

日米化学研究協力事業  
平成22年度実施計画書

平成22年 9月7日

共同研究代表者

所属機関・部局 日本医科大学・医学部

職・氏名 講師 ・ 岩崎 俊雄

1. 研究課題名 (和文) 好熱菌モデル酵素の金属クラスター電子構造に強く影響する周辺骨格領域の可視化

(英文) International Collaboration in Chemistry: ELECTRONIC STRUCTURE OF BIOLOGICAL METALLO-CLUSTER AND ITS MAGNETIC INTERPLAY WITH THE PROTEIN SURROUNDING IN THERMOPHILE METALLOENZYMES

2. 共同研究実施期間

平成22年10月1日～平成25年9月30日(3年0ヶ月/ 日間)

5. 米国共同研究代表者

所属機関・職・氏名 イリノイ大学ウルバナ-シャンパイン校・准教授・Dikanov, Sergei A.

機関所在地 Urbana, IL 61802, U.S.A.

(注) 本調書は、代表者所属機関を通して電子データを提出してください。

6. 共同研究参加者

(1) 日本側共同研究参加者（代表者を除く）\*

氏名	所属研究機関・職名	最終学位
熊坂 崇	(財)高輝度光科学研究センター・グループリーダー 副主席研究員	博士（理学）
公募予定	日本医科大学・ポスドク研究員	博士
(公募予定、ただし H23年度からに変更)	((財)高輝度光科学研究センター・プレドクまたは 人材派遣会社を介したポスドク研究員)	(修士以上)

\* 新規の共同研究で申請書から新たに参加者を追加する場合、及び継続の共同研究で前年度から新たに参加者を追加する場合は、追加する参加者に（新）のマークをつけてください。

(2) 米国共同研究参加者（代表者を除く）

氏名	所属研究機関・職名
Samoilova, Rimma, I.	University of Illinois at Urbana-Champaign・シニア客員研究員
Baldansuren, Amgalanbaatar	University of Illinois at Urbana-Champaign・ポスドク研究員
(To be appointed)	University of Illinois at Urbana-Champaign・大学院生

## 7. 本年度実施計画の概要

(経費との関連がわかるように具体的に記入してください。)

鉄硫黄クラスターは、酸素呼吸、光合成、水素代謝、窒素固定等の主要電子伝達系・触媒中心として広く機能し、生命進化プロセスの方向性に決定的影響を与えた「生物最古の補欠分子族」代表例とされる。この幅広いクラスター反応特性は、Fe 及び S のケミストリーに基づいており、更にクラスター本体の電子構造および周辺タンパク質骨格との相互作用に深く起因する。本日米化学研究協力事業 (ICC プログラム) は、パルス電子スピン共鳴 (EPR) を軸とする詳細な分光解析と高分解能 X 線結晶構造解析により、好熱菌モデル酵素の鉄硫黄クラスター電子構造に強く影響する周辺骨格領域の可視化(定量的、空間的理解)を主目的とする。採択者らのような系統的・定量的解析は、生物材料として前例がない。

初年度 (H22 年度) は、共同研究基盤をまず盤石にし、かつ次年度以降の国際共同研究を円滑推進すべく、本申請時の計画を一部変更し下記実験を中心に遂行する。その主要研究成果は論文等で逐次公表するとともに、次なる共同実験の立案・展開をはかるための基礎データとしてフィードバックする。

### 1) アミノ酸特異的 $^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}$ 導入酵素サンプルの調整:

4 種類のモデル鉄硫黄タンパク質 (sulredoxin (SDX, Rieske-type  $[2\text{Fe}-2\text{S}](\text{His})_2(\text{Cys})_2$  をもつ), archaeal Rieske-type  $[2\text{Fe}-2\text{S}](\text{His})_2(\text{Cys})_2$  ferredoxin (ARF), TthNEET0026 ( $[2\text{Fe}-2\text{S}](\text{His})_1(\text{Cys})_3$  をもつ), ISC-like  $[2\text{Fe}-2\text{S}](\text{Cys})_4$  ferredoxin (FdxB)) につき、鉄硫黄クラスターに配位する Cys 残基に  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  を導入した部位特異的安定同位体ラベル導入酵素を作成する。大量発現・精製に際しては、Cys 要求性の宿主大腸菌株を作成し用いる。精製サンプルはイリノイ大でパルス EPR 測定する。すでに SDX につき  $^{15}\text{N}(\text{His})$  ラベル導入酵素の基礎データを得ており、本結果との比較から、還元型  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  クラスターの  $\text{Fe}^{3+}$  (oxidized iron) 及び  $\text{Fe}^{2+}$  (reducible iron) 側に配位する Cys 軸配位子の定量的寄与を解析する。なお、本研究材料の 1 つ TthNEET0026 については、本酵素機能同定に不可欠な受託解析研究結果が必要であり、初年度補助により遂行、未発表の結晶構造・分光解析データと総合し、成果公表する。

