

CryoEM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin

IUCrJ, 6, 426-437 (2019)

Yoshikazu Tanaka, Sanae Kato, Markus Stabrin, Stefan Raunser, Takashi Matsui, and Christos Gatsogiannis

Summary

軟体動物の酸素運搬蛋白質ヘモシアニンは、機能性ドメイン(FU)が連なったプロトマーの重合体からなる。ヘモシアニンは各プロトマー中のFUが複雑に相互作用し、頭足類では1つの10量体、腹足類では2つないし3つの10量体が巨大なシリンダー型の会合体構造を形成する(図1)。また、多くのヘモシアニンはサブユニット中のN末端側6個のFUによって D_5 対称を示す外壁領域が形成され、C末端側に残ったFUは内部領域の一方の半球側に C_5 対称で配置されている。軟体動物の進化の過程においてC末端側のFUの個数は異なっており、FUの個数を増減させることにより、内部領域の構造を変えることで酸素結合能を微調整してきたと考えられている(図1)。

しかし、スルメイカのヘモシアニン(Type 4, TpH)は、外壁領域を構成するN末端側4個目の機能性ドメイン(d*)が重複した特異な配列を持つ。TpHの立体構造はX線結晶構造解析により、 C_5 対称を持つ分子が上下逆さまに結晶化した疑似の D_5 対称分子として解析された。また、結晶構造から、外壁領域はこれまで同様の構造を形成することが明らかになっているものの、内部領域は擬似的な D_5 対称の影響によりd*の正確な位置は不明瞭なままであった。

そこで、本研究ではクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析により、特徴的なd*ドメインを持つTpHの正確な立体構造を明らかにし、その構造進化モデルを提唱した。

TpHは非対称な構造を持つ分子であった

クライオ電子顕微鏡で得られたTpHの二次元平均画像から三次元*ab initio*モデルを構築した。はじめに、ネガティブ染色で観察されている特徴から C_5 対称であると仮定し、 C_5 対称での*ab initio*モデルを構築した(図2c)。しかし、この構造はX線結晶構造同様に内部構造は不明瞭であった。そこで、 C_1 対称としてTpHの*ab initio*モデルを作成したところ、内部構造の電子密度の特徴を鮮明に捉えたモデルを得ることに成功した(図2d)。さらに、はじめに外壁領域と内部領域を別々に構造精密化し、その後、得られた密度をマージしてさらなる精密化を行い、FSC (0.143) が4.2 Å分解能のTpH構造を得た(図2e)。

プロトマー内の各FUの配列と、既知の外壁領域の構造から内部領域のFUを同定し、プロトマー9と10の対称性の歪みにより C_5 対称が崩れることがわかった(図3)。

