

## 蛋白質結晶学研究室

<スタッフ> 栗栖 源嗣（教授） 川本 晃大（准教授）

<研究のキーワード>

- （１）結晶構造解析 （２）電子顕微鏡構造解析 （３）NMR 分光法  
（４）光合成電子伝達 （５）分子モーター （６）金属タンパク質

<令和 6 年度の主な研究活動概要>

我々の研究室では、結晶学の手法開発と並行して蛋白質複合体の構造を解析し、立体構造に基づいて分子機能を理解する事を目指している。最近では、結晶構造をベースに NMR やクライオ電子顕微鏡、等温滴定熱測定などを併用した相関構造解析にも取り組んでいる。「光合成電子伝達」「分子モーター」「金属タンパク質」をキーワードに、以下のような研究プロジェクトが進行中である。令和 6 年度は、(1) ピレノイドを構成する新規因子 PyShell の構造解析、(2) フェレドキシン取り込みシステムを通じた Pectocin M1 の分子認識機構の解析、(3) ワニのヘモグロビンがもつ特徴的なアロステリック制御機構の解析、について研究を行った。

### (1) ピレノイドを構成する新規因子 PyShell の構造解析

珪藻が持つ葉緑体は、CO<sub>2</sub> 固定化酵素であるルビスコが中心部に緩やかに集合した「ピレノイド」と呼ばれる構造体を作る。このピレノイドを構成するタンパク質として Pyrenoid Shell (PyShell) を発見した。組換え体 PyShell の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて観察したところ、自律的にチューブ構造やシート状の構造を作っていた。チューブの周期性を利用して 2.4Å 分解能で PyShell の立体構造を決定した。PyShell は C 末端が突き出した特徴的な構造をしており、この C 末端が分子同士を繋ぎ合わせてチューブやシートを形成することが分かった。さらに凍結した葉緑体をトモグラム撮影したところ、自己重合した PyShell と同じ構造体と思われるシート状構造を確認できた。クライオ電子線トモグラフィーの手法を用いて細胞内の PyShell 構造を 20Å 分解能で解析したところ、分子の繰り返しの周期性が、2.4Å 分解能で解析した組換え体 PyShell のものと完全に一致することを示した (図 1)。珪藻は海水中に豊富に存在する重炭酸イオンを積極的に取り込んで CO<sub>2</sub> 固定すると考えられる。PyShell による正常なピレノイド構造の構築が、ルビスコへの CO<sub>2</sub> 供給に必須であることが示された<sup>1</sup>。

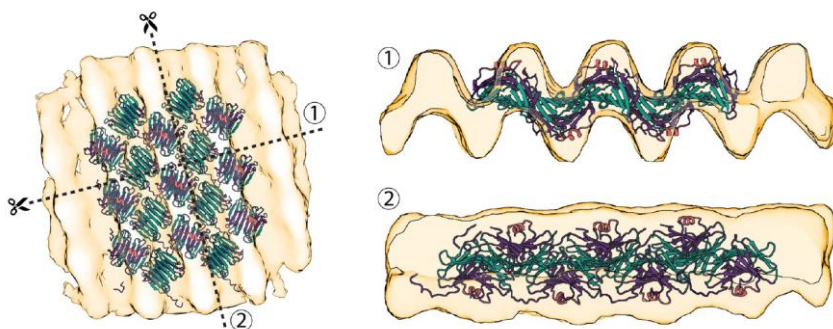
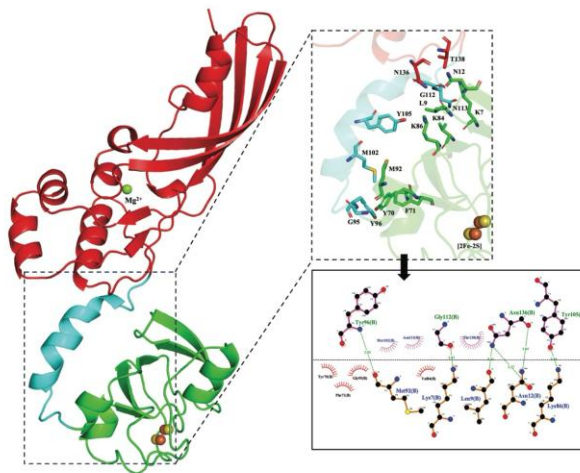


