

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 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されません

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、共同研究者によって apo 型酵素をベースに高活性の holo 型酵素を人工合成する手法が開発された(*Nature Chem. Biol.* 2013)。この手法を用いて複合体の立体構造解析を推進し、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、Gaに置換した再構成Fdを用いることで安定な複合体結晶の作成に成功したので、引き続き高分解能化を目指す。また並行して、Ga置換体Fdがどの程度NativeFdの代替えとなりうるのか、機能解析を進める。Fdとグルタミン酸合成酵素複合体については、平成24年度中に2.0Å分解能での複合体構造解析に成功している。基質結合に伴う構造変化を議論するため、3種類の基質が順に結合した状態での構造が求められており、種々の阻害剤との共結晶化に取り組み複合体形成に伴う構造変化の全容を明らかにする。

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、緑色光合成細菌 *Chlorobaculum tepidum*を用いて、嫌気状態で大量の組換え体を得る事に成功し、その試料を用いて結晶構造解析を行った。その結果、活性型が持つH-clusterの代わりに成熟化途中と思われる新規クラスターの形成を確認した。H-clusterの成熟化機構にも知見を与えるので、配位子の同定と配位化学の詳細を検討する予定である。並行して、人工再構成法による試料調製と結晶化・構造解析を精力的に行ったが、apo型の結晶のみしか得ることができていない。引き続き、長時間安定で高活性の試料調製法を検討する。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4.5Å分解能の回折強度データの収集に成功した。Ga置換型Fdが野生型Fdと機能上の相補性を持つことを確認するため、Fd-NADP+還元酵素を樹脂担体に結合させたアフィニティークロマトグラフィーを行い、Ga置換体Fdが完全に野生型Fdと同等の電子伝達複合体形成能を保持していることを確認した。現在は、複合体結晶を高分解能化するべく、引き続き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、酵素の基質であるFd, 2-オキソグルタル酸(2-OG), そしてグルタミンの3種が結合した状態の2.0Å分解能での構造解析を完了している。3種の基質がどの順で結合することが活性に必須の分子内チャネルの形成に必要であるのかを確認するため、グルタミンのアナログであるアザセリンを結合していない、Fdと2-OGのみが結合した状態で結晶化を行った。現在、構造解析を行っており基質結合に伴う構造

様式19 別紙1

変化の全容を明らかにする予定である。(667字)

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 2 件</p>	<p>Kimata-Arigo, Y., Kubota-Kawai, H., Lee, Y.H., Muraki, N., Ikegami, T., <u>Kurusu, G.</u>, Hase, T. Concentration-dependent oligomerization of cross-linked complexes between ferredoxin and ferredoxin-NADP+ reductase. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> (2013) <b>434</b>, 867-872 Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G., Itoh, S. Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. <i>J. Biol. Chem.</i>, (2013) <b>288</b>, 22128-22140 (掲載済み一査読有り) 計 2 件  (掲載済み一査読無し) 計 0 件  (未掲載) 計 0 件</p>
<p>会議発表 計 7 件</p>	<p>「結核菌呼吸鎖に含まれるシトクロム c 1c サブユニットの高分解能構造解析」 市川 純平、田中 真之、坂本 順司、北 潔、昆 隆英、栗栖源嗣 日本蛋白質科学会年会、2013年6月12日(水)～14日(金)、とりぎん文化会館(鳥取市) 「緑色硫黄細菌が持つシトクロム c-556 の結晶構造解析」 山本和矢、浅井智広、大岡宏造、栗栖源嗣 日本結晶学会、平成 25 年 10 月 12 日(土)～13 日(日)、熊本大学(熊本県熊本市) 「脂質キュービックフェーズ法を用いたシトクロム bd 複合体の結晶化」 三城佑樹、三角将輝、田中良樹、島村達郎、坂本順司、栗栖源嗣 日本結晶学会、平成 25 年 10 月 12 日(土)～13 日(日)、熊本大学(熊本県熊本市) 「CRYSTAL STRUCTURE OF Ga-SUBSTITUTED FERREDOXIN AND ITS INTERACTION SITES FOR PHOTOSYSTEM I AND FERREDOXIN-NADP+ REDUCTASE」 Risa Mutoh, Norifumi Muraki, Hisako Kubota-Kawai, Toshiharu Hase, Takahisa Ikegami and <u>Genji Kurisu</u> AsCA 2013, The 12th Conference of the Asian Crystallographic Association, 7-10 December 2013 「CRYSTAL STRUCTURE OF PHOTOSYSTEM I FROM SYNECHOCYSTIS SP. PCC6803 AT 5.1 Å RESOLUTION」 Hisako Kubota-Kawai, Hajime Wada <u>Genji Kurisu</u> AsCA 2013, The 12th Conference of the Asian Crystallographic Association, 7-10 December 2013 「生物化学における結晶学」 <u>栗栖源嗣</u> 日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014 年 3 月 27 日(木)～30 日(日)、名古屋大学 「4 つのヒスチジンからなる金属結合部位をもつタンパク質の酸化的自己修飾反応」 谷口勇希・石濱謙一・藤枝伸宇・西河洋祐・栗栖源嗣・伊東忍 日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014 年 3 月 27 日(木)～30 日(日)、名古屋大学  専門家向け 計7件  一般向け 計0件</p>

