

(様式1)

国際化学研究協力事業
平成24年度実施計画書

平成24年 3月21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26年3月31日(3年6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
松下 真一 (新)	日本医科大学・学術 (ポスドク) 研究員	分子生物学・生化学・本研究における分子生物学実験全般、単結晶 EPR 関連研究 (中野 良治の後任公募内定者、H24年4月2日より)
深澤 里沙子	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
萩生田 絵美	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

* 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
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
Hong, Sangjin (新)	University of Illinois at Urbana-Champaign・ポスドク研究員	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
Choi, Sylvia, K. (新)	University of Illinois at Urbana-Champaign・大学院生	分子生物学・本研究における分子生物学・生化学実験

* 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。本国際化学研究協力事業 (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 (H24 年度) は、これまで日米間で作成した安定同位体ラベル導入大腸菌株コレクション拡充と公的機関への一括寄託手続きを行うとともに、これらを用い、緊密な国際共同研究をさらに推進する。昨年度までの国際共同研究で、FdxB [2Fe-2S] (Cys)₄ クラスター近傍のほぼ全窒素原子の残基特異的 ¹⁵N ラベル導入酵素を作成、その一部を除きほぼ解析した。一方、昨年度末の共同実験から、ARF 等 Rieske 型 [2Fe-2S] クラスター系では、¹⁴N_(His) 配位子由来の強い ESEEM モジュレーション信号により、弱くカップルするペプチド骨格 ¹⁵N シグナルが強く抑制されるという当初計画で想定しなかった現象を見出した。そこで ¹⁵N_(His) を含む二重 ¹⁵N ラベル導入系を作成し、この問題解決をはかる。また、本年度は単結晶 EPR 解析のための融合タンパク質作成と結晶化・解析にも力点をおき、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。さらに、昨年度からの主要研究成果を国際学会で若手研究者と共に発表討論するとともに、逐次論文等での公表も重点的にすすめる。

1) アミノ酸特異的 ¹⁵N, ¹³C 導入酵素サンプルの調整:

①昨年度は、震災後の影響により当初計画変更を余儀なくされた。まず、イリノイ大グループと共同で作成した各種遺伝子発現対応の新規欠損株シリーズ (現在、Gln, Cys, Ile, Leu, Val, His, Arg, Met, Lys, Gly, Ala, Thr, Tyr, Phe, Asn 要求性に対応) と部位特異的変異法を併用し、系統的に ¹⁵N, ¹⁴N を導入した一連の部位特異的安定同位体ラベル酵素を作成・解析してきた [基本的方法論は昨年度論文等で公表]。また、日米の遺伝子組換え大腸菌株コレクションを一括して公的機関へ無償寄託するために、昨年度末にイリノイ大 Gennis グループより菌株コレクションを委託輸入した (岩崎・深澤)。これらの菌株につき PCR 等による目的遺伝子欠損確認と菌株ストック保存を開始した。本年度は、これを継続して行い、早期の寄託手続き完了を目指す (深澤・萩生田)。また、これまでの解析結果に基づき新たな菌株作成も継続して行い、昨年度未測定・本年度予定の酵素試料につき、イリノイ大で逐次測定・データ解析する (松下・深澤・岩崎)。さらに、鉄硫黄クラスター近傍の N-H...S 水素結合の構造特徴と pulsed EPR データとの相関解明のため、新たな部位特異的変異酵素を作成、イギリス・MRC (ケンブリッジ) Judy Hirst グループ (イリノイ大グループより紹介) との protein film voltammetry 解析も計画している (岩崎・深澤・松下)。これらの成果を総合し、一部を9月の国際学会 (スペイン・セビリア) で岩崎・深澤・萩生田らが発表する (このため共同実験・成果発表に外国旅費を要する)。

②JASRI 熊坂グループが構造解析したモデル鉄硫黄タンパク質 (sulredoxin (SDX, Rieske-type [2Fe-2S] (His)₂(Cys)₂ をもつ), archaeal Rieske-type [2Fe-2S] (His)₂(Cys)₂ ferredoxin (ARF), TthNEET0026 ([2Fe-2S] (His)₁(Cys)₃ をもつ), ISC-like [2Fe-2S] (Cys)₄ ferredoxin (FdxB)) およびその部位特異的置換変異体につき、鉄硫黄クラスターの Cys 配位残基に ¹³C や ²H を導入した安定同位体ラベル酵素も作成、結晶構造を参考にしつつ理論解析もすすめる。昨年度末までに基本的なサンプル作成法をほぼ確立し、¹⁴N_(His) 配位子由来の強い ESEEM モジュレーション信号により、弱くカップルするペプチド骨格 ¹⁵N シグナルが強く抑制されてしまう Rieske-type [2Fe-2S] (His)₂(Cys)₂ クラスター系を除き、サンプル調整した。後者については、¹⁵N_(His) を含む二重 ¹⁵N ラベル導入系を本年度作成し、問題解決をはかる (深澤・松下・岩崎)。本結果を ¹⁵N Cys ラベル蛋白質の結果 (投稿準備中) 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 [2Fe-2S] クラスターの Fe³⁺ (oxidized iron) 及び Fe²⁺ (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、論文等で公表する。

