

日米化学研究協力事業
平成23年度実施計画書

平成23年 3月11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)

(注) 本計画書は、受託機関を通して電子データにて提出してください。

5. 共同研究参加者

(1) 日本側参加者* (代表者を除く)

氏名	所属研究機関・職名	専門及び本研究における役割
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	構造生物学・本研究におけるCo-PI、X線結晶構造解析
中野 良治	日本医科大学・ポスドク研究員	分子生物学・本研究における分子生物学実験全般
再公募予定 (新)	日本医科大学または(財)高輝度光科学研究センター・ポスドク研究員	構造生物学・本研究におけるX線結晶構造解析と単結晶EPR実験
公募予定 (新)	日本医科大学・研究補助員	分子生物学・本研究における分子生物学・生化学実験補助 (H23年3月退職予定の研究補助員・長岡ゆみ子の引継ぎとして新規公募予定)

*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) 米国側参加者* (代表者を含む**)

氏名	所属研究機関・職名	専門及び本研究における役割
○ Dikanov, Sergei, A.	University of Illinois at Urbana-Champaign・准教授	構造生物学/物理化学・本研究における米国側PI、パルストEPR解析および米国側総括
Samoilova, Rimma, I.	University of Illinois at Urbana-Champaign・シニア客員研究員	物理化学・本研究におけるパルストEPR解析
Baldansuren, Amgalanbaatar	University of Illinois at Urbana-Champaign・ポスドク研究員	物理化学・本研究におけるパルストEPR解析
Burton, Rodney (新)	University of Illinois at Urbana-Champaign・大学院生	生化学・本研究における蛋白質単結晶試料を用いた構造機能解析

* 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。

** 米国側代表者の氏名の前に、「○」のマークをつけてください。

6. 本年度実施計画の概要

※ 申請書のの内容を踏まえて、日本語にて記入してください。

※ 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、パルスト電子スピン共鳴 (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。

本年度 (H23 年度) は、初年度に立ち上げた安定同位体ラベル導入系を最大限に活用しつつ、緊密な国際共同研究をすすめる。このため、本申請時の計画を一部変更して下記実験を中心に遂行し、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。また、本年度は各国の本分野における著名研究者が集まる国際学会で、初年度からの主要研究成果一部を若手研究者と共に発表討論するとともに、論文等でも逐次公表する。

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

初年度にイリノイ大グループと共同で作成した古細菌遺伝子発現対応の新規欠損株シリーズ (現在, Gln, Cys, Ile, Val, His, Arg, Met, Lys 要求性に対応) を用い、系統的に ^{15}N , ^{14}N を導入した部位特異的安定同位体ラベル導入酵素を逐次作成する。酵素 10 種は初年度に作成済みであり、イリノイ大パルスト EPR 装置調整が整い次第、逐次測定を再開する。これらの研究成果の一部は、5 月の国際学会 (スウェーデン・ストックホルム) で中野・岩崎が発表する (このために外国旅費を要する)。さらに、JASRI 熊坂グループで結晶構造解析を完了した 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 ^{13}C を導入した部位特異的安定同位体ラベル導入酵素も作成、結晶構造を参考にしつつ理論解析もすすめる [ただし、現在 Cys 導入ラベル酵素につき、目的遺伝子発現の際に培地中に生成する硫化鉄無機化合物が、蛋白質精製の大きな弊害 (収率低下) になっており、(^{13}C -Cys は ^{15}N -Cys よりも高価なため) さらなる条件検討後に実施する]。本結果を ^{15}N Cys ラベル蛋白質の結果と総合し、議論する (精製サンプルはイリノイ大でパルスト EPR 測定する)。これらの結果を総合し、還元型 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ クラスターの Fe^{3+} (oxidized iron) 及び Fe^{2+} (reducible iron) 側に配位する Cys 軸配位子の定量的寄与の系統解析につき、論文として公表する。なお、本研究材料の 1 つ TthNEET0026 については、本酵素の機能同定に不可欠な受託解析研究結果の確認のための追加データが急務になっており、本年度補助より遂行、初年度からの結晶構造・分光解析・変異酵素解析データと総合し、8 月の国際学会 (カナダ・バンクーバー、岩崎が発表につき外国旅費を要する)・原著論文等で成果公表する。

