

(様式1)

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
平成25年度実施計画書

平成25年 3月 6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^{いわさき}俊雄^{としお}

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 | 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、X線結 晶構造解析(精密化)分担 |
| 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・結晶化 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・結晶化 実験補助 |

* 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、または、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 EPR 解析および米国側総括 |
| Samoilova, Rimma, I. (新(H22年度参加)) | 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 EPR 解析 |
| Noguchi, Alexander. (新、昨年度途中より 継続) | University of Illinois at Urbana-Champaign・大学院生 | 生物物理学/分子生物学・本研 究における生物物理学・分子 生物学実験 |

* 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 (H25 年度) はプロジェクト最終年度であり、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を用いて緊密な国際共同研究を完遂、総括する。昨年度までの国際共同研究で、FdxB [2Fe-2S] (Cys)₄ クラスター近傍の全窒素原子の残基特異的 ¹⁵N ラベル導入酵素 (部位特異的変異酵素を含む)、および ARF [2Fe-2S] (His)₂(Cys)₂ クラスター近傍の全窒素原子の残基特異的 ¹⁵N(His)・¹⁵N 二重ラベル導入酵素 (部位特異的変異酵素を含む) を作成、FdxB については全測定を完了した。本年度前半で解析完了と論文等による発表を目指す。これまでの結果から、異なる鉄硫黄蛋白質ファミリーでは、クラスター電子構造に強く影響する周辺骨格領域に顕著な違いがあることが判明しており、FdxB では Cys S₁ と水素結合する Thr 主鎖 N₁、ARF では [2Fe-2S] クラスター本体の S^b と水素結合する Lys N₁ への spin density transfer が最大であった。こうした鉄硫黄蛋白質ファミリー間の相違をより詳細に調べるため、本年度は、新たな欠損株・¹⁵N や ¹³C ラベル導入酵素を作成、解析を補完する。昨年度より試みている単結晶 EPR 解析用の融合タンパク質の作成・結晶化、解析等は、技術的問題を克服できておらず、継続して遂行、可能な限り問題解決に尽力する。これまで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、期間内に論文等で公表、研究総括する。

1) アミノ酸特異的 ¹⁵N, ¹³C 導入酵素サンプルの調整:

①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 [Methods 2011, J. Am. Chem. Soc. 2012 論文等で公表の他、研究ホームページ上でも委細を公開 <<http://www.nms.ac.jp/fesworld/EcoliStrains.html>>]。これらの遺伝子組換え大腸菌株コレクションを理研バイオリソースセンターに無償寄託する事務手続きをすすめている (ストック菌株作成・各欠損遺伝子確認は完了、岩崎・深澤)。

本年度もこれまでの解析結果に基づき新たな菌株作成を継続して行う。とくに *trpB/tyrB* 二重欠損株、*tyrB/ilvE/hisG* 三重欠損株、*proC/hisG* 二重欠損株等を作成、¹⁵N, ¹⁴N, あるいは ¹³C アミノ酸導入サンプルを作成する。*tyrB/ilvE* 二重欠損株については、昨年度後期から半年間作成を試みており *tyrB, ilvE* 遺伝子の個別欠損株は作成済だが、日米両グループで両遺伝子の二重欠損株を得られない状況が続いている。本年度は *tyrB* 欠損株をもとに (i) *ilvE* 遺伝子クラスターの広い領域、または (ii) *ilvE* 遺伝子のごく一部のみの欠損を試み、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)。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、これらの成果を総合し、一部を 7 月 (フランス・グルノーブル、米国 PI の Sergei A. Dikanov 准教授も訪仏予定につき、現地での研究協議も計画) で岩崎・松下が、および 9 月の国際学会 (ドイツ・レーゲンスブルク) で岩崎・深澤・萩生田が発表する (成果発表に外国旅費を要する) 他、原著論文としても早期公表を計画している。

2) 鉄硫黄蛋白質結晶試料による EPR 解析:

②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。昨年度はイリノイ大グループ来日時に共同実験を計画し、イリノイ大でも multifrequency EPR 測定を試みたが、単結晶サンプルのサイズ、EPR 線幅等の問題があり、十分な S/N のスペクトルが得られなかった。蛋白質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の問題への対策として、(1) 目的鉄硫黄タンパク質をマルトース結

合蛋白質等の比較的巨大な単純融合タンパク質としての高発現、(2)結晶中の蛋白質分子間で相互作用する残基の部位特異的改変による結晶単位胞あたりの分子数の減少や空間群(結晶格子内の蛋白質分子パッキング)改善を試みている(岩崎・松下・萩生田)が、解決には至っていない。

