

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2018

課題番号：15KK0248

研究課題名（和文）分子量4MDaの巨大酸素運搬蛋白質ヘモシアニンの構造生物学研究（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Structural study of a huge respiratory supermolecule hemocyanin (international collaboration work)(Fostering Joint International Research)

研究代表者

田中 良和 (Tanaka, Yoshikazu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：20374225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,400,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：ヘモシアニンは軟体動物の酸素運搬タンパク質である。イカ由来のヘモシアニンは分子量約4MDaの円筒状の巨大なタンパク質会合体である。本研究の基研究では、イカ由来ヘモシアニンのX線結晶構造解析を実施したが、結晶のパッキングの関係から、内部ドメインの構造を正確に決定することができなかった。本研究では、クライオ電子顕微鏡単粒子解析の手法を用いて、イカ由来ヘモシアニンの構造解析を行い、その内部構造が非対称であることを明らかにした。また、得られた構造から、ヘモシアニンの分子進化についての知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X線結晶構造解析では結晶中の全ての分子の平均構造が得られるため、外壁領域と内部領域の対称性が異なる場合、分子同士の接触に影響を与える外壁領域の影響を受けやすい。先行研究にてイカヘモシアニンのX線結晶構造解析を行った際も、D5対称性を持つ外壁領域の影響を受け、内部の構造もD5の対称性で平均化され、その正確な構造を決定できなかった。本研究では、外部領域と内部領域を個別に精密化することができるクライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いることにより、ヘモシアニンの非対称な内部構造を決定することができた。本研究により、対称性がミスマッチした分子の構造解析におけるクライオ電子顕微鏡解析の有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：Hemocyanin is an oxygen transporter of mollusks. Squid hemocyanin is a huge cylindrical protein complex with a molecular mass approximately 4 MDa. In a previous study, we determined crystal structure of squid hemocyanin at 3.0 angstrom resolution. However, due to the crystal packing and symmetry of the outer wall region, we could not determine precise structure of the inside domains. Therefore, in the present study, we used cryo-electron microscopy single particle analysis method to determine the structure. The revealed structure showed that the inner domains are arranged asymmetrically. As well, insight into molecular evolution of hemocyanin was revealed.

研究分野：構造生物学

キーワード：ヘモシアニン 立体構造 クライオ電顕 対称性

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

イカなどの軟体動物は、ヘモシアニンという分子量約 4MDa の巨大蛋白質会合体を用いて酸素を運搬している。興味深い事に、ヘモシアニンはその大きさを生かしてハプテンのキャリアー蛋白質や免疫賦活剤として医工学的に応用されている。本研究では、ヘモシアニンの立体構造をクライオ電子顕微鏡の単粒子解析により原子分解能で解明し、構造情報に基づく分子設計などのヘモシアニンの応用研究を加速できるような情報基盤を提供する。

申請者は基課題において、スルメイカ由来ヘモシアニンの会合体の結晶構造を 3.0Å の分解能で決定した (Gai et al. Structure (2015), Matsuno et al., J. Struct. Biol. (2015))。明らかになった構造は、巨大な円筒状の 10 量体であり、外壁領域と 5 つの内部領域から構成されていた (図 1)。外壁領域では非常に明瞭な電子密度が観測され、ドメイン同士の会合機構や糖鎖修飾の役割、酸素結合部位の詳細な構造、分子進化に関する知見など、様々な情報を得る事ができた。一方で、結晶中でヘモシアニンは外壁同士の相互作用によりパッキングしていたため (図 2)、内部領域の方向の異なるヘモシアニンが混在し、その結果、内部領域の立体構造を正確に決定する事は困難であった。

X 線結晶構造解析では短所となった上記の結晶中でのパッキングだが、分子デザインの観点からは大きなメリットとなり得る。すなわち、内部に空隙を持つ円筒がストロー状に重なり合っているため、結晶化させた後でも、ヘモシアニンの内部空間に分子を導入できるのである。この特性を利用すれば、ヘモシアニンを分子包摂のためのホスト分子として利用できる。このような応用研究を実現するには、内部領域の構造解析は避けては通れない。そこで本課題では、近年、著しい発展を遂げ、X 線結晶構造解析に劣らない解像度で構造解析が可能となったクライオ電子顕微鏡による単粒子解析の技術を用い、基課題では達成できなかったスルメイカ由来ヘモシアニンの内部領域の構造を決定し、ヘモシアニンの内部空間のデザイン学に有用な知見を得ることを目指した。