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に共同で単結晶 EPR 解析を試み、g 因子の主軸方向を可能な限り決定する。本計画は初年度実施予定であったが、イリノイ大グループの来日延期に伴い、本年度より実施する (初年度はかわりに計画 1) を先取り開始、一部遂行済)。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試みに着手する。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、本年度後半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。間接法の場合、データ解析プログラムが非常に煩雑なため、米国 PI の Dikanov グループによれば、本分野を国際的にリードしているドイツ・ザールラント大学グループまたはマックスプランク研究所生物無機化学グループとも共同実施する必要があり、本年度後半での進捗状況を鑑み、改めて具体的に検討する。

3) 放射光での回折データ測定と解析:

初年度は、発現ベクター改変により ARF の新単結晶を作成、構造解析、精密化に成功した。この発現系改変に伴う蛋白質局所構造変化の有無をパルスト EPR と共鳴ラマン法で評価し、クラスター近傍構造に

は有為差なしと結論できた。さらに JASRI で開発した放射光専用の顕微分光計を用い、ARF 単結晶における回折強度データ収集時の X 線照射による経時的[2Fe-2S]クラスター光還元を定量解析した。これらの結果を踏まえ、本年度 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抑えることで、光還元/損傷を最小限に抑えた ARF 結晶の高分解能構造解析を「非常に多数の単結晶」を用いて行い、年度内に[2Fe-2S]クラスター近傍の微細変化の有無を検討する。また、SDX につき構造精密化を完了したが、クラスター近傍の水素原子が観測できるレベルの超高分解能データを得るため、単結晶の質的改善、データ収集と構造解析を行う（必要により液体ヘリウム温度で強度データ収集する）。さらに、米国共同研究者が共同実験で来日した際には、顕微分光計を用いた単結晶サンプル調整を行い、単結晶 EPR 測定と構造変化解析のための予備的回折実験も行う。

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。本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] 中野・岩崎、[結晶化] 岩崎・研究補助員・若手(ポスドク)研究員(公募予定)・熊坂、[単結晶 EPR] 同若手(ポスドク)研究員・中野・岩崎・熊坂、[X 線結晶構造解析] 同若手(ポスドク)研究員・熊坂、[本計画における研究総括] 岩崎。本申請時計画のポスドク研究員 1 名(蛋白質構造解析分野・再公募予定)は、本年度より加える(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、本年度は現在不足している培養インキュベータを JASRI グループにおいても購入・研究整備をはかるとともに、本共同研究をより円滑に推進する。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継続的に必須である。

本 ICC プログラムは、若手研究者育成および国際間共同研究の経験トレーニングも重視している。本年度はポスドクター研究員 2 名((株) 医大サービスを介した雇用形態、うち 1 名(中野)は初年度から継続雇用、他 1 名は再公募の上、新規雇用し JASRI グループと共同指導を予定)、任期付研究補助者 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で、新規公募の上、(株) 医大サービスを介した雇用形態・初年度雇用した長岡の研究補助業務を引き継ぎ、遂行予定)を雇用し、研究の活性化と育成・推進をはかる。主たる研究業務内容は、本研究計画のための分子生物学の実験全般・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スウェーデンでの国際学会発表・討論、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、国際学会発表以外の渡航時期は、米国側研究者グループの来日期間により、変更の可能性あり)。その他、初年度から出始めてきた研究成果公表のための論文別刷代等も必要である。初年度からの研究進捗状況とそれに伴う若干の計画変更の必要性に伴い、H23 年度実施計画申請においては本申請時より各費目に若干修正を加えた。

7. 本年度経費総額 19,700 千円

(単位：千円)

