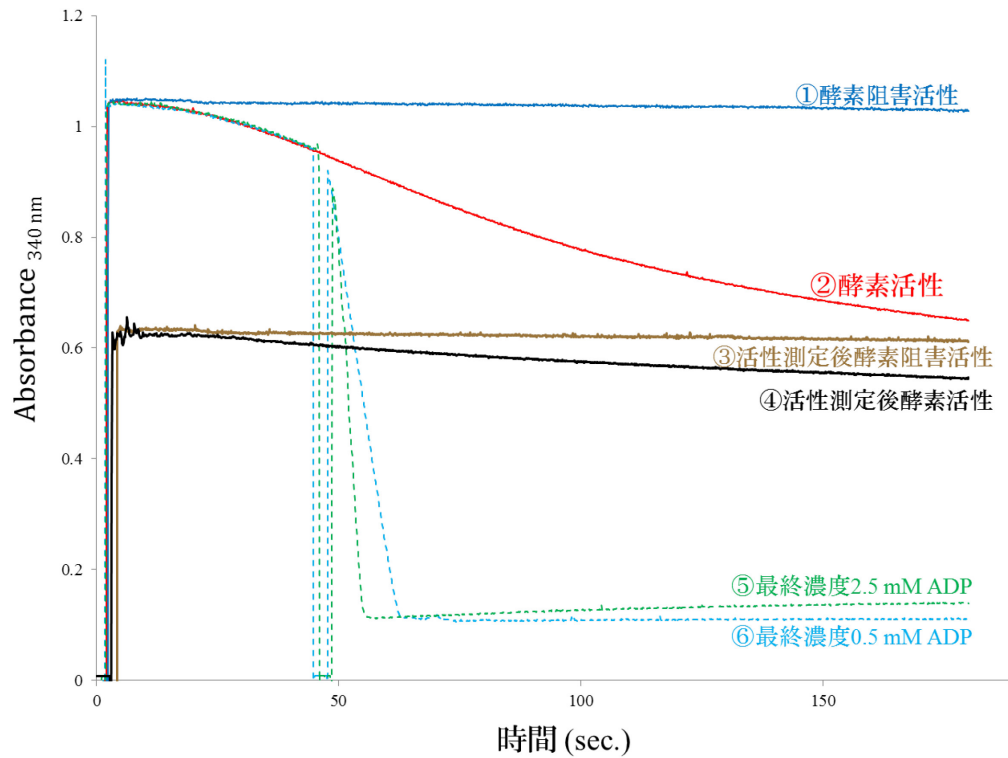


Figure 15. ATP 加水分解活性算出領域

反応液組成:40 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.2 % DDM,  
200 μM NADH, 2.5 mM ATP, 2.5 mM PEP, 20 μg LDH, 20 μg PK, 10 μl 複合体 V  
測定温度:20 °C

①:阻害活性、②:酵素活性、③:酵素活性測定後阻害活性、④:酵素活性測定後酵  
素活性、⑤:最終濃度 2.5 mM ADP 添加による酵素活性、⑥: 最終濃度 0.5 mM  
ADP 添加による酵素活性

## 2-3-2. ミトコンドリア内膜小胞量

### (i) ウシ心筋に含まれるミトコンドリア量の定量法の確立

心臓は末端の組織にまで血液を拍出する為、昼夜問わず常に活動している器官である。故に、心臓は多くの ATP を必要とし、それを供給する為ミトコンドリアを他の組織を構成する細胞と比較して豊富に含んでいる特徴がある。同じくミトコンドリア内膜に在って機能するシトクロム酸化酵素の研究からウシ心筋に含まれるミトコンドリア量は常に一定であると考えていた。しかしながら、実際に含まれるミトコンドリア量を測定すると、季節により大きく変動し、個体差による影響も看過できない結果となった。ここに、各精製時に得られたミトコンドリア内膜量の推移と各季節のミトコンドリア内膜量の平均と標準偏差を示す。この結果からミトコンドリア量は最も多い時で12月に精製した1100 gの心臓に対して約200 gであった (AA135)。対して、最も少ない時は7月に精製した1100 gの心臓に対して約121 gであった (AA154)。これら値を各季節つまり3カ月ごとのミトコンドリア量として平均と標準偏差を算出すると冬季にミトコンドリア量が最も多くなり、夏季に最も少なくなる傾向が示された。

Table 1. 3カ月毎に於けるミトコンドリア量の推移

1,2,3月	165 ± 11 g (n=5)
4,5,6月	155 ± 15 g (n=8)
7,8,9月	136 ± 9 g (n=9)
10,11,12月	148 ± 25 g (n=8)

Table 2. ミトコンドリア内膜小胞量の推移

精製日	精製番号	ミトコンドリア量 (g)
2012.5.20-6.01	AA114	170.3
2012.6.18-6.19	AA116	160.3
2012.7.12-7.13	AA118	149.4
2012.8.01-8.02	AA120	152.7
2012.8.08-8.09	AA121	150.1
2012.8.22-8.23	AA122	179.1
2012.9.12-9.13	AA125	162.5
2012.9.25-9.26	AA126	166.0
2012.10.10-10.12	AA129	122.7
2012.10.31-11.01	AA130	153.9
2012.11.14-11.15	AA132	176.5
2012.12.05-12.06	AA133	132.1
2012.12.19-12.20	AA135	199.4
2013.1.17-1.18	AA137	158.5
2013.1.30-1.31	AA138	185.0
2013.2.14-2.15	AA140	154.8
2013.3.06-3.08	AA143	171.6
2013.3.19-3.20	AA144	155.2
2013.4.03-4.04	AA145	171.0
2013.4.16-4.17	AA147	129.5
2013.5.9-5.10	AA148	147.0
2013.5.21-5.22	AA149	141.0
2013.6.5-6.6	AA151	171.0
2013.6.18-6.19	AA152	172.0
2013.7.2-7.3	AA154	121.0
2013.7.9-7.10	AA155	128.9
2013.7.17-7.18	AA156	149.9
2013.7.23-7.24	AA157	138.0
2013.8.6-8.7	AA158	132.4
2013.8.20-8.21	AA159	130.8
2013.9.3-9.4	AA160	138.9
2013.9.10-9.11	AA161	139.9
2013.9.18-9.19	AA162	147.1
2013.10.1-10.2	AA163	129.7
2013.10.16-10.17	AA164	148.1
2013.10.22-10.23	AA165	124.0

この傾向があることは以前より考えられていた。しかし、今回数値化することで明確となった。用いている心臓は一貫してホルスタイン牛のものである。ホルスタイン牛は品種的にジャージー牛やガーンジー牛に比べ耐熱性が弱いことが知られている。ホルスタイン牛にとって最適となる温度は10-16℃である。一般的に24℃を越す温度の場合、呼吸による体温調節が上手くいかず、熱が体内にこもることによる体温上昇がみられる事が報告されている。また、体温上昇に伴い引き起こされる生理現象として食欲の減退、体重の減少、乳脂率の減少、発育の遅延、甲状腺の異常、肝臓機能の低下などさまざまである(岡山畜産便り)。おそらく、夏季にミトコンドリア量が大幅に減少する理由として体温の上昇が起因しているのではないかと想像される。

従来、このミトコンドリア内膜量を目測によって見積もりそこから懸濁する緩衝液量を決め、更に懸濁量から可溶化に用いる界面活性剤量を算出してきた。しかし、この方法は個人の経験に大きく依存するなど信頼性に乏しい。一般的に膜タンパク質精製において最も重要な要因として界面活性剤対酵素比 (detergent protein ratio) が挙げられる。酵素に対して界面活性剤が多いと界面活性剤によって変性する酵素が増加することが考えられる。対して、この比が小さいと界面活性剤による変性効果を最低限とすることができる。故に、複合体Vの精製のために適切なこの比を速やかに決定し、常に一定に保つことが最も重要である。そこで、ミトコンドリア内膜量を数値化することで季節、個体差による微小な変化に対して対応できるよう改良した。ミトコンドリア内膜量を数値化した事による効果は大きく、個人の経験にのみ依存していたミトコンドリア内膜量に加える緩衝液量決定が容易になり、そこから適切な界面活性剤量を算出することが可能となった。つまり、以前は不可能であった界面活性剤対酵素比を一定に保つことが可能となった。新規に考案した方法の仔細を記すと以下の通りである。予め空の超遠心チューブ (45Ti ローター用 Beckman 社製) 6本と (P45AT-548 ローター 日立製作所製) 4本の重量を電子天秤で計測しミトコンドリア小胞を含む懸濁液をこれら 10本の超遠心チューブに均等に分配した。そこに 0.1 mM DTT/EDTA を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) を超遠心チューブの肩口まで加え 30,000 rpm、30 min 遠心分離した。不要な上清はデカンテーションにより除去することで目的のミトコンドリア内膜小胞は沈殿として回収することができる (Figure 16)。沈殿として得られたミトコンドリア内膜小胞を含む超遠心チューブ 10本を再度電子天秤に静かに乗せ重量を測定し、その重さから空のチューブの重さを差し引くことでミトコンドリア内膜小胞の重量を算出した。



Figure 16. ミトコンドリア内膜小胞沈殿

### 2-3-3. ミトコンドリア内膜小胞の調製

#### (i) ホモジナイズの回数の決定

記述すべき順番が前後するが、ウシ心筋からミトコンドリア内膜小胞を調製する方法について記す。従来の精製法については既に記述した通りである。ウシ心筋をホモジナイズし高速遠心分離機 (Beckman 社製冷却式フロア型高機能遠心機 Avanti HP-30I, JLA-10.500 ローター)によって膜画分を調製、上清をきれいに取り除いた後沈殿に 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8)を加え、ガラス製テフロンポッター型ホモジナイザーを用いて懸濁し、600 ml 程度とした。この過程に於いてガラス製テフロンポッター型ホモジナイザーを用いて懸濁する回数は7回 (上下合わせて)が最適であると判断した。従来の精製法ではこの回数は決定されておらず、最低5回は行うとしていた。ホモジナイズの回数が極端に少ない場合、沈殿が均一な懸濁液とならず、酵素が可溶化されない結果となる。対して、ホモジナイズの回数が極端に多い場合、懸濁液とした時の粒子が細かくなり、界面活性剤によって不要なタンパク質が可溶化される結果となる。そこでさまざまな回数を検討した結

果、7回が最も適していた。同様に、可溶化直前の懸濁液を調製する際のホモジナイズの最適な回数の決定を行った。その結果、10回(上下合わせて)を最も適している回数と判断した。

## 2-3-4. 懸濁液濃度による酵素活性の差 (1)

上記の方法によってミトコンドリア内膜小胞定量を迅速かつ簡便に行うことが可能となった。そこで可溶化時の懸濁液濃度の違いが精製酵素に及ぼす影響を検討することとした。複合体Vはミトコンドリア内膜中に在る酵素であり、精製する為に界面活性剤を用い可溶化することが必要である。複合体Vの可溶化はDOCとDMを用いて行われる。DOCはステロール骨格を持つイオン性の界面活性剤であり、強い界面活性作用を有している。対し、DMは非イオン性界面活性剤であり両者を比較すると界面活性作用は弱い。強い界面活性作用は可溶化する力も強いが同時に酵素に対しての変性効果も強い。よって、用いる界面活性剤の量は必要最小限にする必要がある。既に記述したが、複合体Vの精製に用いる界面活性剤の量は可溶化前懸濁液量にのみ依存する。故に、懸濁液量を増加すると用いる界面活性剤の量も増え、懸濁液量を減らすと用いる界面活性剤の量も少量となる。そこで、懸濁液濃度に敢えて差を作るように調整しそこから可溶化し精製した複合体Vが持つ酵素活性にどのような差が表れるか検討した。懸濁液濃度は430 g/lと460 g/lとした。この430 g/lを薄い懸濁液濃度とし、460 g/lを濃い懸濁液濃度とした。430 g/lは複合体Vを精製する際の懸濁液濃度としては極めて希薄な懸濁液である。460 g/lは今回初めて扱う濃度であるが、各呼吸鎖複合体を精製する際の懸濁液濃度から考慮すると極めて高い濃度である。

### (i) 430 g/l 溶液からの可溶化

430 g/l に調整した懸濁液から可溶化した複合体Vの示す酵素活性は  $0.45 \pm 0.22$   $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  (n=8)、オリゴマイシンによる阻害率は  $95 \pm 1.8\%$  (n=8) となった。

### (ii) 460 g/l 溶液からの可溶化

460 g/l に調整した懸濁液から可溶化した複合体Vの示す酵素活性は  $0.92 \pm 0.29$   $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  (n=8)、オリゴマイシンによる阻害率  $96 \pm 1.9\%$  (n=8) となった。

高濃度の懸濁液を調整し可溶化することで酵素活性をおよそ2倍高めることに成功した。しかし、精製毎に見られる誤差の減少には寄与しなかった。懸濁液濃度を高めることによって、以前の酵素を比較して高い酵素活性を持つ複合体Vを精製することに成功した要因として、複合体Vのみ内膜より可溶化することができた為と考えられる。複合体Vはダイマーを形成することが可能であり、実際に電子顕微鏡を用いて可溶化後の酵素を観察すると“V字型”をしたダイマーを観察することができる。複合体Vは特徴的な形のダイマーを形成すると同時に、内膜に歪みを生じさせる。この歪みが大きくなるとクリステと呼ばれるわけであるが、この歪みによって複合体Vは呼吸鎖複合体中で最も可溶化されやすい酵素となっている。ここに、各複合体を精製する際に用いる界面活性剤の名前と量を記載する。複合体Vの精製に用いる界面活性剤量が如何に少ないかが明確である。高濃度懸濁液とすることで界面活性剤による変性効果を抑えることができると同時に、複合体Vのみが可溶化される必要最低限量とすることで、複合体V比含量の高い標品を得ることが比活性の向上につながったと考えられる。

Table 3. 各呼吸鎖複合体の精製に用いる界面活性剤と量

複合体種類	界面活性剤	界面活性剤量
シトクロム酸化酵素	コール酸 (cmc.=0.41%)	20 g
NADH酸化酵素	デオキシコール酸 (cmc.=0.2%)	3.6 g
F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP合成酵素	デオキシコール酸 (cmc.=0.2%)	2.8 g



## 2-3-5. 酵素活性/阻害率の誤差低減

懸濁液濃度の違いによって酵素活性に大きな差が表れることが明らかとなった。しかし、誤差の低減にはつながらなかった。そこで誤差の原因を検討したところ、従来の精製方法ではミトコンドリア内膜小胞を沈殿として得る際に超遠心チューブを傾けて上清を除去するわけであるが、この沈殿が非常に柔らかいため完全に上清を除去することができずに上清が少量残存していることが判明した。つまり、上清を含んだ重さをミトコンドリア内膜小胞量としていたこととなる。そこで、上清を完全に除去することが可能となるようにアスピレーター (MDA-006 ULVAC 社製) を用いる事とした。アスピレーターの吸引口にガラス製パストゥールピペットを付けた内径 5 mm のゴム製チューブを取り付け約 0.02 MPa の圧力で吸引し超遠心分離後の沈殿と上清を完全に分離した。以下にアスピレーターを用いて上清を除去した場合の沈殿の写真を記す。Figure 16 と比較すると明らかに上清が完全に除去され沈殿のみとなっていることがわかる。



Figure 17. ミトコンドリア内膜小胞沈殿 (アスピレーター使用)

## 2-3-6. 懸濁液濃度による酵素活性の差 (2)

アスピレーターを取り入れることでミトコンドリア画分 (沈殿)のみの正確な重量を測定することが可能となった。この方法を取り入れて、更に、先ほどと同様に可溶化懸濁液濃度を 430 g/l と 460 g/l となるように調整し複合体Vを内膜から可溶化し精製した ATP 加水分解、オリゴマイシンによる阻害率を比較した。

### ( i ) 430 g/l 溶液から可溶化

430 g/l に調整した懸濁液から可溶化した複合体Vの示す酵素活性は  $0.64 \pm 0.12$   $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  (n=4)となりオリゴマイシンによる阻害率は  $93 \pm 1.7\%$  (n=4)となった。

### ( ii ) 460 g/l 溶液から可溶化

460 g/l に調整した懸濁液から可溶化した複合体Vの示す酵素活性は  $0.75 \pm 0.10$   $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  (n=9)、オリゴマイシンによる阻害率は  $98 \pm 0.42\%$  (n=9)となった。

( i )( ii )において酵素活性、オリゴマイシンによる阻害率とも従来値と比較して各段に上昇する結果となった。アスピレーターと懸濁液濃度変化の併用を考慮した効果は極めて大きく、高い活性及びオリゴマイシン感受性を保持した複合体Vを精製することができることが示された。これは、当初予測した通りミトコンドリア懸濁液濃度によって複合体Vを選択的に精製することで複合体V比含量の高い画分を得ることができた為と考えられる。また、460 g/lの懸濁液としたことにより界面活性剤が必要最小限ですみ、界面活性剤によって変性する酵素量を減らすことも酵素活性、阻害率の上昇に繋がったと考えられる。そこで更なる高濃度の懸濁液を調整することで、より酵素活性、阻害率の高い酵素を精製可能であるかという問題については、それは技術的に困難であると言える。この 460 g/l の懸濁液は極めて粘性が高く、ガラス製テフロンホモジナイザーが安定して回転する限界に近い。故に、更に濃度を高めたとしてもホモジナイザーが回転せず均一な粒子による懸濁液を調整することが不可能であると考えられる。今回酵素活性、阻害率ともに誤差が最小となった。このように、アスピレーターを用いる事により上清を残すことなく完全に除去することができ、それによって厳密なミトコンドリア沈殿量を算出することができたことが今回の誤差軽減につながったと考えられる。

Table 4. 懸濁液濃度に対する酵素活性の推移

精製番号	懸濁液濃度 g/l	比活性 μmoles/min/mg	阻害率 %	
AA114	437	0.40	96	Avg. 432 g/l
AA116	430	0.47	96	
AA118	433	0.58	97	
AA120	424	0.38	93	
AA121	417	-	-	
AA122	437	0.38	96	
AA125	439	0.33	95	
AA126	437	0.25	93	
AA129	438	0.84	98	
AA130	452	1.0	95	
AA132	453	0.84	97	Avg. 454 g/l
AA133	456	0.62	95	
AA135	453	1.0	97	
AA137	466	1.6	97	
AA138	451	0.69	98	
AA140	449	0.84	97	
AA143	452	0.74	92	Avg. 430 g/l
AA144	431	0.77	97	
AA145	439	0.54	93	
AA147	432	0.63	87	
AA148	432	0.73	96	
AA149	415	0.50	93	
AA151	460	0.58	91	Avg. 462 g/l
AA152	453	0.57	97	
AA154	457	-	-	
AA155	457	0.61	98	
AA156	461	1.9	97	
AA157	460	0.82	98	
AA158	460	0.74	98	
AA159	461	0.88	98	
AA161	466	0.71	97	
AA162	467	0.75	98	
AA163	466	0.90	98	
AA164	467	0.73	98	
AA165	466	0.68	98	

アスピレーター不使用

アスピレーター使用

## 2-3-7. カラムクロマトグラフィー条件検討

所属する研究室に於いて複合体Vは Poros-20HQ（強陰イオン交換体 Life Technologies 社製）陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって夾雑物と分離される。Poros-20HQ 陰イオン交換体は一般的なイオン交換体と比べて早い流速で精製することが出来る特徴を持つ。複合体Vのような不安定な膜タンパク質にとってカラムクロマトグラフィーは大きな負担となる。特に、イオン交換体との相互作用によって酵素本来の構造に歪みが生じることは無視できない。そこで、複合体Vを安定に保ち且つ、精製することが出来る条件の検討が必要となる。複合体Vの2次元結晶化結果から、カオトロピックイオンによる複合体Vへの損傷が示唆された。一般的にカオトロピックイオンと呼ばれ水分子間の相互作用を弱め分子構造を不安定化させるとされる。そこで、カオトロピックイオンを用いることなく複合体Vを精製することで酵素の損傷を防ぐことが可能と考えた。複合体Vの精製過程に於いて高濃度のカオトロピックイオンに複合体Vが接触する箇所は限定され、特に、イオン交換体に結合した複合体Vを溶出際に用いる KCl が酵素の変性に寄与していると考えた。溶出は、400 mM KCl を含んだ 40-150 mM HS 緩衝液 (pH 7.8) と KCl を含まない同緩衝液を混合し KCl を含んだ緩衝液の割合を高めることで行う。複合体Vは KCl 濃度が 135 mM 以上で溶出されることが実験結果より明らかとなっている。溶出された複合体Vの濃度は 13.5  $\mu$ M (n=6)である為、およそ 10000 倍のカオトロピックイオンに晒されることとなる。そこで、溶出は KCl 濃度変化ではなく K-Pi 緩衝液 (pH 7.8)濃度変化を用いる事とした。しかし、Poros-20HQ は K-Pi、Na-Pi 緩衝液などのリン酸を含む緩衝液に対する使用が不可である為、過去の精製結果を参考に Q-Sepharose (陰イオン交換体 GEヘルスケア社製) を用いて、複合体Vを精製することとした。精製法は、予めカラムを 0.2 % DM、0.1 mM DTT/EDTA を含む 40 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8) で平衡化し、複合体Vを含んだ画分を流速 1.3 ml/min で平衡化後アプライした。アプライ後カラム洗浄は一切行わず、平衡化に用いた緩衝液と 0.2 % DM、0.1 mM DTT/EDTA を含む 400 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8) を 500 ml のリニアグラジエントで最終的に 400 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8) の割合が 100 % になるようにプログラムを組み複合体Vを流速 1.5 ml/min で溶出した。その時の溶出パターンを以下に示す (Figure 18)。

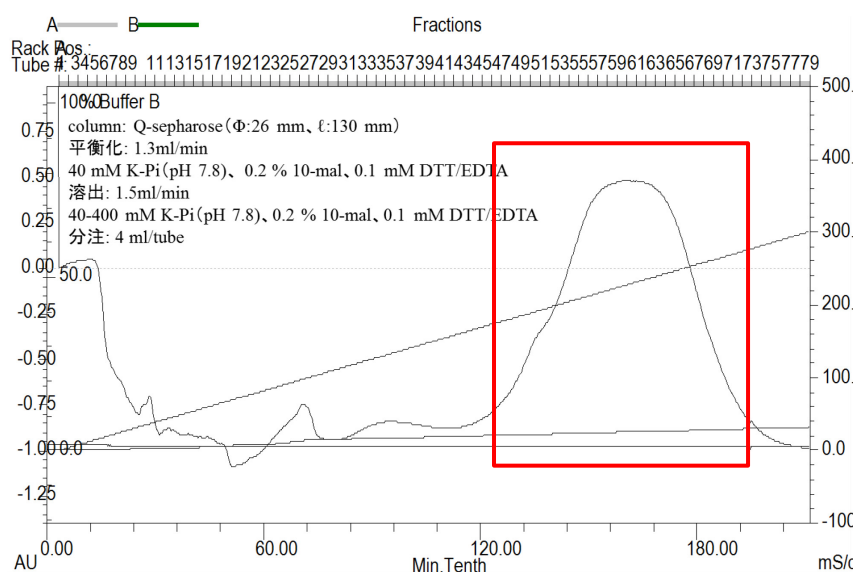


Figure 18. Q-Sepharose カラムクロマトグラフ

カラム: Q-Sepharose (φ:26 mm, l:130 mm)

平衡化: 40 mM K-Pi 緩衝液(pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT/EDTA,

0.2 % DM, スクロース少々 流速 1.3 ml/min

溶出: 400 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT/EDTA, 0.2 % DM

流速 1.5 ml/min

試料アプライ後、カラム洗浄は行わず 40-400 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8) リニアグラジエントにより容量 500 ml で溶出した。

複合体Vは赤の四角で囲んだ範囲に含まれており、精製酵素標品の ATP 加水分解活性、オリゴマイシン阻害率はそれぞれ 1.9 μmoles/min/mg、97 %となった。ATP 加水分解活性が Poros-20HQ イオン交換体を用いて精製した酵素標品と比較して著しく高い値となったが、高い阻害剤感受性を示したことから、この活性が解離した F<sub>1</sub> によるものではないことが示された。酵素標品の可視吸収スペクトルによって測定したところ、ヘム b 由来のピークを確認した。この標品を用いて 2 次元結晶化を行ったが、結晶の形成が一切認められなかった。このように、Q-Sepharose カラムを用いて精製した複合体Vが高い活性と阻害剤感受性を示しながら、結晶が形成されなかった。これは、高濃度のヘムが混入したことも考えられるが、Q-Sepharose カラムクロマトグ

ラフィーに要した時間が最も大きいと考えられる。Q-Sepharose 陰イオン交換体は、Poros-20HQ 陰イオン交換体と比較し速い流速でカラムクロマトグラフィーを行うことが出来ない。実際に、この実験ではカラムクロマトグラフィーにおよそ6時間を要し、その間 Q-Sepharose 陰イオン交換体に結合した複合体Vは緩衝液によって洗浄され続け、過度の脂質が取り除かれた結果、酵素活性に直接寄与しないサブユニットが脱離したことが高い比活性と阻害剤感受性を示しながら、結晶化が成功しなかった理由と考えられる。

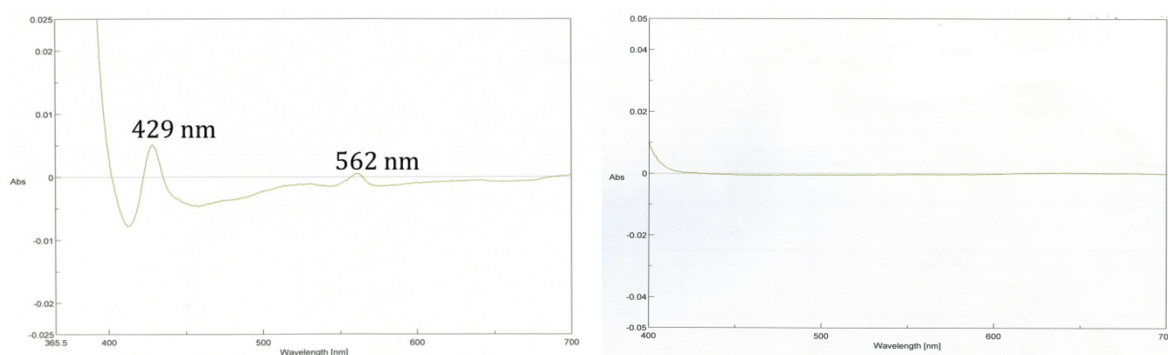


Figure 19. Q-Sepharose カラム溶出後酵素と Poros-20HQ カラム溶出後酵素の吸収スペクトル (還元型-酸化型)

左: Q-Sepharose カラムクロマトグラフィー溶出後酵素

右: Poros-20HQ カラムクロマトグラフィー溶出後酵素

上記の検討結果からイオン交換体として短時間でカラムクロマトグラフィーを行うことが出来る Poros-20HQ が適していることが示された。そこで、Poros-20HQ イオン交換体を用いた複合体Vの最適溶出条件の検討結果について記述する。複合体Vを精製する為に使用する溶出プログラムを下記する。この溶出プログラムによって精製すると複合体Vを含む画分は赤の四角で囲んだ部分のようにブロードなピークとして現れる。このようにブロードなピークとなる為、酵素濃度は最も高い画分で1 mg/ml以下であり、複合体Vの2次元結晶化に最適な酵素濃度である10-15 mg/mlから大きく逸脱している。その為、窒素圧を掛けながら限外濾過膜を用いて濃縮する方法で酵

素濃度を高め、2次元結晶化に用いていた。複合体Vは非常に不安定な酵素であることを経験的に熟知しており、濃縮を行う窒素圧やスターラーによる攪拌速度など細部に亘るまで細心の注意を払っている (圧力: 2 atm、回転: 60 rpm)。そこで、濃縮による酵素の損傷を防ぐため、溶出条件を変更し濃縮を行うことなく結晶化が行えるよう検討した。先ず、従来から用いている複合体V用溶出条件とその条件で溶出した際のクロマトグラフを下記する。

Table 5. 複合体V旧溶出条件 (Poros-20HQ カラムクロマト用)

溶出体積 (ml)	緩衝液 A (%)	緩衝液 B (%)
0	100	0
50	81	19
100	80	20
180	80	20
420	40	60
450	35	65

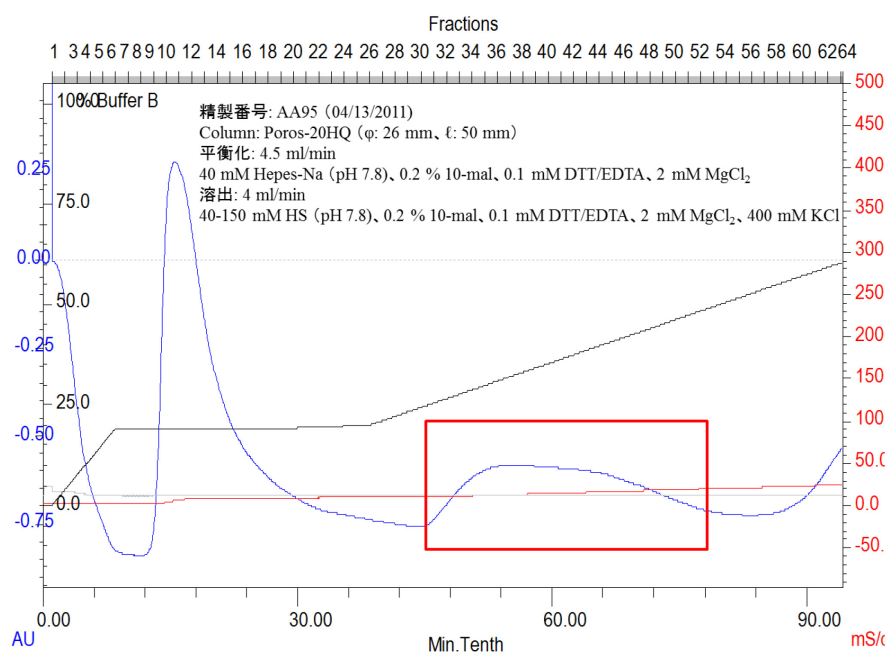


Figure 20. 旧溶出条件による Poros-20HQ カラムクロマトグラフ

カラム: Poros-20HQ (φ:26 mm, l:50 mm)

平衡化: 40 mM HEPES-Na 緩衝液(pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT/EDTA, 0.2 % DM, スクロース少々 流速 4.5 ml/min

溶出: 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl, 0.1 mM DTT/EDTA, 0.2 % DM, 150 mM スクロース

流速 4 ml/min

次に、溶出条件を下記に変更しその条件によるカラムクロマトグラフを記す。この溶出条件はイオン強度を急激に増加させカラムに結合している複合体Vを同時に溶出することができる。これにより、酵素濃度を高く維持でき安定性が向上すると考えた。

Table 6. 複合体V新溶出条件 (Poros-20HQ カラムクロマトグラフィー用)

溶出体積 (ml)	緩衝液 A (%)	緩衝液 B (%)
0	100	0
30	81	19
150	80	20
200	80	40
250	80	40
300	35	65

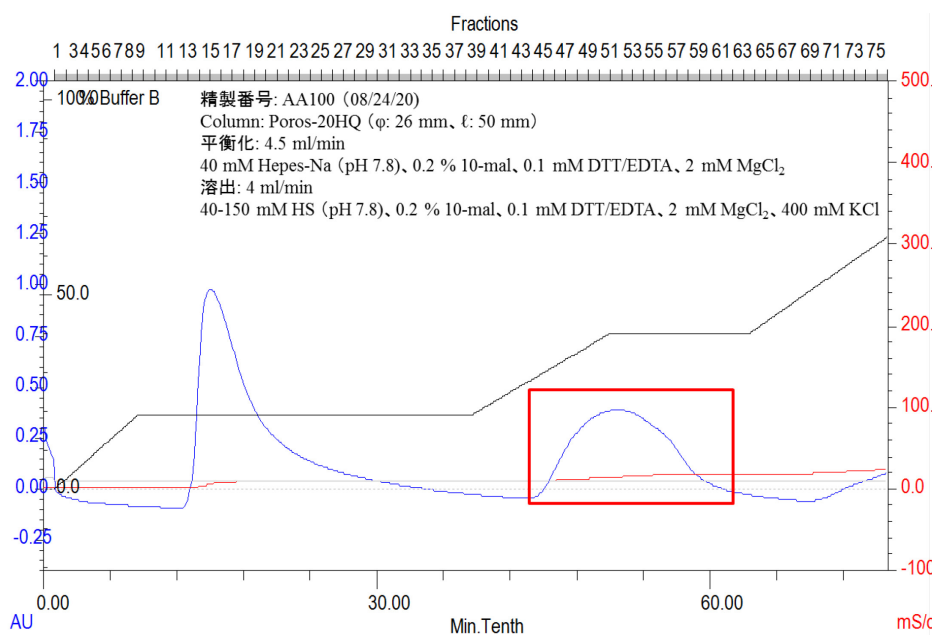


Figure 21. 新溶出条件による Poros-20HQ カラムクロマトグラフ

カラム: Poros-20HQ (φ:26 mm, l:50 mm)

平衡化: 40 mM HEPES-Na 緩衝液(pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT/EDTA,

0.2 % DM, スクロース少々 流速 4.5 ml/min

溶出: 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl,

0.1 mM DTT/EDTA, 0.2 % DM, 150 mM スクロース

流速 4 ml/min



上記のように変更したところ複合体Vを含むがブロードからシャープなピークに変化した。しかし、この溶出条件を用いても酵素濃度は2 mg/mlが最大であり結晶化最適濃度までおよそ5-7倍の濃縮を必要とする。現状から更にイオン強度を上げるとは夾雑物の混入が予測できた為、これ以上の溶出条件を変更することはせず、カラムに充填するPoros-20HQイオン交換体の体積を26 cm<sup>3</sup>から70 cm<sup>3</sup>を増やしカラムに吸着する酵素量を増やすことで、高く酵素濃度を維持し酵素を安定に保つこととした。このようにカラムベッド体積を増やすことによって溶出された酵素濃度が7 mg/mlとなり濃縮に費やす時間を大幅に短縮することが可能となった。この時のカラムクロマトグラフを上記する。

