

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月22日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570123

研究課題名（和文） 光応答性酸素発生機能を有するトキイロヒラタケ由来の色素タンパク質の構造研究

研究課題名（英文） Structural studies of a chromoprotein from *Pleurotus Salmoneostramineus* L. Vass.

研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号：30295753

研究成果の概要（和文）：光応答的に酸素分子を発生するトキイロヒラタケ由来色素タンパク質の遺伝子同定とクローニングを行うと共に、酸素発生活性の測定と結晶構造解析を行うため、子実体からタンパク質試料の調製と結晶化を行った。結晶構造解析の結果、従来色素タンパク質に結合していると発表されていた色素に相当する分子は観測されなかったが、これまでの研究では明らかにされていなかった新規の直鎖状色素分子が色素タンパク質に含まれていることを発見した。

研究成果の概要（英文）：In this study cDNA cloning, purification, and X-ray structure analysis of a chromoprotein from *Pleurotus Salmoneostramineus* have been performed. The X-ray structure revealed that the chromoprotein does not contain the reported pigment molecule but does a novel linear chromophore which might lie along the active site of it.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：色素タンパク質・結晶構造解析・担子菌・酸素発生

1. 研究開始当初の背景

光応答的に酸素分子を発生する現象は光合成における光化学系Ⅱによってのみ達成され、その他にそのような機能を持つ酵素は知られていない。しかし、担子菌の一種であるトキイロヒラタケの子実体は、その名前の由来であるピンク色の色素タンパク質を産生するが、これが光化学系Ⅱのように光応答的に酸素分子を発生する現象について報告されている (*J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8849-8850

(1994))。また、同報告において、色素タンパク質に含まれる 3*H*-indol-3-one と呼ばれる色素の発見と金属イオンの存在について言及している。この報告はこれまでの常識を覆す可能性を秘めているのだが、残念ながらその後の研究はあまり進展していない。また、これらの補因子が酸素分子発生に関わっているという直接的な証拠はないため、どのようにして酸素発生を行うのか全く不明である。また、このタンパク質は2種類のポリペ

プチド鎖(Mr = 23 k, 25 k)によって構築されるヘテロダイマーとして存在する可能性が指摘されている。

一方、本研究代表者は、以前に得られた色素タンパク質の結晶を用いて測定した回折強度データと最新の解析プログラムを用いることで、重原子同型置換法による構造解析に成功した(未発表データ)。色素タンパク質の遺伝子は同定されていないため、アミノ酸配列は不明であるが、電子密度の形状からアミノ酸残基の種類を推定出来る程度の電子密度が得られたので、それに基づいて精密化を行った。解析の結果、2種類のポリペプチド鎖のうち一方しか結晶中に含まれていないことが分かった。従って、他方のサブユニットについては構造未知であった。また、明らかにアミノ残基ではない直鎖状の分子が色素タンパク質内に含まれている可能性があることが分かっていた。

2. 研究の目的

本研究は、トキイロヒラタケ色素タンパク質が以下にして光応答的酸素発生を達成するのか、その立体構造を基に明らかにしていくことを目指すものである。この反応は光化学系Ⅱのみが達成できると考えられているが、色素タンパク質が同様の反応を触媒するならば、果たしてどのようなメカニズムでそれを達成するのか、光化学系Ⅱの活性中心との共通性は見いだせるのか、酸素原子の供給源は水なのか、などの興味は尽きない。一方で、色素タンパク質の活性に関する学術報告は1編しかなく、明らかにすべき点が非常に多岐に渡る。そこで、本申請研究課題では主に以下の4項目に絞って研究を進めた。

(1) 色素タンパク質遺伝子同定と塩基配列の決定

色素タンパク質遺伝子は同定されていないため、その塩基配列が明らかではない。これまでの予備実験で、植物組織用のRNA抽出キットを利用することによってトキイロヒラタケ子実体から mRNA を含むトータル RNA を抽出できることは確認した。得られたトータル RNA から mRNA の精製を行い、cDNA ライブラリを得ると共に、色素タンパク質遺伝子の塩基配列を決定する。

(2) 試料調製と酸素発生活性測定

子実体から色素タンパク質を調製出来ることは確認できているので、酸素発生活性測定を行った。また、不純物が活性に影響している可能性を排除するために標品の高純度化を目指した。

