

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成23年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	水から水素発生するラン藻モデル細胞創成に必要な光合成レドックス代謝ネットワークの完全理解
研究機関・ 部局・職名	大阪大学・蛋白質研究所・教授
氏名	栗栖源嗣

1. 当該年度の研究目的

緑藻型[FeFe]ヒドロゲナーゼに関しては、高活性を示す[FeFe]ヒドロゲナーゼ単体の立体構造解析を先行して推進することで、光駆動型水素発生に必須の蛋白質安定性に関する知見を得ることを目的とする。光化学系 I 複合体(PS1)については、常温性ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 株由来の PS1 を用いて PS1 と Fd 複合体の良質な単結晶を再現性よく得ることが出来るよう集中して研究を進めることで、次年度以降の迅速な構造研究の礎を築くことを目的とする。Fd とグルタミン酸合成酵素複合体については、網羅的に結晶化条件の検索を展開する。グルタミン酸合成酵素も、結晶化が困難な分子量が大きい酵素タンパク質である。全体計画を推進する上で極めて重要な単結晶を再現性良く得る実験を平成23年度に精力的に推進し、次年度以降の進展を確かなものとするを目的とする。

2. 研究の実施状況

フェレドキシン (Fd) 依存性 [FeFe]ヒドロゲナーゼ (CrHydA1) に関しては、嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum* をホストとした大量発現系により、高活性な CrHydA 組換え体を再現性よく得る事に成功している。CrHydA1 単体および Fd との複合体の双方で結晶化スクリーニングを行っているが、現在までの所、構造解析可能な結晶は得られていない。光化学系 I 複合体 (PS1) に関しては、常温性ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 が持つ PS1 単独での結晶化を先行して進めてきた。0.6 mm 程度の比較的大型の単結晶を再現性良く得る事に成功し、放射光を用いた回折実験を行って 7.5Å 分解能で構造解析を行った。ゲノム情報から推察された通り PsaX サブユニットを欠損している事や、PsaK サブユニットが分子間接触に重要である事などの知見を得ている。また、PS1 と Fd との複合体結晶化は、好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongates* BP-1 が持つ PS1 と Fd で行っており、現在、大型結晶を得るべく精力的に結晶化実験を行っている。グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) に関しては、プロジェクトで購入した自動化装置を用いて網羅的に結晶化条件を検討した結果、良質な単結晶を得る事に成功した。2.65Å 分解能で構造解析を行った結果、配列情報から予想されていた Fd-loop と呼ばれる領域ではなく、GOGAT の [3Fe-4S] クラスタに近い領域に Fd が結合する事が判った。また、glutaminase 反応を行う部位と 2-iminoglutarate 還元反応を行う部位とを繋ぐ分子内チャンネルの形成が、Fd 結合により誘起されることも明らかとなった。この事は、Fd との複合体形成に 2 つの活性中心を同期させる役割があり、複合体形成がアンモニアの効率的な分子内輸送を制御している可能性を示唆するものである。(644字)