本年度も、発現コンストラクト作成と結晶化を継続して行い、可能ならばデータ収集をすすめる(松下・萩生田・岩崎・熊坂)。また、昨年度からの現況を鑑み、より現実的な方法として電子原子核二重共鳴(¹H ENDOR)法によるg因子の全主軸方向の間接決定も実施する(ドイツ・ザールラント大学グループと共同実施する計画)。イリノイ大グループ来日の際の共同実験では、昨年度に引き続き、米国グループ大学院生の共同研究指導の他、予備的単結晶EPR解析を行い、g因子の主軸方向を可能な限り決定する(松下・岩崎・熊坂)。米国グループとの合議の上、改めて具体的に検討する。

③昨年度までの国際共同研究で、FdxB [2Fe-2S](Cys)₄クラスター近傍の全窒素原子の残基特異的¹⁵Nラベル導入酵素(部位特異的変異酵素を含む)を作成、全測定を完了した。その結果、FdxB凍結サンプルでは、予想に反し、Cys S₁と水素結合するThr N₁へのspin density transferが最大であり、その¹⁴N cross-peaksも逆ラベル法(¹⁴N Thrラベル導入した¹⁵N FdxBサンプルを用いた測定法)で帰属できた。一方、結晶構造解析では、Thr N₁はCys S₁近傍に位置するものの、水素結合のなす角度はやや不利であり、2D pulsed EPR解釈との整合性に蓋然性がある。この確認のため、本年度はFdxBを大量調整・結晶化、結晶試料の2D pulsed EPR測定を行い、非結晶凍結サンプルとのスペクトル比較を行う(松下)。FdxB結晶は針状であり、単結晶EPR法には不適だが、多結晶試料であれば調整・解析できる可能性がある。本年度前期中に実施する計画であり、その結果も踏まえてこれまでの全データを総合的に判断する。

3) 放射光での回折データ測定と解析:

④JASRI 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))をもとに、日本医科大グループでARF, TthNEET変異体酵素を結晶化した(深澤・萩生田、松下)。本年度も継続してこれらの強度データ収集・解析を行い(熊坂、松下、岩崎)、各種分光解析データと総合、成果公表する。

⑤日本医科大グループが作成中の部位特異的変異体・巨大融合タンパク質単結晶(岩崎・深澤・萩生田)につき、良質な結晶が得られ次第、可能な限りデータ収集・解析する[熊坂・松下(熊坂グループの共同指導のもと構造精密化一部のみ分担)]。④、⑤については、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、長期間ビームタイム占有困難なため、期間内に可能な限り実施し、逐次成果発表する。

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。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] 深澤・萩生田・松下・岩崎、[結晶化] 深澤・萩生田・岩崎、[単結晶EPR] 松下・岩崎・熊坂、[X線結晶構造解析] 熊坂・松下、[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おり、その成功には、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。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・松下は昨年度からの継続、結晶構造解析についてはJASRIグループと昨年度後期より共同指導)、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(昨年度は松下がイリノイ大に1週間滞在し2D pulsed EPR共同測定を実施、本年度は松下が4週間程度の海外共同実験を計画)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、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、内国旅費が必要不可欠である(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別刷代等も必要である。

昨年度は、米国グループが来日し、日本医科大と SPring-8 で共同実験した。当初計画通り、安定同位体ラベル導入酵素を用いた pulsed EPR 網羅的解析については、本年度内に成果発表・総括できる見込みである。期間内に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についても理研バイオリソースセンターへの一括寄託するための事務手続きをすすめており、広く一般利用・供与できるようにする。一方、申請時より審査員から技術的困難が指摘されていた単結晶 EPR 解析計画部分については、まだ多くの課題を解決できておらず、継続して尽力する。なお、昨年度の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 H25 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し、期間内に研究総括する。

7. 本年度経費総額 14,690 千円

(単位：千円)

| 研究経費 | | | | | | | 業務委託 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 | 1,620 | 200 | 2,100 | 7,580 | 2,328 | 163 | 699 (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。
- * 委託費の上限は申請額に基づき、次のとおりとします。
 - ・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 |
|----------|-----------|------------|
| | | |

左の欄は該当する場合のみ記入してください。
(単位：千円)