(3) 色素タンパク質モノマーの構造解析

(1)で決定する塩基配列から決定されるアミノ酸配列情報を利用して、構造解析が進行中である色素タンパク質モノマーの構造精密

化を完了させる。

(4) ヘテロダイマーの結晶化と構造解析
従来得られていた結晶では一方のサブユニットだけしか含まれていなかったため、ヘテロダイマーとして結晶を調製し、構造解析を行う。得られる構造を基に、酸素発生活性のメカニズムについて考察する。

3. 研究の方法

(1) 色素タンパク質遺伝子同定と塩基配列の決定

トキイロヒラタケ子実体から得られたトータル RNA から mRNA 精製を行い、逆転写酵素によって cDNA 調製した。色素タンパク質の遺伝子を同定するために、従来の結晶構造の電子密度形状から、曖昧さのないアミノ酸残基配列を選択し、それに対応する塩基配列を有する PCR プライマーを設計し、RACE 法によって全長の色素タンパク質遺伝子を増幅させた。

(2) 試料調製と酸素発生活性測定

試料調製はトキイロヒラタケ子実体を出発材料とした。色素タンパク質は子実体からの抽出液の遠心上清を陰イオン交換クロマトグラフィーと分子ふるいクロマトグラフィーによって精製した。この方法によって得られたタンパク質試料について、従来の結晶化条件による結晶化と共に、新規の結晶化条件を検索するために結晶化スクリーニングを行った。

活性測定はすでに報告されている方法(*J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8849-8850 (1994))に従って行った。具体的には、色素タンパク質にタングステンランプによる光照射を断続的に行い、溶存酸素計を用いて、溶存酸素濃度の時間変化を測定した。

(3) ヘテロダイマーの結晶化と構造解析と構造に基づく酸素発生のメカニズムの解明
ヘテロダイマーとして得られた試料について結晶化スクリーニングを行い、得られた結晶について、X線回折強度データ測定とX線結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 色素タンパク質遺伝子同定と塩基配列の決定

トキイロヒラタケ子実体から市販のキットを用いてトータル RNA の抽出、mRNA 精製を行い、逆転写酵素によって cDNA ライブラリを得た。X線結晶構造解析によって得られた電子密度の形状を基に、アミノ酸配列を一義的に推定可能な領域が存在していた(図1)。これを基に設計した PCR プライマーの中で、色素タンパク質の cDNA だけを特異的に増幅するものが存在していた。こうして得られた PCR 増幅産物をプローブとして利用することで、トキイロヒラタケ cDNA ライブラリから

完全長の cDNA を選別し、クローンを作成した。これによって、これまで未知であった完全長の色素タンパク質遺伝子塩基配列の決定に成功した。

(2) 試料調製と酸素発生活性測定

トキイロヒラタケ子実体抽出液から色素タンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーと分子ふるいクロマトグラフィーによって精製した。その結果、色素タンパク質をヘテロダイマーとして精製することが出来た。ヘテロダイマー精製試料について、酸素発生活性測定を行ったところ、文献に記載されているような有為な酸素発生活性は確認出来なかった。

(3) 色素タンパク質モノマーの構造解析

(1) で得られた塩基配列から決定したアミノ酸配列を利用して色素タンパク質モノマーの構造精密化を行った。その結果、色素分子に相当すると思われる電子密度が明瞭に浮かび上がって来た (図 2) が、その形状は従来報告されてきた複素環式化合物 (3*H*-indol-3-on) とは全く異なる直鎖状分子であることが確実となった (図 2、図 3)。従来報告されてきた複素環式化合物は色素タンパク質ヘテロダイマー中の他方のサブユニットに含まれている可能性が考えられるが、色素タンパク質モノマーの構造解析の結果、今回解析されたサブユニットには直鎖状分子だけが結合しているものと考えられる。

一方、「(2) 試料調製と酸素発生活性測定」で述べたとおり、酸素発生活性が観測されなかったのは、試料精製の過程で複素環式化合物が何らかの原因で取り除かれてしまったことに起因している可能性がある。また、現時点では色素タンパク質モノマー含まれる直鎖状分子が何であるか、またどのような性質を持つのか明らかではないが、今後の研究の進展によって、この直鎖状分子の同定が新規の天然有機化合物の発見に繋がると期待される。

(4) ヘテロダイマーの結晶化と構造解析

ヘテロダイマー試料について結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、従来とは異なる条件で結晶が得られることが分かった。しかし、得られた結晶は従来と同型のものであった。実際に X 線回折強度データ測定を行い、結晶構造解析を行ってみたところ、従来の色素タンパク質モノマーの結晶と同型であり、また立体構造が同じであることが判明した。