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計5件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計4件 Shinmura K, Muraki N, Yoshida A, Hase T, <u>Kurusu G</u>. Crystallization and preliminary X-ray studies of an electron-transfer complex of ferredoxin and ferredoxin-dependent glutamate synthase from the cyanobacterium <i>Leptolyngbya boryana</i>. <i>Acta Cryst. Sect F</i> (2012) 68, 324-7. Kon T, Oyama T, Shimo-Kon R, Imamula K, Shima T, Sutoh K, <u>Kurusu G</u>. The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain. <i>Nature</i> (2012) 484, 345-50 Kon T, Sutoh K, <u>Kurusu G</u>. X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain. <i>Nature Struct Mol Biol.</i> (2011) 18, 638-42 Shimegi T, Takusagawa Y, Ohtsuki T, Noda S, <u>Kurusu G</u>, Kusunoki M, Ui S. Construction of a tailor-made L (2S,3S)-butanediol dehydrogenase by exchanging domains between native structural analogs. <i>Protein Pept Lett.</i> (2011) 18, 825-30. (掲載済み一査読無し) 計0件 (未掲載) 計1件 Sakakibara Y, Kimura H, Iwamura A, Saitoh T, Ikegami T, <u>Kurusu G</u>, Hase T. A new structural insight into differential interaction of cyanobacterial and plant ferredoxins with nitrite reductase as revealed by NMR and x-ray crystallographic studies. <i>J Biochem.</i> (2012) published in May 2012</p>
<p>会議発表 計6件</p>	<p>専門家向け 計6件 <u>Genji Kurisu</u> 「X-ray structure of a functional full-length dynein motor domain」 Madrid, 22nd Congress, 2011, 8/22-30, International Union of Crystallography <u>栗栖源嗣</u> 「暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素の結晶構造－蛋白質の構造と分子進化－」 兵庫県立大学, 第49回年会, 2011年9月16-18日, 日本生物物理学会 <u>Genji Kurisu</u>, 「Structure-function of the Dark-operative Protochlorophyllide Reductase -Evolutionary implications-」 国立台湾大学, 第10回会議, 2011年11月8日, 台湾結晶学会 大山拓次, 昆隆英, 下-昆理恵子, 須藤和夫, <u>栗栖源嗣</u> 「細胞質ダイニンモータードメインの結晶構造」 北海道大学, 平成23年度年会, 2011年11月24-25日, 日本結晶学会 新村加奈子, 村木則文, 吉田綾子, 長谷俊治, <u>栗栖源嗣</u> 「Structural analysis of the electron transfer complex between cyanobacterial Fd and Fd-GOGAT」 京都産業大学, 第53回年会, 2012年3月16-18日, 日本植物生理学会 新村加奈子, 村木則文, 長谷俊治, <u>栗栖源嗣</u> 「X-ray Structure of the Electron Transfer Complex between Ferredoxin and Ferredoxin-dependent Enzyme」 慶應日吉キャンパス, 日本化学会公開シンポジウム, 2012年3月25-28日, 日本化学会主催 一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>大阪大学・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next 大阪大学大型教育研究プロジェクト支援室・最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>大阪大学×大阪ガス「アカデミックッキング」vol.11 「ようこそ！タンパク質ワンダーランド」 2011年8月5日, 大阪ガスクッキングスクール千里にて開催, 小学生と保護者対象, 参加人数40名 料理の材料を題材に, 料理教室に併せて身近に利用されているタンパク質や酵素について講演を行った,</p>

様式19 別紙1

新聞・一般雑誌等掲載 計4件	平成23年8月23日 毎日小学生新聞「タンパク質, 食べて学んで」 平成24年3月8日 産経新聞「細胞内の物質運び屋タンパク質構造解明」 平成24年3月10日 読売新聞「運び屋タンパク質構造解明」 平成24年3月11日 日刊工業新聞「細胞運動担う分子モーター阪大が原子構造解明」
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	135,000,000	61,900,000	0	73,100,000	0
間接経費	40,500,000	18,570,000	0	21,930,000	0
合計	175,500,000	80,470,000	0	95,030,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	61,700,000	0	0	61,700,000	61,700,000	0	0
間接経費	18,570,000	0	0	18,570,000	342,298	18,227,702	0
合計	80,270,000	0	0	80,270,000	62,042,298	18,227,702	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	55,310,180	タンパク質結晶化自動化装置、実験試薬等
旅費	2,666,370	研究成果発表旅費等
謝金・人件費等	3,546,430	博士研究員人件費等
その他	177,020	シーケンス解析委託費等
直接経費計	61,700,000	
間接経費計	342,298	
合計	62,042,298	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
Ni-NTA Agarose	キアゲン(500ml)	1	529,872	529,872	2011/4/20	大阪大学
超音波ホモジナイ ザー	BRANSON社製	1	822,150	822,150	2011/4/26	大阪大学
嫌気性チャンバー・ ガスアナライザー	COY社製	1	2,220,750	2,220,750	2011/7/29	大阪大学
低温低湿制御シス テム	サンヨー社製	1	4,307,310	4,307,310	2011/8/11	大阪大学
タンパク質結晶化 卓上型自動化シス テム	Rigaku社製	1	21,000,000	21,000,000	2012/1/16	大阪大学
タンパク質結晶化 ロボット	嫌気チャンバー 向け(古河機械)	1	12,705,000	12,705,000	2012/2/24	大阪大学