- * 委託費の上限は申請額に基づき、次のとおりとします。
 - ・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

| |
|-----------|
| 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 (単位：千円) | 積算内訳 |
|---------|-----------------------------|---------------|--|
| 設備備品費 | | | |
| | 計 | 0 | |
| 消耗品費 | 消耗品(日本医科大学) | 1,620 | 遺伝子実験試薬・キット類 720千円 培地・安定同位体ラベル試薬 500千円 その他一般試薬類 300千円 冷媒(液体ヘリウム・液体窒素) 100千円 |
| | 計 | 1,620 | |
| 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 600千円 培地類 300千円 その他一般試薬類 400千円 解析用計算機等 500千円 国内旅費(2回 x 2名分) 200千円 |
| | 論文投稿・別刷料 (日本医科大学) | 328 | 論文投稿・別刷料 328千円 |
| | 計 | 2,328 | |

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8-8参照))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）の国内出張計画

| 出張者 (氏名) | 出発地 (都市名) | 用務先 (都市名) | 旅行期間* | 用 務 (用務先・用務内容) | 経費負担** |
|---------------------------------|--------------|---------------------------------|------------------|--|-------------|
| 岩崎 俊雄・ 講師 | 東京 | JASRI/SPring-8 (相生・SPring-8) | 5 月下旬 頃、2 日間 | X 線結晶構造解析用の蛋白質単結晶試料運搬、熊坂グループとの結晶構造解析共同作業 | 有 (交通費・滞在費) |
| 松下 真一・ 学術 (ポ ストク) 研究 員 | 東京 | JASRI/SPring-8 (相生・SPring-8) | 5 月下旬 頃、3 日間 | X 線結晶構造解析用の蛋白質単結晶試料運搬、熊坂グループとの結晶構造解析共同作業 | 有 (交通費・滞在費) |
| 松下 真一・ 学術 (ポ ストク) 研究 員 | 東京 | JASRI/SPring-8 (相生・SPring-8) | 9 月中旬 頃、2 日間 | X 線結晶構造解析用の蛋白質単結晶試料運搬、熊坂グループとの結晶構造解析共同作業 | 有 (交通費・滞在費) |
| 松下 真一・ 学術 (ポ ストク) 研究 員 | 東京 | JASRI/SPring-8 (相生・SPring-8) | 12 月初旬 頃、2 日間 | X 線結晶構造解析用の蛋白質単結晶試料運搬、熊坂グループとの結晶構造解析共同作業 | 有 (交通費・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）の米国への渡航計画

| 出張者 (氏名) | 出発地 | 用務先 (都市名) | 旅行期間* | 用 務 (用務先・用務内容) | 経費負担** |
|---------------------------------|-----|--------------|------------------|--|-------------------------|
| 岩崎 俊雄・ 講師 | 東京 | 米国 (ウルバナ) | 11 月中旬 頃、7 日間 | 海外共同研究実験 (Pulsed EPR 測定)、研究打合わせ、総説論文作成 | 有 (予算執行状況により、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) | 6 月初旬 頃、28 日間 | 海外共同研究実験 | 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

(c) 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) | 出発地 | 用務先 (国名・都 市名) | 旅行期間** | 用 務 (用務先・用務内容) | 経費負担*** |
|----------------------------|-----|-----------------------|--------|---|------------------|
| 岩崎 俊雄・ 講師 | 東京 | フランス (グルノーブル) | 7月、9日間 | 生物無機国際学会(ICBIC 16) にて本研究成果発表・Dikanov グループとの研究打合せ | 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 | フランス (グルノーブル) | 7月、9日間 | 生物無機国際学会(ICBIC 16) にて本研究成果発表・Dikanov グループとの研究打合せ | 有(渡航・滞在費) |
| 岩崎 俊雄・ 講師 | 東京 | ドイツ (レーゲンスブ ルク) | 9月、9日間 | 国際学会(12th International Meeting, Thermophiles 2013) にて本研究成果発表 | 有(渡航・滞在費 の一部) |
| 深澤 里沙 子・研究補助員 | 東京 | ドイツ (レーゲンスブ ルク) | 9月、9日間 | 国際学会(12th International Meeting, Thermophiles 2013) 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 | ドイツ (レーゲンスブ ルク) | 9月、9日間 | 国際学会(12th International Meeting, Thermophiles 2013) にて本研究成果発表 | 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

(d) 米国側研究者の来日計画

| 出張者 (氏名) | 用務先 | 旅行期間* | 用 務 (用務先・用務内容) |
|-----------------------------|------------------|--------------|--|
| Dikanov, Sergei A.・ 准教授 | 日本医科大学 | 5月頃、 14日間 | 研究打合わせ、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) |
| Noguchi, Alexander・ 大学院生 | 日本医科大学と SPring-8 | 5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 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」