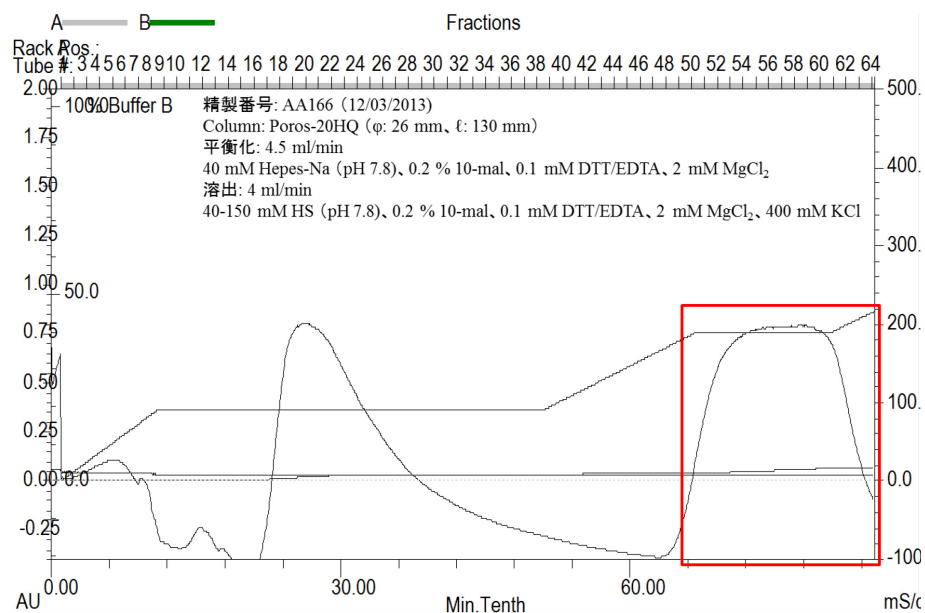


Figure 22. 新溶出条件,2.7倍カラムベッド体積によるクロマトグラフ

カラム: Poros-20HQ (φ:26 mm, l:130 mm)

平衡化: 40 mM HEPES-Na 緩衝液(pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT/EDTA,  
0.2 % DM, スクロース少々 流速 4.5 ml/min

溶出: 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl,  
0.1 mM DTT/EDTA, 0.2 % DM, 150 mM スクロース  
流速 4 ml/min

いずれの条件検討に於いても濃縮を行わず結晶化が可能な酵素濃度に達することはなかった。更にカラムベッド体積を増やすことは物理的に困難であることから異なる方法を検討する必要がある。そこで、従来、溶出量 50 ml で 135 mM となるようにしたところを 40 ml、20 ml、10 ml とすることで、複合体Vの高濃度化が可能と推測した。これはステップワイズグラジエント法と同じ原理である。その結果、溶出量 20 ml とすることで酵素濃度が 14 mg/ml となり濃縮を行わず2次元結晶化が可能となった。その際の ATP 加水分解活性とオリゴマイシン阻害率はそれぞれ 0.82  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、98 %であった。(Figure 19)。溶出量 20 ml のカラムクロマトグラフを下記する。

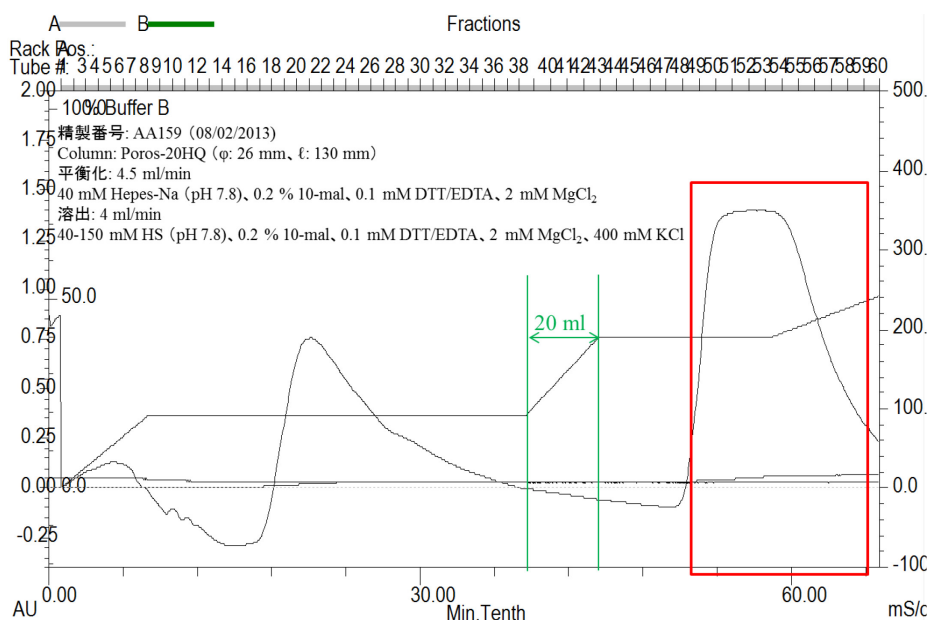


Figure 23. 溶出量変化による酵素濃度の向上

カラム: Poros-20HQ ( $\phi$ :26 mm, l:130 mm)

平衡化: 40 mM HEPES-Na 緩衝液(pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT/EDTA,  
0.2 % DM, スクロース少々 流速 4.5 ml/min

溶出: 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl,  
0.1 mM DTT/EDTA, 0.2 % DM, 150 mM スクロース  
流速 4 ml/min

この酵素標品を用いて2次元結晶化を行ったが結晶が認められず、凝集した酵素が認められる結果となった。下に各溶出量に於ける酵素濃度、比活性、阻害率を記す。いずれの条件に於いても結晶は形成されなかった。結晶が形成されなかった理由として、複合体Vの含有リン脂質量が変化したことと推測し、リン量を測定したがそれぞれのリン量に有意な差は認められなかった。急激な KCl 濃度の上昇は複合体Vの精製に適していないと考えられる。

Table 7. 各溶出量に対する酵素濃度、比活性、阻害率、含有リン量の差

溶出量 ml	酵素濃度 mg/ml	比活性 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$	阻害率 %	含有リン量 moles/ATPase
50	7.5	0.75	98	$75 \pm 8$ (n=9)
40	8.4	0.67	98	$70 \pm 6$ (n=2)
20	13.8	0.82	98	73
10	15.7	0.79	98	$83 \pm 7$ (n=3)

## 2-3-8. 含有脂質に関する分析

上記したように2次元結晶化に適した標品を得る為に、複合体V精製条件を多岐にわたり検討し、酵素活性、阻害剤感受性の向上に成功することが出来た。ここでは、その過程に於いて変化する複合体V含有脂質に関する分析結果について記述する。旧プログラムを用いてカラムから溶出すると複合体Vはブロードなピークとして現れることは既に述べた。ピークの各画分（緑丸）をBN-PAGEによって構成するモノマー/ダイマー比を確認したが構成比に大きな差は認められなかった（Figure 24）。

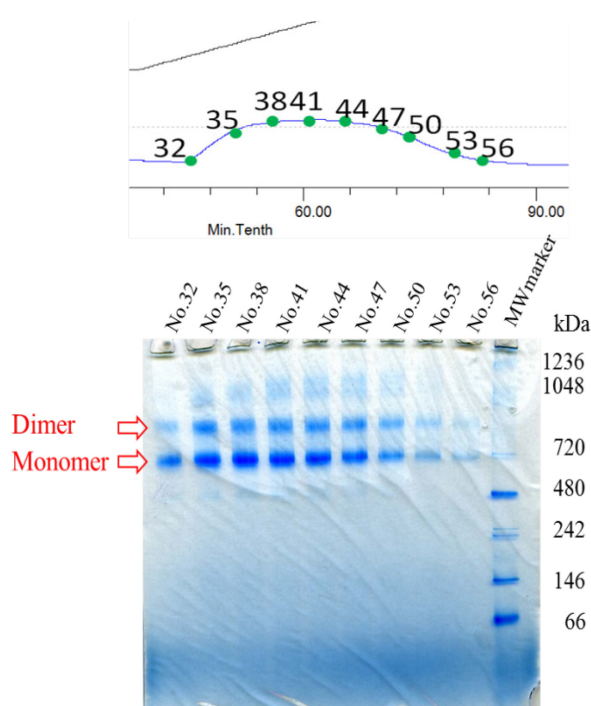


Figure 24. BN-PAGEによるモノマー/ダイマー構成比 (山本卒論)

そこで、複合体Vのブロードなピークを4つに分画 (Fc.1, Fc.2, Fc.3, Fc.4)しそれぞれリン量を測定した。測定結果は Fc.1 (No.32-34);162 moles/ATPase、 Fc.2 (No.35-40);122 moles/ATPase、 Fc.3 (No.41-49);60 moles/ATPase、 Fc.4 (No.50-56);40 moles/ATPase となった (Table 5)。各画分の酵素活性、阻害率はそれぞれ Fc.1;0.57  $\mu$ moles/min/mg、89%、

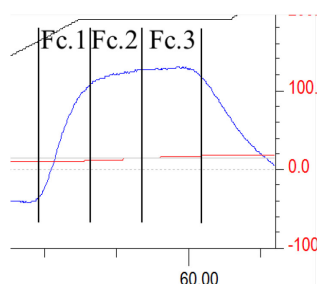
Fc.2;0.41  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、97 %、Fc.3;0.16  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、88 %、Fc. 4;0.12  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、66 %であり、酵素活性と含有リン量に相関関係があると考えた。

Table 8. 精製酵素の含有リン量

	Fc.1	Fc.2	Fc.3	Fc.4
リン個数/ATPase	162	122	66	40

溶出条件を変更し、更にカラムベッド体積を増やすことで、従来では不可能であった酵素濃度でカラムより溶出することが可能となった。溶出された複合体Vを3つ(Fc.1,Fc.2,Fc.3)に分画し、それぞれの画分の含有リン量について分析すると、Fc.2に於いてのみ含有リン量が一定であることが示された。そこで、それぞれの画分の結晶化を行うとFc.2のみ結晶の形成が認められた。これは、この画分が2次元結晶化に適していることを示す結果である。故に、Fc.2を2次元結晶化に用いることとした。

Table 9. 各画分に於ける含有リン量と結晶形成の有無



画分	リン個数/ATPase	結晶の形成
Fc. 1	150 $\pm$ 54 (n=8)	×
Fc. 2	72 $\pm$ 8 (n=25)	○
Fc. 3	32 $\pm$ 4 (n=4)	×

常に一定であると考えていたミトコンドリア内膜小胞量は意に反して増減することがミトコンドリア重量測定の結果より明らかとなった。可溶化に於ける界面活性剤濃度を固定し界面活性剤対酵素比のみを変化させることとし、この比を小さくすることで従来と比較して高い酵素活性を示す複合体Vの精製が可能であることを見出した。

酵素活性の差が含有リン量に依存していると考えたが、それぞれに於いて有意な差は認められなかった。

Table 10. 可溶化懸濁液濃度の違いによる含有リン量の差

画分	可溶化懸濁液濃度 g/l	リン个数/ATPase
Fc.2	430	80 ± 8 (n=5)
	460	75 ± 8 (n=9)

本実験開始当初は、含有リン量が酵素活性に大きく寄与すると考えたが、今回の実験値はそれを覆す結果であった。そこで、構成脂質組成を分析することとした。脂質を抽出後、薄層クロマトグラフィーによって分離展開し組成分析を行うと両者に大きな差が認められた。界面活性剤対酵素比を小さくすることで、現在報告されているウシミトコンドリア内膜の脂質組成に近くなり、それが酵素活性に影響したと考えられる。

Table 11. 各可溶化懸濁液濃度の違いによる含有リン脂質組成

	CL	PE	PC
430 g/l (n=3)	14 ± 3%	6 ± 2%	68 ± 12%
460 g/l (n=3)	27 ± 1%	16 ± 2%	57 ± 5%
<sup>a</sup> ウシミトコンドリア内膜	23%	27%	39%

<sup>a</sup>: ヴォート生化学

## 2-3-9. F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素の熱安定性

ここまでに記した通りの精製条件で従来と比較して高い酵素活性と阻害剤感受性を示す複合体Vを精製できる新規の方法を開発した。そこで、精製した複合体Vの2次元結晶化を行う為に精製標品の熱安定性について検討することとした。酵素標品を4,15,20,27 °Cに設定されたインキュベーター内に静置し、毎日酵素活性と阻害剤感受性を測定した。インキュベーター内に静置された酵素標品の比活性と阻害剤感受性の推移を下記する。

Table 12. 複合体Vの熱安定性

	4°C		15°C		20°C		27°C	
	比活性 μmoles/min/mg	阻害率 %	比活性 μmoles/min/mg	阻害率 %	比活性 μmoles/min/mg	阻害率 %	比活性 μmoles/min/mg	阻害率 %
精製直後	0.68	98	0.68	98	0.68	98	0.68	98
1日後	0.52	95	0.60	96	0.62	96	0.61	85
2日後	0.66	94	0.72	96	0.61	95	0.62	87
3日後	0.59	94	0.75	94	0.74	91	0.28	20
4日後	0.79	71	0.26	10	0.23	18	0.24	15

今回の検討温度内での複合体Vの安定性は4°Cに於いて最も高く、対して27°Cに於いて最も低い結果となった。4°Cに静置した複合体Vは精製後4日後で70%以上の阻害剤感受性を示した。複合体Vの親水性部位であるF<sub>1</sub>は、1976年E.Rackerによって

“A New Look at Mechanisms in Bioenergetics”に記述された通り低温変性を示すことが広く知られているが、完全な複合体Vはその性質を示さずむしろ低温で安定性を保つことが示された。複合体VとそのサブコンプレックスであるF<sub>1</sub>で全く異なる性質を持つことが今日まで結晶化に成功しなかった理由と考えられる。

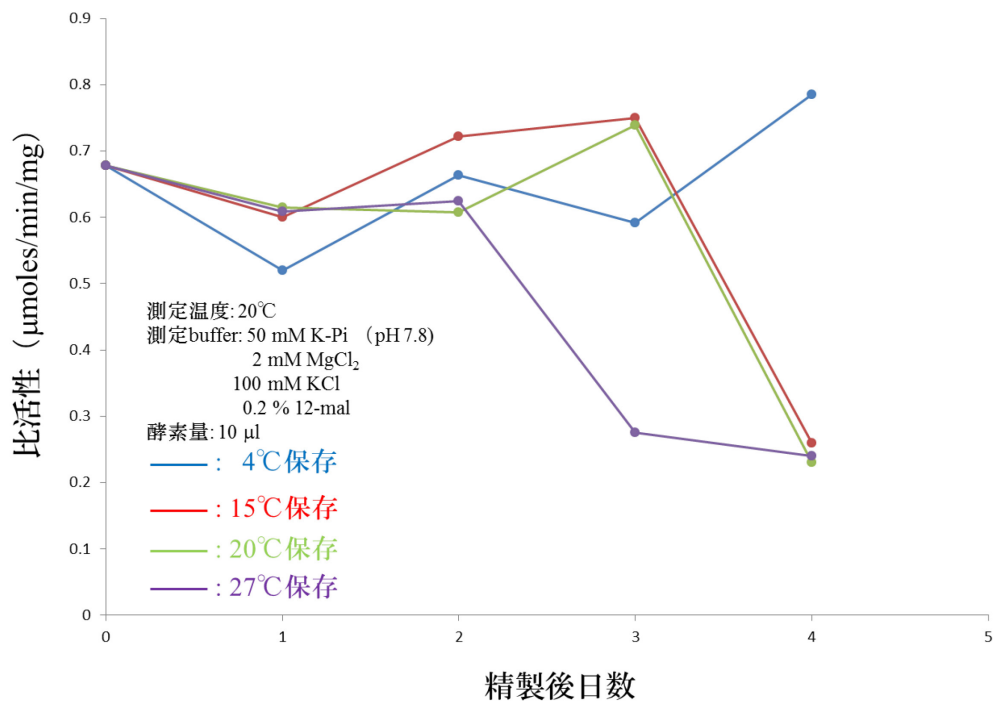


Figure 25. 各温度保存による酵素活性の増減

精製番号: AA165

酵素濃度: 11.8 mg/ml (21.2 μM)

測定温度: 20°C

反応液組成: 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.2 % DDM

水色: 4°C 保存 赤: 15°C 保存 緑: 20°C 保存 紫: 27°C 保存



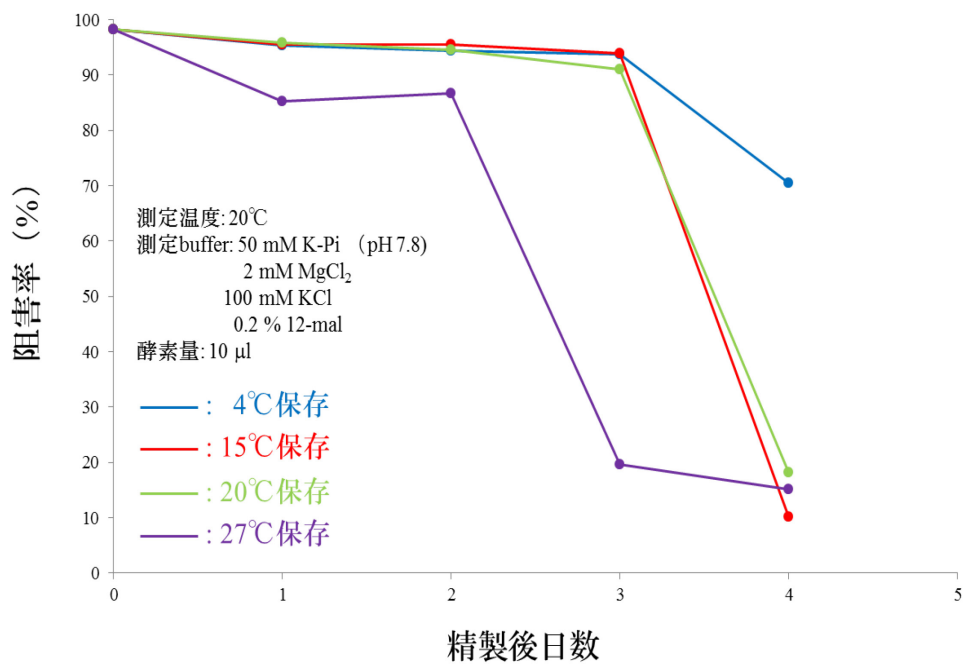


Figure 26. 各温度保存による酵素活性の増減

精製番号: AA165

酵素濃度: 11.8 mg/ml (21.2 μM)

測定温度: 20°C

反応液組成: 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl,

0.2 % DDM, 20 μM オリゴマイシン

水色: 4°C 保存 赤: 15°C 保存 緑: 20°C 保存 紫: 27°C 保存

## 第肆節. 考察

### 2-4. 考察

#### 概略

複合体Vの全体構造解明に向けた結晶作成は如何に安定した高純度の複合体Vを得るということが絶対条件であり、最大の難関でもある。複合体Vの全体構造が未だ報告されないことは緒言にも記したが、それは複合体Vが極めて複雑であり不安定な分子であるが故のことである。この問題の解決策は第一に精製法の確立であると考えられる。従来の精製法からの改善点を以下にまとめ、そこから得られた知見を記す。

#### 1. 活性測定方法の検討

複合体Vは、プロトン濃度勾配がある環境に於いて ATP 合成反応を行い、緩衝液中では ATP 加水分解反応を行う。ATP 加水分解活性を測定する方法は Figure 7 に示した通り複雑であるが、この反応における律速段階は複合体Vが触媒する ATP 加水分解反応であることが実験結果より明らかとなっている。この反応に於いて複合体Vが触媒する ATP 加水分解反応は、Figure 13 に示す通り 3 段階の反応過程を経る。第 1 段階を加速期、第 2 段階を定速期そして第 3 段階を減速期である。酵素活性は、3 つの反応段階中で最も速度の速い定速期から算出し、定速期に達する反応開始後 20-80 秒の吸光度差から求めた。活性測定に用いる酵素量に比例して吸光度が減少した為、酵素活性は定常状態であると推定された。故に、この反応段階から酵素活性を算出することに対して支障はないと考えられる。

#### 2. ATP 加水分解反応過程

先ほど記した通り、複合体Vが示す加水分解活性は 3 つの反応過程がある。この 3 つの反応過程に於いて、減速期は複合体Vが完全な機能を有することを示す最も重要な過程であると考えられる。一般的に酵素活性が収束に向かう場合、プロダクトインヒビションや酵素が希薄濃度となったことで酵素が変性した可能性と考えさせられる。そこで、ATP 加水分解後生成物である ADP を添加し酵素活性が阻害されるか測

定したところ ADP 加水分解活性は阻害されなかった。また、活性測定後の酵素標品を用いて再度 ATP 加水分解活性を測定すると酵素標品は ATP 加水分解を触媒し、オリゴマイシンによって反応が阻害された。故に、この結果はプロダクトインヒビションと酵素濃度が希薄となったことによる変性を否定する。そこで、この反応系に於いて酵素活性が収束する要因として考えられるのは、本来複合体Vは ATP 加水分解・合成反応を調整、制御するサブユニットを構成因子として持つ。つまり、酵素標品が3段階目の減速期を示すことはこれらサブユニットが機能していることを示す結果であると考えられる。

### 3. ミトコンドリア小胞の定量

ウシ心筋に含まれるミトコンドリア量は季節によって変動し、また、ウシ個体によっても大きく異なることが今回の実験結果より明らかとなった。従来の精製法では、ミトコンドリア量は1年を通して常に一定であると考え、目測から懸濁量を決めて複合体Vを可溶化し精製を行った。この方法から得た複合体Vを用いた結晶化実験では、優れた2次元結晶を得ることは出来なかった。これは、精製毎に得られる複合体Vの酵素活性や阻害剤感受性に大きな変動があり、酵素の質が安定しなかったことから適切な結晶化条件を絞りこむことが出来なかったことに起因すると考えられる。そこで、ミトコンドリア小胞量を正確に計測する方法を取り入れることで、酵素活性と阻害剤感受性が安定することとなった。この改善によって、懸濁液濃度を自在に調整することが可能となり従来の精製方法では不可能であった界面活性剤対酵素比が精製酵素に及ぼす影響について詳細に検討することが可能となった。

### 4. 可溶化時懸濁液濃度が及ぼす比活性と阻害率

ミトコンドリア小胞を正確に測定することが出来るようになったことで、界面活性剤対酵素比を自在に調整可能となった。そこで、可能化時懸濁液濃度を 430 g/l となるように調整し可溶化した酵素と 460 g/l となるように調製した酵素とで活性と阻害剤感受性を比較すると前者は、 $0.45 \pm 0.17 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、 $95 \pm 1.7 \%$ となり、後者は、 $0.75 \pm 0.10 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、 $98 \pm 0.42 \%$ となった。明らかに後者が酵素活性、阻害剤感受性ともに高く偏差も小さいことから酵素として優れている。後者は、界面活性剤対酵素比は小さい為、他の呼吸鎖複合体の可溶化を最低限に抑えたことで、目的の複合体Vの比含量を高めたことが酵素活性を上げる要因となったと考えられる。また、用

いる界面活性剤量を最低限にすることも界面活性剤の持つ変性効果を抑え、それが酵素活性の向上を招いたと考えられる。更なる懸濁液濃度の向上は、結果にも記す通りガラス製テフロンホモジナイザーを安定に回転させることが出来ない為不可能である。よって複合体Vの精製に於いては 460 g/l が懸濁液濃度としては最適であると推測できる。

#### 5. イオン交換クロマトグラフィーの決定

複合体Vの精製過程の中でカラムクロマトグラフィーに唯一 Poros-20HQ 陰イオン交換体を用いる。複合体Vは極めて不安定である為、長時間のイオン交換体との結合は立体構造の歪みを生じさせ酵素の変性を招くことが明らかとなった。急激なイオン強度の上昇もまた酵素変性を招く結果となった。故に、複合体Vの精製に於けるイオン交換体は高速で使用可能である Poros-20HQ が最適であり、溶出には、KCl を用いたリニアグラジエントで行うことが酵素標品の純度から考えて優れていると考えられる。

#### 6. 精製酵素に結合するリン脂質の個数・種類

新規に開発した精製法に基づいて得た複合体Vは常に 75 個のリンを有しており、そのうち 27 %が CL というリン脂質である。CL はホスホグリセロールが 2 分子結合した構造をしており、ミトコンドリア内膜に特有の脂質である。様々な文献より CL は酵素の安定性や酵素活性に大きく寄与していることが明らかとなっている。そこで CL を精製時に 4 moles/ATPase 分加えることで複合体Vの酵素活性を大幅に向上させることに成功した。これは、ミトコンドリア内膜中で CL が複合体Vの回りに局在し、機能していることを示すものである。現在に於いては、如何に機能しているかを特定することは出来ないが、脂質分子との相互作用を解析することが出来る電子線結晶構造解析によって明らかにすることが出来るものであると考えられる。

#### 7. 精製酵素の熱安定性

精製した複合体Vの熱安定性を測定したところ、27°Cで保存した場合精製後 3 日目で白濁したのに対して、4 °Cで保存した場合精製後 4 日目に於いても白濁しなかった。20 °Cと 15 °Cの両条件は、精製後 4 日目で白濁した。可溶化酵素の保存は、4 °Cが最適であり、複合体Vの精製は氷上で行うことが望ましいと考えられる。1976 年

E.Racker により提唱された複合体 V の親水性部位である  $F_1$  は低温に於いて不安定となり変性する性質を有するとされている (A New Look at Mechanisms in Bioenergetics)。しかし、完全な複合体 V はその性質を全く示さず、低温で安定となる性質を持つことが示された。複合体 V とサブコンプレックスである  $F_1$  が相反する性質を示すことで、結晶化条件がより複雑となりそれが現在まで全体の複合体 V の結晶作成に成功していなかった要因と推測できる。

#### 8. 複合体 V の新規精製法

ウシ心臓の皮、筋、脂肪分をできるだけ取り除いた心筋を用意し、ミンチ機(日立製作所製 Meat Chopper 12RF 型)にかけ、ミンチ約 1,100 g を用意した。550 g のミンチに対して、PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) を加え、氷水 (イオン交換水) 2,875 ml, 0.2 M Na-Pi 緩衝液緩衝液 (pH 7.4) 375 ml を加え、破碎した (11,000 rpm, 5 min; 日本精機製破碎機)。懸濁液を遠心分離し (2,800 rpm, 20 min; 久保田製作所製大容量冷却遠心機 9810 型、RS-6600 ローター)、上清は 2 枚重ねしたガーゼで濾し、直ちに 3 N NaOH で pH を 7.4 に調整した。氷中で保存した残りのミンチ 550 g も同様に処理し、上清回収した。沈殿からミトコンドリア画分を再回収するため、沈殿に対して氷水 (イオン交換水) 3,000 ml, 0.2 M Na-Pi 緩衝液緩衝液 (pH 7.4) 375 ml を加え、破碎し (11,000 rpm, 5 min)、遠心分離した (2,800 rpm, 20 min)。上清をガーゼで濾し、氷中に保存済の上清と合わせた。集めた上清を遠心分離し (10,000 rpm, 30 min; Beckman 社製冷却式フロア型高機能遠心機 Avanti HP-30I, JLA-10.500 ローター)、沈殿に 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) を加え、ガラスフロンポッター型ホモジナイザーを用いて 7 回繰り返すりつぶした (上下合わせて)。予め重量測定した 10 本の超遠心チューブ (6 本; Beckman 社製 45Ti ローター、4 本; 日立社製 P45AT-548 ローター) に均等に懸濁液を入れさらに懸濁用緩衝液を超遠心チューブの首まで加え、超遠心分離した (30,000 rpm, 30 min; Beckman 社製超遠心機 L-7 型、45Ti ローター、30,000 rpm, 30 min; 日立)。超遠心分離後、上清はパスツールピペットを取り付けたアスピレーターを用いて除去した。沈殿に 2 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT を含む 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) を加え、ガラスフロンポッター型ホモジナイザーを用いて 10 回繰り返すりつぶした (上下合わせて)。懸濁量は沈殿量から推測して 320~360 ml 程度とし、この懸濁液をミトコンドリア内膜小胞懸濁液とした。11% (w/v) DOC (デオキシコール酸ナトリウム) (pH 8~9) をミトコンドリア内膜小胞懸濁液 1 l に対し 66.125 ml となるように、また、20% (w/v)

DM (デシルマルトシド)を終濃度が0.4% (w/v)となるように30秒かけてゆっくりと加え、酵素を可溶化した。直ちに終濃度が7.2% (w/v)となるように塩化カリウムを加えた。水中で攪拌し、溶解したのを確認後、遠心分離 (39,000 rpm, 50 min、6本 Beckman 社製 45Ti ローター用)して、4重に重ねたガーゼで濾し上清を回収した。0.2% DM, 0.05% DDM, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 2 mM MgCl<sub>2</sub>を含む40 mM HEPES-Na緩衝液 (pH 7.8)に2.0 M, 1.1 M, 1.0 M, 0.9 M sucroseを加えたものをそれぞれ調製しておいた。遠心チューブに2.0 Mを8 ml (9.92 g)、1.1 Mを5 ml、1.0 Mを15 ml、0.9 MをBeckmanの遠心チューブには13 ml、日立の遠心チューブには12 mlのせて、sucroseの段階的濃度勾配を作製した。この上に遠心後の上清を、0.1 mM DTT、0.1 mM EDTA、0.2% DM、2 mM MgCl<sub>2</sub>を含む40 mM HEPES-Na (pH 7.8)で1.5倍に希釈したものを24 mlのせ、遠心した (39,000 rpm, 15.5 hour, accel slow, brake slow)。遠心後、遠心チューブの底から約4 mlずつ分取し、各分画10 µlを用いて活性測定を行い(ATP加水分解活性、後述)、活性の高い画分を集めた。この画分を超遠心チューブ (Beckman 社製 45Ti ローター用)に均等に分け、2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTTを含む40 mM HEPES-Na緩衝液 (pH 7.8)を遠心チューブの首まで入れ、遠心分離した (35,000 rpm, 15 min)。上清を150 mM sucrose, 0.2% DM, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTTを含む40 mM HEPES-Na緩衝液 (pH 7.8)で平衡化したPoros-20HQカラム (φ;26 mm、ℓ;130 mm)に吸着させ、塩化カリウム濃度勾配によって溶出させた。カラムのA<sub>280 nm</sub>の吸光度より得られたピークから複合体V画分を判断し、画分ごとに集め、4 moles/ATPaseとなるようにCLを加え、その後2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTTを含む40 mM HEPES-Na緩衝液 (pH 7.8) 800 mlに対して20分の透析 (分画分子量約14,000; Viskase 社製透析用セルロースチューブ UC20-32-100)を3回繰り返した。透析後、限外濾過 (画分分子量200,000; 東洋濾紙社製ウルトラフィルター43 mm)によって濃縮した。濃縮の圧力は2 atm、60 rpmとし濃縮後、最終標品とした。最終標品は直ちに脂質と混合し結晶化を行った。

## 第伍節. 結論

### 2-5. 結論

第弐章に於ける結論は、ウシ心筋ミトコンドリア複合体Vの新規精製法の開発に成功したことである。この精製法を開発したことによって酵素活性を約 2.5 倍高めることに成功し、98 %の酵素がオリゴマイシンに対して感受性を保持していた。同時に、精製毎によって認められた誤差を 96 %も減少させることに成功した。

## 第参章

### $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の結晶化



## 第壹節 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の結晶化条件の検討

### 3-1. $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の 2 次元結晶化

#### 3-1-1. 緒言・目的

複合体Vの全体構造解明を目指して組織的な努力が幾年にも亘り世界中で行われてきた。しかし現在に於いても、複合体Vの結晶作成に成功した例は皆無であり、当然全体の結晶構造は報告されていない。これは、この複合体Vが類稀な反応機構を持つ極めて不安定な酵素である為である。故に、複合体Vの結晶化に於いて如何に安定な酵素を精製するかが成否に関わっている。第貳章に記した通り複合体Vを精製する新規の方法開発に取り組み成功した。これにより、複合体Vを用いて詳細な結晶化条件の検討を試みる事が可能となった。第参章は複合体Vの結晶化条件検討について記す。

## 第3節 装置/原理

### 3-2. 装置/原理

#### 3-2-1. 電子顕微鏡

##### (i) 電子顕微鏡概要

電子顕微鏡の基本原理は光学顕微鏡と同じである。しかしながら、決定的に異なる点は可視光線を用いて対象を見る光学顕微鏡とは違い電子線を用いて対象を観察するという点である。そのために、作動させる環境が大きく異なり、それを支える機器によって大きさは光学顕微鏡と比較し遥かに大きい。電子顕微鏡に用いる電子線とは、放電などによって生じた電子の流れであり、当然電子線を構成するのは文字通り電子である。然らば、電子とは何か。レプトンの一種である電子とは肉眼で識別することは出来ず、負の電荷を持っている。電子は相互作用が強く透過力が弱い、その為高真空状態でのみ取り出すことが可能である。これは、他の粒子と相互作用し消滅する為である。故に、電子顕微鏡の照射系は常に高真空状態に置かれることになる。電子線は、光学顕微鏡で用いられているガラス製レンズによって屈折せず、マグネティックレンズにより屈折させる。電子は肉眼では観察できないことは既に記した。その為、観察には蛍光版を用いて直接肉眼で観察可能なように変換する必要がある。電子顕微鏡は2つの型に大別することができる。それは、走査型電子顕微鏡 (SEM)と透過型電子顕微鏡 (TEM)である。走査型電子顕微鏡は低加速電圧によって加速された電子線を試料に照射し、入射電子によって励起された試料内部の電子、所謂2次電子、試料に反射した反射電子を観測し、試料表面の情報を得るというものである。対して、透過型電子顕微鏡は、高加速電圧によって加速された電子を1  $\mu\text{m}$  以下の薄い試料に照射し、試料を透過した電子、エネルギーのやり取りを一切していない弾性散乱電子、もしくは反射電子を観測し、対象試料の内部構造や構成成分の情報を得るというものである。本研究で用いる電子顕微鏡はすべて透過型電子顕微鏡である。(日本電子 HP)