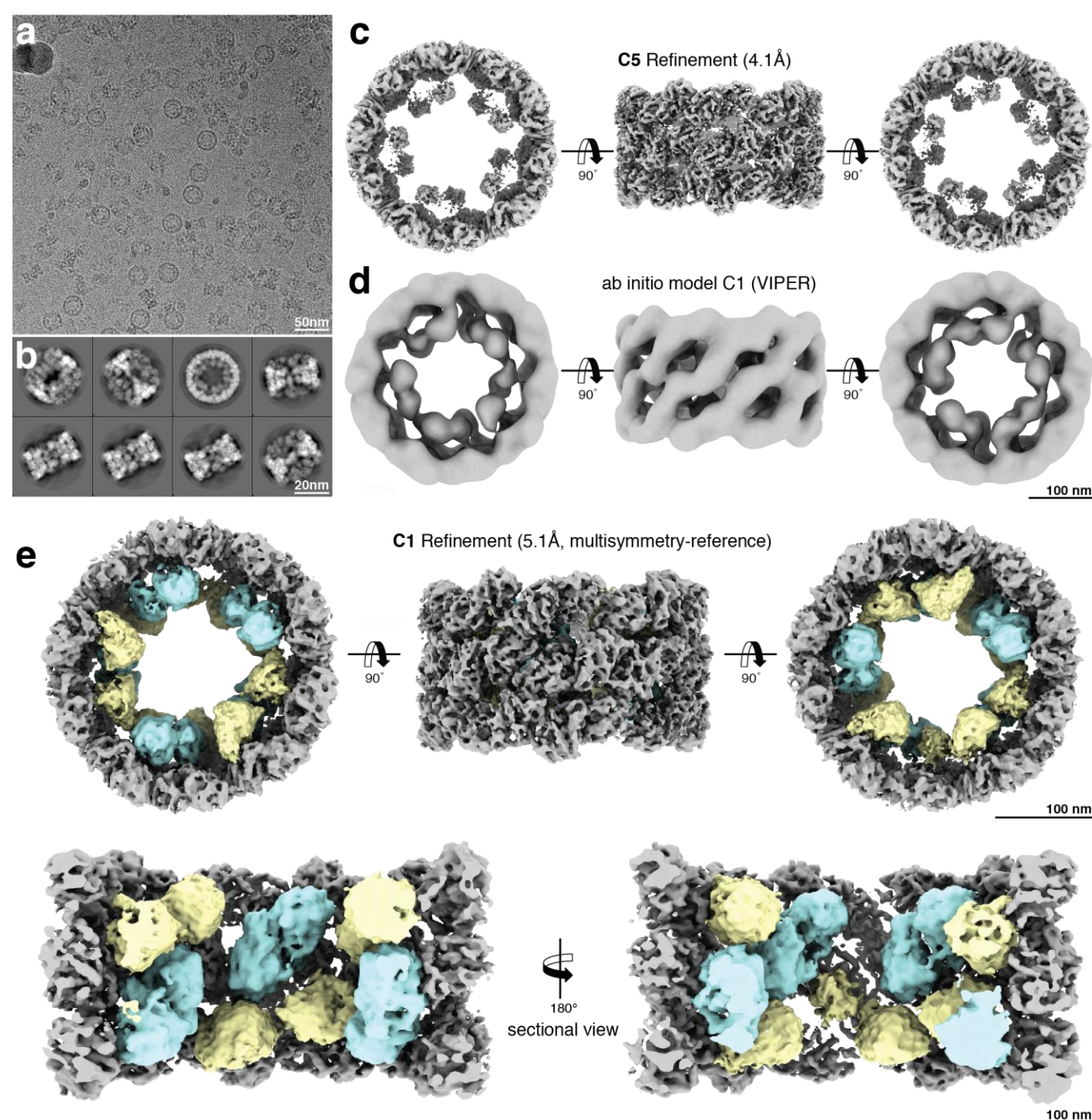


図2. (a) CryoEM画像、(b) 二次元平均画像、(c) C_5 対称での構造精密化モデル (d) C_1 対称での初期モデル構造 (e) C_1 対称での最終構造 (シアン:gドメイン, 黄色:d*ドメイン)