### 2) 単結晶 EPR 予備解析:

常磁性中心と周辺骨格とのカップリングを磁気分光法で詳細に解析するには、テンソル量である g 因子の全主軸方向を、分子座標軸と対応・決定する必要がある。比較的大きなサイズの単結晶を得ている SDX と ARF 結晶につき、イリノイ大ポスドク研究員の来日時で共同で単結晶 EPR 解析を試み、g 因子の主軸方向を可能な限り決定する。現在、結晶サイズは十分だが、分子サイズの小ささに起因する結晶単位胞あたりの分子数の多さが問題である。この対策として SDX, ARF 等を比較的巨大な単純融合タンパク質として発現・結晶化させ、結晶単位胞あたりの分子数を減らすことを試す。分子数減少により単結晶 EPR スペクトルを単純化でき、g 因子の全主軸方向の直接決定につながる可能性がある。直接法が技術的に困難な場合、次年度以降に電子原子核二重共鳴 (プロトン-ENDOR) 法による間接決定を考える。

### 3) 放射光での回折データ測定における放射線光還元/損傷の寄与の解析:

JASRI で新開発した放射光専用の顕微分光計を用いた熊坂らの予備実験から、回折強度データ収集の際、ARF 単結晶中の  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  クラスターが X 線照射で経時的に光還元/損傷することが最近判明した。そこで JASRI グループでは、本申請時の初年度計画を一部変更し、物品費により研究整備をはかるとともに、単結晶 1 個あたりの X 線露光時間を十分短くすることで、光還元/損傷を最小限に抑えた ARF 結晶構造解析を行い、年度内に  $[2\text{Fe}-2\text{S}]$  クラスター近傍の微細変化の有無を検討する。

本共同研究計画遂行にあたり、各研究者が密接に連携をとりつつ遂行する。初年度の日本グループの主たる担当は次の通り。[分子生物学的手法、酵素の発現精製、変異体作成と解析] 若手(ポスドク)研究員 (日医大にて公募予定)・岩崎、[結晶化] 岩崎・同若手研究員・熊坂、[単結晶 EPR] 同若手研究員・岩崎・熊坂、[X 線結晶構造解析] 熊坂、[本計画における研究総括] 岩崎。本申請時計画の JASRI 側ポスドク/プレドク研究員 1 名 (公募予定) は、予算・人事等の関係上、H23 年 4 月より加える (変更)。

本研究遂行のための大型基本設備 (超遠心、分光器、PCR や DNA シーケンサー等の分子生物学的研究設備) はほぼ整っている。X 線構造解析と顕微分光装置については、基本的に高輝度放射光施設 SPring-8 (播磨) の既存設備を活用するが、初年度は物品費により結晶化インキュベータと解析用 PC (及び周辺機器) を JASRI グループにて購入・使用する。また本年度研究計画遂行のため、発現酵素の精製・結晶化と分子生物学的手法などの関連キット、カラム樹脂類、培地類、安定同位体ラベル、冷媒、特注石英チューブ作成などの消耗品が必須である。

本 ICC プログラムは、若手研究者育成及び国際間共同研究の経験トレーニングも視野に入れている。初年度は日本医科大学においてポスドク研究員 1 名 ((株) 医大サービスを介した雇用形態)、任期付アルバイト研究補助者 1 名 (学部ないし修士卒以上で産休後等の研究復帰希望者) を新規雇用し、

研究の活性化と育成・推進をはかる[上述の通り、本申請時に計画していた JASRI 側ポスドク/プレドク 研究員 1 名（公募予定）は、H23 年 4 月より加わる予定（変更）]。主たる研究業務内容は、本研究計画のための分子生物学的実験全般・培養・発現・サンプル調整（結晶化も含む）を分担遂行する他、ポスドクター研究員はイリノイ大学での海外共同実験・研究討論、国内解析データ収集・計画討論にも参加する。このため、特に PI と若手研究員の外国旅費、内国旅費が必要である（機関内規に基く渡航費・日当込みで概算、渡航時期は変更の可能性あり）。その他、任期付アルバイト研究事務 1 名を新規雇用、共同研究推進の円滑化を測るとともに、成果公表のための論文別刷代等も必要である。

なお、JSPS-NSF 本申請時の当初計画では、H22 年 8 月 15 日開始を予定していたが、NSF 側の採択通知・その後の NSF-UIUC 間事務手続きの大幅な遅延等により、開始時期変更を余儀なくされた。改めて米国側 PI、Dikanov 准教授と緊急に協議した結果、日本側は H22 年 10 月 1 日に開始時期を設定したい。これに伴い、H22 年度・H25 年度予算申請に若干修正を加えた。