設備備品費	消耗品費	旅費等		人件費・謝金等	その他経費	事務委託手数料 (5%)	外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税*
		国内旅費	外国旅費				
1,500 (内1,500千円は再委託)	4,128 (内1,500千円は再委託)	300	2,000	10,000	700	939 (内150千円は再委託)	133

* 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。

* 委託費の総額の上限は、2,000万円/年度です。

翌年度所要見込額	翌々年度所要見込額	3年度後所要見込額
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)

* 委託費の総額の上限は、2,000万円/年度です。

研究計画全体必要額
58,656

2年度目以降の場合は、前年度までの執行済額も含めて記載してください。

(単位：千円)

8. 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費

	細 目	金 額	積 算 内 訳
設 備 備 品 費	備品 (JASRI 再委託)	1,500	微生物用ファーメンター 1,500 千円 X1 台
	計	1,500	
消 耗 品 費	消耗品 (JASRI 再委託)	1,500	結晶化用試薬類・回折実験用器具類 800 千円 培地類 300 千円 その他一般試薬類 400 千円
	消耗品 (日本医科大学)	2,628	遺伝子実験試薬・キット類 900 千円、培地・安定同位 体ラベル試薬 900 千円、その他一般試薬類 728 千円 特注石英チューブ類 100 千円
計	計	4,128	
人 件 費 ・ 謝 金 等	博士研究員 2 名 (日本医科大学)	8,800	12 ヶ月分 X2 名 (8,800 千円/年/2 名より算出)
	研究補助 1 名 (日本医科大学)	1,200	12 ヶ月分 X (研究補助員 1 名) (計 1,200 千円/年より算出)
	計	10,000	
そ の 他 経 費	論文投稿・別刷料 (日本医科大学)	500	論文投稿・別刷料 500 千円
	受託解析代 (日本医科大学)	200	本共同研究試料の発現条件検討に関連した受託エナジ ースコープ 機能解析(ヒューマン・メタボローム・テ クノロジーズ社) 200 千円
	計	700	

備考：

- ① 細目は設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費（「通信費（切手・電話等）」「運搬費」「印刷費」等（手引 8-9 参照）の別に記入してください。
- ② 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、については、「積算内訳」の欄に品名または人物名、単価および数量を明記してください。

9. 交流計画

(a) 日本側参加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**
岩崎 俊雄・ 講師	東京	米国 (ウルバナ)	10 月末頃、 9 日間	海外共同研究実験 (Pulsed EPR 測定)、研究打合わせ	有 (渡航・滞在費)
公募予定・ポ スドク研究員	東京	米国 (ウルバナ)	10 月末頃、 18 日間	海外共同研究実験 (単結晶 を用いた Pulsed EPR 測定)	有 (渡航・滞在費)

* 旅行期間の欄の記入例：「6 月頃、10 日間」

** 本経費使用予定の有無を記入すること

(b) 日本側参加者の米国以外の国への渡航計画*

出張者 (氏名・職名)	出発地	用務先 (国名・都 市名)	旅行期間**	用 務	経費負担***
岩崎 俊雄・ 講師	東京	スウェーデン (ストックホル ム)	5月、9日間	国際学会 (IX European Symposium of the Protein Society) にて本研究成果 発表	有 (渡航・滞在費)
中野 良治・ ポスドク研究 員	東京	スウェーデン (ストックホル ム)	5月、9日間	国際学会 (IX European Symposium of the Protein Society) にて本研究成果 発表	有 (渡航・滞在費)
岩崎 俊雄・ 講師	東京	カナダ (バンクーバ ー)	8月、9日間	国際学会 (ICBIC 15) にて本 研究成果発表・米国側研究 代表者と研究打合せ	有 (渡航・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限り、米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」

*** 本経費使用予定の有無を記入すること

(c) 米国側研究者の来日計画

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	7月中旬頃、 15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	9月末頃、 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)
Burton, Rodney 大学院生	SPring-8 と日本医科大学	9月末頃、 14日間	共同研究実験 (単結晶試料の顕微 分光・強度データ収集) (使用予定無)

* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」