2) 単結晶 EPR 予備解析:

③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。昨年度は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、イリノイ大グループ来日時に共同実験を計画したが、震災後の影響で延期を余儀なくされた [かわりに計画 1] を重点的にすすめ、一部を論文等で発表。昨年度は日本グループで単結晶サンプル調整等を試み、測定上の各種課題点を抽出した。現在、結晶サイズは十分大きく成長するが、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、目的鉄硫黄タンパク質を比較的巨大な単純融合タンパク質として発現させ、結晶単位胞あたりの分子数を減らす試みに昨年度後半より着手した (岩崎・中野・萩生田) が、例えばマルトース結合蛋白質との融合タンパク質等では、大腸菌発現時にプロテアーゼ切断を非常に受けやすいことがわかった。そこで本年度は、酸化還元中心をもたず、結晶化しやすい好熱菌酵素との融合タンパク質の作成・結晶化を試み、可能ならばデータ収集をすすめる (松下・萩生田・岩崎・熊坂)。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。イリノイ大グループ来日の際の共同実験では、米国グループ大学院生の共同研究指導の他、結晶サイズが大きな ARF、SDX または TthNEET H52C 変異体の予備的単結晶 EPR 解析なども試み、g 因子の主軸方向を可能な限り決定する (松下・岩崎・熊坂)。

④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 [FdxB については昨年度に論文公表済] (岩崎・松下)。これまでの経験から間接法ではデータ解析プログラムが煩雑であり、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る。本年度後半での進捗状況を鑑み、米国グループとの合議の上、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:

⑤これまで 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。昨年度は震災による関西電力供給事情等のため、SPring-8 ビームタイムスケジュール変更があり、実質的に放射光利用が制限された。本年度 JASRI グループでは、構造精密化を完了した SDX につき、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継続して行う (必要により液体ヘリウム温度で強度データ収集する)。

⑥日本医科大グループが作成した部位特異的変異体や巨大融合タンパク質単結晶について、可能な限りデータ収集・解析する [学術 (博士) 研究員・松下を共同指導し、構造精密化をすすめる計画]。本年度もビームタイムスケジュール状況に影響が懸念されるが、昨年度計画した「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」を用いて可能な限り遂行し、[2Fe-2S] クラスター近傍の微細変化の有無の検討を改めて行う計画である。また、機会があれば、無損傷測定が可能な X 線自由電子レーザー (XFEL) 施設 SACLA での単結晶回折実験も試みたい。

⑦米国共同研究者が共同実験で来日した際には、単結晶 EPR 測定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] 松下 (学術 (博士) 研究員、内定)・深澤・萩生田・岩崎、[結晶化] 岩崎・深澤・萩生田・松下・熊坂、[単結晶 EPR] 松下・岩崎・熊坂、[X 線結晶構造解析] 松下・熊坂、[本計画における研究総括] 岩崎。

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。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、単結晶 EPR および結晶構造解析のための各種消耗品・計算機等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。本年度は学術 (博士) 研究員 1 名 ((株) 医大サービスを介した雇用形態で内定通知済、結晶構造解析については JASRI グループと共同指導を予定)、任期付研究補助者 2 名 ((株) 医大サービスを介した雇用形態・深澤・萩生田ともに昨年度からの継続) を雇用し、国際共同研究、国際学会発表、論文作成等を通じたトレーニング (昨年度末は深澤がイリノイ大に 3 週間滞在して共同実験を実施) を実施するとともに、本研究のさらなる活性化と育成・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)・学会等での研究成果発表の一部を分担遂行する他、学術 (博士) 研究員はイリノイ大学等での海外共同実験・研究討論、タンパク質結晶構造解析トレーニング、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・研究補

助員の外国旅費、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等により、変更の可能性あり）。その他、これまでの研究成果公表のための論文別刷代等も必要である。