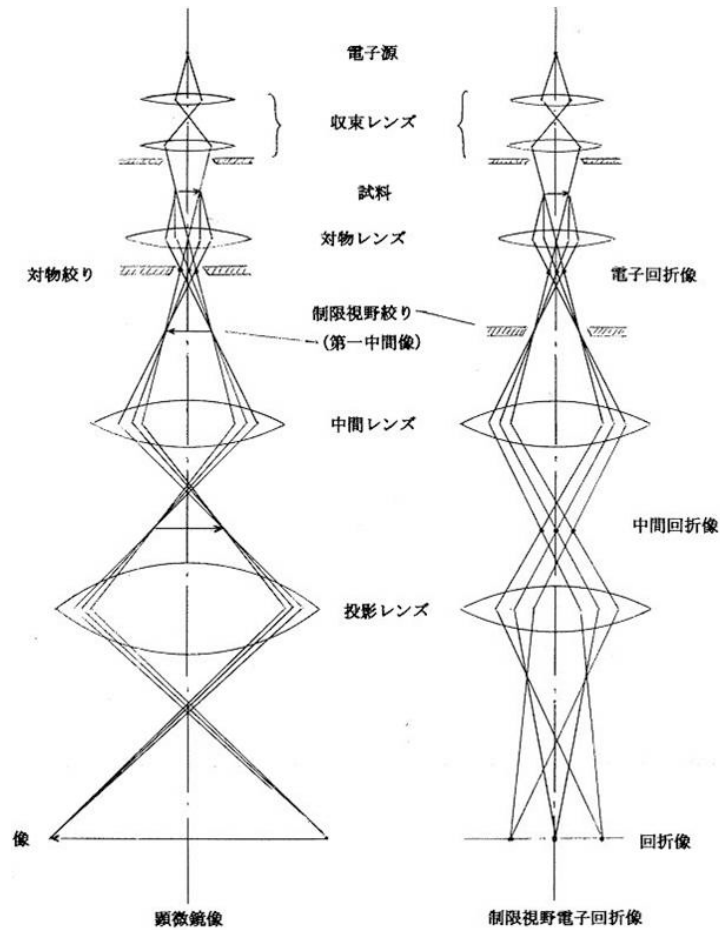


Figure 27. 光学顕微鏡 電子顕微鏡模式図

左: 光学顕微鏡, 右: 電子顕微鏡

(ii) 電子線の波長

電子線の波長は、使用する電子顕微鏡のフィラメントに印可する電圧によって決まる。この電圧を加速電圧と呼び、高くなるほど照射される電子線の波長が短くなり、透過

能力が上がる。一般的な生体試料の場合 80-100 kV が用いられる。加速された電子の波長を求める場合、ドブロイの方程式によって求めることができる。

$$E = hv$$

それぞれの文字が表す意味は E:エネルギー、h:プランク定数、v:波数である。波数  $\lambda$  は波長の逆数であることから上記の式に代入すると、

$$E = \frac{h}{\lambda}$$

上記のように表すことができる。ここで、エネルギーに注目する。全エネルギーの総和はアインシュタインの方程式で表すことができる。しかし、加速された電子の場合、相対論的効果を硬化する必要があり、次式で表すことができる。

$$E = mc^2 + eV$$

熱力学第1法則によるとエネルギーは保存されるため電子が加速電圧によって加速され得たエネルギーはポテンシャルエネルギーとして考えることができ、このポテンシャルエネルギーは運動エネルギーと等しくなるはずである。つまり、

$$U = \frac{1}{2}mv^2$$

上記の関係が必ず成り立つ。ここで上記の式の文字が表す U:ポテンシャルエネルギー、m:質量、v:速度である。このポテンシャルエネルギーは加速電圧によって電子1個が得たエネルギーである。よって加速電圧 100 kV であれば 100 keV となる。つまり、

$$eV = \frac{1}{2}mv^2$$

と表すことができる。この式から速度 v について解けば

$$v = \sqrt{\frac{2eV}{m}}$$

となり、加速された電子の速度を得ることができる。ここでドブロイの方程式を波長  $\lambda$  を求める式に変換し、それぞれの式を挿入すると

$$\lambda = \frac{ch}{\sqrt{eV(2mc^2 + eV)}}$$

となるはずである。そしてそれぞれの値を挿入すると、

$$\lambda = \frac{12.26}{\sqrt{V * (1 + 9.8V * 10^{-7})}}$$

となって、それぞれの加速電圧の時の電子線の波長を算出することができる。

Table 13. 加速電圧と電子線波長

加速電圧 kV	波長 pm
100	3.70
200	2.51
300	1.97
400	1.64
1000	0.872

### (iii) 電子顕微鏡像におけるコントラスト

TEM は、明視野像と暗視野像の 2 つの観察法で試料の形状や表面構造、内部構造の情報を得ることができる。本研究は一貫して明視野像によって結晶の評価をしているわけであるが、それぞれの違い及び発生原理を詳細に理解することは電子顕微鏡を扱う上で重要である。まず、第一に明視野と暗視野の違いについて記述する。電子線を試料に照射すると透過した電子と試料内部で相互作用し散乱する電子が発生する。これら電子のことを透過電子、散乱電子と呼ぶ。透過電子のみを結像させ、散乱電子を対物絞りでカットした際に得られる像が明視野像である。対して、散乱電子を結像した場合が暗視野像である。TEM 画像や電子線回折は試料内部情報を含んでいる為、そこから内部構造を読み取ることが可能である。基本的に TEM 画像におけるコントラストは位相コントラスト、散乱コントラスト、回折コントラストによって生じる。まず、最も簡単な散乱コントラストについて記述する。加速された電子が試料の原子・電子と衝突することによって散乱され、対物絞りによって散乱した電子がカットされることにより生じるコントラストであり、主に非晶形試料に電子線を照射した場合生じる。次に、回折コントラストについて記述する。このコントラストは、散乱コントラストとは異なり結晶質の試料に電子線を照射した場合に起こる。原理は照射さ

れた電子線が試料に当たり回折現象を起こし、対物絞りにより回折した電子線がカットされることによって生じるコントラストである。最後に、位相コントラストについて記述する。このコントラストは透過電子、散乱電子、回折した電子が干渉することで生じるものである。透過電子の場合エネルギーのやり取りが皆無であるので、加速電圧によって電子線の持つ波長が決まる。対して、散乱電子の場合エネルギーのやり取りによって波長がずれ位相が変化することで生じる。極低温電子顕微鏡の場合、位相コントラストのみで試料を観察する必要がある、2次元結晶のような軽い原子によって作られる試料は高いコントラストを得ること困難である。

## 3-2-2. 真空蒸着機

### (i) 真空蒸着機

真空蒸着機は、高真空中で蒸発材料に高電流を流すことで蒸発材料が持つ抵抗によって蒸発材料を気化・昇華し離れた位置に置かれた基板となる表面に気化した蒸発材料を付着させ薄膜を形成する装置である。この装置における重要部分は高真空状態を維持することである。高真空状態によって気化した蒸発材料は初めて真空蒸着機内を飛行することができる。低真空度の場合、気化した蒸発材料は空気中に含まれる分子と衝突し移動することができないためである。気化した蒸着材料は、温度の低下と共に凝集し基板の表面に付着するのである。冬季に霜が降りる現象と同じ原理である。この装置は高真空状態を作り出す為、それぞれ用途の異なる2種類のポンプが装置内に組み込まれている。一つは油回転ポンプである。このポンプは粗びきポンプとして使用でき、 $10^5$ - $10^2$  Paの真空度まで用いる事ができる。さらに一つはタービンポンプである。こちらのポンプは高真空状態を作り出す為に必要なポンプであり、 $10^2$ - $10^9$  Paまで使用できる。タービンポンプが稼働している間油回転ポンプはこれを補助するように設計されている。これら2種の用途の異なるポンプによって真空蒸着機では $2 \times 10^{-4}$  Pa以下の環境を作り出す。



Figure 28. 真空蒸着機

## (ii) 蒸発材料

本研究に用いた蒸発材料はカーボンである。真空蒸着機の所定の位置に加工したカーボンロッドを差し込み高真空状態にする。その後、電気を流し抵抗加熱によってカーボンを蒸発させる。一般的に蒸発材料として用いられる材料はカーボンの他に窒化ホウ素など平面構造を持つ物質である。本研究で用いるカーボンロッドは高純度の物を用いる必要があり、使用したカーボンロッドの純度は99.999%以上の物である。純度が低いと蒸着中にスパークが発生する。このスパークは、クラスター状の炭素であると思われるが、これが発生することにより、カーボン膜に穴が開き使用できなくなる。カーボンロッドの加工は金属鑪を用いて行い、以下のような形状とした。これら相違点は、上記は複数回の蒸着に適しているが蒸着する為の電流が高く真空度が途中で悪くなりやすい。下記は蒸着できる回数は限られるが蒸着する為の電流が低く真空度が悪くなりにくい。

## (iii) 基板

本研究に用いた基板はマイカである。日本語では雲母と呼ばれ、層状ケイ酸塩鉱物である。工業的に絶縁体として用いられている。このマイカ板は原子レベルで平面である為、この表面に支持膜であるカーボン膜を蒸着させる。極低温電子顕微鏡による試料観察に使うカーボン膜は原子レベルでフラットである必要があり、その為に特別に手配したマイカを用いる。しかし、通常の観察に使用するカーボン膜は購入したマイカに蒸着したの物を用いる。購入したマイカの質は大きな偏りがあり、使用に耐えるもの耐えないものを選別する必要がある。使用に耐えないものは、電球などの光に透かすとニュートンリングのような光の乱反射が認められるものである。よって、使用する場合は、このニュートンリングが観測できないものを選んで使用する必要がある。

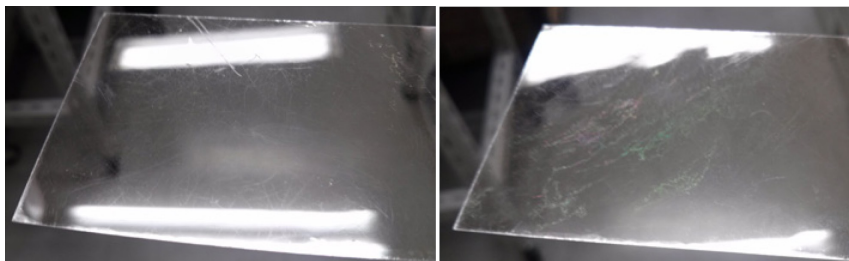


Figure 29. 雲母版  
(左)良い例、(右)悪い例



### 3-2-3. イオンコーター (ion sputtering device)

カーボン支持膜などの疎水性基板の表面に親水性処理を施す為に用いる装置である。油回転ポンプを用いて低真空環境を作り出し、数百ボルトの電圧によって気体に放電させ残余ガスをプラズマ状態にする。プラズマ化した気体は陰極側に在るターゲットに衝突する。その結果ターゲットを構成する原子が放出され、そして、放出した構成原子が試料に対して均一に被膜を形成する。



Figure 30. イオンコーター

## 第参節 試薬調整法

### 3-3. 試薬調整法

#### 3-3-1. 脂質調整法

シグマ社製の脂質は 25 mg、100 mg の粉末状でプラスチック製容器に封入されている。よって、クロロホルムで洗浄し乾燥させた 50 ml ナス型フラスコにアルゴンガスを満たし、そこに粉末状脂質を入れる。指で数回脂質容器を叩き脂質をナス型フラスコに落とす。以前は、容器に残った脂質はクロロホルムに溶解させナス型フラスコに加えたが、クロロホルムによって容器が溶けることが考えられるため新規の方法では、容器に残った脂質は無視することとする。ナス型フラスコに脂質を入れたらそこにクロロホルムを加え脂質を溶解させる。クロロホルムを加える量は、脂質 25 mg の場合 500  $\mu$ l とし脂質 100 mg の場合 2 ml とする。つまりこの段階で脂質溶液の濃度は 50 mg/ml である。予めクロロホルムで洗浄し乾燥させた 1 ml バイアル瓶にこの脂質クロロホルム溶液を 500  $\mu$ l 毎分注し、脱酸素剤を複数入れた保存容器に入れ-80 $^{\circ}$ C で使用するまで保存する。脂質溶液濃度は 50 mg/ml となるように調整したが正確な濃度はコリン定量によって算出した。Avanti 社製の脂質はクロロホルムに溶解した状態でガラス製アンプル瓶に封入されている。アンプルの上部を切断後、予め洗浄し乾燥させたガラス製バイアル瓶に分注しておく。保管は脱酸素剤の入った箱に入れ-80  $^{\circ}$ C で行う。濃度はコリン定量によって算出した。

#### 3-3-2. 脂質使用法

50 ml ガラス製ナス型フラスコをクロロホルムで洗浄し乾燥させる。乾燥後必要量の脂質クロロホルム溶液をガラス製バイアル瓶よりマイクロピペットを用いて採取しガラス製ナス型フラスコに入れる。その後、アルゴンガスを吹き付けクロロホルムのみ完全に揮発させる。この際アルゴンガスが出る圧力に留意すること。圧力は

0.05 MPa を推奨する。揮発させると乾燥した脂質の薄膜ができるが、低純度の脂質を用いた場合乾燥した脂質薄膜とはならない。その場合、その脂質ロットの使用は中止する方がよい。薄膜となった脂質が入ったガラス製ナス型フラスコを減圧乾燥器にセットし3時間ほど乾燥させクロロホルムを完全に揮発させる。減圧乾燥後、界面活性剤が入った脂質溶解溶液を加え、脂質薄膜を溶解させる。加える脂質溶解溶液量は25 mg の脂質に対して2.5 ml とする。

Table 14. 脂質溶解溶液組成

保存濃度	添加容量	最終濃度
100 mM DTT	200 $\mu$ l	2 mM
20 % DM	1000 $\mu$ l	2 %
20 % NaN <sub>3</sub>	10 $\mu$ l	0.02 %
Milli Q	8790 $\mu$ l	-
total	10 ml	-

### 3-3-3. 脂質溶解溶液調整法

10 ml ガラス製メスシリンダーにミリ Q 水 6000  $\mu$ l 程入れ、そこに DTT を 200  $\mu$ l、NaN<sub>3</sub> を 10  $\mu$ l 加える。DM を 1000  $\mu$ l 加えた後、MilliQ で 10 ml までメスアップして数回転倒攪拌し脂質溶解溶液とした。

### 3-3-4. 結晶化用透析緩衝液調整法

使用する透析用緩衝液は、100 mM NaCl、0.02 % NaN<sub>3</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA、0.2 mM DTT、0.5 mM ADP を含む 40 mM Tris-HCl (pH 8.2) とした。この透析用緩衝液は、5 l 三角フラスコに、100 mM NaCl、0.02 % NaN<sub>3</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA、0.2 mM DTT を含む 40 mM Tris-HCl (pH 8.2) として作り、使用する直前に ADP を添加した。まず、1 M になるように量り取った Tris を 1 l ビーカーで 800 ml 程度のミリ Q で溶かしたものに、HCl を加えて pH を 8.2 に合わせた後、1 l にメスアップしてから瓶に入れ、常温で保存し、1 M Tris-HCl (pH 8.2) を作製した。これを、メスシリンダーで 200 ml 量り取り、そこに、20 % NaN<sub>3</sub> を 5 ml、2 M MgCl<sub>2</sub> を 12.5 ml 入れ、ミリ Q

で 1 l にメスアップしたものを 5L 三角フラスコに移した。次に、ビーカーに粉末の NaCl を 29.22 g 測り取りミリ Q を入れた後、スターラーを回しながら溶かし先ほどの 1 l メスシリンダーに移しビーカーを 3 回ほど洗いこんだ。それを、1 l にメスアップし、5 l 三角フラスコに移した。そこに、先ほどの 1 l メスシリンダーで 3 l のミリ Q を量り取って加え、パラフィルムで二重に蓋をしてから、転倒攪拌した。500 mM ADP は、粉末で約 1 g ほど分注されている ORIENTAL YEAST 社の ADP を使用した。ビーカーに室温に戻した ADP を入れ、重さを量り、500 mM になるように 40 mM HEPES-Na (pH 7.8) で溶かし、1.5 ml のチューブに 1 ml ずつ分注した後、-80 °C で保管した。

### 3-3-5. 3 者複合溶液調製法

氷上に、金属性のエッペン立て(金色)を置き、そこに 1.5 ml のエッペンドルフチューブにラベルをし、Ar で満たした。その中にマイクロマン(赤チップ)で精製した酵素標品を 70  $\mu$ l ずつ分注した。そこに、検討したい LPR になる量の脂質を、分注していたストックから取り加えた。この時、脂質はマイクロマンを用いて酵素に加え、加える時は、まんべんなく加わるように、溶液をかき混ぜるかのようにエッペンドルフチューブ中でマイクロマンをくるくる回しながら加え、10 回ほどピペッティングした。エッペンドルフチューブの蓋をした後、底を指で 10 回程はじいてさらによく混ぜた。これを、4 °C で 1 晩置き、Pre-incubation とした。

### 3-3-6. 透析ボタンを用いた 2 次元結晶化方法

SPECTRUM 社製の透析膜は、まず筒状の透析膜を必要な分だけはさみで切り取る。この透析膜を、milliQ を入れたビーカーに入れ透析膜の筒をはさみで切り開き、約 2.5 cm 幅に切り取る。3 回ほどビーカー内の milli Q を入れ替え、透析膜をすすぎ透析膜についているアジ化ナトリウムを取り除いた。透析膜の保存は 4 °C で行った。

透析ボタンは HAMPTON 社製 (直径 5 mm、深さ 2.45 mm、表面積 78.55 mm<sup>2</sup>) 及び安田商店製 (直径 4 mm、深さ 4 mm、表面積 50.2 mm<sup>2</sup>) の 50  $\mu$ l ボタンを使用した。このボタンに脂質：界面活性剤：酵素混合溶液を 60  $\mu$ l 入れ、余分な水分をキムワイプで拭き取り透析膜をかぶせた。O リングをはめ透析膜を固定した後、O リングからはみ出した余分な透析膜を切り取り、透析膜が上を向くように透析用緩衝液の入

ったジャム瓶に入れた。これを 27°C のインキュベーターの中に入れ保存した。使用するはさみやピンセット、ゴルフのピン等は予めエタノールで消毒した。透析用緩衝液は、300 ml をメスシリンダーで量り取り、ジャム瓶に入れた後にマジックで印をつけ、そこに、ADP、EDTA、DTT を入れて混合したものにボタンを入れた。以降、透析用緩衝液の交換の際には、この印を使用するものとした。

### 3-3-6. 結晶化用透析緩衝液交換方法

透析用緩衝液の交換は、300 ml のビーカーに、古い透析用緩衝液を 1/4 程度移し、その中にピンセットでボタンを移し、ジャム瓶の残りの透析用緩衝液を捨てた。イオン交換水で軽くゆすいだ後、水分をプロワイプ等で拭きとり、300 ml の印の所まで透析用緩衝液 A を入れた。これに、P1000 のマイクロピペットを用いて、500 mM ADP を 300  $\mu$ l、100 mM EDTA を 300  $\mu$ l、100 mM DTT を 600  $\mu$ l 入れ、蓋をした後に 10 回程転倒攪拌を行った。これに、キムワイプで余分な水分を拭き取った透析ボタンを入れて、再び 27°C で保存した。使用するピンセットは予めエタノールで消毒した。

### 3-3-8. 電子顕微鏡観察用グリッド作製方法

グリッドにはオランダ VECO 社製の VECO グリッド I (Cu 製、400mesh) を使用し、カーボン膜をはった。

グリッドは、プラスチック製の専用ケースに長く切った濾紙を置き、ケースと濾紙を何回も Milli Q で洗うことでほこりなどを除去した。その後、きれいな Milli Q をケースに満たし、濾紙をその中に沈めた。そこに、きれいなメタノールに浸したグリッドを、表(カーボン膜を貼る面、キラキラ光っている面)を上にしてきれいに並べた。そこに、マイカに真空蒸着したカーボン膜の四つ端をハサミで切り、斜めにしながらゆっくりと膜を沈めて、膜がマイカからはがれて、水面に浮かぶようにした。この膜を、濾紙をひっぱりながら並べたグリッドに上手く乗るように動かし、グリッドにカーボン膜をくっ付けた。余分な濾紙を切り、机の上を何回かスライドさせて、水分を少し取り除き、さらにシャーレ上でも少し動かすことで水分を取り除いた。その後、シャーレの蓋を半分開けたまま、デシケーターの中で最低 3 日間は乾燥させた。ある程度乾いてきたら、蓋は閉めた。

### 3-3-9. 金属染色法

サンプリングは、25  $\mu\text{l}$  のマイクロマンを用いて、マイクロマンのチップの先で透析膜を破り、チップの先でボタンの底をこするようにして透析後の膜標品を 0.5ml のサンプルチューブに移した。溶液を 10 回ピペッティングし均一な懸濁液にした後、ピペットマンで 3  $\mu\text{l}$  取り、親水処理済みのカーボン膜を貼ったグリッドにのせた。30 秒後、濾紙の端で軽く溶液を吸い取り、パラフィルムの上にドロップした 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) にサンプルをのせた面を接触させて 40 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.8) をグリッドにのせ、吸い取ることで余分なサンプルを落とした。吸い取ったと同時に 2% 酢酸ウラニルを 2.5  $\mu\text{l}$  のせ、30 秒後、濾紙の端で酢酸ウラニルを残らず吸い取った。この時、染色液の吸い取りムラがあると電子顕微鏡で観察する際に、染色液が試料を観察する邪魔になるのでムラなく吸い取るようにした。濾紙は ADVANTEC 社の Filter Paper No.2 を使用した。

グリッドの親水処理はイオンコーター IB-3 (Eiko 社製) を用いて、 $\sim 3$  mA (目盛り 5 に合わせた。) の電流を約 30 秒かけ行った。電流の強さの調節は、イオンコーターからグリッドに照射される紫の光が、手をかざすとうっすら見える程度の強さに設定した。

グリッドの親水処理は、 $\sim 10$  枚程度ずつ行い、 $\sim 10$  個の透析ボタンからサンプルを取り出し、その $\sim 10$  個についてサンプリングを行ってから、新たな親水処理を行うこととし、一度に全部のサンプルを透析ボタンから取り出すのではなく、なるべく $\sim 10$  個ずつ取り出し、染色を行うこととした。

## 第肆節 結果/新規 2次元結晶化条件検討

### 3-4. 結果

#### 3-4-1. Negative control

複合体Vが脂質膜中に組み込まれた事を判断するための基準が必要となる。この基準は複合体Vのみならず膜タンパク質の2次元結晶化において共通すると考えてよい。2次元結晶化は前述した通りプラスチック製の透析ボタンに精製酵素と脂質を混合した複合溶液を入れ透析膜で蓋し透析することで作成される。基準として用いるは、再構成用脂質のみ透析ボタンに充填し透析を行ったものと複合体Vのみ透析ボタンに充填し透析を行ったものである。その結果を下記する。両者大きく異なる結果となり、脂質のみ透析するとリポソームが得られ、酵素のみ透析すると凝集する結果となった。

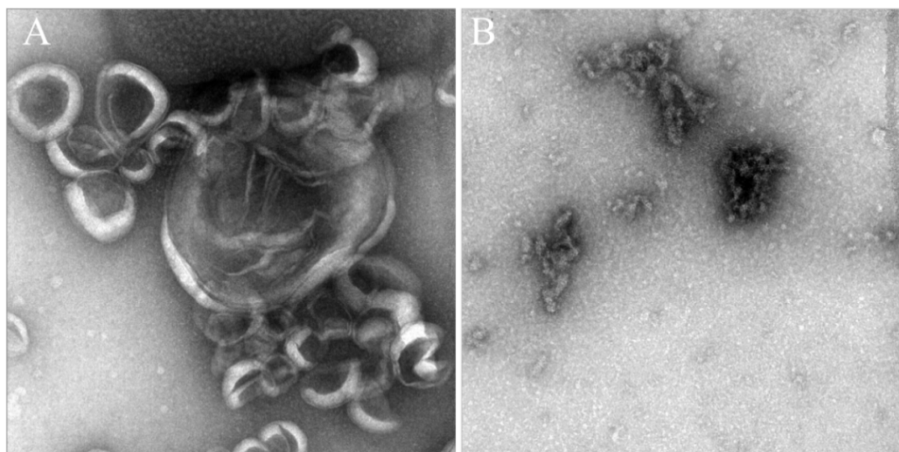
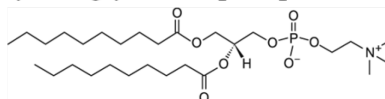


Figure 31. Negative control  
(A)DMPCのみ透析、(B)複合体Vの透析

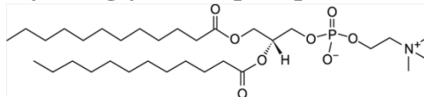
### 3-4-2. 結晶化用脂質の検討

複合体Vを脂質膜中に組み込む為の脂質の検討について記す。ここで用いる脂質は、必ずしも目的とする酵素が生体膜中に在る際に膜を構成している脂質とは限らない。その為、人工的な合成脂質から精製された脂質まで幅広くスクリーニングする必要がある。この脂質の決定は結晶作製の成否に関わる極めて重要な要因となる。精製酵素と脂質を混合し透析ボタンに充填し透析を行った。複合体Vの2次元結晶化のために使用する脂質は以下の通りである。

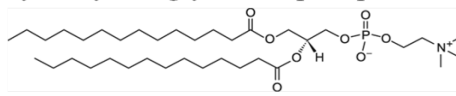
1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DDPC)



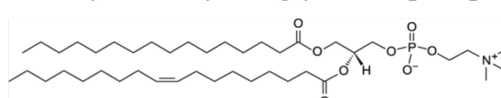
1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC)



1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)



1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)



1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)

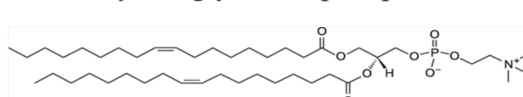


Figure 32. 各種結晶化用脂質構造式

電子顕微鏡による観察結果を次に記す。DDPC、DLPC、POPC、DOPCの使用は適していないことが明らかとなった。対して、DMPCを用いた場合のみ酵素が脂質膜中に組み込まれ、一部に酵素の規則的な配列が見られた。故に、複合体Vの2次元結晶化において最も適している脂質はDMPCであると考えられる。



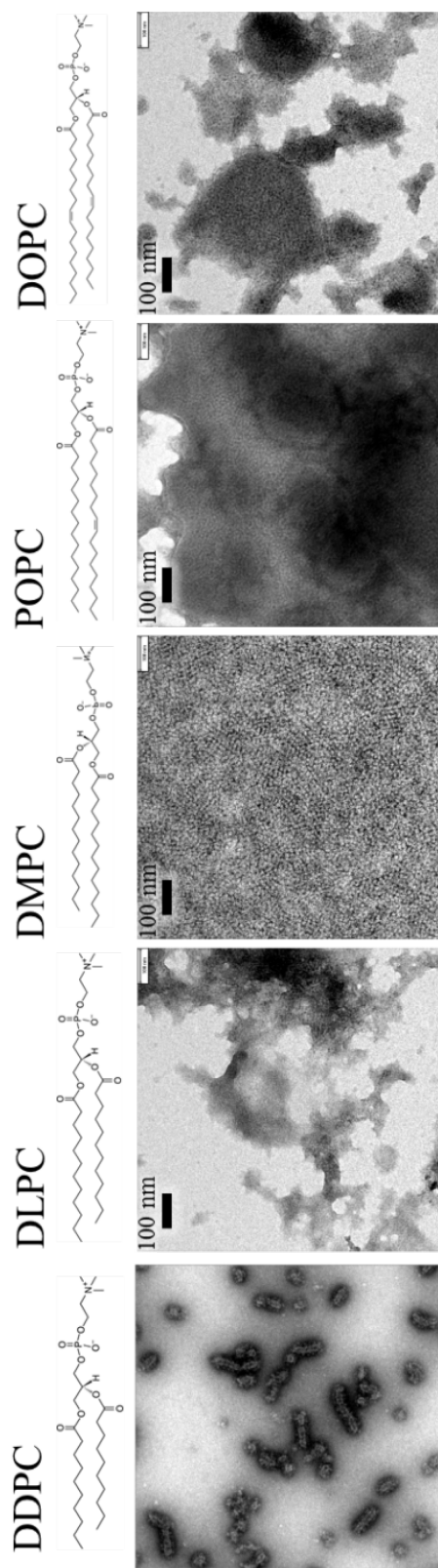


Figure 33. 各種結晶化用脂質の検討

左から DDPC、DLPC、DMPC、POPC、DOPC を用いた結晶化結果

精製番号:AA118 酵素濃度:24.6 mg/ml、酵素活性: 0.89  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 94.9 %

### 3-4-3. 脂質と複合体Vの混合方法

規則的な酵素配列を持つ複合体Vの2次元結晶を再現性よく得るためには、複合体Vを少なくとも10日間は安定に保つ必要がある。これは、複合体Vの2次元結晶化が10日間で行われるためである。酵素にとって最も変性しやすい条件は、脂質/酵素/界面活性剤から成る3者複合溶液の状態である。これは、高濃度の界面活性剤が周りに存在している為である。脂質は一般的に脂溶性であるがその程度は脂質毎によって大きく変化し、これは、酵素についても同じであり、その酵素に合った条件を絞り込む必要がある。所属する研究室に於いて精製される呼吸鎖複合体I、IVはそれぞれ異なる脂質と異なる方法を用いて2次元結晶が作成されている。そこで、複合体Vの安定な結晶を得るために、この結晶化直前の状態である3者複合溶液の最適な作製方法を検討することとした。各複合体の2次元結晶化に使われる結晶化方法を参考にし、下記の4種の方法を考案しそれぞれ結晶化し比較した。

## 方法①

30 ml ガラス製ナス型フラスコを 2 個用意しクロロホルムで洗浄し乾燥させる。クロロホルムに溶解している脂質 10 mg をマイクロマンによってガラス製ナス型フラスコに分注する。アルゴンガスを用いて 0.02 MPa の圧力でクロロホルムを揮発させ脂質を薄膜とした後、減圧乾燥機を用いて徹底的にクロロホルムを揮発させる。そこに 2 % DM と 2 mM DTT を含む脂質溶解用溶液を添加し脂質溶液を作製し、低温室で一夜静置する。その後、脂質溶液に精製直後の複合体 V を最も低い LPR と最も高い LPR になるように添加した。例えば最も低い LPR が 0.2 であれば複合体 V は 50 mg 必要となり、必要量をマイクロマンで添加した。均一になるように攪拌した後、氷中でインキュベーションして脂質/酵素/界面活性剤からなる 3 者複合溶液を作製した。しかしながら、この方法では広い面積を持った再構成膜を得ることは出来たが、結晶を得ることができなかった。この方法は高濃度の脂質を用いる事からガラス製ナス型フラスコ中で完全に溶解していなかったのではないかと予測される。この脂質溶液を低濃度とすると酵素が過剰に希釈されることになりこの場合においても結晶は得られなかった。

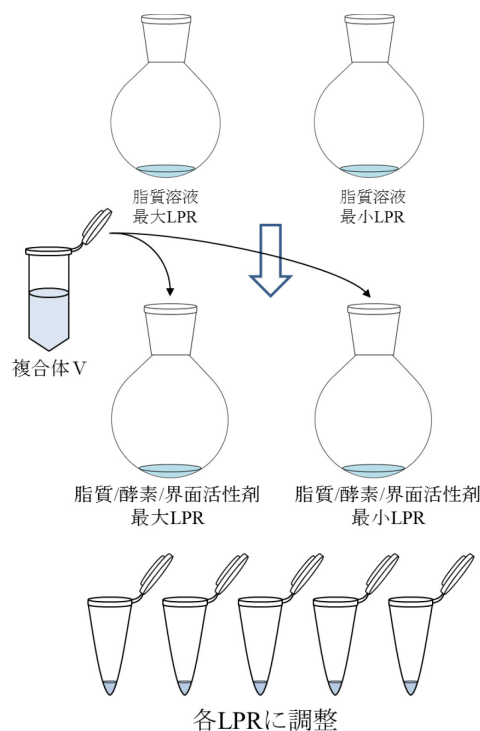


Figure 34. 調整法①の概略図

## 方法②

蓋をすることができる丸底ガラス製チューブにアルゴンガスを十分に満たしておき、そこに複合体Vを 300  $\mu$ l 加える。10 mg/ml に予め調整しておいた脂質ストックから脂質を各 LPR になるように加え脂質/酵素/界面活性剤の 3 者複合溶液を作製した。作製後氷中でインキュベーションを行い透析ボタンに充填した。電子顕微鏡を用いて観察したところ部分的に酵素配列のある再構成膜を観察することができた。しかしながら、方法①と比較していずれも大きな面積を持つまでには至らなかった。この方法では各ガラス製チューブに酵素を先に入れ、そこに各 LPR となるように脂質を加える方法で調整する。この方法は簡便であるがそれぞれのチューブで扱う量が少量である為、誤差を生みやすい特徴を持つ。少量の酵素と脂質は混合し難く均一な 3 者複合溶液を作製することができなかつた為、結晶を得ることができなかつたと考えられる。