図 1. PyShell の細胞内構造 (20Å) に組換え体の構造 (2.4Å) を当てはめた図

## (2) フェレドキシン取り込みシステムを通じた Pectocin M1 の分子認識機構の解析

*Pectobacterium* 属の細菌は、植物の軟化腐敗を引き起こす原因菌であり、野菜や花卉の栽培現場において大きな被害を引き起こす。宿主植物に感染すると細菌特有のフェレドキシン (Fd) 取り込みシステム (Fus) を介して、植物がもつ Fd を選択的に細胞内に取り込み、生育に必須の鉄分を盗んでいる。また、類縁菌に対して抗菌活性を示す Pectocin M1 を分泌し、類縁菌に Fus システムを介して取り込ませることで類縁菌を殺すことが知られている。Fus システムのうち外膜に存在する膜タンパク質 FusA と Pectocin M1 の複合体構造が解析されていないため、その分子認識の詳細な議論ができていない状況であった。そこで *Pectobacterium carotovorum* 由来 Pectocin M1 の結晶構造を 2.04 Å で解析した<sup>2</sup>。N 末端から植物型 Fd と配列相同性の高い Fd ドメイン、 $\alpha$ ヘリックスリンカー、触媒活性ドメインが繋がった構造をしており、FusA による Pectocin M1 の認識においては、 $\alpha$ ヘリックスリンカーの柔軟な構造が Pectocin M1 を FusA を介して細胞内に取り込ませる構造要因であると考察した。

図 2. Pectocin M1 の結晶構造



## (3) ワニのヘモグロビンがもつ特徴的なアロステリック制御機構の解析

ヘモグロビン 4 量体は酸素がヘムに結合すると、4 量体が R 型構造をとり、酸素が外れると T 型構造をとることが知られていた。この構造の変化は、ほとんどの脊椎動物において有機リン酸の作用によってアロステリックに制御される。しかし唯一ワニは、有機リン酸の作用を受けることなく、重炭酸イオンの作用を受けることが 40 年以上前に報告されていた。この重炭酸イオンの作用のおかげで、ワニは長時間潜水しても酸素を供給することができる。ワニに特有な重炭酸イオンの作用の仕組みを明らかにするために、ワニのヘモグロビンの立体構造を分子レベルで解析し 2.2 Å 分解能で構造を決定することに成功した。T 型構造をとったデオキシ状態のワニのヘモグロビンの立体構造から、ヘモグロビン 4 量体の  $\alpha$  サブユニット、 $\beta$  サブユニットの界面に合計 2 分子の重炭酸イオンが結合することが明らかになり、その結合部位はワニのヘモグロビンが独自に獲得したものであることがわかった<sup>3</sup>。

<参考文献>

1. Shimakawa, G.; Demulder, M.; Flori, S.; Kawamoto, A.; Tsuji, Y.; Nawaly, H.; Tanaka, A.; Tohda, R.; Ota, T.; Matsui, H.; Morishima, N.; Okubo, R.; Wietrzynski, W.; Lamm, L.; Righetto, R.D.; Uwizeye, C.; Gallet, B.; Jouneau, P.H.; Gerle, C.; Kurisu, G.; Finazzi, G.; Engel, B.D.; Matsuda, Y. *Cell* **2024**, *187*, 5919-5934.
2. Jantarit, N.; Tanaka, H.; Lin, Y.; Lee, Y.H.; Kurisu, G. *FEBS Open Bio.* **2024**, *14*, 1731-1745.
3. Takahashi, K.; Lee, Y.; Fago, A.; Bautista, N.M.; Storz, J.F.; Kawamoto, A.; Kurisu, G.; Nishizawa, T.; Tame, J.R.H. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 6505.