8. 本年度経費総額 9,056 千円

外国旅費	国内旅費	物品費	人件費・謝金等	その他	委託事務手数料(4%)	外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税*
1,295	200	3,490	2,945	700	349	77

\* 外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税を本経費から支出しない場合は、その理由等を「外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税」欄に記入してください。

平成 23 年度所要見込額	平成 24 年度所要見込額	平成 25 年度所要見込額
19,700	19,300	10,600

左の欄は該当する場合のみ記入してください。  
(単位：千円)

9. 交流計画

(a) 日本側研究者の米国への渡航計画

出張者 (氏名・職名)	出発地	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務	経費負担**	
					渡航費	滞在費
岩崎 俊雄・ 講師	東京	米国 (ウルバナ)	11 月頃、14 日間	海外共同研究実験 (Pulsed EPR 測定)、研究打合わせ	有	有
公募予定・ポス ドク研究員	東京	米国 (ウルバナ)	11 月頃、14 日間	海外共同研究実験 (Pulsed EPR 測定)	有	有

\* 旅行期間の欄の記入例：「6 月頃、10 日間」(日本側研究者・来日研究者共通)

\*\* 本経費使用予定の有無を記入すること

## (b) 日本側研究者の相手国以外の国への渡航計画\*

出張者 (氏名・職名)	出発地	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務	経費負担**	
					渡航費	滞在費

\* 外国出張の渡航先は原則として、米国のみを渡航先とします。ただし、当該共同研究の研究成果発表を目的とする学会等への出席や、フィールドワーク等で当該第三国へ行くことが必須である研究上の理由がある場合に限り、相手国以外の国を訪問することは可能です。

\*\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」（日本側研究者・来日研究者共通）

\*\*\* 本経費使用予定の有無を記入すること

## (c) 米国研究者の来日計画

出張者 (氏名・職名)	用 務 先	旅行期間*	用 務**
Dikanov, Sergei A. ・ 准教授	日本医科大学	10月下旬 頃、10日間	研究打合わせ（使用予定無）
	日本医科大学	3月末頃、 10日間	研究打合わせ、データ討論と共著 論文作成（使用予定無）
Baldansuren, Amgalanbaatar ・ ポスドク研究員	日本医科大学と SPring-8	10月下旬 頃、14日間	共同研究実験（単結晶 EPR の予備 測定とデータ収集） （渡航・滞在費等は使用予定無、 本実験に関わる消耗品費のみ有）

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」（日本側研究者・来日研究者共通）

\*\* 本経費使用予定の有無を記入すること

10. 日本側研究者の国内出張計画

出張者 (氏名・職名)	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務
岩崎 俊雄・講師	SPring-8 (兵庫県佐用町)	10月下旬頃、3 日間	Baldansuren 研究員との国内共同 実験・データ収集、研究打合わせ
岩崎 俊雄・講師	神戸・SPring-8	12月、4日間	生化学会(BMB2010)ワークショップ 発表および研究打合わせ
公募予定・ポスドク研究員	神戸・SPring-8	12月頃、3日間	国内共同実験・研究打合わせ

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

11. 物品費、人件費・謝金等、その他経費

	細 目	金 額 (単位：千円)	積 算 内 訳
物 品 費	備品 (JASRI 再委託)	1,100	解析用 PC(+周辺機器) 300 千円 X1 結晶用インキュベータ(三洋電機, MIR-154) 400 千円 X2 結晶化キット類・回折実験用器具類 400 千円 その他一般試薬類 500 千円
	消耗品 (JASRI 再委託)	900	
	消耗品 (日本医科大学)	1,490	
	計	3,490	
人 件 費 ・ 謝 金 等	博士研究員 1 名 (日本医科大学)	2,225	6ヶ月分 X 1 名 (4,450 千円/年より算出)
	研究補助 2 名 (日本医科大学)	720	6ヶ月分 X (研究補助員 1 名、研究事務 1 名) (計 1,440 千円/年より算出)
	計	2,945	
そ の 他 経 費	論文投稿・別刷料 (日本医科大学)	200	論文投稿・別刷料 200 千円
	受託解析代 (日本医科大学)	500	本共同研究試料の発現条件検討に関連した受託 Basic Plan 機能解析(ヒューマン・メタボローム・テクノロ ジーズ社) 500 千円
	計	700	

備考：

- ① 細目は物品費、人件費・謝金等、その他経費 (通信運搬費、会議費、印刷製本費、雑役務費等) の別に記入してください。
- ② 物品費については、「積算内訳」の欄に品名、単価および数量を明記してください。