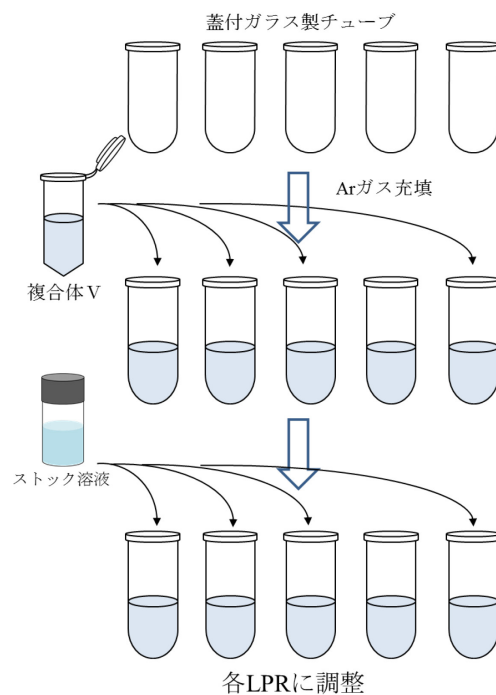


Figure 35. 調整法②の概略図

### 方法③

容量 500  $\mu\text{l}$  のプラスチック製チューブに精製直後の複合体Vを加え、方法②と同様 10 mg/ml に予め調整しておいた脂質ストックから脂質を各 LPR になるように加え脂質/酵素/界面活性剤の 3 者複合溶液を作製した。作製後氷中でインキュベーションを行い透析ボタンに充填した。電子顕微鏡を用いて観察したところ、部分的ではあるが酵素配列のあるベシクル状の再構成膜がみられた。しかしながら、大部分が酵素配列のない再構成膜であった。方法②と同様に、先に酵素を加え後から脂質を加え各 LPR に調整するこの方法で用いる容量 500  $\mu\text{l}$  のプラスチック製チューブは先が細くなっておりハンドリングが方法②より難しく均一に脂質と酵素が混合しなかったためと考えられる。

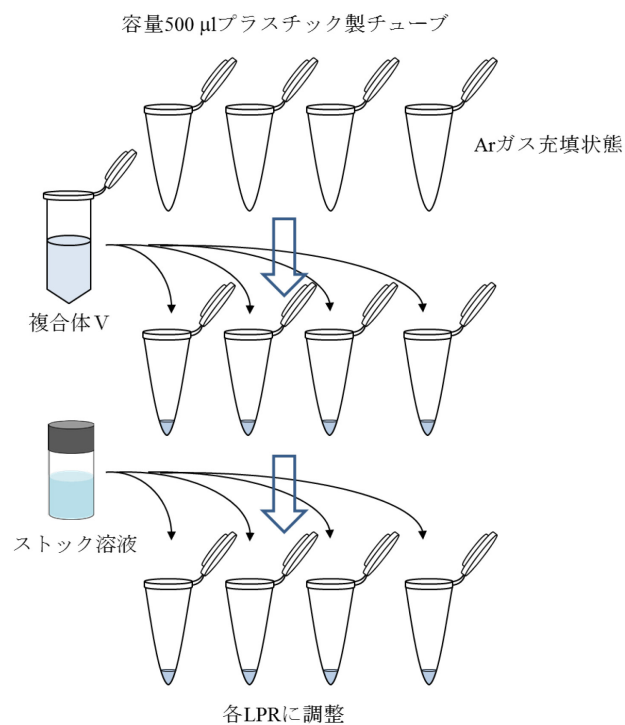


Figure 36. 調整法③の概略図

#### 方法④

方法①と比較的似ているが、この方法④に於いて3者複合溶液形成に用いるチューブはプラスチック製2 ml チューブである。チューブにまず複合体Vを入れそこに脂質を加える。このように3者複合溶液を形成した後、低温室に配置した下記の振盪台に固定し回転速度40 rpmで振盪させインキュベーションを行った。その後、各LPRになるように調整し透析ボタンに充填した。この方法は、方法①から③までの問題をすべて解決することができる方法として考案した。最大LPRと最小LPRを扱うことによるハンドリングの容易さと振盪による均一な3者複合溶液の作製がこの方法の特徴である。得られた結晶はいずれもシート状でありそれぞれに酵素配列が見られた。しかし、酵素配列がパッチ状となっているなど新たに問題点も見つかる結果となった。

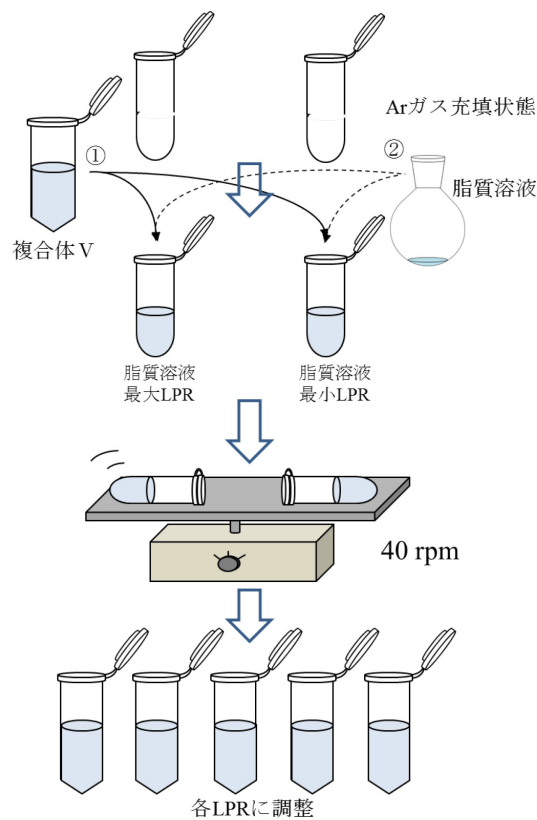


Figure 37. 調整法④の概略図

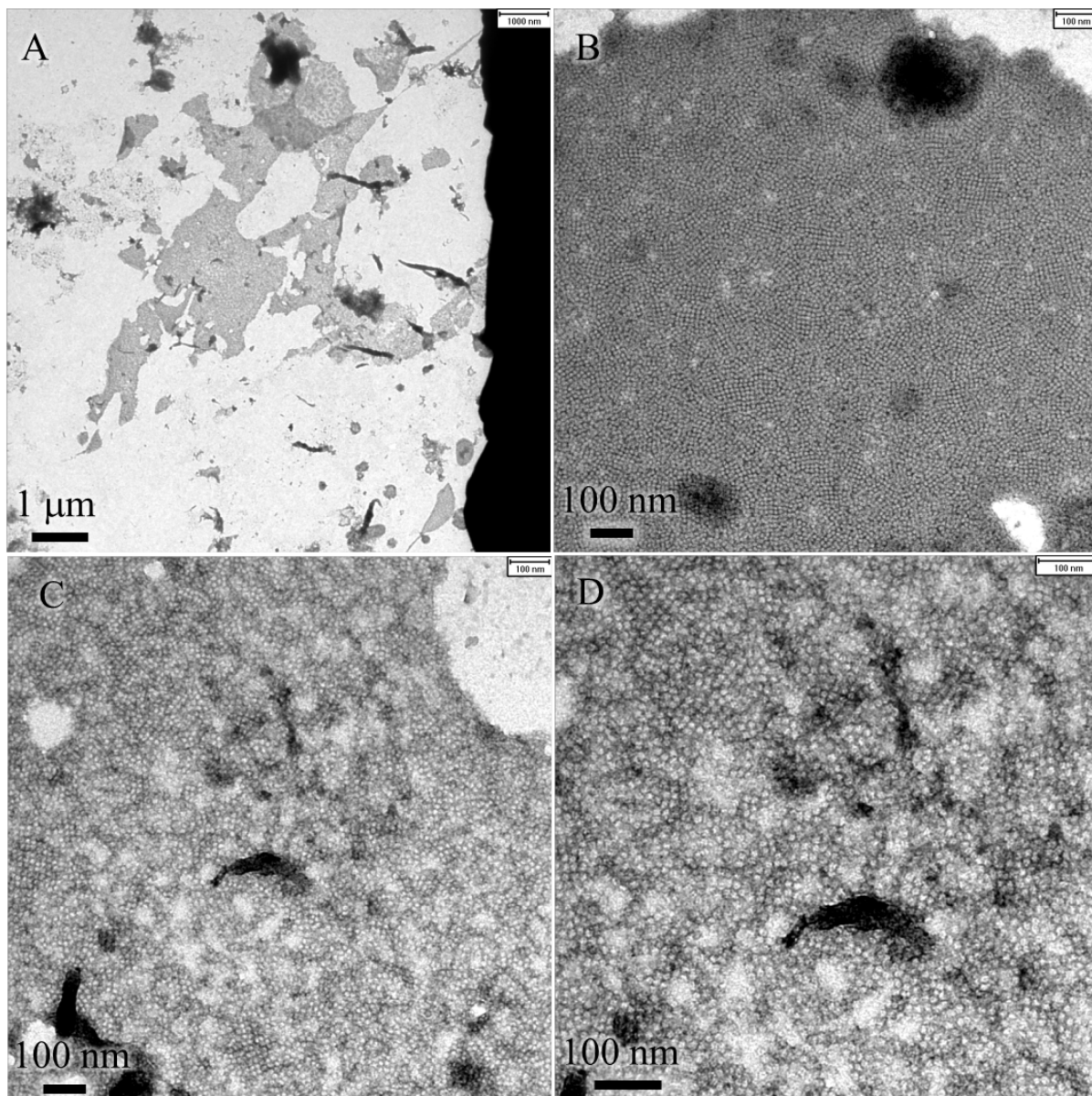


Figure 38. 調整法①による結晶化結果

精製番号:AA120、121

酵素濃度:13.7 mg/ml、酵素活性: 0.57  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 88.1 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、12 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA



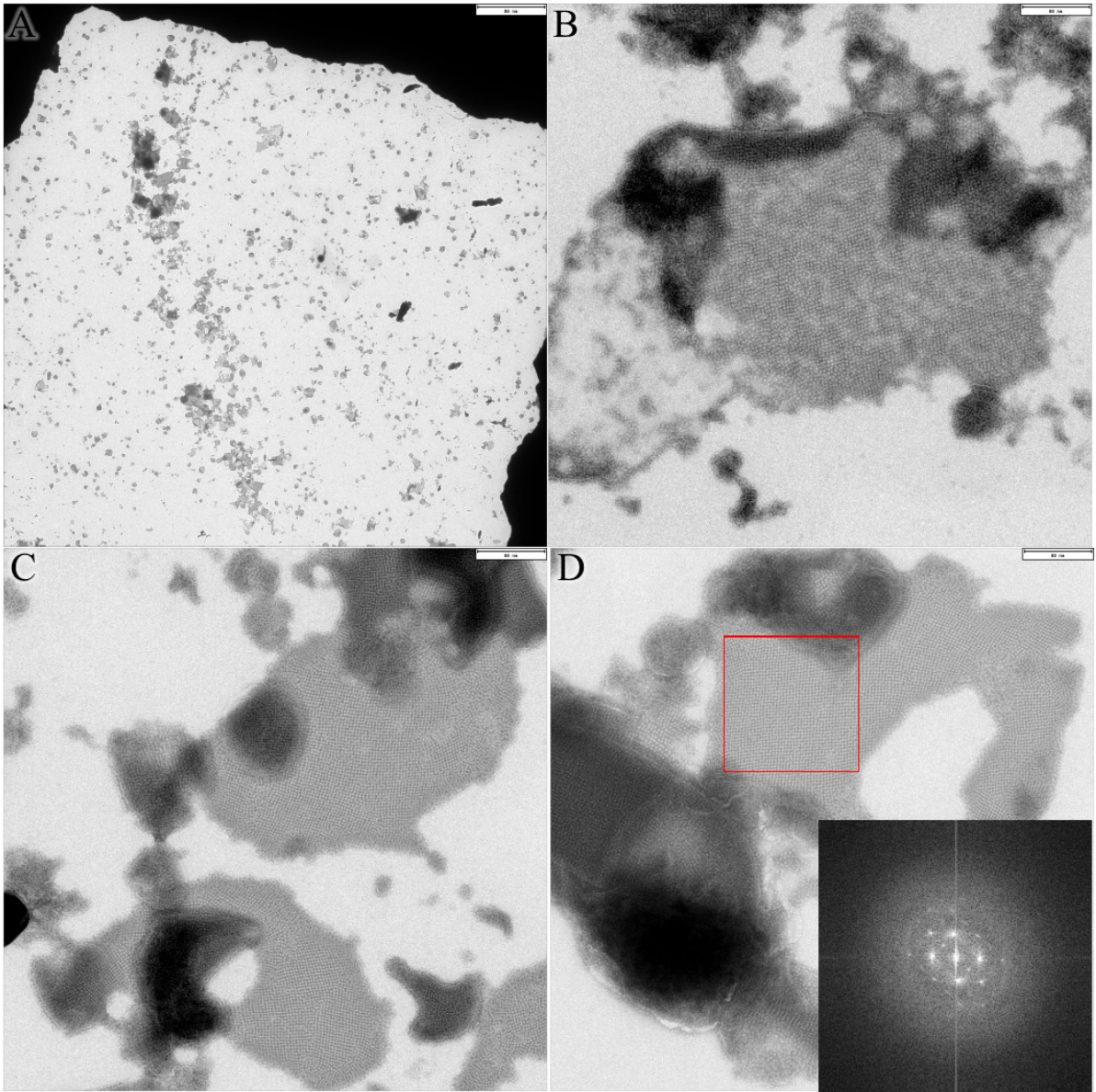


Figure 39. 調整法②による結晶化結果

精製番号:AA120、121

酵素濃度:13.7 mg/ml、酵素活性: 0.57  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 88.1 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、12 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA



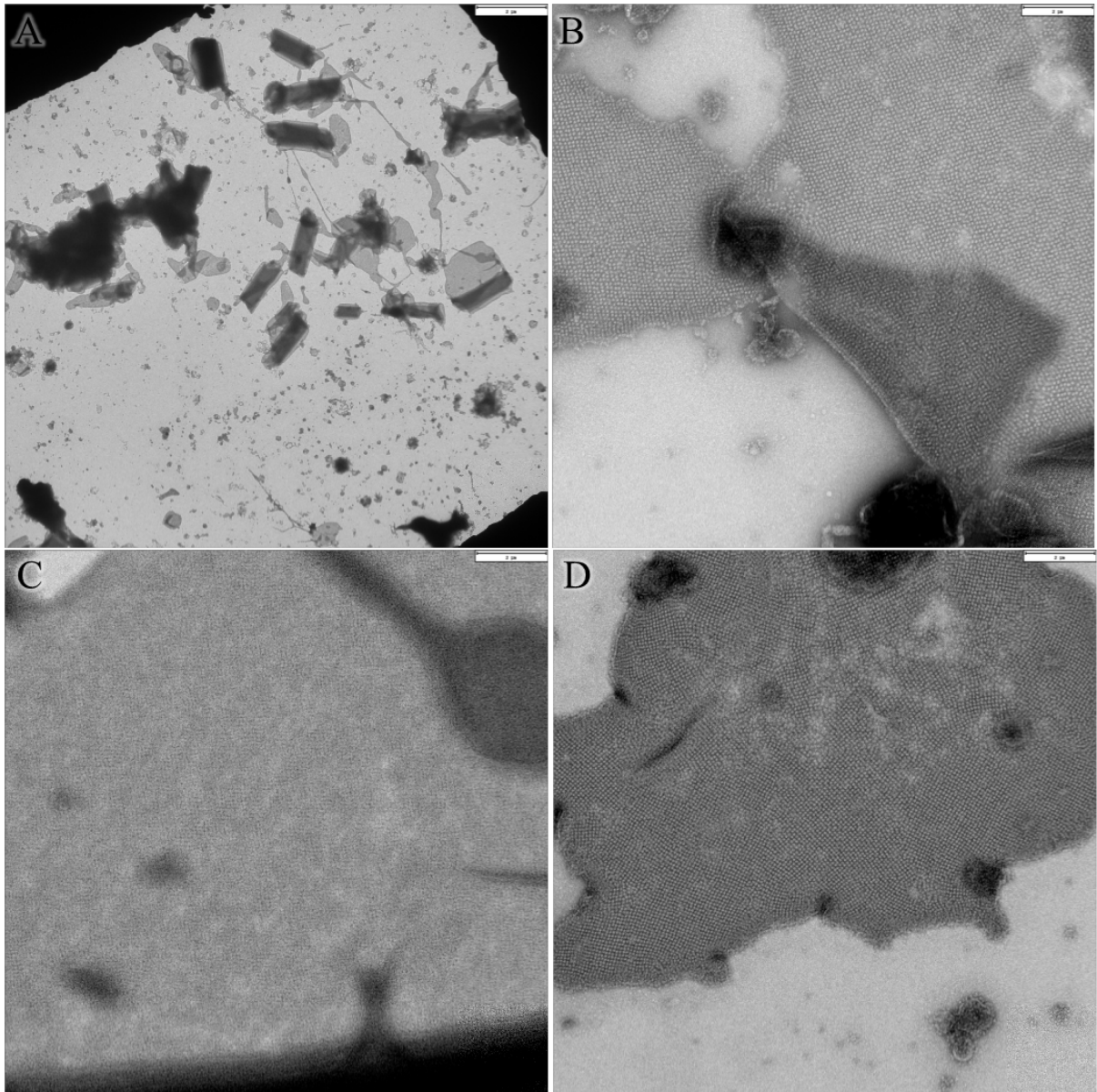


Figure 40. 調整法③による結晶化結果

精製番号:AA120、121

酵素濃度:13.7 mg/ml、酵素活性: 0.57  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 88.1 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、12 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

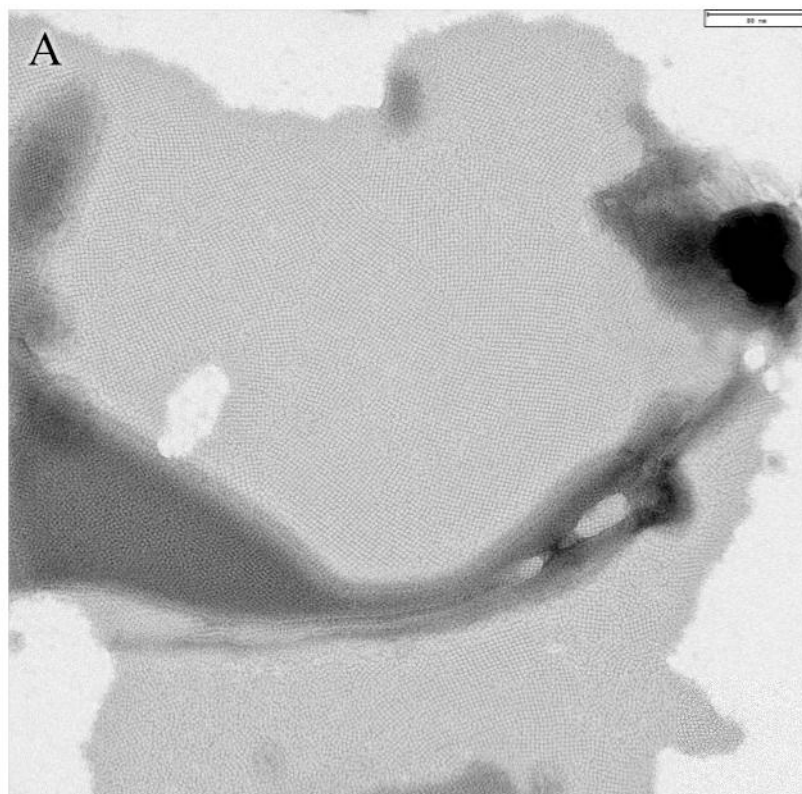


Figure 41. 調整法④による結晶化結果

精製番号:AA120、121

酵素濃度:13.7 mg/ml、酵素活性: 0.57  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 88.1 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、12 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

### 3-4-4. インキュベーション時間の検討

酵素/脂質/界面活性剤からなる3者複合体は混合後一定時間静置される必要がある。これは、形成される再構成膜の大きさや頻度に大きく影響する為である。酵素は脂質膜中に組み込まれることにより安定となる。3者複合溶液形成後は速やかに界面活性剤を除くことが良いと考えられるが、一定時間インキュベートすることによって結晶の大きさ、頻度が格段に上昇する。そこで、最も適切なインキュベーション時間を検討した。検討したインキュベート時間は2 hと12 hである。インキュベーションはいずれも低温室で行った。両者の再構成膜の電顕写真を記載するが、2 h インキュベーションを行った場合、再構成膜中に酵素配列が認められ、更に、部分的ではあるが高い結晶性を持っていることがわかる。対して、12 h インキュベーションを行った場合、大部分の再構成膜中で酵素配列は見られず、結晶頻度、結晶性の低下を招くことが明らかとなった。結果として適しているインキュベート時間は2 h であると考えられることがわかった。

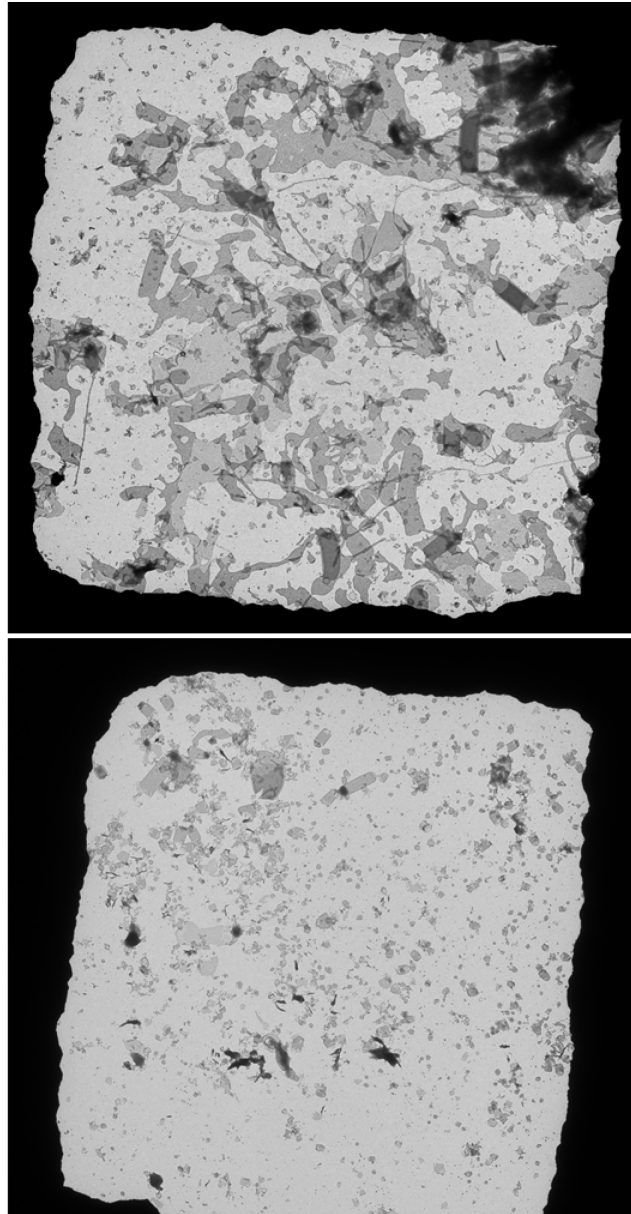


Figure 42. 3 者複合溶液のインキュベーション時間  
(上): 2 時間インキュベーション、(下):12 時間インキュベート  
精製番号:AA116

酵素濃度:11.5 mg/ml、酵素活性: 0.62  $\mu$ moles/min/mg、阻害率: 95.0 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $MgCl_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、  
0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

### 3-4-5. 結晶化用透析ボタンの検討

3者複合溶液形成後2 h インキュベーションすることが適していると先の検討で明らかとなった。インキュベーションを終えた3者複合溶液は速やかに透析ボタンに充填され透析によって界面活性剤が除去される。しかし、透析ボタンの容量や穴の径によって界面活性剤の除去速度が大きく異なる。一般的に2次元結晶形成において最初は速やかに界面活性剤を除去することによって酵素を安定な脂質膜中に組み込み、その後透析速度を遅くし結晶の成長を促す方法が用いられる。つまり、透析ボタンのサイズは結晶形成や結晶成長に大きく寄与するといえる。そこで、2種類の透析ボタンを用意し、両者を比較することとした。比較対象のボタンはハンプトン社製内径5 mm、深さ2.45 mm、表面積78.6 mm<sup>2</sup> と安田商店製内径4 mm、深さ4 mm、表面積50.2 mm<sup>2</sup> のいずれも容量50 µl ボタンである。このボタンに3者複合溶液を75 µl 入れ、透析膜をかぶせOリングで透析膜を固定した。Oリングからはみ出した余分な透析膜を切り取り、透析膜が上を向くように透析用緩衝液の入ったガラス製耐熱ビーカーに入れ透析を開始した。電子顕微鏡を用いて観察したところ両者に大きな差は見られなかったが、頻度、再構成膜の大きさから安田商店が複合体Vの2次元結晶化に適していると考えられる。両者の容量は同じであるがハンプトン社製ボタンと比較して安田商店製ボタンは内径が小さいことにより界面活性剤除去が遅く、それにより再構成膜が大きく成長したと考えられる。しかし、再構成膜中にみられる酵素配列は極めて強いパッチ状となっており、結晶成長が様々な方向より進行したと考えられる。このように結晶成長が様々な方向より進行する理由として結晶形成速度が最適速度から逸脱している可能性が考えられる。

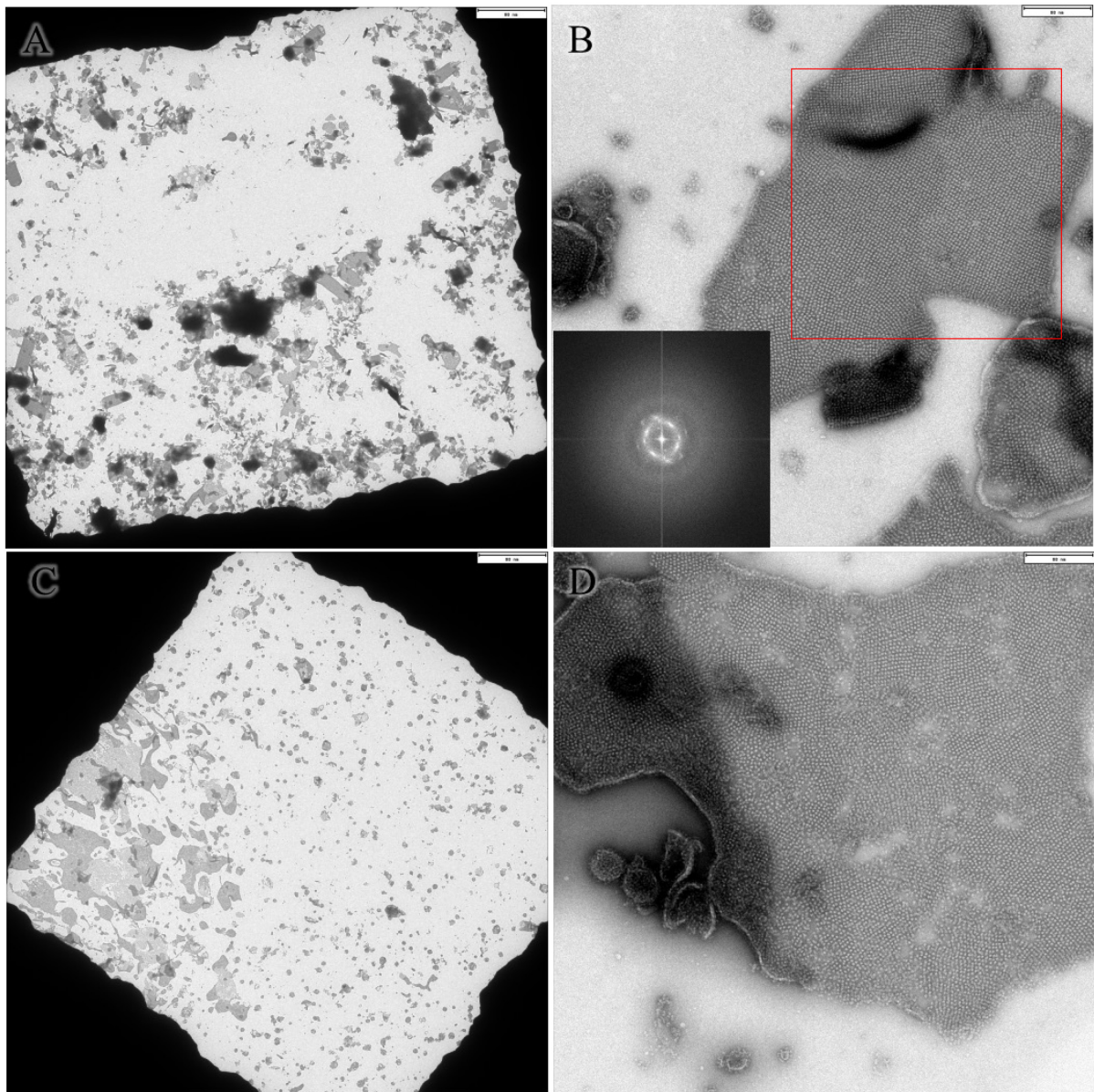


Figure 43. 透析ボタンスクリーニング

(A) ハンプトン社製透析ボタン、低倍率(B):ハンプトン社製透析ボタン、高倍率

(C)安田商店製透析ボタン、低倍率(D):安田商店製透析ボタン、高倍率

精製番号:AA120

酵素濃度:13.7 mg/ml、

酵素活性: 0.57  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 88.1 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、2 時間インキュベーション、

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA



### 3-4-6. 透析外液の金属イオン組成

一般的に2次元結晶は透析によって界面活性剤を除去することで作られる。複合体Vの2次元結晶化に用いる透析緩衝液は40 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.2)が適していることが過去の実験結果より明らかとなっている。しかし、緩衝液中に添加する金属イオンの最適濃度を決定するに至っていない。透析外液に添加する金属イオンは結晶の形態に大きく影響を及ぼしアクアポリン1 (AQP1)の場合、10 mM Mg<sup>2+</sup>添加でベシクル状結晶が形成され、20 mM Mg<sup>2+</sup>添加で一部ベシクルが開裂しシート状結晶となる。更に濃度を上げ50 mM Mg<sup>2+</sup>添加ですべてのベシクルが開裂しシート状結晶となる (Walz et al., 1994b)。このように金属イオン濃度に依存し結晶形態が大きく変化することが報告されている。そこで、複合体Vの結晶化に於いて最適となる金属イオン濃度を決定することとした。過去の文献に鑑みて、最も使用されている2価金属塩である塩化マグネシウムと次に使用されている塩化カルシウムを選択した。そして同時に加える1価金属イオンとして塩化ナトリウム、塩化カリウムを選択した。下記の表に記す通り濃度を振り分けスクリーニングを行ったところ、5 mM Mg<sup>2+</sup>、100 mM NaClを含む40 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5)に対して透析を行うと小さいながら結晶が得られた。この透析緩衝液に対して透析して得られた結晶の形態はすべてベシクル状であった。ベシクル状結晶の場合今後結晶化条件次第で大きく成長する可能性が残っている。対してシート状結晶の場合、現状より大きく成長させることが難しい。そこで、2次元結晶化スクリーニングの初期段階はシート状よりむしろベシクル状を選択する方が今後発展していく可能性が高いと考えられる。

Table 15. 金属イオンスクリーニング

(mM)	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8
Mg <sup>2+</sup>	10	5	10	10	5	10	5	5
Ca <sup>2+</sup>	-	-	-	-	-	-	5	5
K <sup>+</sup>	50	100	100	-	-	-	-	50
Na <sup>+</sup>	-	-	-	50	100	100	-	50
結晶形成	×	△	×	×	○	×	×	×