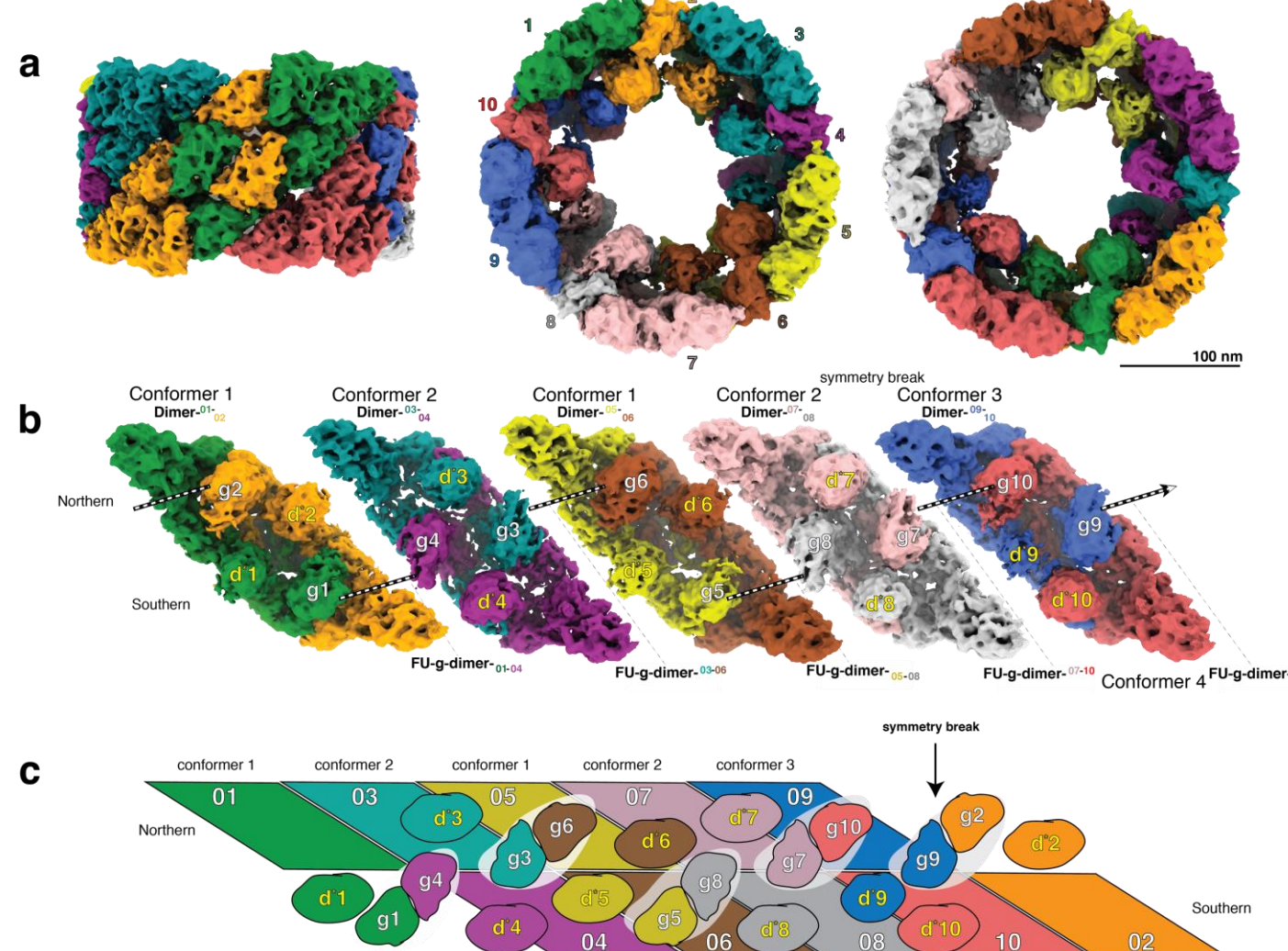


図3. (a) 10量体からなるTpHの電顕構造 (Side, Top, Bottom view) (b) 内部領域側からみた5つのプロトマーダイマーの構造 (c) 10量体構造の概略図 (プロトマーをそれぞれ異なる色分けで示す)