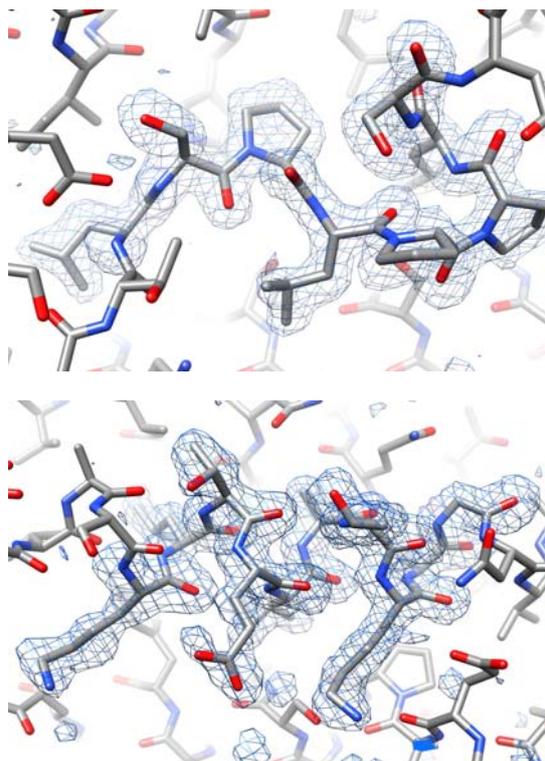


図 1 PCR プライマー設計の基となった電子密度図

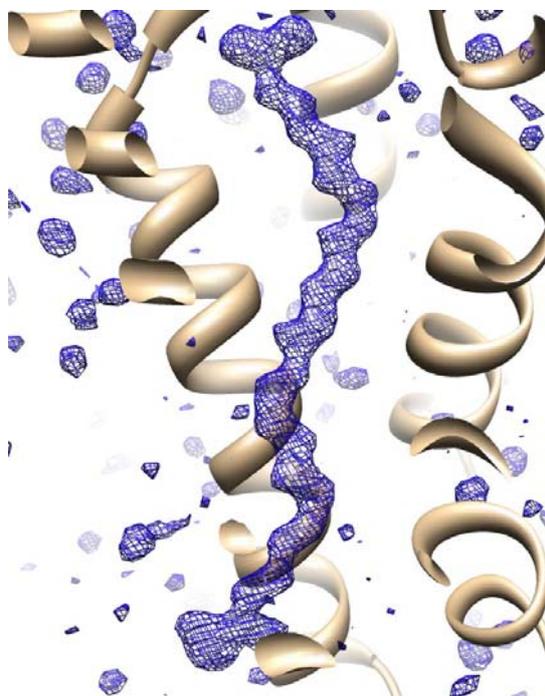


図 2 直鎖状分子の電子密度図

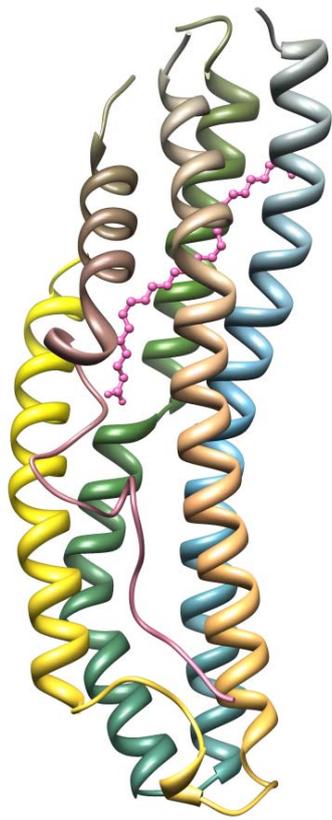


図3 色素タンパク質モノマーの構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 柴田直樹・井上豪・樋口芳樹・甲斐泰、Primer design for cDNA synthesis based on the crystal structure、XXII Congress and General Assembly, International Union of Crystallography、2011年8月22-30日、マドリッド(スペイン)
- ② 柴田直樹・井上豪・武隈秀子・武隈真一・吉田善一・樋口芳樹・甲斐泰、結晶構造に基づくトキイロヒラタケ由来色素タンパク質の遺伝子クローニング、平成23年度日本結晶学会年会、2011年11月24-25日、北海道大学(北海道)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biophysics1/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 直樹 (SHIBATA NAOKI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号：30295753

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：