様式19 別紙1

図書 計0件	
産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件  (出願中) 計0件
Webページ (URL)	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> 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>
国民との科 学・技術対話 の実施状況	大阪大学×大阪ガス「アカデミックッキング」vol.36 「ようこそ！タンパク質ワンダーランド」 2013年8月21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、
新聞・一般雑 誌等掲載 計1件	平成25年10月25日 日経新聞ドイツ版「光と水で水素効率製造」
その他	

4. その他特記事項

## 実施状況報告書(平成25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	97,100,000	37,900,000	0	0
間接経費	40,500,000	29,130,000	11,370,000	0	0
合計	175,500,000	126,230,000	49,270,000	0	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	37,900,000	0	37,900,000	37,900,000	0	
間接経費	18,309,220	11,370,000	0	29,679,220	29,679,220	0	
合計	18,309,220	49,270,000	0	67,579,220	67,579,220	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	27,031,812	オートクレーブ、研究用試薬等
旅費	1,522,504	データ解析、研究成果発表等
謝金・人件費等	9,192,613	特任研究員人件費
その他	153,071	学会参加費
直接経費計	37,900,000	
間接経費計	29,679,220	
合計	67,579,220	

## 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
LCP専用デッキチャン パー	アズワン 2-2203-13	1	630,000	630,000	2013/4/25	大阪大学
オートクレーブ	トミ精工 LSX-700	1	630,000	630,000	2013/5/14	大阪大学
微量高速冷却遠心 機	トミ精工 MX-307	1	861,000	861,000	2013/5/14	大阪大学
プリントグラフ	アト AE-6933FXES-W	1	1,312,500	1,312,500	2013/5/17	大阪大学
Elix Advantage 3 一式	ミリオア MIP-ZRXV003JP	1	974,967	974,967	2013/5/20	大阪大学
バイオシェーカー	タイテック BR-23FP・MR	1	598,500	598,500	2013/5/24	大阪大学
嫌気性チャンバー システム	COY社製 Type C	1	2,051,206	2,051,206	2013/9/30	大阪大学
ガスアナライザー	COY社製 CAM-12	1	531,794	531,794	2013/9/30	大阪大学
AKTAprime Plus	GEヘルスケア	1	1,680,000	1,680,000	2013/9/30	大阪大学
窒素ガス細胞破碎 器	セントラル科学貿易 NCD-920	1	905,139	905,139	2013/11/11	大阪大学
紫外線可視分光光度 計	日本分光(株) V-630ST	1	1,249,500	1,249,500	2013/11/28	大阪大学
電動式フレンチプレ ス	大岳製作所 5501-M	1	2,415,000	2,415,000	2013/12/27	大阪大学