

## 新博士紹介

1. 氏名 溝端栄一 (RIKEN GSC)
2. 論文提出大学 大阪大学
3. 学位種類 博士 (工学)
4. 取得年月日 2003年3月
5. 題目 植物の改良を目指した葉緑体蛋白質の構造と機能の研究
6. 使用施設 KEK-PF BL18B

## 7. 要旨

## [序]

全ての生物の構成成分である有機炭素は、源をたどれば植物が光合成によって生産した炭水化物に由来している。光合成における大気  $\text{CO}_2$  の固定は、還元的ペントースリン酸サイクルの初発反応を担う酵素、リブロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (Rubisco; ルビスコ) によって行われる。Rubisco は L サブユニットと S サブユニットが 8 個ずつ会合した分子重量 550 kDa の巨大蛋白質である。本酵素はリブロース-1,5-ビスリン酸に  $\text{CO}_2$  を付加して 2 分子の 3-ホスホグリセリン酸を生成する  $\text{CO}_2$  固定反応だけでなく、 $\text{CO}_2$  の代わりに  $\text{O}_2$  を付加して 3-ホスホグリセリン酸と 2-ホスホグリコール酸を 1 分子ずつ生成する  $\text{O}_2$  固定反応も触媒する二機能的な酵素である。Rubisco の最も重要な特徴は、光合成反応を律速することで植物成長を制限していることである。そのため、高機能 Rubisco を設計して農作物に導入することができれば、農作物の生産効率を向上させることが可能となる。これを実現するためには、本酵素の構造機能相関を理解することが必要である。

これまで筆者は、複数の光合成生物由来の Rubisco の生化学的・構造生物学的な研究を行ってきた<sup>1-3)</sup>。ここでは、緑藻由来 Rubisco の構造研究を紹介したい。Rubisco の立体構造は高等植物、ラン藻、紅藻、光合成細菌、始原菌由来のものが報告されてきた。しかし、植物界における巨大な分類群の一つである緑藻類の Rubisco の構造は未解明であった。そこで、代表的な緑藻、クラミドモナスの Rubisco の X 線結晶構造解析を行った<sup>1)</sup>。

## [結晶化と構造解析]

クラミドモナスの細胞を大量培養し、細胞抽出液から Rubisco を精製した。Rubisco の結晶化条件を検索したところ、 $2.5 \mu\text{l}$  の蛋白質溶液 (80 mM HEPES-KOH pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) と  $2.5 \mu\text{l}$  のリザーバー溶液 (80 mM HEPES-KOH pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 7% PEG4000, 30% glycerol) からなるドロップを用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により、 $20^\circ\text{C}$  で再現よく結晶が得られた。回折強度の測定は KEK-PF の BL18B で行った。検出器にはラージ・イメージングプレートを装着した

Sakabe カメラを用い、オシレーション法により反射データを収集した。クラミドモナス Rubisco の結晶は空間群  $P2_1$ 、格子定数は  $a=129.2$ ,  $b=174.8$ ,  $c=222.3 \text{ \AA}$ ,  $\beta=97.8^\circ$  であった。位相および構造決定は、ハウレンソウ Rubisco の立体構造をサーチモデルとした分子置換法によりおこなった。本結晶の非対称単位は非常に大きく、Rubisco 2 分子と水分子 1 万個から構成されていた (分子重量 1,300 kD)。最終的に、分解能  $1.84 \text{ \AA}$ ,  $R_{\text{cryst}}=15.2\%$ ,  $R_{\text{free}}=18.1\%$  で精密化を完了した。

## [結果と考察]

クラミドモナス Rubisco の全体的なサブユニット配置は、L と S サブユニット 2 つずつから成る単位 ( $\text{L}_2\text{S}_2$ ) が非結晶学的 4 回軸によって関係付けられる構造をとっていた (Fig. 1)。これは、以前に解かれた他の 16 量体型の Rubisco と同様であった。また、触媒部位を有する L サブユニットの構造も他の Rubisco と良く似ていた。一方、S サブユニットには、他の Rubisco とは異なる独特の部分構造がみられた (Fig. 2)。この特徴的な構造が L サブユニットと相互作用することで、緑藻 Rubisco に特徴的な活性 (例えば高等植物よりも高い比活性と低い基質親和性) が実現されていると考えられた。