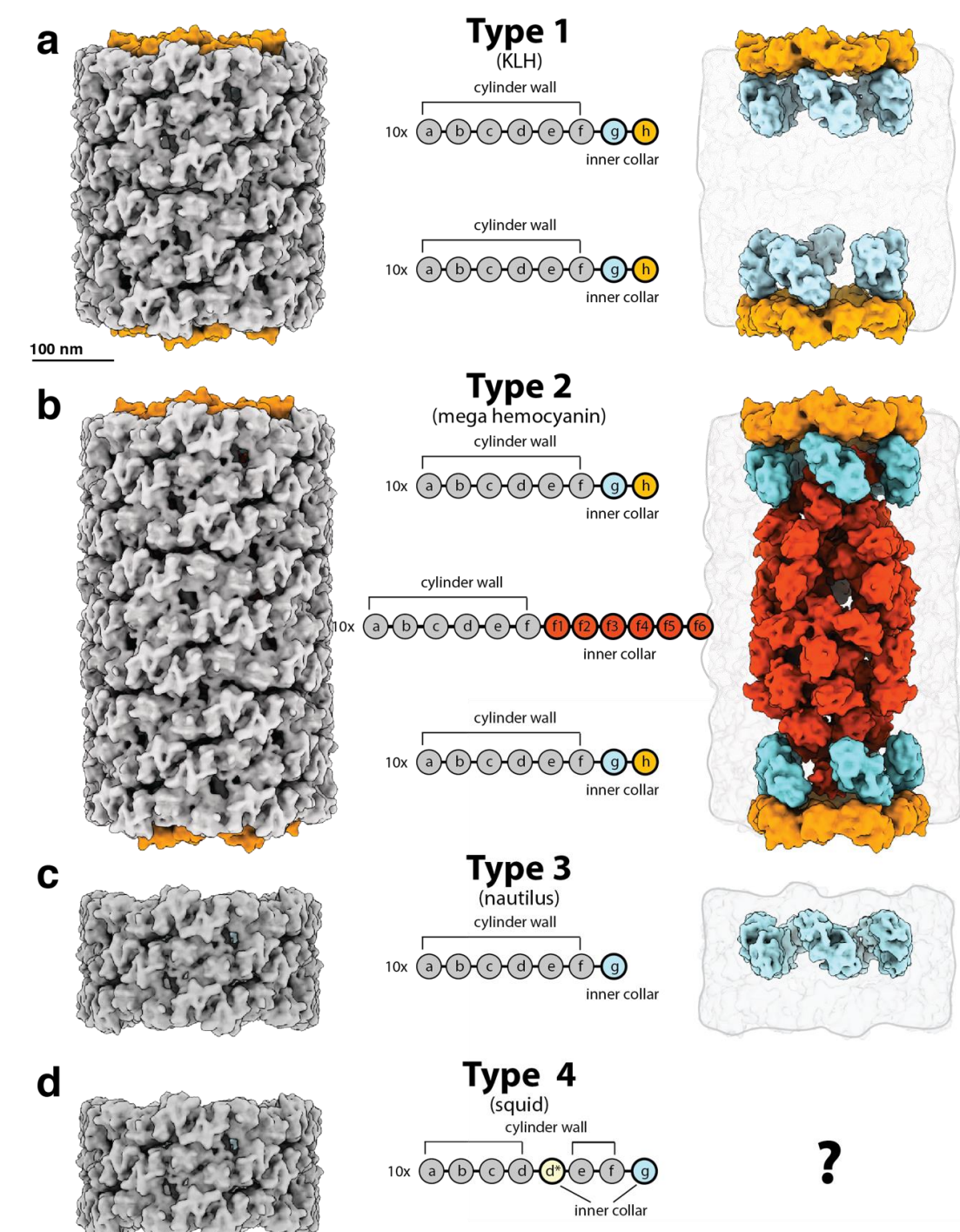


図1. (a) Type 1 (keyhole limpet-type), (b) Type 2 (mega hemocyanin) (c) Type 3 (nautilus type), (d) Type 4 (TpH)ヘモシアニンの構造

TpHは4つの異なるコンフォーマーからなる

各プロトマーを比較すると、コンフォーマー1(プロトマー1, 2, 5, 6), 2(プロトマー3, 4, 7, 8)に加え、対称性のズレが生じるプロトマー9と10はこれらとは異なるコンフォーマー3と4の構造を取った。また、コンフォーマー3のd*とgドメインはコンフォーマー1のd*と2のgドメインの特徴を、コンフォーマー4のd*とgドメインはコンフォーマー2のd*と1のgドメインと類似の配置を取った(図4)。