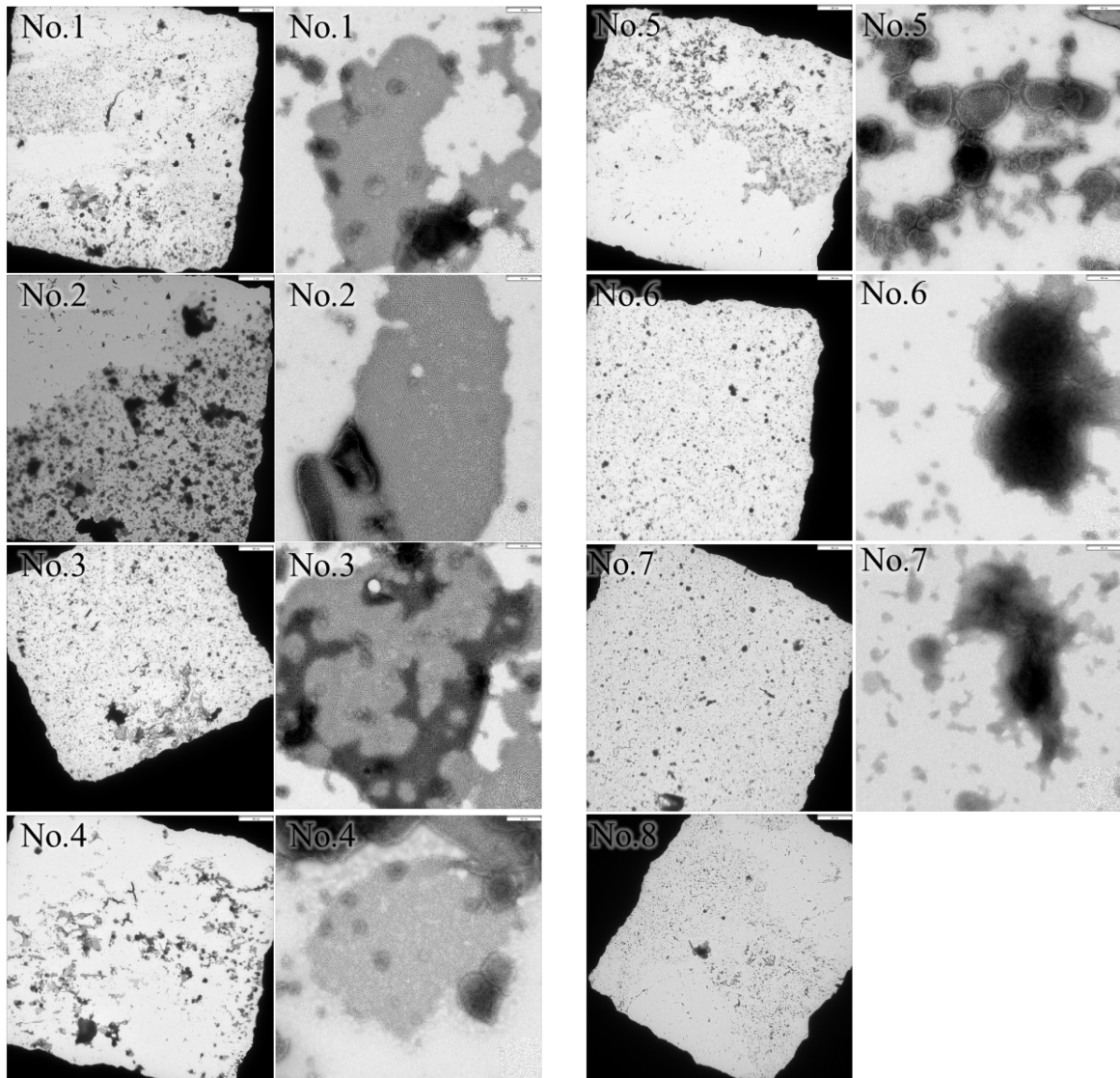


Figure 44. 金属イオンスクリーニング結果

精製番号:AA122

酵素濃度:15.2 mg/ml、

酵素活性: 0.58  $\mu$ moles/min/mg、阻害率: 93.9 %

脂質 DMPC、透析温度 27°C、2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 上記表参照



### 3-4-7. 結晶化に用いる画分の選択

複合体Vの精製法についての仔細は第2章に記したとおりである。複合体Vは1100 gの心筋からおよそ150 mg前後精製することが出来る。しかし、このすべてで結晶が形成されるようなことはなく、結晶化に適した酵素標品はこの150 mgにおける極一部である。その為、最も適した複合体Vを含んだ画分を選択する必要がある。選択することが可能となるのがイオン交換カラムクロマト後であるが、どの部分に於いて結晶が形成されるかを結晶化し見極める必要がある。下にカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを示す。赤の部分画分1、青の部分画分2、黄の部分画分3としてそれぞれ結晶化し評価した。それぞれの画分の含有リン量に大きさ差があることは既にわかっており、前方の画分ほど含有リン量が多い傾向にある。ここでの含有リン量は単純にリン脂質量を表している。2次元結晶は脂質膜中に組み込む為、結晶形成の成否はこのリン脂質量に大きく左右される。結晶性の良い2次元結晶を作製する為に極力取り除きたい、しかしながら、構造の一部として組み込まれている脂質も存在していることから取り除くことによって酵素の変性を招く恐れがある。そこで、結晶化に適した量を保持した酵素を見極めることが重要であると考えこのスクリーニングを行う。それぞれを結晶化したところ、すべての画分で結晶の形成が見られた。しかし、頻度や大きさを考慮すると画分2が適していると考えられる。

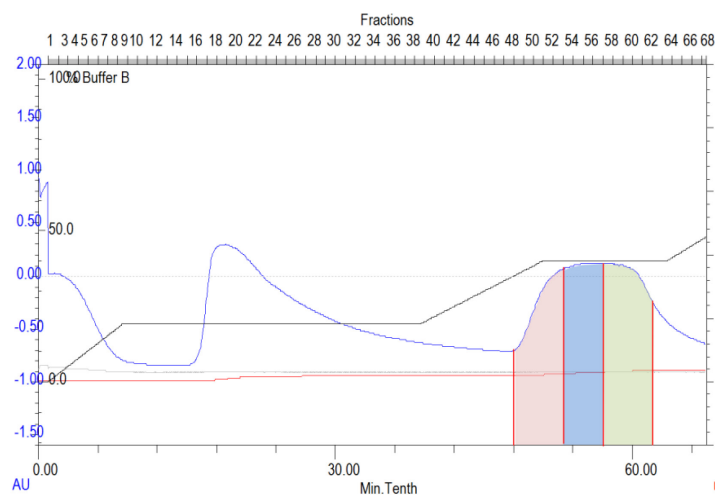


Figure 45. Poros-20HQ カラムクロマトグラフ(AA100)

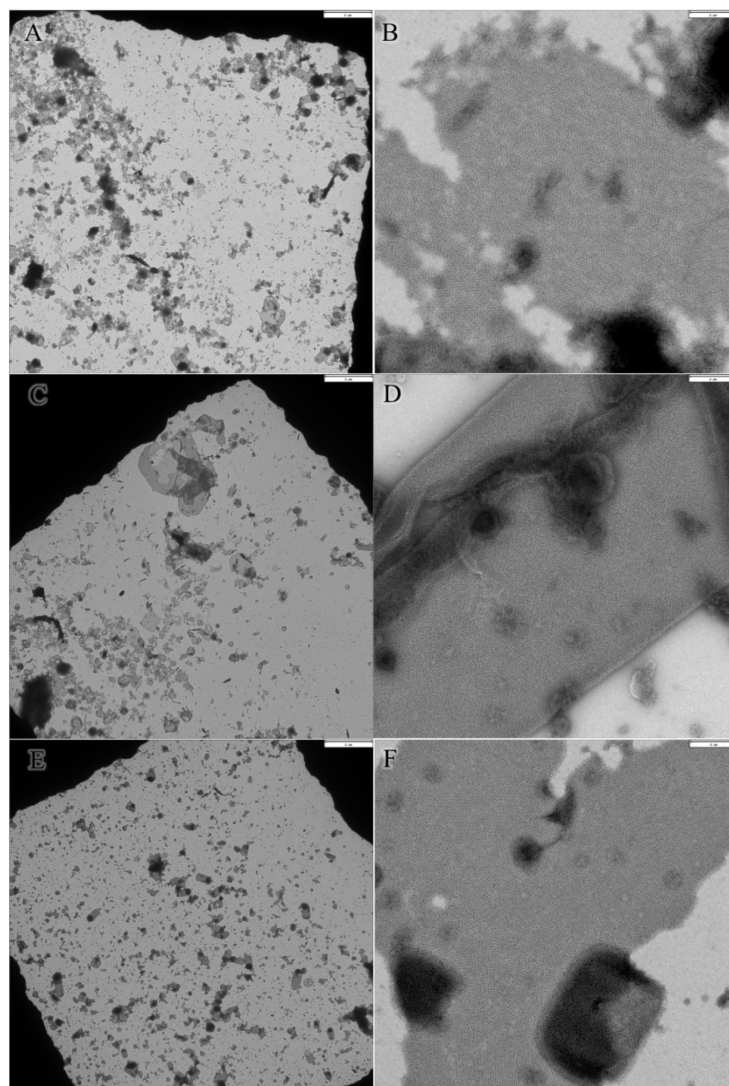


Figure 46. 結晶化画分の選択

精製番号:AA118

上 (画分番号:48-50) 酵素濃度:12.5 mg/ml、酵素活性: 0.91  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 97.9 %  
 中 (画分番号 51-54) 酵素濃度: 24.6 mg/ml、酵素活性: 0.89  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 94.9 %  
 下 (画分番号 55-59) 酵素濃度:13.3 mg/ml、酵素活性: 0.92  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 95.4 %  
 脂質 DMPC、透析温度 27 °C、2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用  
 透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、  
 0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

### 3-4-8. CL の添加効果

複合体Vが保持するリン脂質組成を測定したところ多くの CL が含まれていることが判明した。CL はミトコンドリア内膜のみで見られる特徴的な脂質であり、多くの酵素の機能維持に関わっていることが報告されている(Acehan et al., 2011)。更には、複合体Vがミトコンドリア内膜クリステの形成に関与しているのと同様に、CL もクリステ形成に関与しているなど CL の機能は多岐にわたる。複合体Vの精製に於いても、CL を外部より添加し補うことで酵素活性を大幅に上昇させることが可能である。添加はカラムより複合体Vが溶出し結晶化に用いる画分を回収し濃度測定後とした。添加による結晶への影響も大きく、過剰に加えた場合平面膜の結晶は一切形成されず、すべてベシクル状の結晶となることが過去の実験より明らかとなっている。

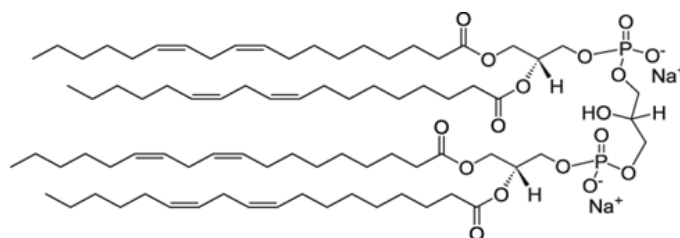


Figure 47. ウシカルジオリピンの構造式

Table 16. カルジオリピン添加数による酵素活性、阻害率、含有リンの個数の変化

添加量 moles/ATPase	比活性 μmoles/min/mg	阻害率 %	リンの個数 moles/ATPase
0	0.319	82.1	59
4	0.490	92.3	67
8	0.845	96.7	64
24	0.400	92.3	-

それぞれの複合体Vを結晶化したところ、CLを一切添加しなかった標品に比べて 4 moles/ATPase 添加した際に結晶性の向上が見られた。しかし、8 moles/ATPase 添加で逆に結晶性が低下する結果となった。24 moles/ATPase は過剰量であるためか平面膜は一切見られず、すべて小さいベシクル状結晶となった。

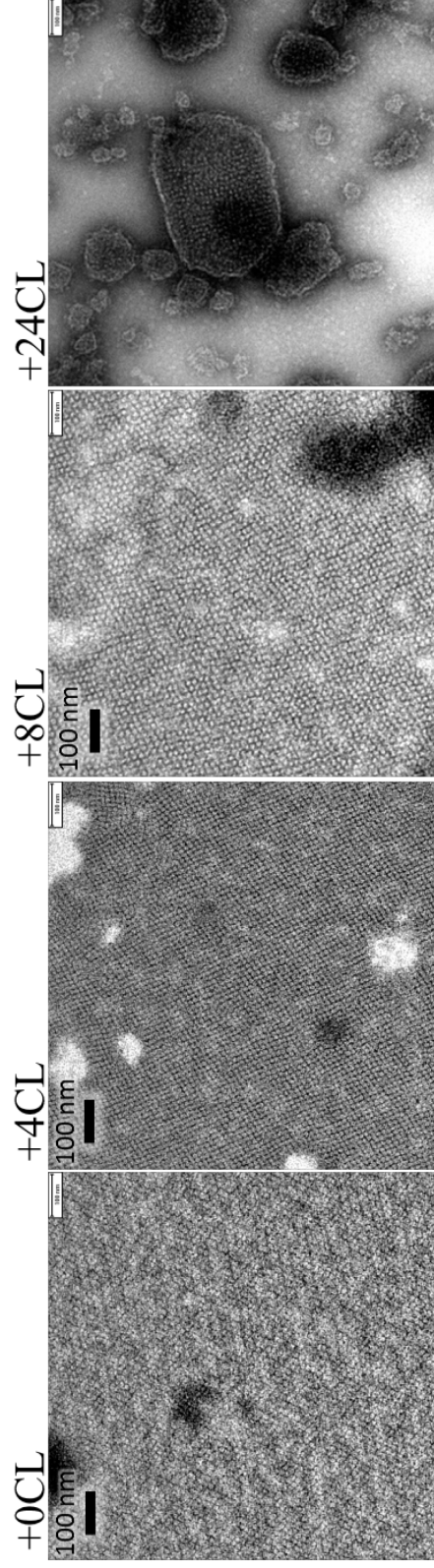


Figure 48. CL 添加による結晶化への影響

精製番号:AA133、AA137

+0CL: 酵素濃度: 10.7 mg/ml、酵素活性: 0.32  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 82.1 %

+4CL: 酵素濃度: 11.3 mg/ml、酵素活性: 0.49  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 92.3 %

+8CL: 酵素濃度: 11.0 mg/ml、酵素活性: 0.85  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 96.7 %

+24CL: 山本麻未卒論参照

脂質 DMPC、透析温度 27°C、2 時間 インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

### 3-4-9. シート状結晶の形成

CL 添加によって複合体Vの安定性が向上したことにより結晶の頻度が上がり結晶性も向上した。しかし、結晶が安定したことによってベシクル状結晶の頻度が格段に増え、目的とするシート状結晶が形成されにくくなった。これは、シート状結晶の形成が結晶形成過程に於いて最後の段階で起こる為である。2次元結晶は、酵素が脂質膜中に組み込まれた後、酵素が規則的に配列したベシクル状結晶をまず形成する。その後ベシクル状結晶が成長し徐々に大きくなり、最後に自身の重さに耐えることが出来なくなったベシクル状結晶が開裂しシート状結晶となるわけだが、安定性が向上したために巨大なベシクル状結晶が開裂せずに残ってしまう結果となった。構造解析を行う上で、2次元結晶の重層は極力避けたい。その為狙うべきは、単層のシート状結晶である。そこで、シート状結晶を作製するべく様々な方法を検討することとした。

#### (i) 透析温度の検討

複合体Vの2次元結晶は27℃に設定されたインキュベーター内で1週間かけて形成される。この間に結晶に与えられる熱エネルギーの総和は莫大な量と考えられる。透析温度が1℃変化することで与えられる熱エネルギーは大きく変化し、それにより結晶性の向上や、もしくは酵素の変性が起こると考えられる。そこで、結晶化温度を変化させることで得られる結晶の形態が変わると予想し検討した。先ず、結晶化温度を27℃一定に加えて28.5、32℃一定の3種用意しそれぞれ比較検討した。

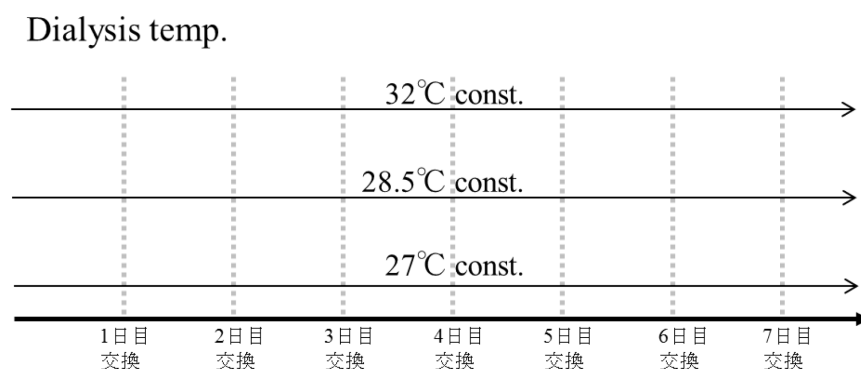


Figure 49. 結晶化温度スクリーニング

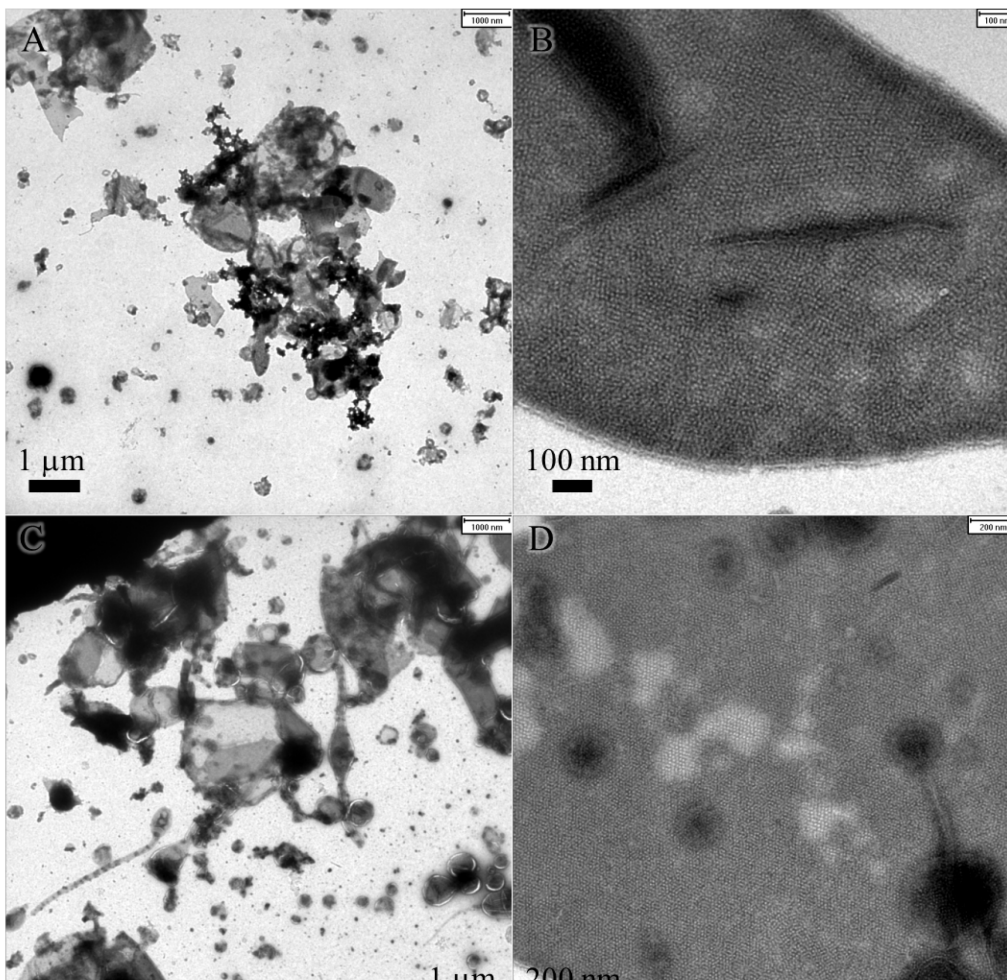


Figure 50. 結晶化温度スクリーニング結果

(A)結晶化温度 27 °C 低倍率

(B)結晶化温度 27 °C 高倍率

(C)結晶化温度 28.5 °C 低倍率

(D)結晶化温度 28.5 °C 高倍率

精製番号:AA129、酵素濃度: 13.27 mg/ml、酵素活性: 0.66  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.6 %

脂質 DMPC、2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

先ず、27 °Cで結晶化すると結晶は形成されるものの全体として小さい印象を受ける。また、全体的に形成された結晶の大部分がベシクル状結晶である。対して32°Cでの結晶化は完全に複合体Vを変性させる結果となった。27 °Cで結晶化すると開始4日目で透析ボタン内が白濁し結晶形を判別することが出来るが、32 °Cでの結晶化の場合、開始2日目でボタン内が白濁した。透析緩衝液量、界面活性剤量から考えて、これは結晶形成によるものではなく複合体Vが変性したことによるものである。28.5 °Cでの結晶化すると、27 °Cでの結果と比べて明らかに得られる結晶が大きく成長したことがわかる。また、酵素配列の未だ改善すべき点はあるもののこれまでの結果と比較してみても格段に良くなったのがわかる。しかしながら、シート状結晶が得られることはなかった。先の検討より、結晶化温度を変更することにより結晶が大きく成長し、また、結晶性も向上することが示されたが、透析温度によっては、酵素が変性し凝集することも示された。そこで、一定時間透析温度を上げその効果について調べることにした。一般的にヒートアニーリングと呼ばれる方法である。温度は27 °Cを基準として先の検討で良い結果を示した28.5 °Cと更に高い温度である30 °Cと32 °Cである。温度は透析開始後3日目から透析開始後4日目にかけて上昇させることにした。アニーリングを行うことに対して注意すべき点は、急激に温度を上げるとボタン内に気泡が発生し、少量であれば問題ないが多量に発生した場合界面活性剤の除去ができない。そこで、温度を上昇させる際は、透析ボタンの入った27 °Cのビーカーを異なる温度のインキュベーター内に静置し徐々に昇温した。それにより、透析ボタン内に気泡が発生することを抑制した。それぞれの結果を比較すると、温度を上げることによって明らかに結晶性が改善された。これは、脂質の流動性が上がったことに起因すると考えられる。しかし、透析温度を32 °Cまで上げると酵素が変性し結晶形成が妨げられることがわかった。一連の実験結果より、当初の目的としている大きな平面状結晶を得ることが出来ないことが示された。



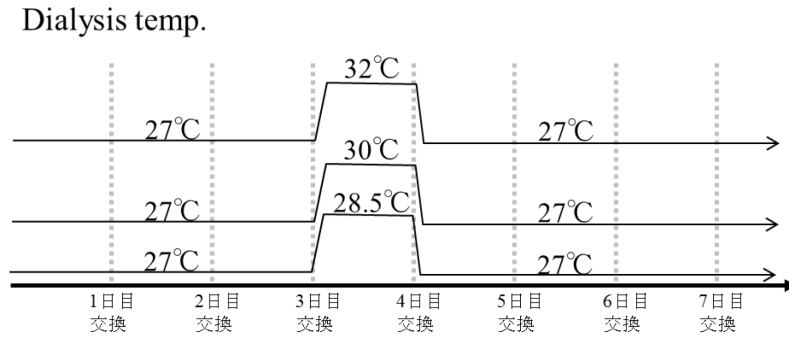


Figure 51. 結晶化温度スクリーニング (annealing)

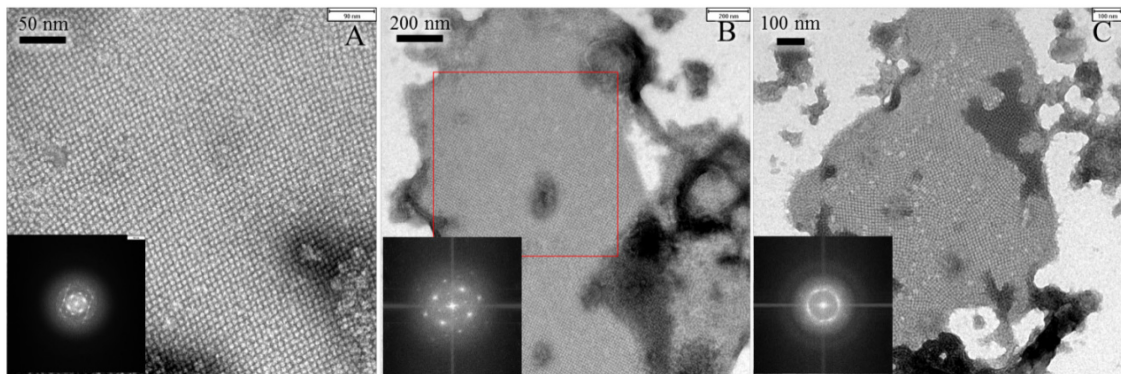


Figure 52. 結晶化温度スクリーニング (annealing)

(A)透析温度 27⇒28.5⇒27 °C

(B)透析温度 27⇒30⇒27 °C

(C)透析温度 27⇒32⇒27 °C

精製番号:AA129、酵素濃度: 13.27 mg/ml、酵素活性: 0.66  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.6 %

脂質 DMPC、2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

(ii) 単鎖脂質の検討

複合体Vの2次元結晶化に於いて平面状結晶が得られない理由として複合体Vの回りに局在している CL が影響していると考えられる。CL は脂質 2 重膜中に在って扇形の構造をしていることが様々な文献により報告されている。このような構造で存在している為、広い面積を持った平面状結晶が得られないと考えられる。そこで、CL と正反対の構造を持つコーンタイプ型脂質であるモノアシルリン脂質 (Lyso PC、Lyso PG)を添加して結晶化を行うこととした。用いる Lyso PC、Lyso PG は両者ともアシル鎖の長さは炭素数 16 である。これにより、広い面積を持った結晶が得られると予測された。先ず、DMPC に対して重量比で 10:1 となるように Lyso PC、Lyso PG を混合し、それぞれの LPR になるように複合体Vを添加しインキュベーションを 4 °C で開始した。

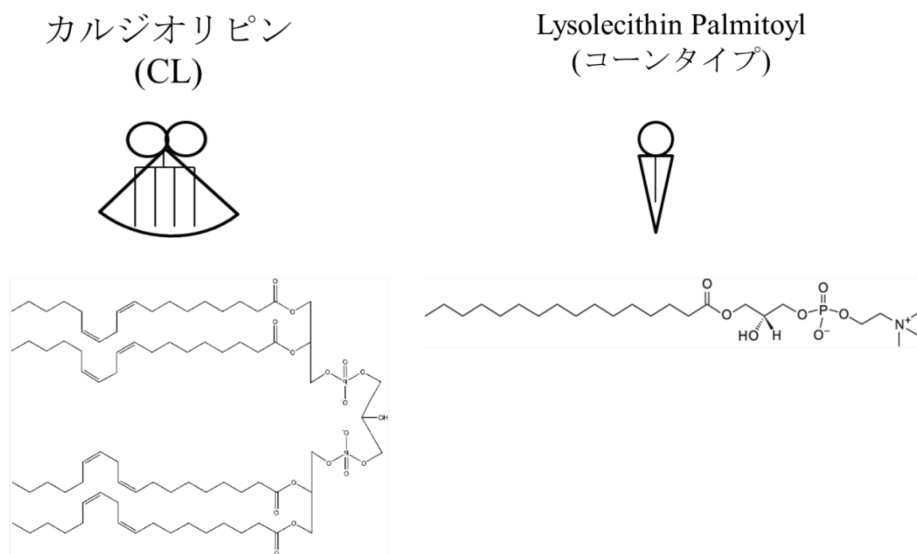


Figure 53. 脂質膜中でのカルジオリピンとモノアシルリン脂質の構造

結晶化後電子顕微鏡を用いて観察したところ、Lyso PG、Lyso PC 両者に於いて広い面積を持った質の高い2次元結晶を高頻度に得られるようになった。しかし、低倍率で撮った電顕写真をみると、Lyso PG を加えた際は、2次元膜にいくつも穴が見らるが、

Lyso PC を加えた際はその穴が一切見られない。その点から Lyso PC を加えた時が Lyso PG を加えた時と比較して明らかに 2 次元膜が丈夫であることがわかる。故に、Lyso PC を DMPC に対して添加した方が適していると判断した。

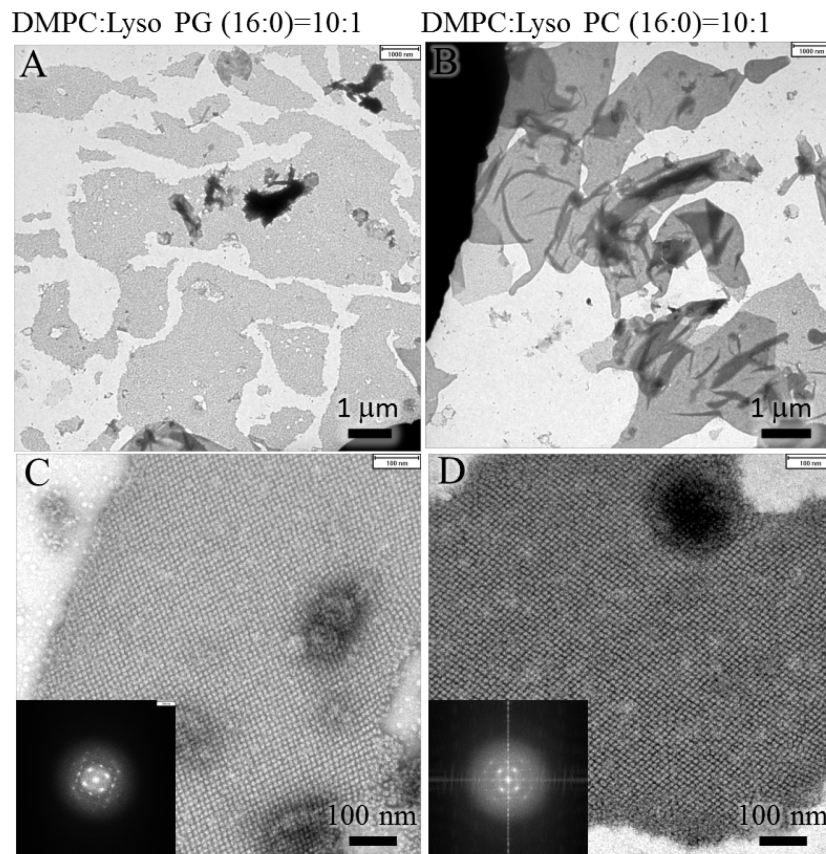


Figure 54. モノアシルリン脂質の添加効果

(A) Lyso PG 添加 低倍率 (B) Lyso PC 添加 低倍率

(C) Lyso PG 添加 高倍率 (D) Lyso PC 添加 高倍率

精製番号: AA129、酵素濃度: 13.27 mg/ml、酵素活性: 0.66  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.6 %

脂質 DMPC:monoacyl lipid=10:1(wt:wt)

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

上記の検討によって Lyso PC を添加する効果は極めて大きいことが示された。そこで、DMPC と Lyso PC の比率をそれぞれ変えて最も適切な割合を求めることとした。DMPC と Lyso PC の混合比率はそれぞれ重量比で、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1 とした。

DMPC:LysoPC= 8:1 (wt:wt)

DMPC:LysoPC= 9:1 (wt:wt)

DMPC:LysoPC=10:1 (wt:wt)

DMPC:LysoPC=11:1 (wt:wt)

DMPC:LysoPC=12:1 (wt:wt)

Figure 55. DMPC と Lyso PC の混合比率スクリーニング

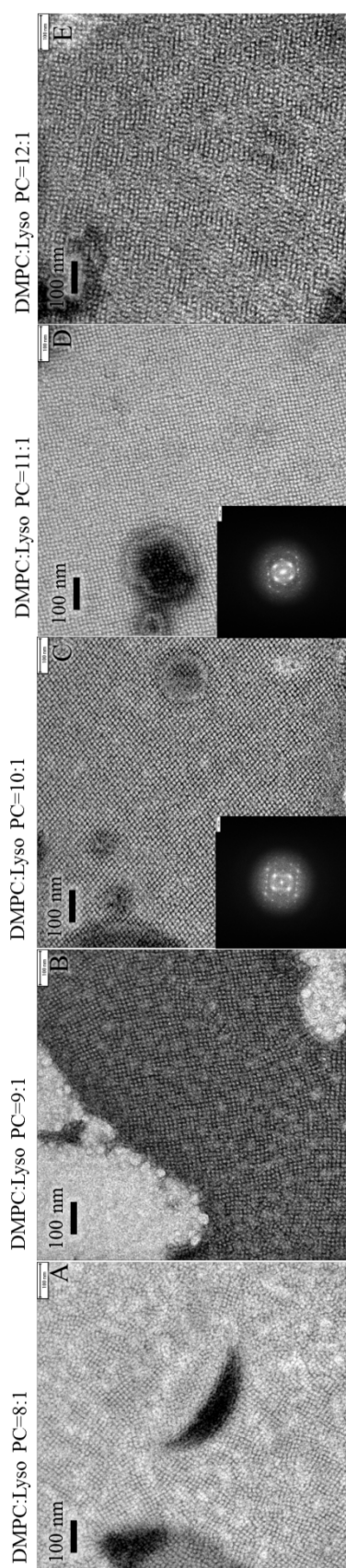


Figure 56. モノアシルリン脂質混合比率検討

(A)DMPC:Lyso PC=8:1 (wt:wt) (B)DMPC:Lyso PC=9:1 (wt:wt)

(C)DMPC:Lyso PC=10:1 (wt:wt) (D)DMPC:Lyso PC=11:1 (wt:wt) (E)DMPC:Lyso PC=12:1 (wt:wt)

精製番号:AA130、AA132 酵素濃度: 15.0 mg/ml、酵素活性: 0.84  $\mu$ moles/min/mg、阻害率: 92.1 %

脂質表参照、2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $MgCl_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

最も Lyso PC の割合の多い 8:1 としたときで、パッチ状の結晶となった。対して、Lyso PC の割合の少ない 12:1 としたときは、結晶性が DMPC のみの時と大きな差は認められなかった。良好な添加効果が認められたのが 10:1、11:1 の時であるが、回折点から判断すると 10:1 の時で結晶性が最も良くなった。故に、混合率は 10:1 が最も適していると考えられる。

先の混合比率を変えた実験結果から DMPC と Lyso PC を重量比で 10:1 となるように混合することによって結晶性の良い 2 次元結晶を得られることが判明した。そこで、Lyso PC のアシル鎖の長さについて検討することとした。以下に示した様々な Lyso PC を DMPC に対して重量比で 10:1 となるように混合し結晶化を行った。このような実験を行う上で、本来ならばモル比で混合することが一般的であると思われるが、今回は重量比で混合することとした。これは最もアシル鎖の短い 14:0 Lyso PC と最もアシル鎖の長い 18:1 Lyso PC で分子量に大きな差がないため重量比で混合したとしてもモル比に差が見られなかったことによるものである。