最も興味深い結果は、本酵素に複数の修飾アミノ酸残基

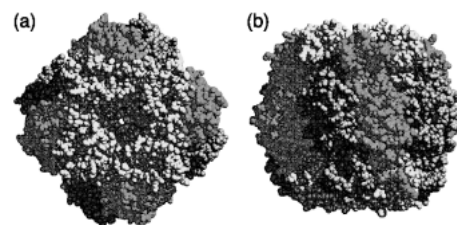


Figure 1. Overall structure of *Chlamydomonas* Rubisco. (a) Viewing down the non-crystallographic 4-fold axis which runs parallel to the solvent channel. (b) Viewing perpendicular to (a).

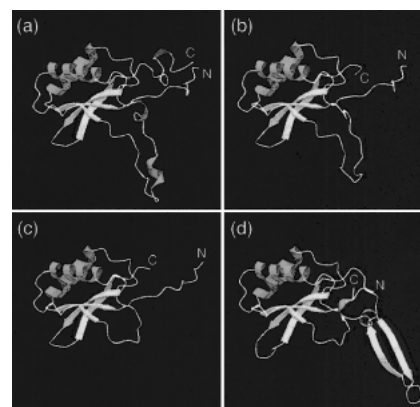


Figure 2. S-subunits from (a) *Chlamydomonas* (green alga), (b) spinach (higher plant), (c) *Synechococcus* PCC6301 (cyanobacterium) and (d) *Galdieria partita* (red alga).

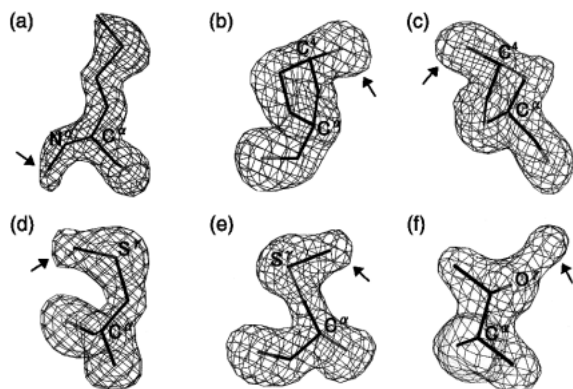


Figure 3. The omit maps ( $F_o - F_c$ , contoured at  $3.5\sigma$ ) of post-translationally modified residues of *Chlamydomonas* Rubisco. The stick models fitted in the electron-density maps are (a)  $N^\alpha$ -methyl-Met<sup>S1</sup>, (b) 4-hydroxy-Pro<sup>L104</sup>, (c) 4-hydroxy-Pro<sup>L151</sup>, (d)  $S^\gamma$ -methyl-Cys<sup>S256</sup>, (e)  $S^\gamma$ -methyl-Cys<sup>L369</sup>, and (f) Thr<sup>L471</sup>. The arrows show the additional electron densities by modifications.

が見出されたことである (Fig. 3)。SサブユニットのN末端のMet残基は、末端窒素がメチル化された $N^\alpha$ -methyl-Metであることが電子密度から推定された (Fig. 3(a))。高等植物 Rubisco では Met<sup>S1</sup> と Lys<sup>L14</sup> (S と L でサブユニットの種類を示す) は、それぞれ、 $N^\alpha$ -methyl-Met<sup>S1</sup> と  $N^\epsilon$ -trimethyl-Met<sup>L14</sup> へ翻訳後修飾されることがわかっている。エンドウとタバコは、この二つのメチル化を同時に触媒する二機能的なメチルトランスフェラーゼを有している。ハウレンソウは Met<sup>S1</sup> の  $N^\alpha$ -メチル化のみを行う酵素を持っている。クラミドモナスにおいては Met<sup>L14</sup> の  $N^\epsilon$ -トリメチル化は起こらないことが知られていたことから、 $N^\alpha$ -methyl-Met<sup>S1</sup> の存在は、クラミドモナスがハウレンソウ型のメチルトランスフェラーゼを有していることを示唆している。なお、 $N^\alpha$ -メチル化は Rubisco の 4 次構造形成に関与していることが高等植物 Rubisco の研究で指摘されている。