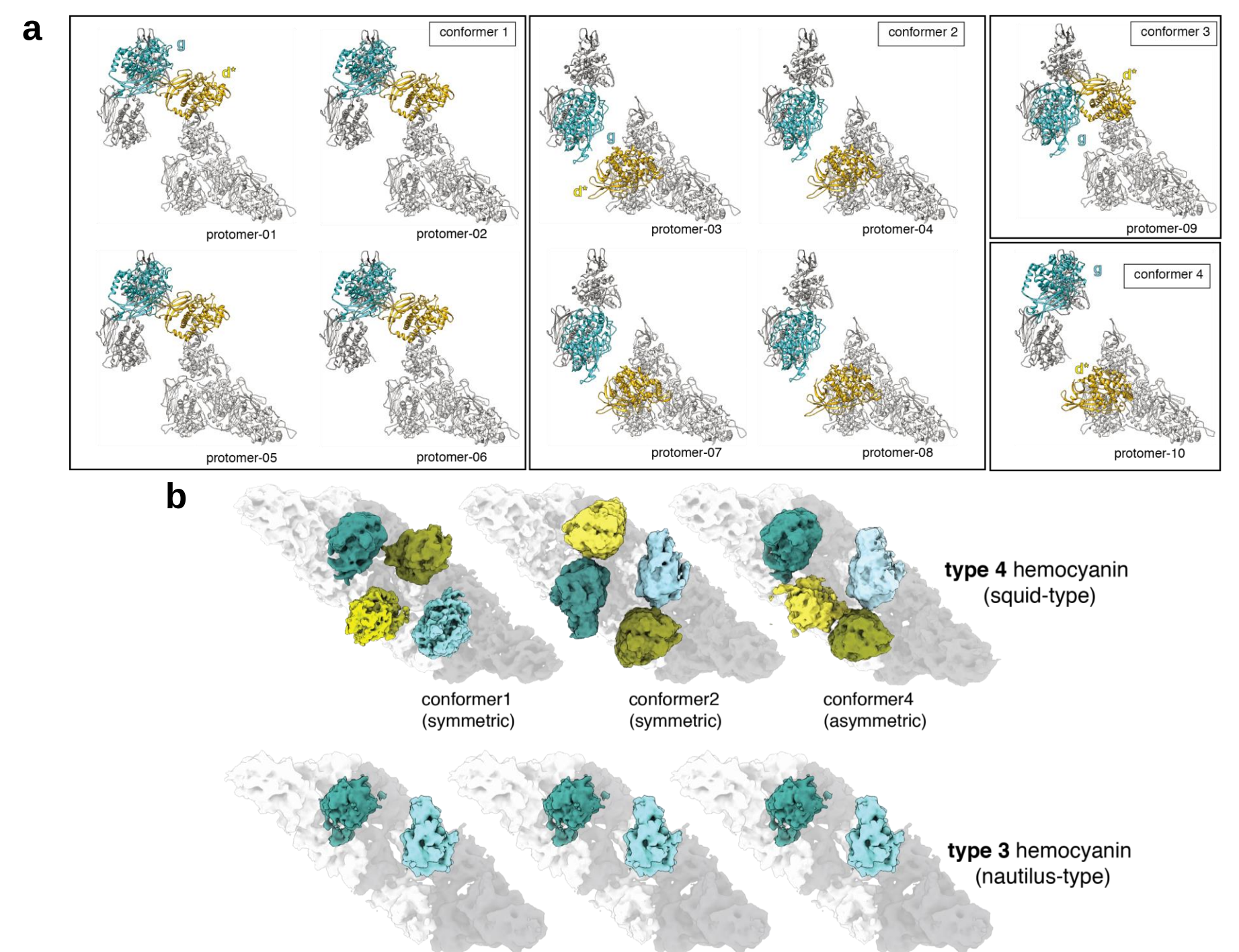


図4. (a) 各プロトマーの構造の構造的特徴の分類 (b) TpH (上) とType 3ヘモシアニン (下) のプロトマーダイマーにおけるgドメインの相対配置 (シアン系: gドメイン, 黄色: d*ドメイン)

立体構造から推測される進化モデル

明らかになった構造から、 C_5 対称性を持つType3ヘモシアニンから、非対称なType4ヘモシアニンへと進化する過程が明らかになった(図5)。

Type3からType4ヘモシアニンへの進化のモデル

系統樹で最近縁にあるType 3ヘモシアニンの構造はすべてのgドメインがすべて北半球に存在する構造を取る。一方、進化によりdドメインが複製されたTpHにおいて、Type 3の相互作用関係は (i) プロトマーダイマー中のd*ドメイン同士が立体障害を示す。そこで、(ii) d*ドメインがドメインスワップを起こし、(iii) ホモダイマーのコンフォーマーを形成する。(iv) コンフォーマー1と2が交互に結合することでgダイマーが北-南-北-南-北半球に存在するように配置される。最終的に、(v) gドメインが共に北半球にあるコンフォーマー3と4のコンフォーマーダイマーがシリンダー状に構造を閉じることで非対称なTpH構造を形成する。