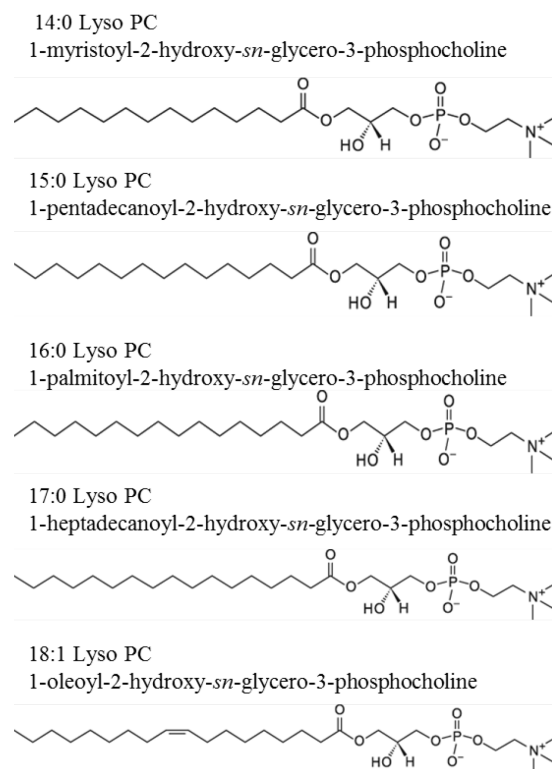


Figure 57. Lyso PC のアシル鎖スクリーニング

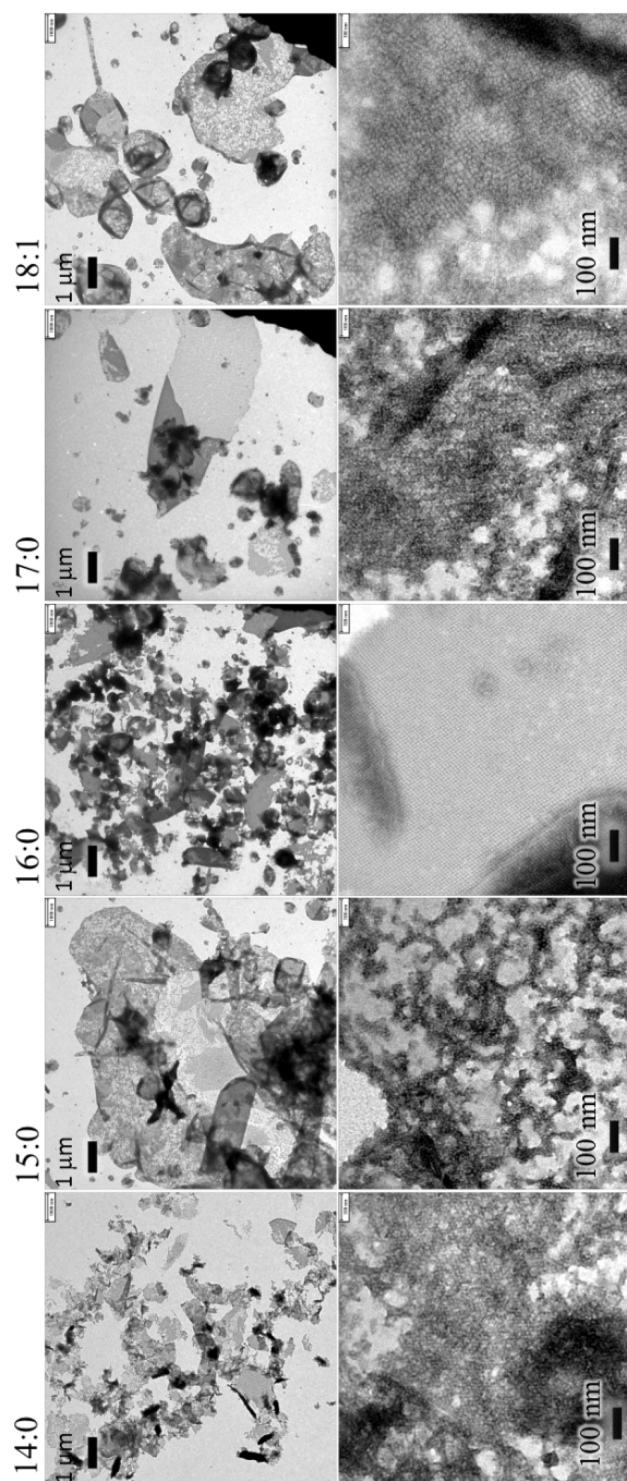


Figure 58. Lyso PC のアシル鎖スクリーニング

左から DMPC:Lyso PC (14:0)=10:1 (wt:wt)、 DMPC:Lyso PC (15:0)=10:1 (wt:wt)、

DMPC:Lyso PC (16:0)=10:1 (wt:wt)、 DMPC:Lyso PC (17:0)=11:1 (wt:wt)、 DMPC:Lyso PC (18:1)=10:1 (wt:wt)

精製番号:AA135 酵素濃度: 11.1 mg/ml、 酵素活性: 0.78  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、 阻害率: 96.2 %

脂質表参照、 2 時間インキュベーション、 安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、 5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、 100 mM NaCl、 0.5 mM ADP、 0.1 mM DTT、 0.2 mM EDTA

それぞれのアシル鎖の長さを持つ Lyso PC を DMPC と混合し結晶化を行ったところ、Lyso PC のアシル鎖が 14:0、15:0、17:0、18:1 の時で、安定した結晶を得られないことがわかった。対して、従来通り 16:0 の Lyso PC を用いることで結晶が得られることが判明した。Lyso PC の添加によって結晶性の良い広い面積を持ったシート状結晶を高頻度に得られた。

### 3-4-10. Lyso PC と透析 度変更の併用

Lyso PC の添加によって結晶性の良いシート状結晶の作製に成功した。そこで、更に結晶性の向上を狙って、結晶性向上に効果のあった透析温度について再度検討することとした。先ず、DMPC と Lyso PC (16:0)を重量比 10:1 となるように混合し、DMPC のみの時に結晶性向上効果があった 28.5°C で透析を行い結晶化した。

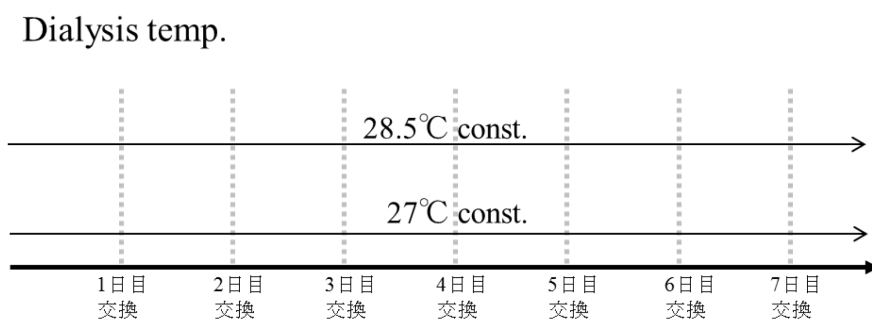


Figure 59. 結晶化温度スクリーニング



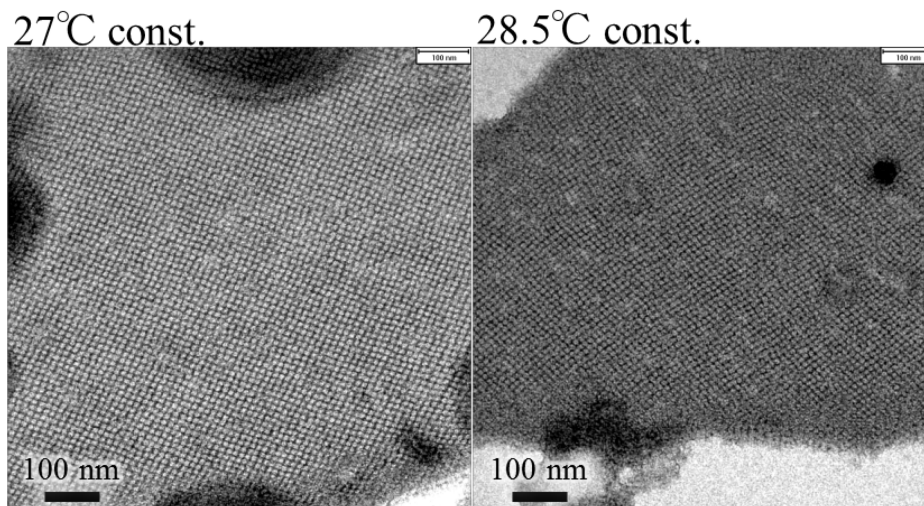


Figure 60. Lyso PC と透析温度変更の併用

(左)DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1 (wt:wt) 透析温度 27°C

(右)DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1 (wt:wt) 透析温度 28.5°C

精製番号:AA129、酵素濃度: 13.27 mg/ml、

酵素活性: 0.66  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.6 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

その結果、27 °C、28.5 °C両者に於いて結晶性の差は認められなかった。これは、Lyso PC の添加効果が温度条件の変化以上にあることを示している。次に、ヒートアニーリングを行った。アニーリング条件は以下の通りとした。

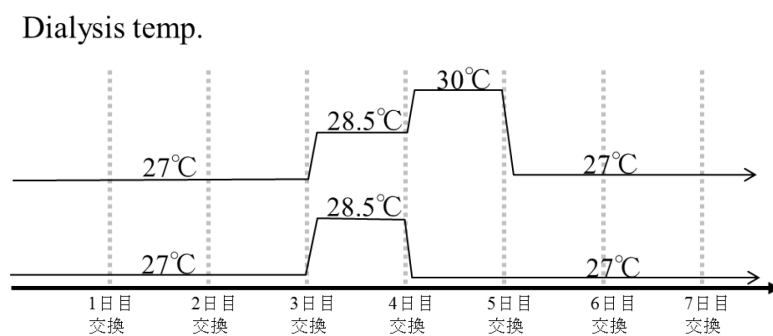


Figure 61. 結晶化温度スクリーニング (annealing)

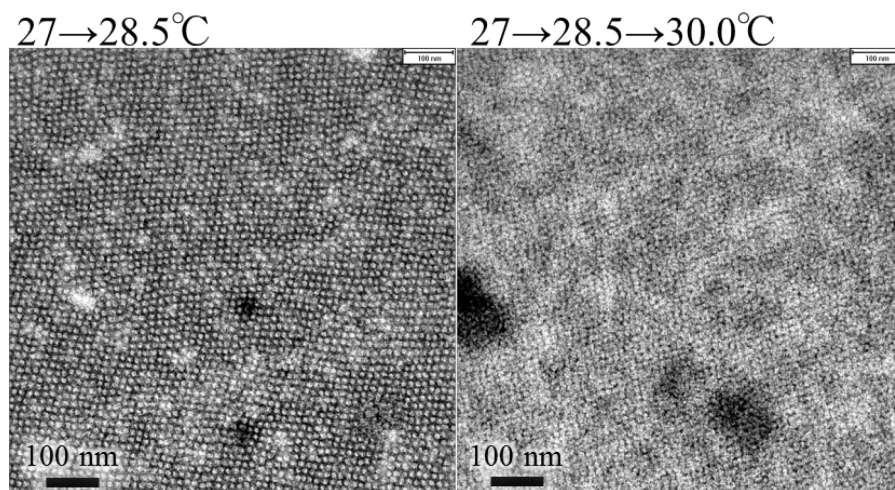


Figure 62. Lyso PC と透析温度変更の併用 (annealing)

(左)透析温度 27⇒28.5⇒27°C

(右)透析温度 27⇒28.5⇒30⇒27°C

精製番号:AA129、AA130 酵素濃度: 13.27 mg/ml、

酵素活性: 0.66  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.6 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

どちらのアニーリング条件に於いても結晶性が悪くなる結果となった。よって、Lyso PC と透析温度変化の併用による結晶性向上は望まれないと判断した。DMPC のみを用いた時では、結晶性向上が認められたが、今回の結果はそれと相反する結果となった。上記から透析温度を上げたとしても結晶性向上が望まれない為、透析温度を下げ、従来通りの 27 °C とそこから 1 °C 下げた 26 °C で結晶化し両者を比較した。

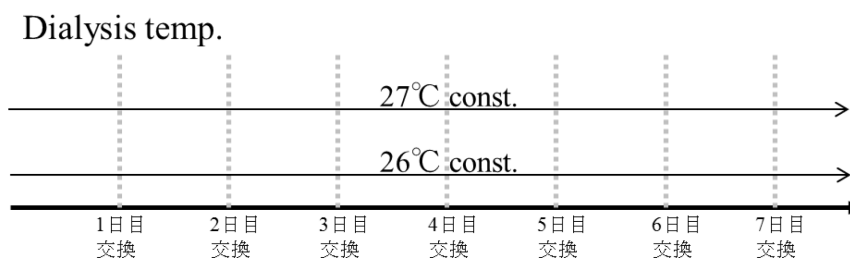


Figure 63. 結晶化温度スクリーニング (27 °C、26 °C)

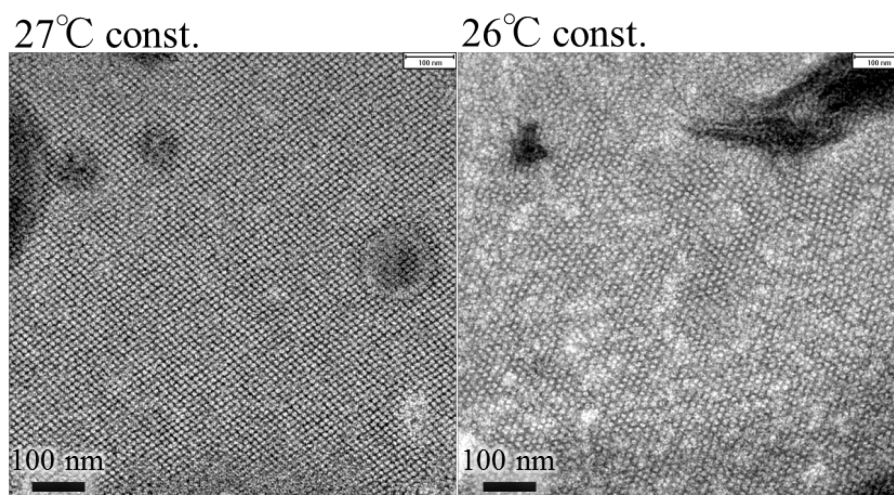


Figure 64. Lyso PC と透析温度変更の併用 (27°C、26°C)

(左)透析温度 27°C

(右)透析温度 26°C

精製番号: AA130 酵素濃度: 14.5 mg/ml、

酵素活性: 0.84  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 92.1 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

両者を比較したところ、結晶性に大きな差が認められた。明らかに 26 °Cでの結晶化が適していないことがわかる結果となった。これは、結晶化に使用している DMPC と Lyso PC の複合脂質の流動性が 26 °Cで低いため結晶形成が妨げられたと考えられる。

### 3-4-11. Lyso PC (16:0)添加に於ける再現性

DMPC に対して Lyso PC (16:0)を重量比で 10:1 となるように調整した複合脂質を用いる事で結晶性の優れた 2 次元結晶を得られることが明らかとなった。得られた 2 次元結晶はいずれも構造解析データ収集に必要な広い面積を有しており頻度も問題なかった。再現性についての結果を下に示す。

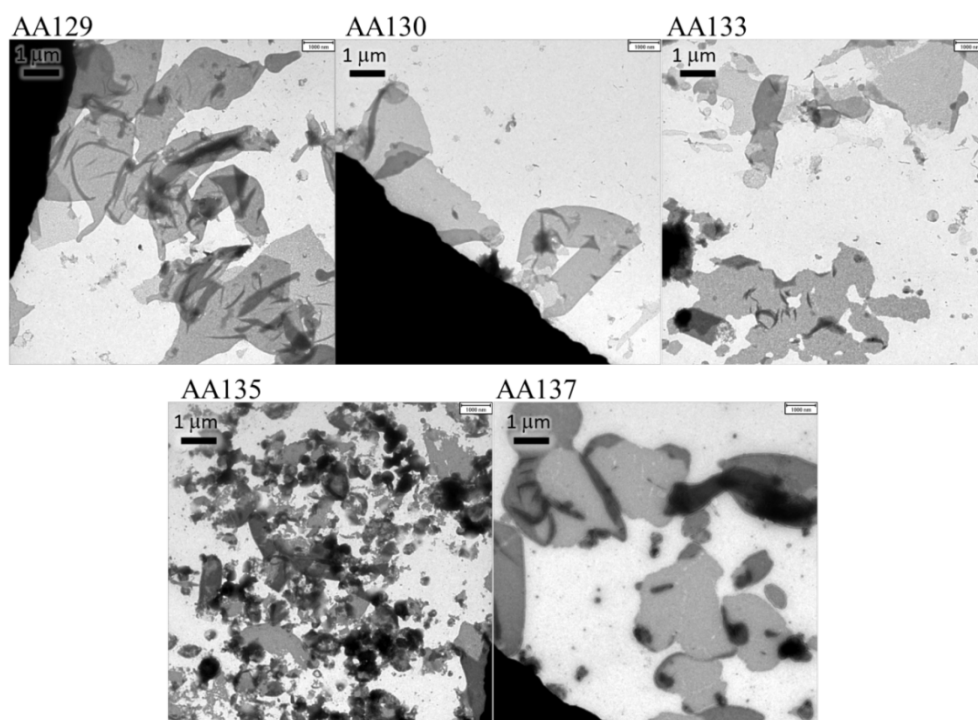


Figure 65. DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1 (wt:wt)を用いた結晶化再現性実験

精製番号: AA129、AA130、AA133、AA135、AA137

酵素濃度: 13.3 mg/ml、

酵素活性: 0.66  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.6 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

### 3-4-12. 複合体Vの2次元結晶と改善点

これまでに記した条件で結晶化を行うことで、下に示すような結晶性の良い2次元結晶が高頻度に得られることがわかった。得られた結晶は、金属染色液を施して電顕観察した際の最高分解能である20Å分解能の回折点が鮮明に表れている。つまり、実際の分解能としては更に高く、構造解析を行うに足る結晶であることを示している。得られた結晶の回折点から考えて螺旋軸を有している。これは、回折点の消滅則から考えられる。このように高い結晶性を有している2次元結晶に於いても改善するべき点が認められる。これによりこの条件から得られた結晶での構造解析データ収集がなされていない。その改善点とは、脂質膜中からのF<sub>1</sub>の脱離である。脂質膜中からF<sub>1</sub>が脱理した箇所の電顕写真を示す。左部では、複合体Vが規則的に配列していることがわかる。しかし、中央部では完全に酵素配列を見ることは出来ない。恐らく脂質膜中で、F<sub>0</sub>は規則的に配列していると考えられる。

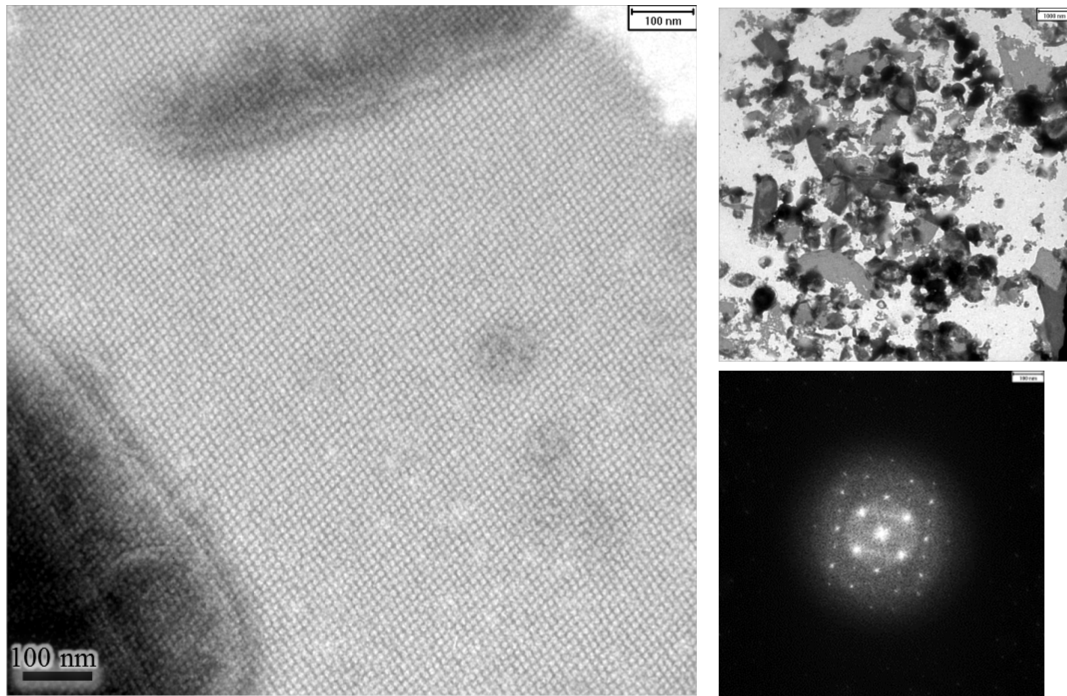


Figure 66. 複合体Vの2次元結晶とその結晶から得られたFFTスポット

精製番号: AA135

酵素濃度: 11.1 mg/ml、

酵素活性: 0.78  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 96.2 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA



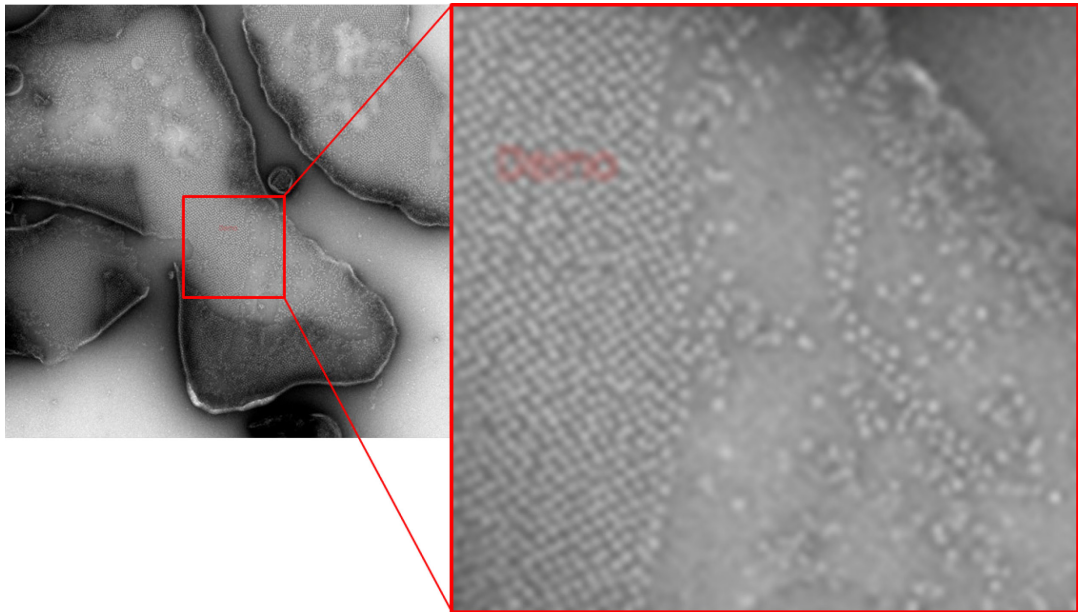


Figure 67. 複合体Vの一部の2次元結晶に認められる問題点

精製番号: AA135

酵素濃度: 11.1 mg/ml、

酵素活性: 0.78  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 96.2 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

このように、 $F_1$ が脂質膜中より脱離する理由として複合体Vが結晶化中に変性したことによるものと考えられる。これは、複合体Vが結晶化温度である27°Cでいち早く変性した結果から容易に考えられる。つまり、複合体Vを安定化することでこれを防ぐことが出来ると予測した。

### 3-4-13. 複合体Vの安定性向上

#### (i) 透析外液組成の変更

従来、透析外液には 5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2) を使い結晶化を行ってきた。この緩衝液中には酵素を変性させる作用を持つカオトロピックイオンが多量に含まれている。特に、上記の組成中では、塩素イオンがそのカオトロピックイオンと呼ばれるイオンである。そこで、このカオトロピックイオンを含まない緩衝液に変更して結晶化を行うこととした。その結果、リン酸ナトリウム緩衝液が最も適していると考えられ、その濃度について更に詳細な検討を行った。検討結果を示す。その結果、5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 55 mM Na-Pi 緩衝液 (pH 8.0) に対して結晶化を行ったときに結晶性の良い、F<sub>1</sub> の脱離の認められない 2 次元結晶化が得られることが明らかとなった。更に濃度が上げると、結晶性が低下しパッチ状結晶となる傾向があることが明らかとなった。つまり、F<sub>1</sub> の脂質膜からの脱離はカオトロピックイオンが一定の影響を及ぼしていることが示された。

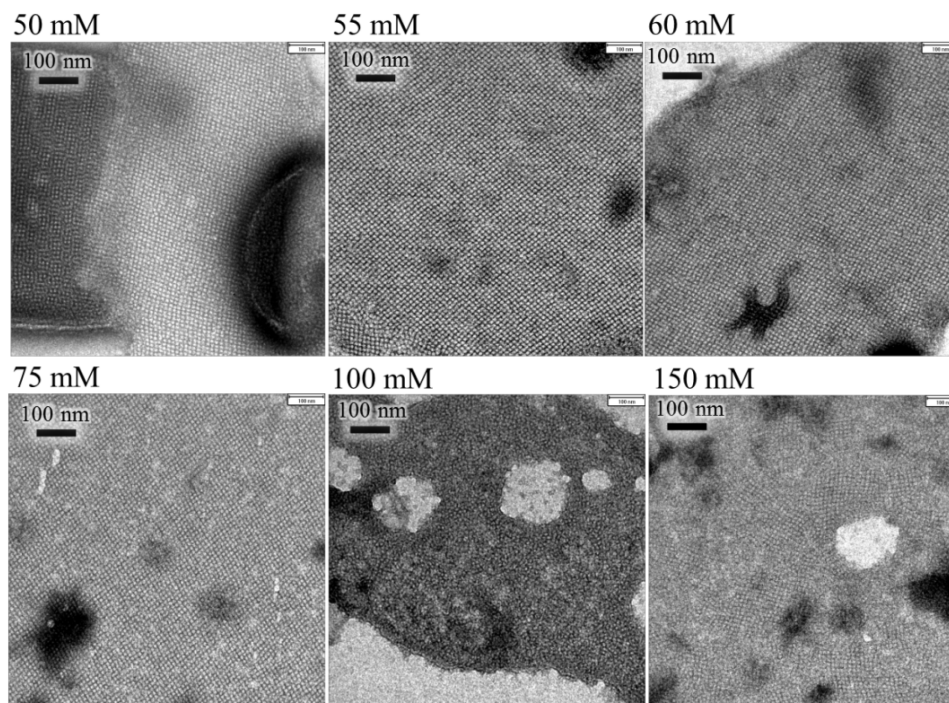


Figure 68.カオトロピックイオンを含まない緩衝液での結晶化スクリーニング

精製番号: AA143

酵素濃度: 15.2 mg/ml、

酵素活性: 0.74  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 91.9 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 上記した濃度 Na-Pi 緩衝液 (pH 8.0)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、

0.5 mM ADP、0.1 mM DTT

## (ii) 阻害剤の添加

現在報告されている複合体Vの結晶構造は常に、プロトンの流入を司る a サブユニットと呼ばれる部位を欠いている。a サブユニットが外れることによって  $F_0$  と  $F_1$  サブコンプレックスを繋ぎ止める部位がなくなりそれによって、rotor ring の回転に合わせて  $F_1$  が脱離すると考えられる。それを抑える為に、阻害剤を添加し回転を抑えることとした。複合体Vの働きを阻害することが出来る試薬は複数報告されており、典

典型的な阻害剤としては、オリゴマイシンがある。この化合物は、所属する研究室に於いて阻害活性を測定する際に用いる。この阻害剤は、膜部位の  $F_0$  に対して特異的に結合することが知られる。結合する部位は **rotor ring** を構成する **c** サブユニットに対してであり、ウシ複合体Vの場合、1分子の複合体に対して8分子のオリゴマイシンが結合する。オリゴマイシンがATP合成や加水分解を触媒する機構は、オリゴマイシンが **c** サブユニットの中心部に在って **a** サブユニットから流入したプロトンが結合するアスパラギン酸もしくはグルタミン酸を覆いかぶさるように結合する為であることが報告されている (Symersky et al., 2012)。

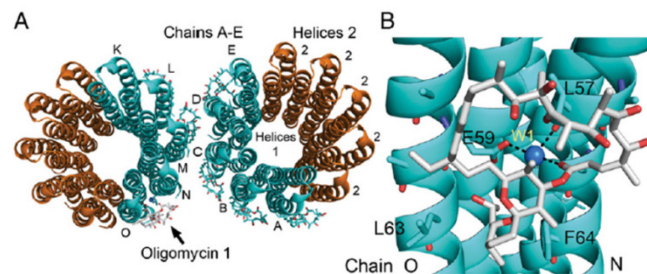


Fig. 1. Oligomycin bound to  $c_{10}$  ring. (A) Shown is a representation of two  $c_{10}$  rings with bound oligomycin. The rings colored in cyan represent the copies in the asymmetric unit; the rings colored in orange are symmetrically related rings. The oligomycin molecules are shown only in the asymmetric unit. Oligomycin shown in cyan and gray represents the molecules that were modeled into the electron density map. Helix 1 is the first helix in subunit-c and is packed in the interior of the c-ring. Helix 2 is packed on the outer portion of the c-ring. The subunits of the asymmetric unit are designated A-E and K-O. Oligomycin 1 (gray) is bound to chains O and N and had the best corresponding electron density. (B) View of the oligomycin-binding site. The atoms in oligomycin are color coded: gray, carbon; red, oxygen; blue, nitrogen. The water molecule (W1, blue) forms a bridging H-bond between Glu59 on chain O, the carbonyl of Leu57 on chain N, and the ester carbonyl of oligomycin (O36). The atoms of the c-ring are color coded: cyan, carbon; red, oxygen; blue, nitrogen.

