

課題番号	GSO16
------	-------

**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24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、引き続き高活性試料の調整法確立を目指す。光化学系 I 複合体(PS1)については、Fd との共結晶化の再現性を上げることに継続して取り組む。その戦略としては、PS1 と Fd との複合体結晶化に、鉄硫黄クラスターの Fe を電子伝達活性のない Ga に置換した再構成 Fd を用いることで安定な複合体を得ることを目指す。また並行して、Ga 置換体 Fd がどの程度 Native Fd の代替えとなりうるのか、その結晶構造解析を進める。Fd とグルタミン酸合成酵素複合体については、平成23年度中に複合体結晶を得ることに成功している。現在までに2.65 Å 分解能の回折強度データの収集に成功しているので、Fd とグルタミン酸合成酵素の複合体結晶の構造を精密化すると共に、種々の阻害剤との共結晶化にも取り組んで、より高分解能で窒素同化酵素の電子分配のメカニズムを明らかにする。

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* をホストとして発現させた比較的高活性の試料を用いて結晶化を行ったが、混在する活性を持たない apo 型 CrHydA1 のみが結晶化してしまい、活性型 CrHydA1 の結晶を得る事は出来ていない。そこで、嫌気性の緑色光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum* を用いて CrHydA1 の発現を試みた。再現性よく大量の組換え体を得る事に成功しているが、水素発生活性が低いので引き続き、金属クラスター成熟化遺伝子の導入等の発現系の改良を試みる。光化学系 I 複合体 (PS1) に関しては、好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongates* BP-1 が持つ PS1 と Fd とで結晶化を行っている。Ga 置換体 Fd が Native Fd の代替えとなり得るかどうかを定量的に評価するため、Ga 置換体 Fd の結晶構造解析も行った。1.60 Å 分解能での構造解析の結果、主鎖レベルで rmsd=0.29 Å と極めてよく似た立体構造をとり、十分に野生型の代替えとなり得る事が判明した。現在、Ga 置換体 Fd を用いて複合体結晶を高分解能化す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。継続的な分解能改善努力の結果、現在では 2.0 Å 分解能で構造解析を完了している。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中には、水分子が整列して配置されており、Fd 結合により誘起されたチャンネル形成が2つの活性中心を同期させ、実際に分子内輸送を可能にしている事を示す結果である。(626字)

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計4件</p>	<p>Sakakibara Y, Kimura H, Iwamura A, Saitoh T, Ikegami T, <u>Kurisu 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) <b>151</b>, 483-492</p> <p>Twachtmann M, Altmann B, Muraki N, Voss I, Okutani S, <u>Kurisu G</u>, Hase T, Hanke GT. N-terminal structure of maize ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase determines recruitment into different thylakoid membrane complexes. <i>Plant Cell</i>, (2012) <b>24</b>, 2979-2991</p> <p>Liauw P, Mashiba T, Kopczak M, Wiegand K, Muraki N, Kubota H, Kawano Y, Ikeuchi M, Hase T, Rögner M, <u>Kurisu G</u>. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray studies of the ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup> reductase from the thermophilic cyanobacterium <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1. <i>Acta Cryst. F</i> (2012) <b>68</b>, 1048-1051</p> <p>Narikawa R, Ishizuka T, Muraki N, Shiba T, <u>Kurisu G</u>, Ikeuchi M. Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. <i>PNAS</i> (2013) <b>110</b>, 918-923</p> <p>(掲載済み一査読有り) 計4件</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計0件</p> <p>(未掲載) 計0件</p>
<p>会議発表 計4件</p>	<p>久保田寿子, 和田元, 栗栖源嗣「Synechocystis sp. PCC6803 光化学系 I 複合体の6.1Å分解能におけるX線構造解析」東京工業大学, 第3回年会, 2012年6月1-2日, 日本光合成学会</p> <p>真下忠彰, 福西快文, 神谷成敏, 福田育夫, 米澤康滋, 昆隆英, 栗栖源嗣, 中村春木「GPU を利用した Zero-dipole summation 法による静電相互作用の高速計算」名古屋国際会議場, 第12回年会, 2012年6月20-22日, 日本蛋白質科学会</p> <p>三角将輝, 坂本順司, 栗栖源嗣「シトクロム bd 複合体の結晶学的研究」東北大学, 平成22年度年会, 2012年10月25-26日, 日本結晶学会</p> <p>Kanako Shinmura, Norifumi Muraki, Toshiharu Hase, <u>Genji Kurisu</u>, 「Structural analysis of the electron transfer complex between Ferredoxin and Ferredoxin-dependent glutamate synthase」, Adelaide Convention Centre, Asian Crystallographic Association 2012, 2012.12.2-6, Adelaide Australia</p> <p>専門家向け 計4件</p> <p>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</p> <p>(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 <a href="http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next">http://www.osaka-u.ac.jp/ja/research/program_next</a></p> <p>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 <a href="http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html">http://www.lserp.osaka-u.ac.jp/index_jisedai.html</a></p>

様式19 別紙1

<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.23 「ようこそ！タンパク質ワンダーランド」 2012年8月8日、大阪ガス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>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計2件</p>	<p>平成24年8月11日 産経新聞 「料理から学ぶ」 平成24年8月15日 電機新聞 「親子で知ろう タンパク質」</p>
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成24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	35,200,000	37,900,000	0
間接経費	40,500,000	18,570,000	10,560,000	11,370,000	0
合計	175,500,000	80,470,000	45,760,000	49,270,000	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	0	35,200,000	0	35,200,000	35,200,000	0	0
間接経費	18,227,702	10,560,000	0	28,787,702	10,478,482	18,309,220	0
合計	18,227,702	45,760,000	0	63,987,702	45,678,482	18,309,220	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	22,281,221	タンパク質観察自動化システム、実験試薬等
旅費	1,673,030	データ解析、研究成果発表等
謝金・人件費等	10,627,727	研究員人件費
その他	618,022	シーケンス解析委託費等
直接経費計	35,200,000	
間接経費計	10,478,482	
合計	45,678,482	

## 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
ガラスプレート整列型 分注	FHDM1-SGP	1	724,500	724,500	2012/5/7	大阪大学
グロースチャンパー	MLR-352	1	892,500	892,500	2012/9/26	大阪大学
タンパク質観察自動 化システム	GalleryDT	1	10,500,000	10,500,000	2012/10/29	大阪大学