2. 研究の目的

本課題では、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の技術を用いて、基課題における X 線結晶構造解析では達成できなかったスルメイカ由来のヘモシアニンの内部領域の詳細な構造を決定することを目指す。X 線結晶構造解析では結晶中の分子の平均構造が観測されるため、複数の方向が混在した状態で結晶化するヘモシアニンの内部構造を決定する事には限界がある。一方で、電子顕微鏡の単粒子解析では、観測された粒子の方向を一つ一つ決定してから、重ね合わせて平均化するため、内部の構造が非対称なスルメイカヘモシアニンでも解析が可能となる。クライオ電子顕微鏡の単粒子解析は、近年、ディテクターの技術革命により、著しい発展を遂げており、その解像度は X 線結晶構造解析に劣らないレベルに達している。最先端の単粒子解析技術を駆使して内部領域の構造を決定し、ヘモシアニンの内部空間のデザイン学へと発展させるのが本申請のねらいである。単粒子解析により明らかになる構造情報を元に、先述したスルメイカヘモシアニンが有する分子特性 (広大な内部空間、およびストロー状に会合する性質) を生かして分子内部の空間をデザインする事で、様々な分子を包摂する生体材料としてヘモシアニンを応用する事が可能となる。

3. 研究の方法

はじめに、試料の調製方法を検討し、超遠心分離を用いた会合体の調製方を構築した。得られた試料を用いてクライオグリッドの作製条件を検討し、良質なグリッド作製の条件を決定した。最新のクライオ電子顕微鏡 (FEI 社製 TITAN KRIOS) を用いて、約 5000 枚のイメージを取得した。得られる電子顕微鏡画像から粒子をピックアップし、プログラム SPHIRE を用いて 2 次元平均化した後 (図 3)、低解像度の 3 次元構造を決定した。その後、SPHIRE の User

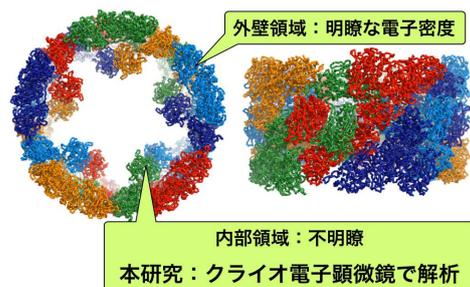


図1. スルメイカヘモシアニンの結晶構造

ストロー状になっているので、結晶化した後に様々な分子を導入することが可能

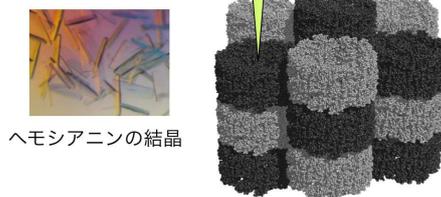


図2. 結晶中でのヘモシアニンの集積の様子

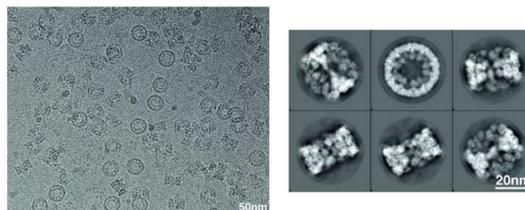


図 3. ヘモシアニンのクライオ電子顕微鏡イメージ (左) と 2 次元平均像 (右)

function の機能を用い, 外壁領域と内部領域を別々に構造精密化した. 得られる電子密度に対し, X 線結晶構造解析法にて決定された機能ドメイン(FU:Functional Unit)を剛体フィッティングし, 10 量体の全体構造を構築した.

4. 研究成果

クライオ電子顕微鏡単粒子解析により得られた構造は, 外壁領域が D5 の対称性で会合している点は X 線結晶構造解析により得られた構造と類似していたが, 内部ドメインは非対称な構造をしているという点で大きく異なっていた (図 4). 内部に存在する FUD*と FUG は上下に互い違いに配置していたが, 内部ドメインは 5 個存在するため, 結果的に非対称な配置となることがわかった.

得られた構造を他の軟体動物のヘモシアニンの構造と比較した結果, 軟体動物由来ヘモシアニンの分子進化の過程が明らかになった. もともと C5 対象で会合していたタコ由来のヘモシアニンが進化の過程で遺伝子重複により FUD*を獲得したと考えられるが, その際, FUG の反対側の領域に FUD*を格納するのではなく, FUG の配置を大きく変化させて FUD*を格納するスペースを作ったと考えられる.

また, 結晶構造解析の際に観察された, D5 対象の電子密度マップの原因も解明できた. すなわち, 非対称な内部構造を有するヘモシアニンは, 結晶中でパッキングする際, D5 対称の外壁の相互作用により, 10 種類の異なる配向で会合し, それらの平均構造が結晶構造として観測されたと考えられる (図 5). これらの結果を考え合わせた結果, ヘモシアニンのように, 1 つの分子中に対称性の異なる領域が混在する分子の構造を決定する際には, X 線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡の各々の長所を組み合わせて構造解析することが重要であることが示された.