Symersky et al., PNAS Vol.109 No.35 2012

### Figure 69. c サブユニットに結合するオリゴマイシン

先ほど記したオリゴマイシンは、 $F_0$  に対して特異的に結合し阻害効果を発揮する阻害剤である。対して  $F_1$  に対して結合する阻害剤として広く知られているのが Adenosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate (AMP-PNP)である。この化合物は、ATP 類似体であり、 $\beta$ 、 $\gamma$ 位がイミドになっている為、複合体Vによる分解を受けない。これら化合物を透析外液に添加し、複合体Vの動きを完全に停止することで  $F_1$  の脱離が抑えられると考えた。先ず、オリゴマイシンを添加した結果について述べる。オリゴマイシンの構造を以下に示す。

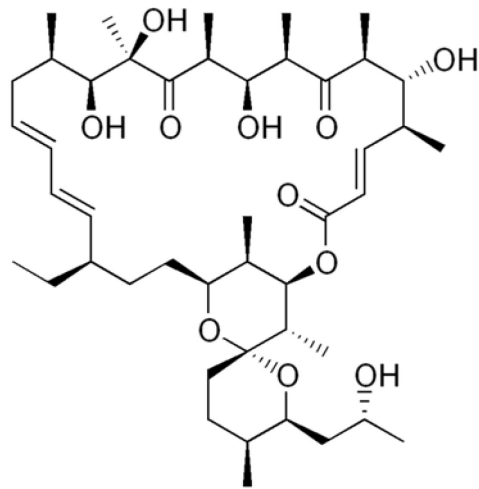


Figure 70. オリゴマイシンの構造式

上記するようにオリゴマイシンは極めて疎水性の強い化合物であり、一切水溶液とはならない。故に、オリゴマイシンはエタノール中に 20 mM となるように調整してある。脂質/酵素/界面活性剤から成る 3 者複合溶液に直接エタノール中のオリゴマイシンを加えるとそれによって酵素が変性することが考えられる。そこで、まず使用する量のオリゴマイシンを算出し、ウシ複合体V1 分子に結合する量は先ほども記したが 8 分子である。そこで、酵素 1 分子に対して 1.5 倍量の 12 分子量をガラス製試験管に加えアルゴンガス中でエタノールを完全に揮発させた。そこに、界面活性剤に溶解した脂質を混合してオリゴマイシンを溶解し、最後に精製した複合体Vを加えた。このように調整した酵素の ATP 加水分解活性を測定したところ、

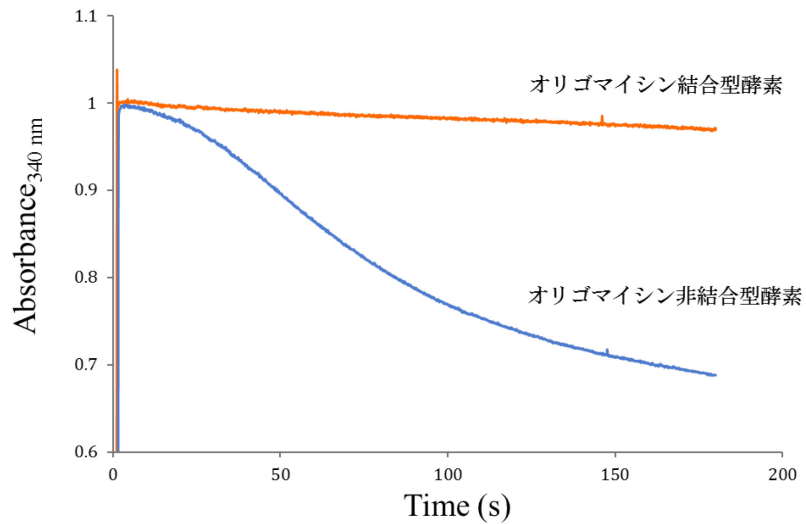


Figure 71. オリゴマイシン結合型酵素と非結合型酵素の酵素活性  
 青:オリゴマイシン非結合型酵素 赤: オリゴマイシン結合型酵素

このように、オリゴマイシンを加えた 3 者複合溶液の ATP 加水分解活性を測定すると反応が阻害され、NADH の酸化が停止した。よって、調整した溶液がオリゴマイシン結合型酵素であることが示された。この 3 者複合溶液を透析ボタンに充填し結晶化を行った。その結果を以下に示す。

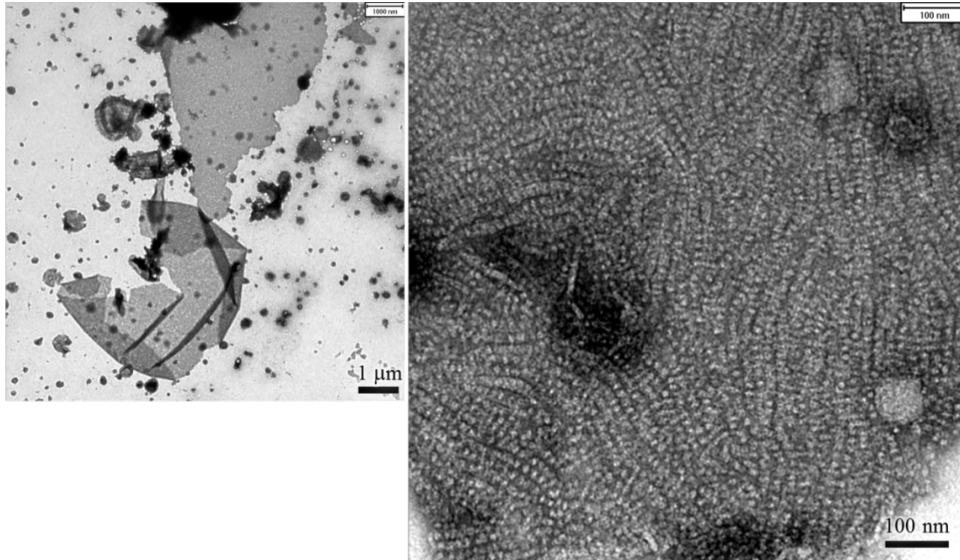


Figure 72. オリゴマイシン結合型複合体Vの結晶化スクリーニング

精製番号: AA137

酵素濃度: 11.0 mg/ml、

酵素活性: 1.18  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 94.6 %

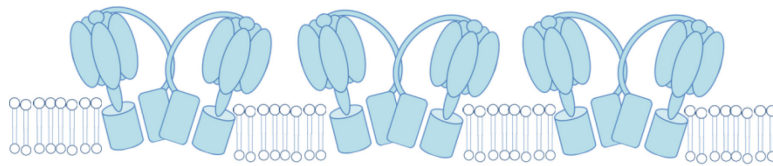
脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、  
0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA、

低倍率で観察すると、広い面積の脂質膜の形成はいくつも見られたが、倍率を上げると明らかにパッキングが異なっていることを示す結果となった。ここから結晶中のパッキングについて考えると以下のようなことが想像できる。

オリゴマイシン結合型結晶模式図



オリゴマイシン非結合型結晶模式図

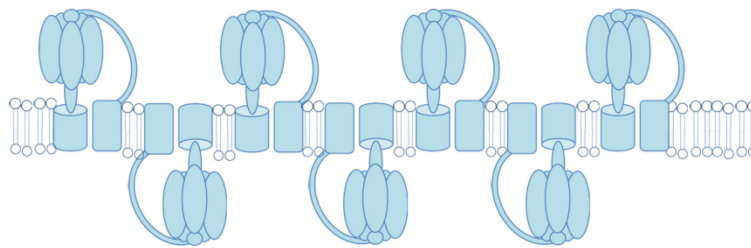


Figure 73. オリゴマイシン結合型酵素と非結合型酵素の結晶パッキング想像図

上:オリゴマイシン結合型酵素 下: オリゴマイシン非結合型酵素

オリゴマイシン非結合型酵素の場合、酵素が上下交互に脂質膜中に組み込まれるため、一定の間隔で酵素が配列しているように見える。対して、オリゴマイシン結合型酵素を組み込んだ脂質膜中には酵素のラインが見える。恐らくこれは、上記したように一つの向きに酵素が配列したことによるものと考えられる。次に、AMP-PNP を添加した場合であるが、こちらは高い親水性を持つため透析緩衝液に直接加えることとした。透析外液の組成は、5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、0.5 mM AMP-PNP、0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA、0.02 % NaN<sub>3</sub> を含む 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.2)とした。

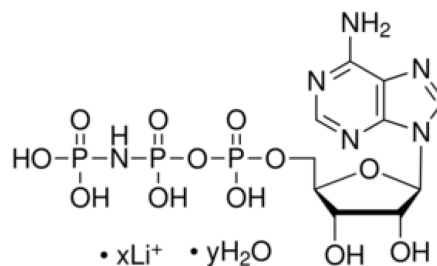


Figure 74. AMP-PNP 構造式



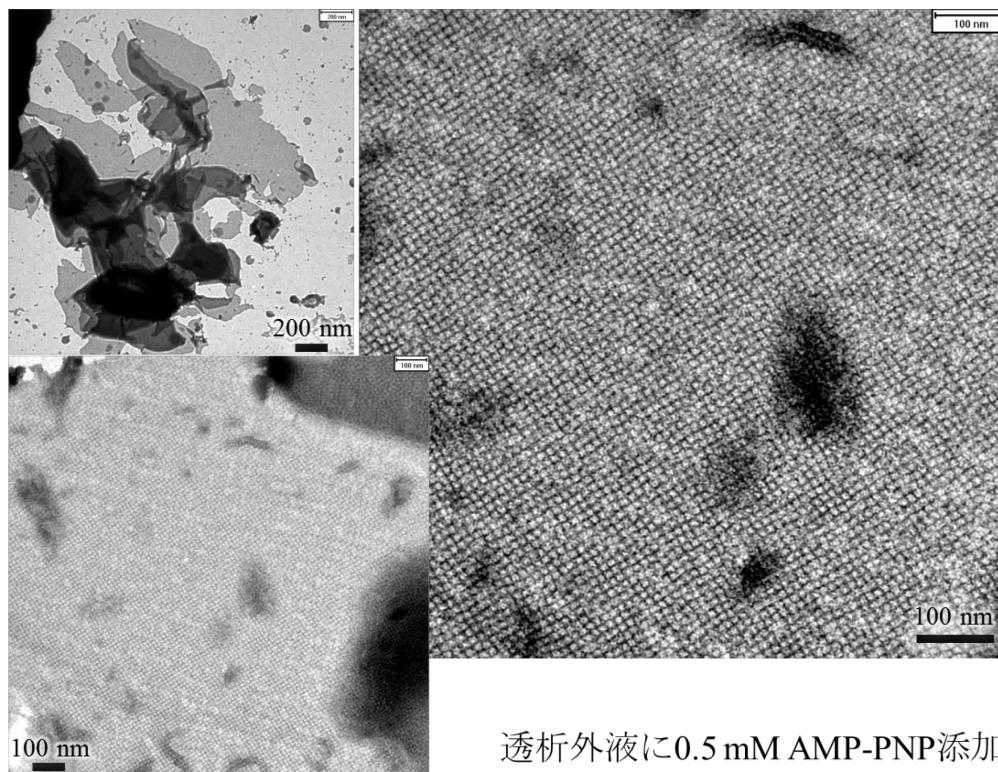


Figure 75. AMP-PNP 結合型複合体Vの結晶化スクリーニング

精製番号: AA144

酵素濃度: 13.2 mg/ml、

酵素活性: 0.77  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 96.5 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

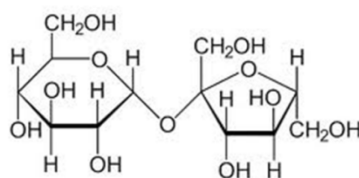
透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、

0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA、0.5 mM AMP-PNP

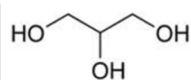
得られた結晶には、一様な酵素の配列が認められた。更に、F<sub>1</sub>は全く脱離せず非常にきれいな結晶であることがわかる。この AMP-PNP の添加実験は、再現性も高く AMP-PNP が F<sub>1</sub> の脱離に対して大きな抑制効果を持っていることを示している。しかし、極めて残念なことにこの AMP-PNP は現在製造中止となり Sigma 社より引き続き購入することが出来ない。ロシュ社も同様に製造しているが、値段が非常に高く購入することが出来ないため今後は、別の阻害剤に関して検討する必要があると考えられる。

### (iii) 安定化剤の添加

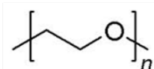
F<sub>1</sub> の脱離に関して、酵素を現状より安定化させることで解決すると考えた。そこで、一般的に酵素を安定化させるために用いられている試薬を透析外液に添加することとした。用いる試薬は、グリセロール、ポリエチレングリコール (PEG)、スクロースである。下に分子式と分子質量を示す。これらを透析外液に加え結晶化を行った。



スクロース  
MW:342.3 g/mol



グリセロール  
MW:92.1 g/mol



ポリエチレングリコール

Figure 76. 添加剤の構造式と分子量

Table 17. 結晶化用透析緩衝液組成と添加剤濃度

緩衝液組成 (mM)				
NaPi (pH 8.0)	55	55	55	55
MgCl <sub>2</sub>	5	5	5	5
ADP	0.5	0.5	0.5	0.5
DTT	0.1	0.1	0.1	0.1
EDTA	0.2	0.2	0.2	0.2
スクロース	100	1000	-	-
グリセロール (%)	-	-	20	-
PEG (%)	-	-	-	10

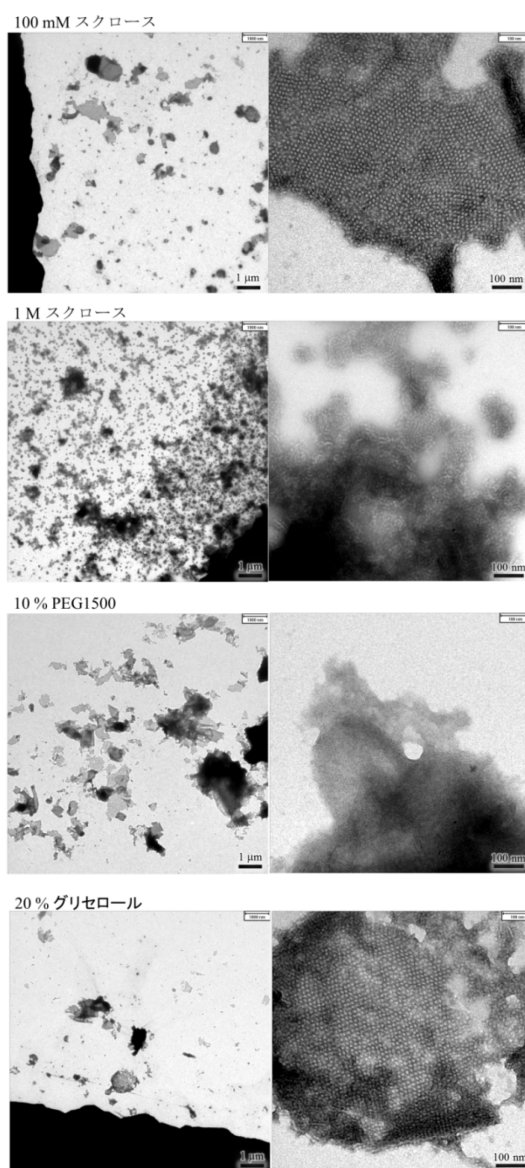


Figure 77. 各種化合物添加による結晶化への影響

精製番号: AA138、AA140、AA155

酵素濃度: 12.1 mg/ml

酵素活性: 0.51  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 98.8 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 55 mM Na-Pi 緩衝液(pH 8.0)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.5 mM ADP、0.1 mM DTT

このように、一般的に酵素を安定化させるとさせる試薬を透析外液に加え、結晶化を行ったが、すべてに於いて結晶を得ることが出来なかった。これは、試薬の添加によって緩衝液粘度が増し、透析速度が遅くなったことによると考えられる。現在、これら試薬を透析外液に添加して結晶化することは行っていないが、この条件から結晶を得ることは極めて困難であると考えられる。

#### (iv) 界面活性剤の添加

2次元結晶化は透析などによって界面活性剤を除くことで脂質膜中に酵素を組み込み形成されるものである。しかし、ここでは敢えて界面活性剤を cmc 以下となるように透析外液に加え結晶化を行うこととした。加える界面活性剤はステロール骨格を持つ Chaps、Bigchap とした。ステロール骨格を持つ界面活性剤が脂質膜中に組み込まれることによって流動性が格段に下がることとなる。それによって脂質膜が強固になると予測しこの検討を行った。添加濃度は、両者とも透析外液と酵素中に 0.002 % (v/v) とした。結果を下に示すが、両者とも平面状結晶は得られるものの結晶性が悪く、また酵素配列も部分的となった。

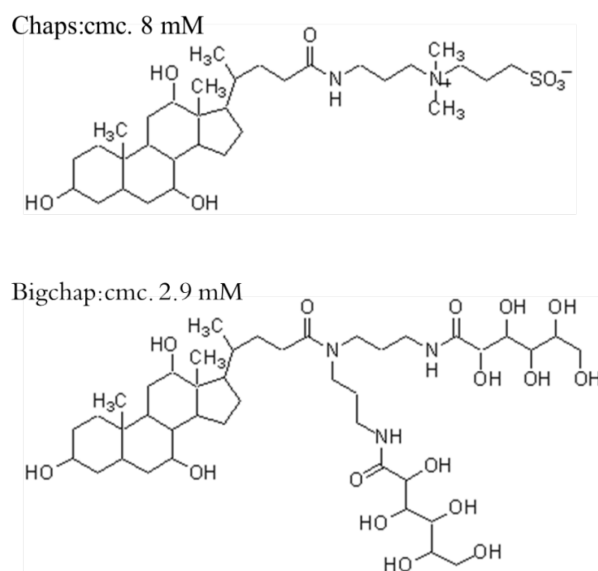


Figure 78. 各種界面活性剤とその臨界ミセル濃度

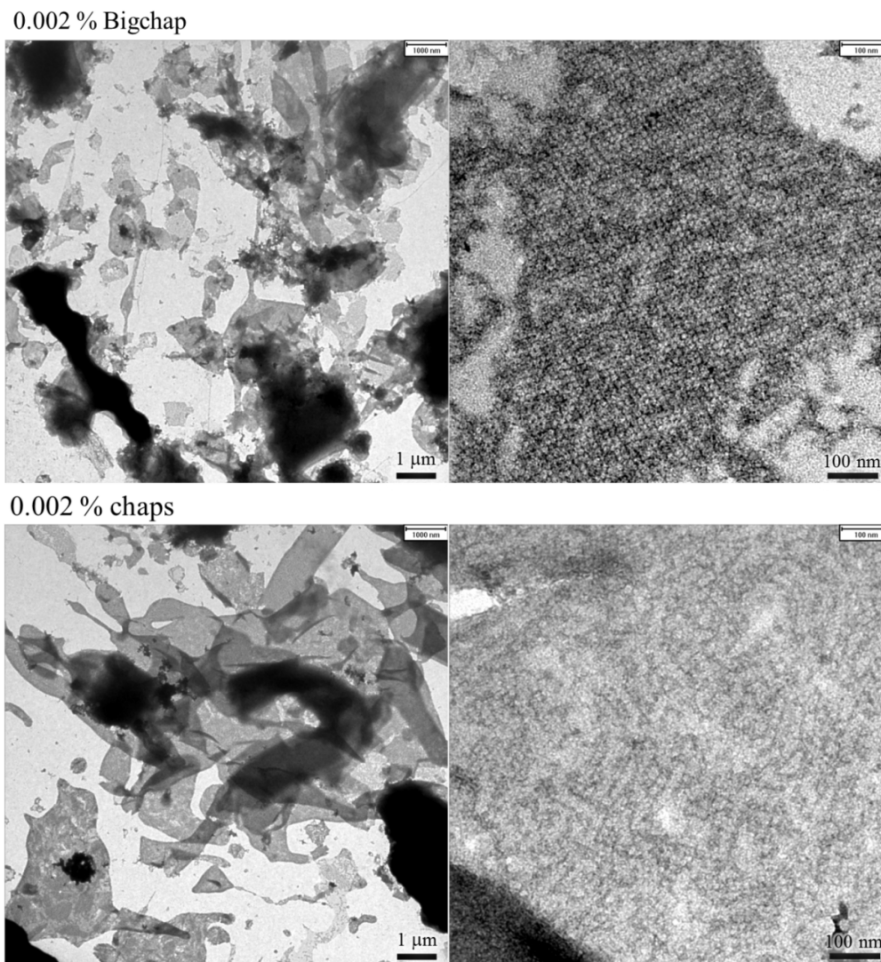


Figure 79. 各種界面活性剤添加が及ぼす結晶への影響

精製番号: AA160、AA161

酵素濃度: 19.4 mg/ml

酵素活性: 0.55  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 97.0 %

脂質 DMPC:Lyso PC(16:0)=10:1(wt:wt)、

2 時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用 透析温度 27°C

透析外液組成 55 mM Na-Pi 緩衝液 (pH 8.0)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.5 mM ADP、0.1 mM DTT

#### (v) 脂質流動性の検討

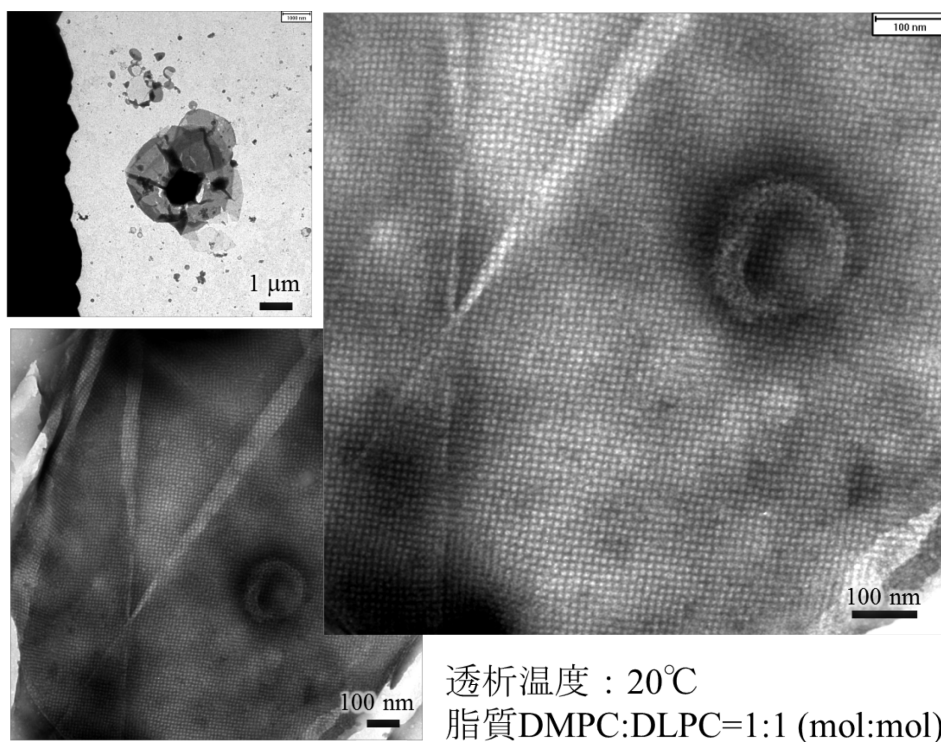
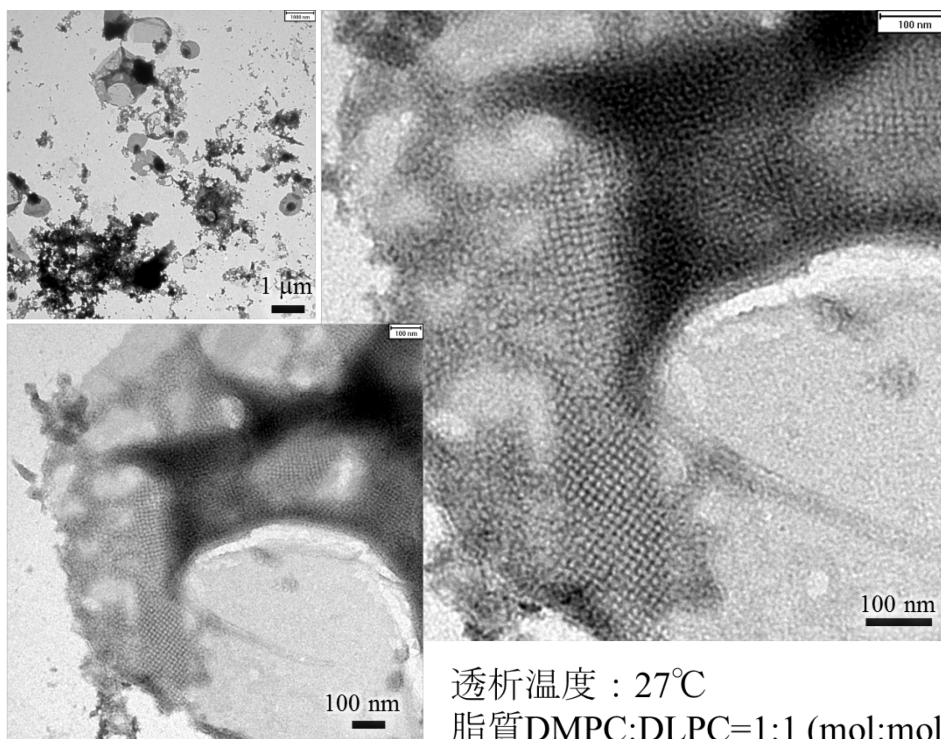
脂質 2 重膜の流動性について検討する。酵素が組み込まれる脂質 2 重膜は流動性を持つ液体として作用する。脂質にはそれぞれ相転移温度があり、その温度以上で流動性を示すとされている。しかし、この値は、単一な系によって測定されたものであり、今回のような緩衝液中に在って DMPC と Lyso PC から成る複合脂質を用いている場合は異なる。現在、使用している結晶化温度である 27 °C は、DMPC の相転移温度から考えたものであり、1 °C 低い 26 °C では結晶が形成されなかった。つまり、DMPC と Lyso PC から成る複合脂質を用いた場合、結晶が形成される為の最低限の流動性を維持できる温度が 27 °C であることになる。しかし、界面活性剤によって溶解された複合体 V は、27 °C でいち早く変性することが既に記した通りである。もしこの温度を 20、15、4 °C とし結晶が形成できれば、今より安定な結晶が形成されると予測できる。教科書に習うと、脂質のアシル鎖が短くなると相転移温度が低下し、長くなると上昇することが知られる。更に、アシル鎖内に不飽和結合を持つことでも相転移温度が低下する。以下に各脂質の相転移温度を参考に記す。

Table 18. 各脂質の相転移温度

脂質種類	相転移温度
DDPC (10:0)	-6 °C
DLPC (12:0)	0 °C
DMPC (14:0)	23 °C
DPPC (16:0)	42 °C
DSPC (18:0)	55 °C
POPC (16:0,18:1)	-2°C
DOPC (18:1,18:1)	-20°C

そこで、DMPC より短いアシル鎖を持つ DLPC をモル比で 1:1 となるように混合した複合脂質を用いて結晶化を行うこととした。透析外液の組成は 5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM ADP、0.1 mM DTT を含む 55 mM Na-Pi 緩衝液 (pH 8.0) とした。結晶化温度は、従来通り 27 °C そして新たに 20 °C、15 °C を加えた。結晶を観察したところ、従来通りの 27 °C で結晶化を行うと酵素配列の認められる脂質膜は全体の一部であり、ほぼすべてがアグリゲートした複合体 V であった。これは、DMPC と DLPC の複合脂質の流動性が 27 °C で非常に高いため、複合体 V が変性したためと考えられる。15 °C で結晶化を行ったところ、この場合も同様にほぼすべてがアグリゲートした。対して、透析温度 20 °C の条件に於いて完全に F<sub>1</sub> の脱離の認められない結晶のみを得ることに成功した。この結果は、脂質を複数混合することにより脂質の温度に対する流動性を制御することが可能であり、それにより複合体 V が安定する低温における結晶化が可能であることを示している。





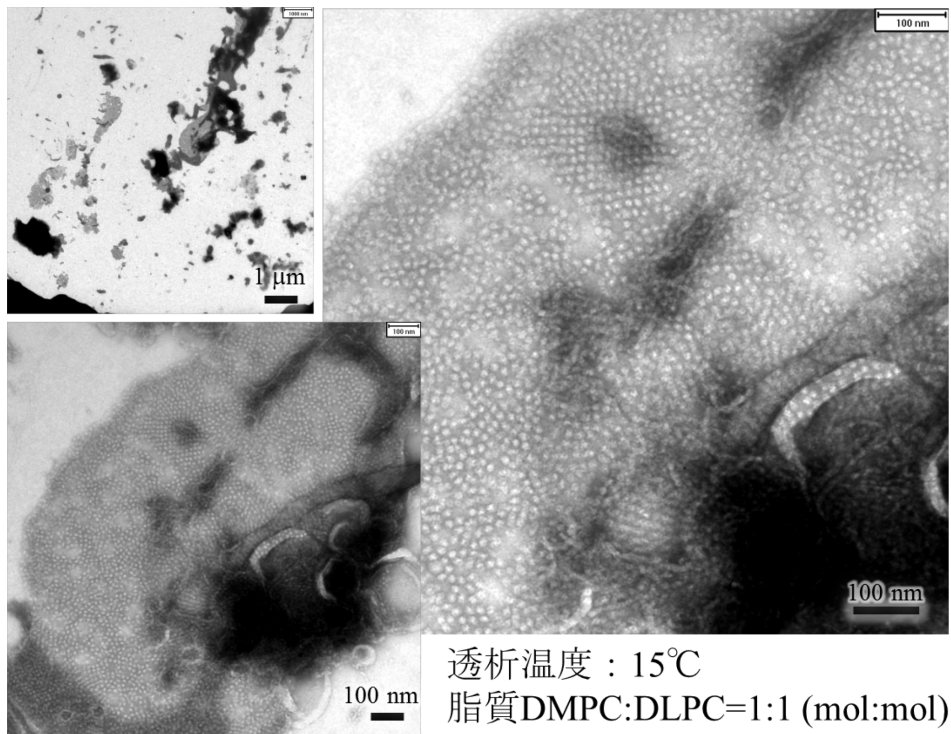


Figure 80. 脂質流動性の検討

精製番号: AA165、AA166、AA167

酵素濃度: 12.3 mg/ml

酵素活性: 0.95  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ 、阻害率: 97.3 %

脂質 DMPC:DLPC=1:1 (mol:mol)

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 55 mM Na-Pi 緩衝液(pH 8.0)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.5 mM ADP、0.1 mM DTT

### 3-4-14. 2次元結晶中の複合体Vが示す ATP 加水分解活性

上記した通りに結晶化条件を検討した末、複合体Vの結晶を頻度よく得ることに成功した。しかし、得られた結晶が機能を保持した複合体Vであることを確かめる必要がある。そこで、結晶中に在る複合体Vの酵素活性を測定することとした。精製した複合体Vは2次元結晶を形成すると ATP 加水分解を示さない。これは、結晶のパッキングが極めて密であり、互いの分子が干渉し脂質膜中で ATP 加水分解を触媒することが出来ない為であると考えられる。しかし、作製した結晶に界面活性剤を加え複合体Vを再可溶化することで再び ATP 加水分解活性を測定することが出来る。測定方法は、100 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.01 % DDM (cmc.:0.0087 %)を含む 50 mM K-Pi 緩衝液 (pH 7.8)を 1 cm 角の石英キュベットに 2 ml とスターラーバーを入れ攪拌しながら、最終濃度 200 mM NADH、2.5 mM PEP、20 µg LDH、20 µg PK となるようにキュベットに加える。この状態でしばらく攪拌を続けてキュベット内の温度が 20 ± 0.1°Cとなるようにする。次に、キュベット内に結晶を 20 µl 加える。2次元結晶をキュベットに加えてから 5 min ほど攪拌した後、最終濃度 2.5 mM となるように ATP をキュベットに加えて測定を開始する。阻害活性を測定する場合、結晶を 20 µl 添加した後にオリゴマイシンを最終濃度 20 µM となるようにキュベット内に添加した。オリゴマイシンを添加した後、5 min ほど攪拌し、ATP を加えて測定を開始した。オリゴマイシンを添加し、直ちに ATP を添加し測定を開始すると一切 ATP 加水分解活性が阻害されない為必ずオリゴマイシンを添加後 5 min は攪拌する必要がある。この方法で、結晶から複合体Vを再可溶化し ATP 加水分解活性と阻害活性を測定した。

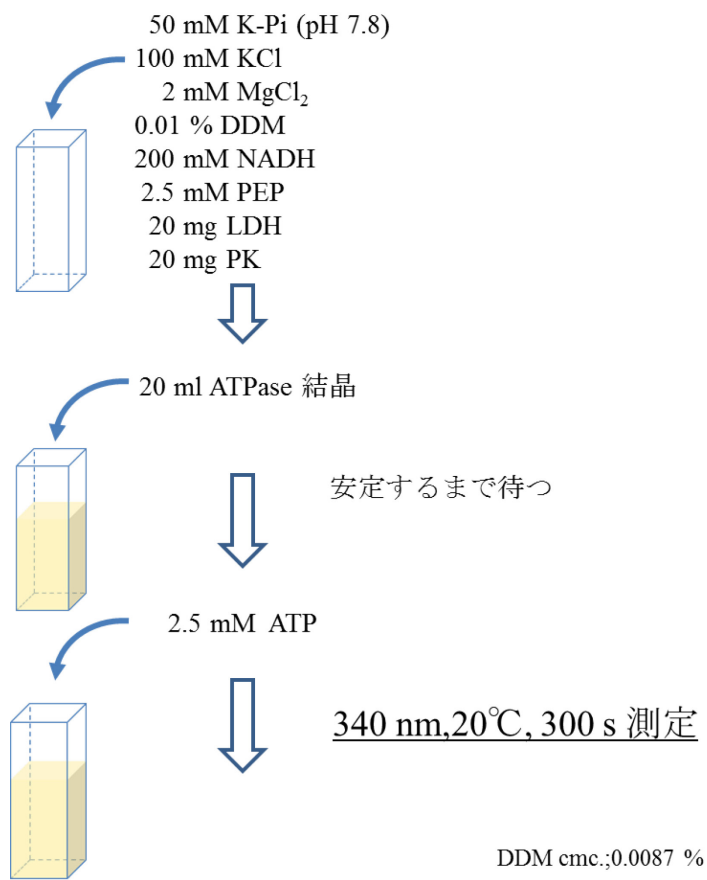


Figure 81. 2次元結晶中の複合体Vの活性測定法

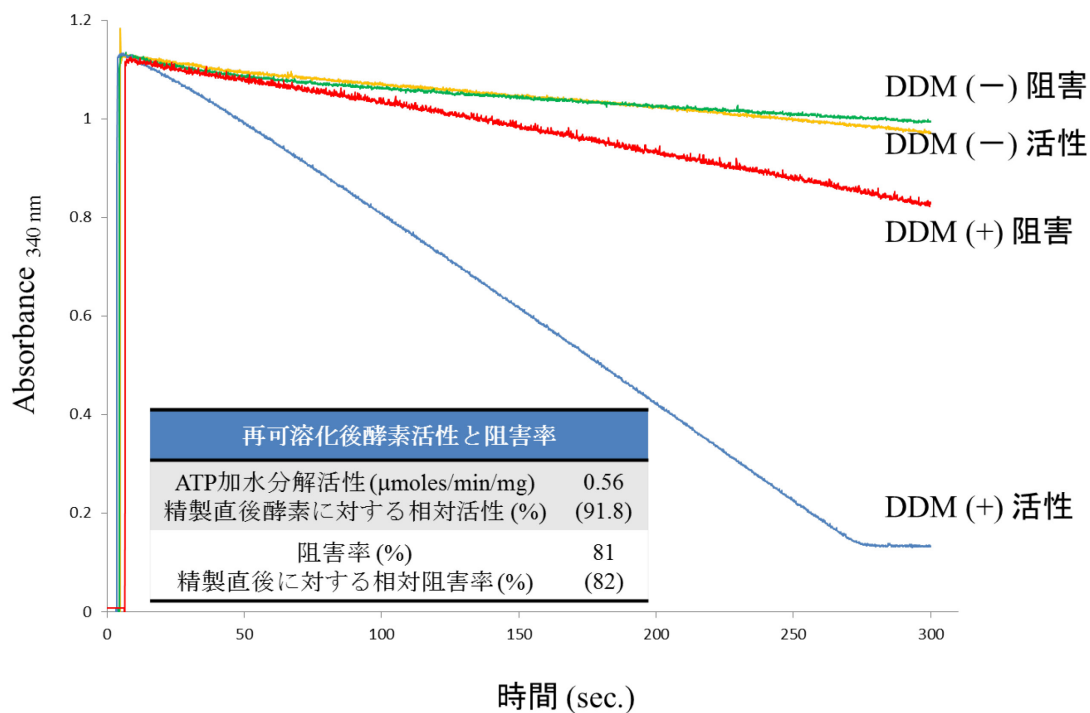


Figure 82. 2次元結晶中の複合体Vの活性測定結果

青: DDM (+)酵素活性 赤: DDM (+)阻害活性

黄: DDM (-)酵素活性 緑: DDM (-)阻害活性

精製番号: AA49、AA151

精製直後酵素活性:  $0.61 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$

精製直後阻害率: 98.4 %

再可溶化後酵素活性:  $0.56 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$

再可溶化後阻害率: 81 %

再可溶化した複合体Vは精製直後に対して90%以上のATP加水分解活性を示し、その活性の80%はオリゴマイシンによって阻害された。これは、精製直後に対して80%以上が完全な機能を保持した複合体Vであることを示している。阻害率が、精製直後に対して20%の減少を示したのは界面活性剤によって再可溶化された際に一部

の酵素が変性したためと考えられる。上記の活性測定の結果は、作製した結晶がまぎれもなく完全な複合体Vの2次元結晶であることを意味している。

### 3-4-15. 結晶の保存条件

作製した結晶から構造解析を行うには大量の結晶が必要となる。そこで、結晶を安定に供給する為に必要な保存条件を検討することとした。複合体Vの結晶保存として-196 °C、4 °Cそして27 °Cの3条件を用意した。4、27 °C保存に於いては予めこの温度に設定したインキュベーターに静置し3日間保存したうえで結晶中の複合体Vを再可溶化し酵素活性と阻害剤感受性を測定した。-196 °C保存に於いては、液体窒素で急速冷凍した後、液体窒素中で3日間保存し解凍後、再可溶化し酵素活性と阻害剤感受性を測定した。また、それぞれの温度で3日間保存した後、電子顕微鏡で再度観察しそれぞれの結晶性について評価を行った。

