

高分子構造科学研究室

<スタッフ> 今田 勝巳 (教授) 金子 文俊 (准教授) 川口 辰也 (講師)
竹川 宜宏 (助教)

<研究のキーワード>

- | | | |
|--------------|-----------|-----------|
| (1) 生体高分子複合体 | (2) 超分子機械 | (3) 細菌べん毛 |
| (4) 蛍光蛋白質 | (5) 酵素 | (6) 構造解析 |

<令和5年度の主な研究活動概要>

当研究室では、細菌べん毛システムや蛋白質分泌装置の構造・機能解析を中心に生体高分子でできた分子機械の作動原理の研究を行っている。また、合成高分子と低分子の複合体構造と物性を主にX線・中性子回折、赤外分光法により研究している。令和5年度は、(1) 緑色蛍光蛋白質 (GFP) から人工的に作成した赤色蛍光蛋白質 (RFP) の構造、(2) L-グルタミン酸酸化酵素 (LGOX) の構造、(3) べん毛分泌装置蛋白質FliH6量体の構造変化についての研究を行った。

(1) 緑色蛍光蛋白質(GFP)から人工的に作成した赤色蛍光蛋白質(RFP)の構造¹

蛍光蛋白質は、特定の蛋白質の発現・分布・相互作用といった細胞中の様々な情報を生きたまま取得するためのマーカーやセンサーとして使われ、現代の生物・医学研究では不可欠なツールである。中でも赤色光は生体透過性が高く細胞毒性も低いため、組織や臓器の観察や長時間観察に適するが、天然の RFP は蛍光が弱く、改変しても暗いものしかできない。蛍光発色団は、蛍光蛋白質内部で自己触媒反応で自発的にできるが、RFP の発色団 (図2右) は GFP の発色団 (図2左) と構造が大きく異なる。GFP と RFP は進化的に大きく離れており、GFP を RFP に改変することも、発色団の違いを生み出す要因も不明であった。我々は、アザミサングの GFP (AG) に多数の変異を導入して RFP 化 (AR1.0) することに成功し、変異したアミノ酸を一つずつ元の AG のアミノ酸に戻すことで、赤色発色団形成に重要なアミノ酸を特定した。そして、X 線結晶構造解析により AG と AR1.0 の立体構造を詳しく調べ、構造の違いから赤色発色団形成に必要な蛍光蛋白質内部のアミノ酸配置を明らかにした (図2)。

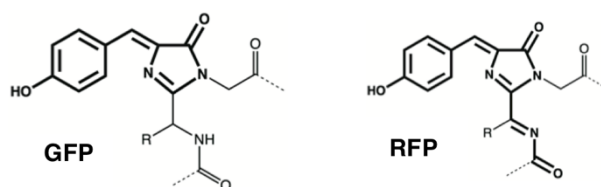


図1 蛍光蛋白質の発色団の構造

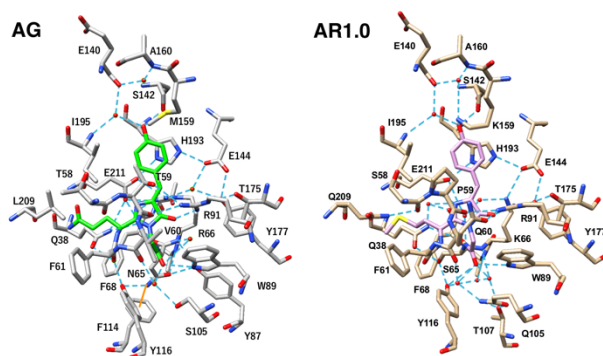


図2 発色団周辺の構造

(2) L-グルタミン酸酸化酵素 (LGOX) の構造

蛇毒、魚類の粘膜、放線菌類の分泌物に含まれるLアミノ酸酸化酵素は、Lアミノ酸の酸化的脱アミノ化を触媒するフラビン酵素である。Lアミノ酸酸化酵素は一般に基質特異性が低いが、放線菌由来 L-グルタミン酸酸化酵素 (LGOX) は L-グルタミン酸のみに活性を示し、グルタミン酸定量に用いられる。酸性アミノ酸であるグルタミン酸を基質として結合するにも関わらず、LGOX の推定基質結合部位にアスパラギン酸やグルタミン酸といった酸性残基があることから、LGOX の基質認識機構は謎であった。我々は、L-グルタミン酸を結合したLGOXの構造を解明し (図3)、L-グルタミン酸と直接結合するアルギニン残基の側鎖の向きをこれら酸性残基が固定することで厳密な基質特異性が発揮されることを明らかにした (図4)。

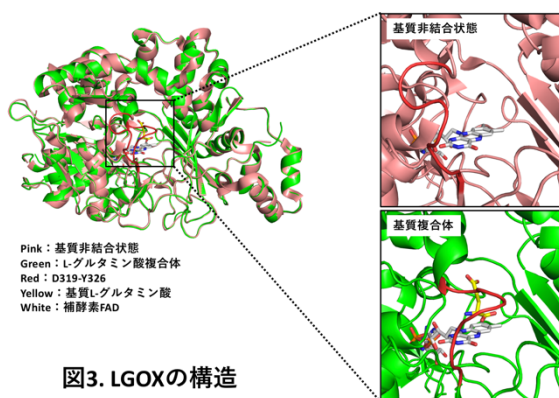


図3. LGOXの構造

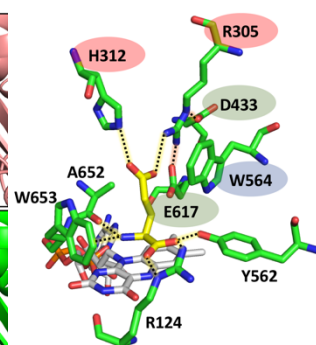


図4. LGOXの基質結合部位

(3) べん毛分泌装置蛋白質 Flii6 量体の構造変化

細菌べん毛を形成する蛋白質は、べん毛根元にある輸送装置により菌体外へ輸送される。輸送装置は輸送ゲートと輸送 ATPase で構成され、輸送 ATPase の主要部は ATP 加水分解能を持つ FliI 蛋白質 6 量体で構成される。我々は、FliI 6 量体の構造をクライオ電子顕微鏡を用いて、動的構造変化を高速 AFM を用いて観察し、基質アナログと Mg の結合解離により 6 量体リング構造の開閉が起こることを明らかにした (図5)。

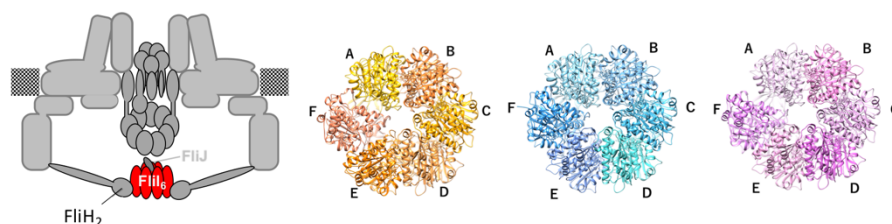


図5. Flii6量体リング構造と構造変化

<参考文献>

1. Imamura, H.; Otsubo, S.; Nishida, M.; Takekawa, N.; Imada, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2023**, *120*, e2307687120