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Hashimoto, T., Ye, Y., Ui, M., Ogawa, T., Matsui, T., and Tanaka, Y., Protein encapsulation in the hollow space of hemocyanin crystals containing a covalently conjugated ligand, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 514, 31-36 (2019), 査読有
2. Tanaka, Y., Kato, S., Stabrin, M., Raunser, S., Matsui, T., and Gatsogiannis, C., CryoEM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin, *IUCrJ*, 6, 426-437 (2019), 査読有
3. Matsui T., Kamata S., Ishii K., Maruno T., Ghanem N., Uchiyama S., Kato K., Suzuki A., Oda-Ueda N., Ogawa T., Tanaka Y., SDS-induced oligomerization of Lys49-phospholipase A2 from snake venom, *Sci. Rep.*, 9, 2330 (2019), 査読有
4. Hashimoto, T., Ye, Y., Matsuno, A., Ohnishi, Y., Kitamura, A., Kinjo, M., Abe, S., Ueno, T., Yao, M., Ogawa, T., Matsui, T., and Tanaka, Y., Encapsulation of biomacromolecules by soaking and co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 509, 577-584 (2019), 査読有
5. Takeda, K., Tanaka, Y., Abe, N., and Kaneko, J., Intermolecular ionic interactions serve as a possible switch for stem release in the staphylococcal bi-component toxin for β -barrel pore assembly, *Toxicon*, 155, 43-48 (2018), 査読有
6. Fujii, H., Tanaka, Y., Nakazawa, H., Sugiyama, A., Manabe, N., Shinoda, A., Shimizu,

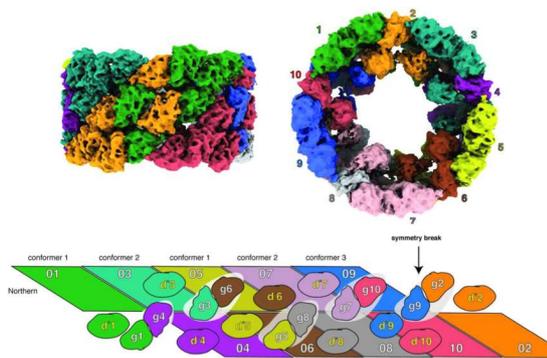


図 4. クライオ電子顕微鏡単粒子解析により決定されたヘモシアニンの構造 (上) と内部ドメインの模式図 (下).