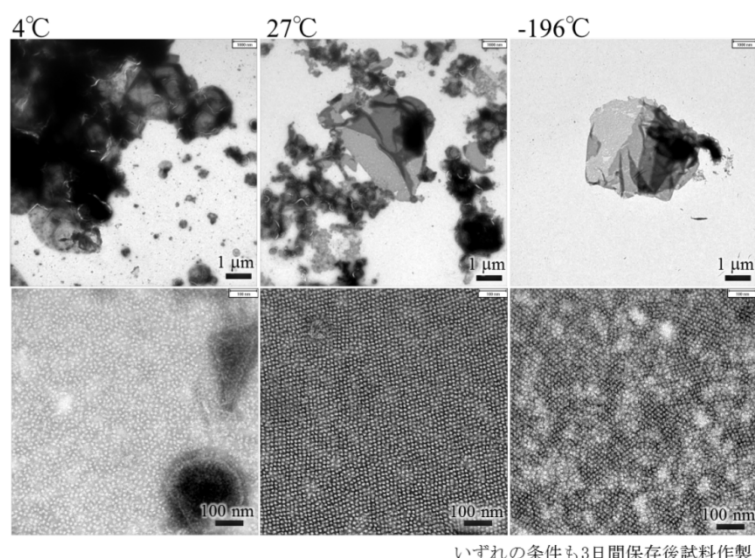


Figure 83. 結晶保存条件の検討

(左)4 °C保存、(中)27 °C保存、(右)-196 °C保存

※いずれの条件も3日間保存

精製番号: AA130

酵素濃度: 15.0 mg/ml

酵素活性: 0.84 μmoles/min/mg、阻害率: 92.1 %

脂質 DMPC:Lyso PC (16:0)=10:1 (wt:wt)

2時間インキュベーション、安田商店製透析ボタン使用

透析外液組成 40 mM Tris-HCl (pH 8.2)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM NaCl、0.5 mM ADP、  
0.1 mM DTT、0.2 mM EDTA

電子顕微鏡で保存後の結晶を観察したところ、結晶が最も安定している条件は、27°Cであることが示された。この時、結晶化に用いている脂質は DMPC と Lyso PC から成る複合脂質であり、27°Cでの保存によって脂質の流動性が最低限保たれたことが、結晶が安定して保存された理由と考えられる。更に、27°Cで保存し続けたところ、結晶化終了後 14 日間後に於いても 70 %以上の高い阻害率を保っていることが示された。界面活性剤中に在る複合体Vは 27°Cでいち早く変性したが、脂質膜中に在ることで、複合体Vは極めて安定となる。この結果は、不安定さ故に結晶化に誰も成功していない複合体Vの性質から考えて驚くべきことである。故に、複合体Vの全体構造解明に向け 3 次元結晶ではなく、脂質膜中に組み込み形成される 2 次元結晶を用いる事は結晶の安定性から考えて適切である。

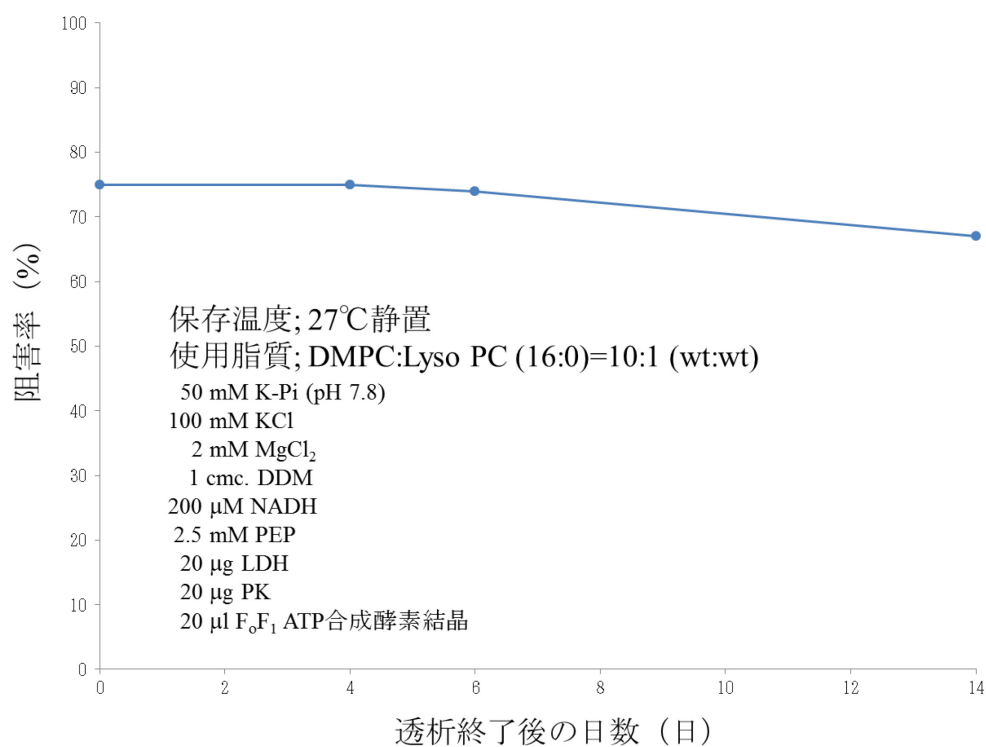


Figure 84. 保存結晶の安定性

27°C 静置にて透析終了後 2 週間まで保存

精製番号: AA130

酵素濃度: 15.0 mg/ml

酵素活性: 0.84 μmoles/min/mg、阻害率: 92.1 %



## 第伍節 考察

### 3-5. 考察

#### 1. 結晶化用脂質の検討

結晶化用脂質として過去の実験データに鑑みて多種にわたる脂質を用いて結晶化実験を行ったが、最も良い結果を示したのが合成脂質であり、パルミチン酸を脂肪酸としてもつ DMPC である。POPC などウシ心筋ミトコンドリアを構成する脂質なども結晶化に用いたが、全く結晶化が形成されなかった。複合体 V が DMPC にのみ再構成される理由として、ウシ心筋から新規の精製法を用いて調製された複合体 V は多くのミトコンドリア内膜構成脂質を持ち、それら内膜構成脂質のアシル鎖は DMPC より長い。その為、膜を形成するためにはバランスを保つ必要があり、アシル鎖の短い DMPC が結晶化に適切であると考えられる。

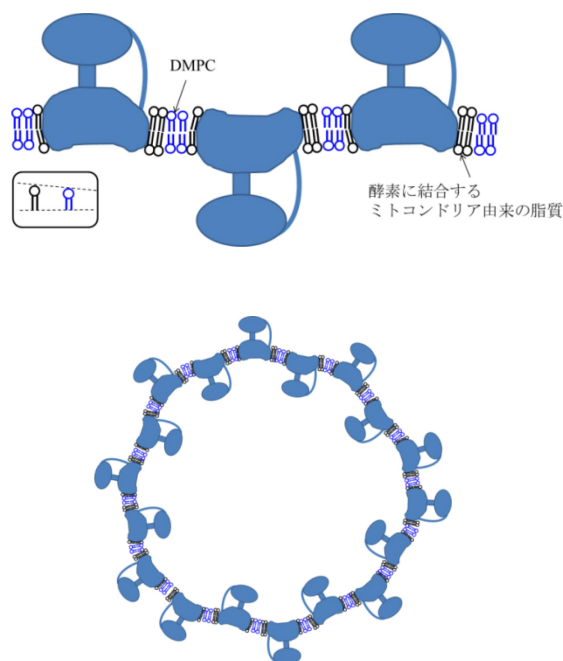


Figure 85. 複合体 V の結晶パッキングの想像図

しかし、DMPCのみを用いて結晶化を行うとチューブ状結晶やベシクル状結晶が圧倒的に多く得られる。対して、シート状結晶は非常に少ない。これは、複合体Vの回りに局在している脂質、特にCLは大きく影響していると考えられる。CLは脂質膜中では扇型の構造をしており、それにより平面膜形成が大きく妨げられたと考えられる。チューブ状やベシクル状結晶は弧を描いていることから電子線結晶構造解析に向かない欠点を持つ。そこで、CLと正反対の構造を持つ単鎖脂質であるLyso PCをDMPCに対して重量比10:1で添加すると、広い面積を持つシート状結晶が頻度よく得られることがわかった。様々なLyso PCを添加しこのような効果を持つLyso PCのアシル鎖の長さはC16のものだけであり、このLyso PC (16:0)以外で同様の効果を持つ化合物は未だ見つかっていない。Lyso PCの添加効果は極めて大きく、結晶形態を一変させるものであったが、同時に脂質2重膜からF<sub>1</sub>を脱離させるという問題を引き起こした。Lyso PCの添加によって脂質の流動性が大きく向上し、それにより複合体Vが変性したことが大きな要因と考えられる。Lyso PCは親水性が高く、界面活性剤としても一面も併せ持つことが知られている。当初、Lyso PCの持つ界面活性剤として作用が酵素を変性させたと考えたが、様々なLyso PC類似体を用いて同様に結晶化を行ったが、この問題を解決することが出来なかった。このことは、F<sub>1</sub>の脱離がLyso PCによるものではないことを示している。そこで、酵素が安定に保たれる温度まで結晶化温度を下げることにした。しかし、DMPCとLyso PCの複合脂質は、27℃が結晶形成に於ける限界温度であり、26℃では結晶性が大きく損なわれた。新たに、複合脂質の検討を行ったところ、DMPCとDLPCを等モル混合した複合脂質を用いる事で、結晶化温度を20℃まで下げることができ、F<sub>1</sub>が脂質2重膜より脱離するという問題を解決した。

## 2. 結晶中複合体Vの酵素活性

作製した2次元結晶中に含まれる複合体Vが、完全な機能を保持した酵素であることは、2次元結晶より再可溶化した複合体VがATP加水分解活性をしめし、オリゴマイン感受性を保持していたことからいえる。これら実験結果は、作製した2次元結晶が完全な複合体Vの結晶であることを証明するものである。

### 3. 複合体Vの2次元結晶化方法

ウシ心筋 1100 g から調製した複合体Vを用いた2次元結晶化条件の探索結果、10-15 mg/ml に濃縮した複合体Vに対し、脂質 DMPC と脂質 DLPC を等モルで混合した複合脂質を LPR 0.245 となるように添加し、4 °C の環境下で振盪速度 40 rpm で泡立たないように2時間インキュベーションを行う。インキュベーション後直ちに安田商店製透析ボタン (直径: 4 mm、深さ: 2.45 mm、表面積: 50.0 mm<sup>2</sup>) に充填し、空気が入らないように留意しながら透析膜ポアサイズ MWCO15000 の SPECTRUM 社製 Spectra Por 透析膜をかぶせ O リングで密閉した。透析ボタン中に封入した DMPC,DLPC/複合体V/界面活性剤から成る3者混合溶液は、予め調整し 20±0.1 °C の 5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM ADP、0.1 mM DTT、0.02 % NaN<sub>3</sub> を含む 55 mM Na-Pi 緩衝液 (pH 8.0) に対して透析を行った。透析に用いる体積は透析ボタン1個当たり 33 ml として一日一回新しい緩衝液に交換した。透析中は常に 20±0.1 °C となるように設定されたインキュベーター内に静置し、透析ボタンの穴が上を向くようにした。透析期間は7日間で完全に複合体Vの結晶が形成される。一般的に界面活性剤に DM を用いる場合、最低で10日の透析が必要と考えられているが、複合体Vの場合7日で完全に界面活性剤を除くことが出来る。形成された複合体Vの2次元結晶は、透析ボタン内の底に重力の影響を受け溜まる。ボタン全体が白濁するようであれば、それは酵素の凝集であり結晶の形成はない。透析終了後、透析ボタンを結晶化用緩衝液から取り出し、先を2 mm ほど切断した容量 200 µl のマイクロピペットチップをピペットマンに装着した物を用いて透析膜を破り、透析ボタン底に在る2次元結晶をゆっくり吸い取る。急激に吸い取ると圧力によって2次元結晶が敗れる為、極力ゆっくり行う。吸い取った結晶はプラスチック製試験チューブにゆっくり入れ蓋をし、使用するまで 20 °C で保存する。電子顕微鏡で観察する場合、金属染色液で染色を施す必要があるが、この場合、20 °C で保存した結晶溶液を取り出し溶液を10回ほどゆっくりとピペッティングし、均一な懸濁液にした後、マイクロピペットで3 µl 取り、親水処理を施したカーボン膜を貼ったグリッドに静かに乗せた。15秒後に ADVANTEC 社製 No.2 の濾紙を用いて軽く溶液を吸い取った。複合体Vの2次元結晶は非常に大きいため15秒以上カーボン膜の上に乗せるとカーボン膜が破れ、電子顕微鏡で観察することが出来ないので注意する。濾紙で吸い取ったと同時に、結晶が乾かないように 10 mM Hepes-Na 緩衝液 (pH 7.8) でグリッドを洗浄し結晶化に用いた Na-Pi 緩衝液 (pH 8.0) を洗い流す。その後、直ちに2%酢酸ウラニルをグリッドに3 µl のせた。50秒間染色を施し、濾紙の端で酢酸ウ

ラニルを残さずに吸い取り半日間デシケーター内で乾燥させたものを電子顕微鏡で観察した。得られた高い ATP 加水分解活性を示し、その酵素活性はオリゴマイシンによって阻害を受けた為、完全な機能を保持した複合体Vの結晶であることが証明された。

本研究は緒言にも記した通り、完全な複合体Vの結晶は作製することが出来ないという従来の考え方を完全に覆す結果であり、2次元結晶と電子線結晶構造解析の可能性を示すものである。

## 第陸節 結論

### 3-6. 結論

第参章に於ける結論は、ウシ心筋ミトコンドリア複合体Vの2次元結晶が作成可能であることを実証したことである。

## まとめ

本研究に於いて、ウシ心筋ミトコンドリアから複合体Vの精製法と、精製酵素を用いた2次元結晶化方法の検討を行った。その結果、2次元結晶化に適した高純度且つ高い酵素活性・阻害剤感受性を有する酵素標品を精製する為の方法を開発することに成功した。この標品を用いる事で初めて2次元結晶化条件の探索を行うことができ、2次元結晶を作成することに成功した。このことは、複合体Vに対する結晶化の可能性を再検討させるものである。

## 参考文献

- Abrahams J. P., Leslie A. G. W., Lutter R. and Walker J. E., 1994 Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370** 621-628
- Boyer P. D., 1997 The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66** 717-749
- Buchanan K. S., Walker J. E., 1996 Large scale chromatographic purification of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.*, **318**, 343-349
- Chang T. and Penefsky H.S., 1973 Aurovertin, a fluorescent probe of conformational change in beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **248** 2746-2754
- Dervrim Acehan, Ashim Malhotra, Yang Xu, Mindong Ren, David L. Stokes, Michael Schlame, 2011 Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophysical Journal* **100** 2184-2192
- E. Racker, 1976 A new look at mechanisms in bioenergetics
- Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroaki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S. C., 2005 Lipid–protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature*, **438**, 633–638.
- Hashimoto 1999 姫路工業大学大学院修士論文
- Hiroaki Y., Tani K., Kamegawa A., Gyobu N., Nishikawa K., Suzuki H., 2006 Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J. Mol. Biol.* **355**, 628–639.
- Jindrich Symersky, Daniel Osowski, Eric Walters, David Mueller, 2012 Oligomycin frames a common drug binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** 13961-13965
- Karen M. Davies, Claudio Anselmi, Ilka Wittig, José D. Faraldo-Gómez, Werner Kühlbrandt, 2012 Structure of the yeast F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109** 13602-13607

Markwell M. A. K., Haas S. M., Tolbert N. E. and Bieber L. L., 1981 *Method Enzymol.* **72** 296-303

Mitsuoka K., Hirai T., Murata K., Miyazawa A., Kidera A., Kimura Y., Fujiyoshi Y., 1999 The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J. Mol. Biol.* **268** 861-882

Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J. B. 2000 Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, **407**, 599–605.

Nakashima 2002 姫路工業大学大学院博士論文

Nariai 2003 姫路工業大学大学院修士論文

Nicholls G. David, 1982 *Bioenergetics An introduction to the chemiosmotic theory*

Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K. Jr., 1997 Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **386** 299-302

Ogasawara 2009 兵庫県立大学大学院修士論文

Peter Dimorth, Christoph von Ballmoos, Thomas Meier 2006 Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthase *EMBO reports* **7** 276-282

Pogoryelov D., Yu J., Meier T., Vonck J., Dimroth P., Muller D. J., 2005 The c15 ring of the *Spirulina platensis* F-ATP synthase: F<sub>1</sub>/F<sub>0</sub> symmetry mismatch is not obligatory. *EMBO Rep.* **6** 1040-1044

Stefan Steigmiller, Paola Turina, Peter Graber, 2008 The thermodynamic H<sup>+</sup>/ATP synthases from chloroplast and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105** 3745-3750

Stock D., Leslie A. G., Walker J. E., 1999 Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286** 1700-1705

Sui H., Han B. G., Lee J. K., Walian P. & Jap B. K., 2001 Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, **414**, 872–878.

Watt I. N., Montgomery M. G., Runswick M. J., Leslie A. G., Walker J. E., Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107** 16823-16827

Walz, T., Smith, B., Zeidel, M., Engel, A., and Agre, P. 1994b Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP *J. Biol. Chem.* **269**, 1583–1586.

Yamamoto 2011 兵庫県立大学学士論文

岡 秀行 岡山畜産便り 1962.06



## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました先生方、諸先輩方、関係者の皆様にこの場をお借りしてお礼申し上げます。

このように重要で、非常にやりがいのある研究テーマを与えてくださった吉川信也特任教授には深く感謝いたします。実験結果について先生と熱い議論を交わせたことは、私の学生生活のなかでも非常に有意義な体験でした。丁寧にご指導いただきありがとうございました。

2年間という短い期間でしたが、指導教授としてセミナー等でご指導いただき、研究テーマを継続させてくださった城宜嗣教授には深く感謝いたします。

実験、及び本論文の執筆、報告会、雑誌会、全てにおいて細やかにご指導いただきました月原 富武特任准教授、伊藤 (新澤) 恭子准教授に心からお礼申し上げます。先生の近くに在って非常に多くのことを学び、今後は学んだことを活かせるように頑張ります。4年間ありがとうございました。電子顕微鏡の使用あたり、丁寧にご指導いただきました細胞構造学分野の宮澤淳夫教授、西野有里さんには心から感謝いたします。ありがとうございました。

4年間の博士後期課程に於いて3年間は、京都大学生命科学系キャリアパス形成ユニットのゲーレ研の一員として研究に携わりました。全く何も知らない私にすべての実験の手順を親切・丁寧に教えていただきました Christoph Gerle 特任准教授には心より感謝いたします。ありがとうございました。また、京都大学生命科学系キャリアパスユニットの皆様にも感謝いたします。

見ず知らずの私に電子顕微鏡の使用を許可してくださり、また、ご指導して下さった名古屋大学の藤吉好則特任教授、谷一寿特任准教授、藤吉研究室の皆様には心から感謝いたします。ありがとうございました。

電子顕微鏡の操作や修理などでいつも迷惑をかけてしまった日本電子の小林一美特定研究員には心よりお詫び申し上げます。

実験の楽しさや、研究の難しさなどを一から教えて下さった日本大学大学院理工学研究科の長田洋子教授には特に感謝します。本当にありがとうございました。

いつも優しく声をかけてくださり、私の雑談にいつも笑顔で付き合ってくださいました石野恭子さんに心から感謝します。ありがとうございました。

同期の引田理英博士、ならびに矢野直峰博士には、実験で直接お世話になることはありませんでしたが、セミナー等の度に貴重な意見をいただき、大変勉強になりました。ありがとうございました。

最後になりましたが、これまで何の苦言もせず、遠く離れたところから暖かく見守り、背中を押し続け、励ましてくれた家族に深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

# 付録

## (i) 電子顕微鏡の使い方

### 1: 朝電源を入れるとき

- ① モニターの電源を入れる。
- ② 1 番または、5 番を選択する。
- ③ プログラムを入れる。
  - i Htset\_80
  - ii ht ボタンを押す。
  - iii load\_ht
  - iv run
  - v 80
  - vi 100
  - vii 1
  - viii 週明けの場合 20, 昼終わりの場 5
- ④ 待っている間にパソコンを起動 EMguest を選択。
- ⑤ 電圧安定後フィラメントボタンを押す。電子線が発射される。

### 2: 昼過ぎに使う場合

朝電源を入れるときと同様に行うこと。

### 3: 最後に電源を切断する場合

- ① 倍率を 800 倍まで落とす。
- ② 明るさを落とす。
- ③ スペースマンセレクターを 1 に戻す。
- ④ スペースマンポジション X, Y を 0 に戻す。
- ⑤ 対物レンズ絞りを右側にする。そうすると外れる。
- ⑥ フィラメントボタンを押す。電子線が発射されなくなる。
- ⑦ グリッドホルダーを外し、グリッドを出す。
- ⑧ グリッドを外した後、グリッドホルダーを電子顕微鏡本体にもどす。
- ⑨ Ht ボタンをおす。
- ⑩ キーボードの F7 ボタンを押しモニターのメイン画面にもどす。

- ⑪ モニターの電源を切断する。

#### 4: グリッドホルダーを電子顕微鏡に入れる場合

- ① グリッドを入れたグリッドホルダーを一段階電子顕微鏡本体に接続する。このとき真空ポンプがスタートするまでグリッドホルダーをしっかり持つこと。
- ② 突起が真空ポンプ本体の電源を入れバキュームがスタートされる。緑のランプが点灯
- ③ 真空になるとバキュームが自動的に停止。緑のランプが消える
- ④ 緑のランプが消えたことを確認してからグリッドホルダーを右側に回す。
- ⑤ グリッドホルダーを右回転させた後、さらに電子顕微鏡本体に入れる。このとき左手を使い、グリッドホルダーのスピードを調節する。

#### 5: グリッドホルダーを電子顕微鏡から外す場合

- ① グリッドホルダーをしっかり持ちゆっくりと外す。このとき、もう片方の手で電子顕微鏡本体を抑えること。
- ② 一段階外れたら左回転させる。そのため手の位置をしっかりと考えること。
- ③ 回転させたら完全にグリッドホルダーをはずす。このとき気持微調整させるとよい。ゆっくりと行うこと。

#### 6: グリッドを交換する場合

- ① 倍率を 800 倍に下げる。
- ② 明るさを下げる。
- ③ スペースマンセレクターを 1 から 2 に変更する。

#### 7: 途中で止める場合

- ① 倍率を 800 倍に下げる。
- ② 明るさを下げる。
- ③ フィラメントボタンを押す。
- ④ Ht ボタンを押す。この順番が重要。
- ⑤ 電子顕微鏡の窓を元に戻す。

#### 8: CL の軸合わせ

- ① MAG2 スイッチを押し基本倍率 5k に設定する。
- ② Spot size スイッチでスポットサイズを 1 に設定する。
- ③ Brightness つまみを反時計一杯より時計を方向に回してゆくと蛍光板上に明

るいスポットが確認できるが、途中で明るさが中止により逃げてゆくような現象がおこる。(固定絞りの影)

もし蛍光板上に何の明るさも見えない時は、wobbler 'gun align'スイッチを入れ、'gun shift'スイッチを入れ def Y つまみで輝度を最高にし、'gun align'スイッチを切り def X つまみで再度輝度を最高にする。次に、'gun tilt'スイッチを押し、def X, Y つまみで輝度を最高にする。

- ④ 固定絞りの影が現れたら'gun shift' スイッチを押し、def X, Y つまみを可変し明るさを蛍光板の中心に戻す。その途中で暗くなる場合'gun tilt' スイッチを押し def X, Y つまみで明るくする。
- ⑤ Spot size スイッチで spot size を 5 に設定する。Brightness つまみを可変し、明るさを収束させ、それを蛍光板中心に shift X, Y で持ってくる。
- ⑥ Spot size 1 では'gun shift'を押し def X, Y で spot size 5 で shift X, Y で明るさを蛍光板の中心に持ってくる。  
操作中に暗くなるようであれば、'gun tilt'スイッチを押し、def つまみで明るさを最高になるように調節する。
- ⑦ Spot size および brightness つまみを可変しても明るさが蛍光板より逃げなくなれば照射系軸合わせは完了する。

## 9: 電圧軸調整

- ① 倍率を 10 万倍に合わせる。
- ② スポットサイズを 2 または 3 に合わせる。
- ③ 試料を挿入する。この試料はできれば金属などのコントラストの強いものが望ましい。
- ④ ブライツネスで蛍光板一杯にビームを広げる。
- ⑤ 目標物を蛍光板の中心に持って行き、フォーカスを完全に合わせる。
- ⑥ Wobbler HT ボタンを押し高圧を周期的に変化させる。
- ⑦ レンズ中心にビームが入っていない場合、像が中心より外側へ逃げる。この場合電圧軸のずれが生じていることになる。
- ⑧ BRT.tilt ボタンを押し、DEF X, Y つまみで像が外側でずれない位置にビームを持ってくる。
- ⑨ Wobbler HT ボタンを押し高圧変化を止める。

- ⑩ ブライトネスつまみでビームをめいっぱい収束させ、蛍光板の中心にあることを確認する。

この調節が完全でない場合、非点調節をするとさらに像をゆがめることになるため毎回行うことが望ましい。

#### 10: CL 非点補正

- ① 倍率を 5k または、MAG2 スイッチを押す。
- ② Spot size を 2 または 3 に合わせる。
- ③ Brightness つまみで明るさを集束した位置より少し左または右に回してみると、非点収差がある場合は、beam が線状になる。
- ④ ‘cond stig’スイッチを押し def X, Y つまみで線状スポットが真円に近くなるように補正する。非点補正が完了すると brightness つまみを可変しても明るさが真円のまま大きくなったり小さくなったり発散する。フィラメント像がシャープに見えるように def X, Y で補正する方法でもよい。

#### 11: フィラメント像の出し方

これまでの軸合わせで‘gun tilt’の def つまみは蛍光板上での明るさが最高になるように調整してきたが、より精密に‘gun tilt’の def つまみを調整するには、フィラメント像を蛍光板上に出して調整する必要がある。

- ① ここでは、あくまで軸合わせが完了していることが条件である。フィラメント像の大きさは、spot size と倍率によって変わってくるのでこの両方でフィラメント像の大きさをちょうど見やすい大きさにする（経験上 800 倍がいい）  
brightness つまみで明るさを最も収束する。
- ② Filament つまみを飽和点の位置から反時計回りにゆっくり回していくと、フィラメント像が蛍光板上に現れる。

LaB6 フィラメントを使用している場合は、‘bias mode’スイッチで gun bias 値をあげて行う

Filament つまみをその位置で止める。もしこの像が鮮明でない場合には brightness つまみで最も鮮明になるように調整する。それでも像が鮮明にならない時には、‘cond stig’スイッチを押し def X, Y つまみも使用して鮮明になるようにする。

- ③ フィラメント像が左右上下対称になるように‘gun tilt’スイッチを押し、def X, Y つまみで調整する。調整していく過程でフィラメント像が消えてしまうこ

とがある。この時は、filament つまみを時計方向に少し回す。

- ④ フィラメント像を対称にすることができたならば、filament つまみを side spot と center spot の三つが一緒になり、間に陰の部分がなくなる位置 (飽和点)まで、時計方向に回す。

## 3-3-2. 真空蒸着機

### Jeol jem 200 改

- ① メインスイッチを入れる。
- ② V5 を閉じる。
- ③ RP のスイッチを入れる。最初はボコボコなり、それがとまるまで待つ。
- ④ DP のスイッチを入れる。ポンプのグリーンロードインジケーターが上昇して再び下降するまで待つ。
- ⑤ 下降したら V2 を開ける。グリーンロードインジケーターが消えるまで待つ。

#### 1: ベルジャーを開ける

- ① V1、V3、V5 は閉じている。V2 はあいている。
- ② V4 ベルジャーバルブをシューという空気が入る音がするまで開ける。そのまま少しずつ開けていく。
- ③ 安全カバーをはずし、ベルジャーを慎重に外す。
- ④ マイカとタイルをセットしてベルジャーと安全カバーを元に戻す。
- ⑤ V4 ベルジャーバルブをやさしく閉める。

#### 2: ベルジャーを真空にする

- ① V2 を閉める。
- ② V3 を少しずつ開ける。ボコボコ音がするまで開けてそのあと少しずつ開ける。
- ③ バキュームゲージのグリーン READY ランプが点灯するまで待つ。
- ④ V3 を閉じる。
- ⑤ V2 を開ける。
- ⑥ V1 メインバルブを開ける。
- ⑦ 2時間くらい待つ。そうすると中の真空状態が良くなる。少なくとも  $1 \times 10^{-3}$  くらいになるまで待つ。

⑧ 液体窒素を入れ、バキュームゲージが  $1 \times 10^{-4}$  に達するまで待つ。

### 3: カーボン蒸着する

- ① ヒータースイッチを入れる。
- ② チャネル2にする。
- ③ ハンドルをゆっくり回す。
- ④ 電流値と圧力値に注意しながら少しずつ上げる。
- ⑤ 電流計の針がチクチクしだしたら蒸着がスタートしている。
- ⑥ ヒータースイッチを切る。

### 4: カーボン膜をベルジャーから取り出す

- ① V1 メインバルブを閉める。
- ② V4 ベルジャーバルブをゆっくり少しずつ開ける。
- ③ ベルジャーと安全カバーを外す。
- ④ カーボン膜を取り出し、ベルジャーを元に戻す。
- ⑤ V4 を閉じる。
- ⑥ V2 を閉じる。
- ⑦ V3 をゆっくりとボコボコ言うまで開ける。
- ⑧ グリーンバキュームゲージのグリーン READY ランプが点灯するのを待つ。
- ⑨ V3 を閉じる。
- ⑩ バキュームゲージを切る。
- ⑪ V2 を開ける。
- ⑫ DP を切る。タービンが停止するまで最低でも5分は待つ。
- ⑬ V2 閉じる。
- ⑭ RP を切る。
- ⑮ V5 をシューという音がするまで開ける。
- ⑯ メインスイッチを切る。

### Jeol jem420T

- ① スタートアップボタンを押す。自動的に減圧作業が開始される。まず、RP により荒引きされる。操作盤のところにある''Rough''が点灯し終了すると消えて''Fine''が点灯する。



- ② Fine が点灯すると、DP によりベルジャー内が高真空状態になる。この時間がだいたい 20～30 分くらいかかるために、その間に、カーボンロッドとマイカを用意しておくといよい。また、スタートアップしてから 20～30 分はベルジャー内を解放してはいけない。
- ③ 20～30 分経過したのち”VENT”ボタンを押す。押すとベルジャー内が解放される。少し待つ。カーボンロッドを爪にセットする。この時注意することは、この機械の爪は、安定しないためカーボンロッドが折れやすい。また、蒸着作業中にカーボンロッドがずれることがある。これを防ぐためには、カーボンロッドを若干左上にセットすることが大事である。
- ④ セットしたら、ベルジャーを慎重に戻して安全カバーをセットする。そして、”EVAC”ボタンを押す。これにより減圧が開始される。30 分くらいで真空状態は  $1 \times 10^{-4}$  ほどになる。真空状態がいいことを確認してから液体窒素を入れる。
- ⑤ ”Heat”ボタンをおしてチャンネル 2 にしてからハンドルを回し電流を上げる。
- ⑥ 終了するときには、真空状態が最低でも High のランプが点灯している状態まで減圧してから”stop off”ボタンを押す。その後、10 分は動き続けるが停止する。

### 3-3-3. カーボンロッドの削り方

#### 方法－①

- ① カーボンロッドを図のように削る。以下のように削り出した場合、印可する電流が少なくて済みガスの放出がかなり抑えられる。しかし、使用回数は一度のみである。



- ② マイカを選択する。マイカは、光に透かしニュートンリングの見えないものが良いと考えられる。
- ③ マイカを割るときは、ピンセットの先端を合わせて一気に割る。
- ④ ベルジャーをかぶせ真空を引く。
- ⑤ 真空度が Low の 2 を下回ったらヒーターのスイッチを入れ加熱する。電流の

強さは 20A にする。

- ⑥ 加熱を 5 分くらいすることでカーボンロッド内のガスがほぼなくなる。
- ⑦ ヒーターのスイッチを切る。真空度が Low の 1 を下回るまで 30 分程待つ。
- ⑧ 真空度が安定したらヒータースイッチを入れ加熱を開始する。
- ⑨ 20A 位まで上げカーボンロッドの温度が一定になるまで待つ。
- ⑩ その後 30A までゆっくり上げる。
- ⑪ 大体 25A ほどでカーボンが蒸発を始める。
- ⑫ 必要な厚さになったところで加熱を止める。

## 方法－②

- ① カーボンロッドを図のように削る。以下のように削り出した場合、蒸着に高い電流を必要とし、それにより多くのガスが放出される。その為真空度が悪くなりやすくスパークが発生しやすい。しかし、この方法で削り出した場合数回使用できる利点がある。



- ② マイカを選択する。マイカは、光に透かしニュートンリングの見えないものが良いと考えられる。
- ③ マイカを割るときは、ピンセットの先端を合わせて一気に割る。
- ④ ベルジャーをかぶせ真空を引く。
- ⑤ 真空度が Low の 2 を下回ったらヒーターのスイッチを入れ加熱する。電流の強さは 25A にする。
- ⑥ 加熱を 10-15 分くらいすることでカーボンロッド内のガスがほぼなくなる。
- ⑦ ヒーターのスイッチを切る。真空度が Low の 1 を下回るまで 30 分程待つ。
- ⑧ 真空度が安定したらヒータースイッチを入れ加熱を開始する。
- ⑨ 20A 位まで上げカーボンロッドの温度が一定になるまで待つ。
- ⑩ その後 35A までゆっくり上げる。
- ⑪ 大体 34A ほどでカーボンが蒸発を始める。
- ⑫ 必要な厚さになったところで加熱を止める。