昨年度は、平成 23 年 3 月 11 日に起きた東北地方太平洋沖地震の影響により、電力不足等から①当初予定の放射光による高分解能の結晶構造解析実験、および、②研究上難易度が高く日米グループの直接共同参加が不可欠にもかかわらず、上記理由による米国グループ来日延期もあり、タンパク質単結晶 EPR 解析の実施延期が余儀なくされた。このため、日米グループによる合議の上、実施計画変更調書(様式 08)により全研究計画期間の経費増を伴わない実施期間延長を昨年度末に提出申請し、これをご承認頂くことができた。本プロジェクト成功には、単年度あたりの人件費と国際共同研究・成果発表・若手研究者トレーニングに関わる外国旅費・内国旅費が必要不可欠である。実施期間延長承認に伴い、当初計画経費申請分を変更（本年度、次年度申請においてほぼ 2 分割の上、再編成）し、その H24 年度分を本実施計画書において申請する。この再編成により、これまで通り当初研究計画遂行に最大限、尽力する。

7. 本年度経費総額 15,210 千円

(単位：千円)

研究経費							事務委託 手数料 (5%)
設備備品費	消耗品費	旅費等		人件費・ 謝金等	その他経 費	外国旅 費・人件 費・謝金 等に係る 消費税*	
		国内旅費	外国旅費				
0	2,000	270	2,100	7,580	2,400	136	724 (内 100 千円 は業務委託)

* 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、次のとおりです。

- ・平成 23 年度以前の採択課題・・・2,000 万円/年(うち事務委託手数料は、研究経費に対し 10%以内)
- ・平成 24 年度以降の採択課題・・・研究経費 1,500 万円/年に、研究経費に対し 10%以内の事務委託手数料を加えた額

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
14,690		

左の欄は該当する場合のみ記入してください。

(単位：千円)

*

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			
	計	0	
消耗品費	消耗品(日本医科大学)	2,000	遺伝子実験試薬・キット類 800 千円 培地・安定同位体ラベル試薬 600 千円 その他一般試薬類 500 千円 特注石英チューブ類 100 千円
	計	2,000	
人件費・謝金等	学術(博士)研究員 1名 (日本医科大学)	4,200	12ヶ月分 X 1名 (4,200 千円/年 (松下 真一) より算出)
	研究補助 2名 (日本医科大学)	3,380	12ヶ月分 X (研究補助員 2名) (2,280 千円/年 (深澤 里沙子)、 1,100 千円/年 (萩生田 絵美) より算出 (勤務時間形態の差による))
	計	7,580	
その他経費	業務委託費 (JASRI)	2,000	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 500 千円 解析用計算機等 400 千円
	論文投稿・別刷料 (日本医科大学)	400	論文投稿・別刷料 400 千円
	計	2,400	

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（代表者を含む）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)	11 月初旬 頃、8 日間	海外共同研究実験 (Pulsed EPR 測定)、研究打合わせ	有 (渡航・ 滞在費の一部)
松下 真一・ 学術 (ポスト ク) 研究員	東京	米国 (ウルバナ)	11 月初旬 頃、8 日間	海外共同研究実験 (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（代表者を含む）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	スペイン (セビリア)	9月、8日間	国 際 学 会 (9th International Congress on Extremophiles) にて本 研究成果発表	有 (渡航・滞在費)
深澤 里沙 子・研究補助員	東京	スペイン (セビリア)	9月、8日間	国 際 学 会 (9th International Congress on Extremophiles) にて本 研究成果発表	有 (渡航・滞在費)
萩生田 絵 美・研究補助員	東京	スペイン (セビリア)	9月、8日間	国 際 学 会 (9th International Congress on Extremophiles) にて本 研究成果発表	有 (渡航・滞在費)
岩崎 俊雄・ 講師	東京	イギリス (ケンブリッ ジ)	6月頃、 8日間	本研究における共同実験 (測定)、研究打ち合わせ	有 (渡航・ 滞在費の一部)
松下 真一・ 学術 (ポスト ドク) 研究員	東京	イギリス (ケンブリッ ジ)	6月頃、 8日間	本研究における共同実験 (測定・解析)	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に限り、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	日本医科大学と SPring-8	7月頃、 21日間	研究打ち合わせ、共同研究実験 (単 結晶 EPR のデータ収集)、データ 討論、共著論文作成 (使用予定無)
Choi, Sylvia, K. ・ 大学院生	日本医科大学と SPring-8	7月頃、 21日間	共同研究実験 (分子生物学実験お よび単結晶 EPR の予備測定) (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」