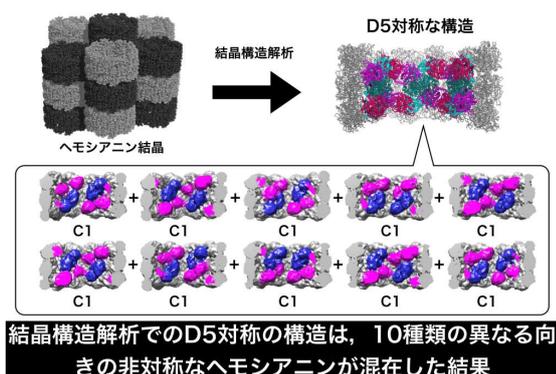


図 5. 結晶構造とクライオ電子顕微鏡構造の比較

- N., Hattori, T., Hosokawa, K., Sujino, T., Ito, T., Niide, T., Asano, R., Kumagai, I., and Umetsu, M., Compact Seahorse-Shaped T Cell-Activating Antibody for Cancer Therapy, *Adv. Therapeut.*, 1, 1700031 (2018), 査読有
7. Peng, Z., Takeshita, M., Shibata, N., Tada, H., Tanaka, Y., and Kaneko, J., Rim domain loops of Staphylococcal β -pore forming bi-component toxin S-components 3 recognize target human erythrocytes in a coordinated manner, *J. Biochem.*, 164, 93-102 (2018), 査読有
 8. Uchida, T., Funamizu, T., Chen, M., Tanaka, Y., and Ishimori, K., Heme Binding to Porphobilinogen Deaminase from *Vibrio cholerae* Decelerates the Formation of 1-Hydroxymethylbilane, *ACS Chem. Biol.*, 13, 750-760 (2018), 査読有
 9. Kato, S., Matsui, T., Gatsogiannis, C., and Tanaka, Y., Molluscan Hemocyanin: Structure, Evolution, and Physiology, *Biophysical Reviews*, 10, 191-202 (2018), 査読有
 10. Chen, M., Kubo, M., Kato, K., Tanaka, Y., Liu, Y., Long, F., Whitman, W., Lill, P., Gatsogiannis, C., Raunser, S., Shimizu, N., Shinoda, A., Nakamura, A., Tanaka, I., and Yao, M., Structural basis for tRNA-dependent cysteine biosynthesis, *Nature Commun.*, 8, 1512 (2017), 査読有
 11. Kunthic, T., Watanabe, H., Kawano, R., Tanaka, Y., Promdonkoy, B., Yao, M., and Boonserm, P., pH Regulates Pore Formation of a Protease Activated Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. *BBA Biomembranes*, 1859, 2234-2241 (2017), 査読有
 12. Chen, M., Asai, S., Narai, S., Nambu, S., Omura, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ikeda-Saito, M., Watanabe, K., Yao, M., Shigi, N., and Tanaka, Y., Biochemical and structural characterization of oxygen-sensitive 2-thiouridine synthesis catalyzed by the iron-sulfur protein TtuA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, 4954-4959 (2017), 査読有
 13. Miyabe, Y., Furuta, T., Takeda, T., Kanno, G., Shimizu, T., Tanaka, Y., Gai, Z., Yasui, H., and Kishimura, H., Structural properties of phycoerythrin from dulse *Palmaria palmata*. *J. Food Biochem.*, 41, e12301 (2017), 査読有
 14. Chen, M., Narai, S., Omura, N., Shigi, N., Chimnaronk, S., Tanaka, Y., and Yao, M., Crystallographic Study of Two-Thiouridine Synthetic Complex TtuA-TtuB from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallogr. F.*, F72, 777-781 (2016), 査読有
 15. Oshima, K., Kakiuchi, Y., Tanaka, Y., Ueda, T., Nakashima, T., Kimura, M., and Yao, M., Structural basis for recognition of a kink-turn motif by an archaeal homologue of human RNase P protein Rpp38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 474, 541-546 (2016), 査読有
 16. Sekine, Y., Tanzawa, T., Tanaka, Y., Ishimori, K., and Uchida, T., Cytoplasmic Heme-binding Protein (HutX) from *Vibrio cholerae* is an Intracellular Heme Transport Protein for the Heme-degrading Enzyme, HutZ. *Biochemistry*, 55, 884-893 (2016), 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 橋本翼, 松井崇, 小川智久, 田中良和, 蛋白質結晶中の巨大な空隙へのタンパク質の包摂, PF シンポジウム, 2019
2. 田中良和, X線結晶構造解析とクライオ電顕、両手法を使って、フォトンファクトリー研究会 X線とクライオ電子顕微鏡で挑む生命の機能とカタチ (招待講演), 2018
3. 田中良和, 巨大蛋白質会合体ヘモシアニンの構造解析, 日本生物物理学会 東北支部会, 2018

4. Yoshikazu TANAKA, Jun KANEKO, Molecular Mechanism of Staphylococcal Pore Forming Toxin, The 79th Okazaki Conference Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines (国際学会), 2018
5. 田中良和, 松井崇, 加藤早苗, Christos Gatsogiannis, Stefan Raunser, スルメイカ由来ヘモシアニンのクライオ電顕構造と X 線結晶構造の違い, 日本蛋白質科学会, 2018
6. 田中良和, 膜孔形成毒素の分子機構とヘモシアニンの構造解析, 山形大学蛋白質科学セミナー (招待講演), 2018
7. Yoshikazu Tanaka, Investigating a novel tRNA thiolational modification mechanism involving an [4Fe-4S] cluster, 2nd Joint International Symposium of NSRRC and IPR, Hsinchu (招待講演) (国際学会), 2018
8. 田中良和, 分子量 4MDa の巨大蛋白質会合体ヘモシアニンの結晶への蛋白質の包摂, JST-ACCEL [革新分子構造解析] 公開シンポジウム (招待講演), 2017
9. 田中良和, 分子量 4MDa の超分子蛋白質会合体ヘモシアニンの構造解析, 第 17 回リング・チューブ超分子研究会シンポジウム (招待講演), 2017
10. Yoshikazu Tanaka, Pore formation mechanism of staphylococcal pore forming toxin, Max Planck Institute of Molecular Physiology Department 3 Lab Retreat Seminar (招待講演) (国際学会), Ringberg ドイツ, 2016
11. 陳明皓, 奈良井峻, 大村直毅, 嶋直樹, 田中良和, 姚関, バクテリアにおける二機能性ユビキチン様タンパク質の機能調節の構造基盤, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡, 2016
12. Asuka Matsuno, Ye Yuxin, Yuki Ohnishi, Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Satoshi Abe, Takafumi Ueno, Yoshikazu Tanaka, Min Yao, 巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの多孔質性結晶を用いた生体分子の包摂, 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば, 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：ステファン ラウンザー

ローマ字氏名：Stefan Raunser

所属研究機関名：Max Planck Institute of Molecular Physiology

部局名：

職名：ディレクター

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。