Lサブユニットの104と151番目の残基は4-hydroxy-Proと推定された (Fig. 3(b), (c))。4-hydroxy-Proはコラーゲンやエクステンシンなどの構造蛋白質に見出されてきたアミノ酸である。Rubiscoのような酵素、あるいは、葉緑体において見出された例は筆者の知る限り存在しない。一部の微生物を除いて、一般に4-hydroxy-Proはプロリル4-ヒドロキシラーゼによる翻訳後修飾によって生成される。プロリル4-ヒドロキシラーゼは幅広い基質特異性を有しているが、最も一般的な認識配列は-Gly-Pro-Pro-である。Lサブユニットの150-152番目のアミノ酸配列-Gly-(4-hydroxy-Pro)-Pro-は、その認識配列に相当し

ていた。一方、103-105番目のアミノ酸配列-Tyr-(4-hydroxy-Pro)-Ile-は、興味深いことに、これまでに報告されている認識配列とは全く異なっていた。クラミドモナスの細胞壁はhydroxy-Proに富んだ糖蛋白質によって構成されている。これまでに、この糖蛋白質の合成に関与すると考えられる2種類のプロリル4-ヒドロキシラーゼが報告されている。今回、クラミドモナス Rubisco に4-hydroxy-Proが見出されたことは、クラミドモナスの葉緑体に、細胞壁合成を行うものとは異なるタイプのプロリル4-ヒドロキシラーゼが存在することを意味している。なお、これら2つの4-hydroxy-Proはいずれも触媒部位から約20 Åも離れており、Rubisco触媒作用に積極的な影響を与えている可能性は考えにくい。Lサブユニットのフォールディングに何らかの関与をしているのかもしれない。

Lサブユニットの256と369番目のアミノ酸残基は $S^\gamma$ -methyl-Cysと推定された (Fig. 3(d), (e))。これらの残基はサブユニット表面に位置しているので、この翻訳後修飾はLサブユニットのCys残基が他の蛋白質のCys残基と非特異的なジスルフィド結合を形成してしまうのを阻害するのに役立っているのかもしれない。この翻訳後修飾がどのようなメカニズムで行われているかは一切不明である。

Lサブユニットの471番目の残基はDNA配列からThrと推定されていた。しかし、このThrのO $\gamma$ のすぐ隣に強い電子密度が観察され、何らかの修飾を受けていることが明らかとなった (Fig. 3(f))。ThrのO $\gamma$ の翻訳後修飾にはメチル化やグリコシル化などが考えられ、今回の電子密度だけから修飾の種類を推定することはできなかった。現在、この残基を含むペプチドを調製し、質量分析により修飾の種類を同定する実験を行っている。Thr<sup>L471</sup>は、活性中心残基一つLys<sup>L334</sup>を有するフレキシブル・ループとファンデルワールス相互作用をしている。よって、この翻訳後修飾はRubiscoの触媒作用に何らかの影響を与えていると考えられる。

#### 参考文献

- 1) E. Mizohata, H. Matsumura, Y. Okano, M. Kumei, H. Takuma, J. Onodera, K. Kato, N. Shibata, T. Inoue, A. Yokota and Yasushi Kai: *J. Mol. Biol.* **316**, 679 (2002).
- 2) Y. Okano, E. Mizohata, Y. Xie, H. Matsumura, H. Sugawara, T. Inoue, A. Yokota and Y. Kai: *FEBS Lett.* **527**, 33 (2002).
- 3) E. Mizohata, M. Anwaruzzaman, H. Okuno, K.-I. Tomizawa, S. Shigeoka, Y. Kai and A. Yokota: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 591 (2003).

(受付番号01073)