

日米化学研究協力事業 平成 22 年度実施報告書

平成 23 年 4 月 12 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 日本医科大学・医学部
(ふりがな) いわさき としお
職・氏名 講師・岩崎 俊雄

1. 事業名 日米化学研究協力事業
2. 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
3. 全採用期間 平成 22 年 10 月 1 日 ~ 平成 25 年 9 月 30 日 (3 年 0 ヶ月)

4. 研究参加者

- (1) 日本側参加者 4 名 (2) 米国側参加者 3 名
- (3) 当該年度に米国または相手国以外の国を訪問した日本側研究者氏名、派遣期間、主たる訪問先（米国以外の国における訪問先には下線をひいてください。）

氏名・所属	期 間 (現地到着日～現地出発日)	主たる訪問先
岩崎 俊雄・日本医科大学	11 月 15 日～11 月 21 日	米国・イリノイ大学ウルバナ-シャンパイン校
中野 良治・日本医科大学	11 月 15 日～12 月 4 日	米国・イリノイ大学ウルバナ-シャンパイン校
計 2 名 (延べ人数)	計 27 日	

- (4) 当該年度に受入れた米国側研究者氏名、来日期間、主たる訪問先

氏名・所属	期 間 (来日日～離日日)	主たる訪問先
当該年度は受入れなし		
計 0 名 (延べ人数)	計 0 日	

5. 研究実施状況

実施内容： 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。

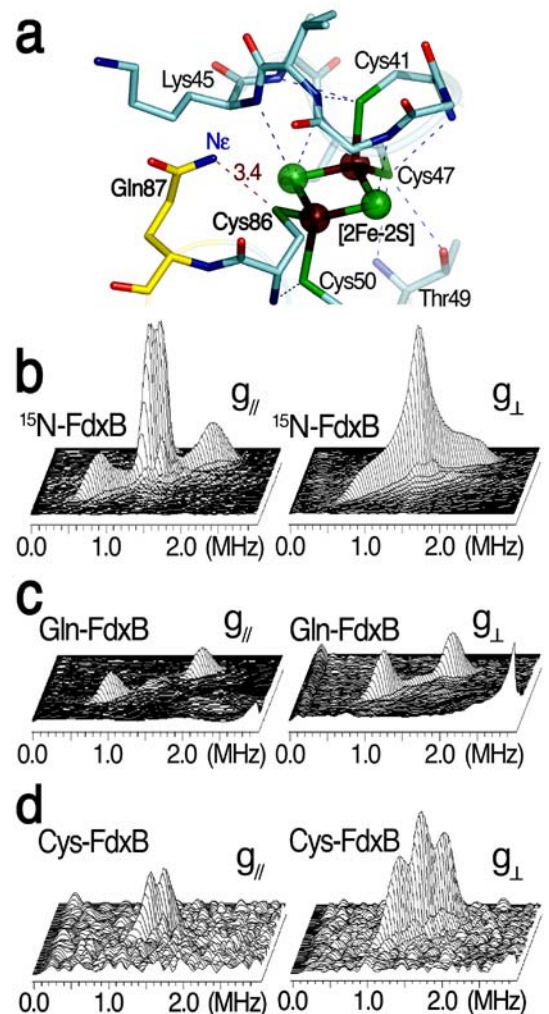
本年度共同研究計画遂行にあたり、日本グループでは、下記研究者4名が密接に連携をとりつつ遂行した〔分子生物学的手法、酵素の発現精製、変異体作成と解析〕中野（ポスドク研究員・日本医科大学）・長岡（研究補助員・日本医科大学）、岩崎、〔結晶化〕岩崎・長岡・熊坂、〔X線結晶構造解析〕熊坂、〔本計画における研究総括〕岩崎。本体制で以下の研究を実施し、その成果の一部をワークショップ・学会等で公表した他、一部論文投稿中、および投稿準備中である。また、岩崎・中野（日本医科大学）が米国イリノイ大学にて共同実験を実施した。

1) アミノ酸特異的 ^{15}N 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) と TthNEET0026 の H52C 変異酵素 ($[2\text{Fe}-2\text{S}] (\text{Cys})_4$ をもつ) につき、 ^{15}N ラベル導入酵素を作成し、 ^{15}N 二次元パルス EPR (HYSCORE) による相互比較解析を行った。

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を行い、NAD 代謝系に影響する可能性を得た。なお、これら全ての蛋白質については、良質の結晶がなかなか得られない H52C 変異体を除き、2.0-1.15 Å 分解能で結晶構造を精密化した（JASRI 熊坂グループによる）。

・ イリノイ大学との共同研究によりゲノムに欠損変異を導入して作成した Cys 要求性の高発現用宿主大腸菌株を用い、 ^{15}N -Cys 導入 FdxB, ^{14}N -Cys 導入 FdxB, ^{15}N -Cys 導入 SDX, ^{15}N -Cys 導入 TthNEET0026 を作成、HYSCORE 測定し、FdxB については十分なデータセットを得た（右図 a-d）。この結果、Cys 主鎖 N_α に由来するカップリングは、 ~ 0.15 MHz 程度であり、類縁蛋白質である還元型プチダレドキシンの ^{15}N NMR 解析から予想された値と大きく異なることが判明した。 ^{15}N -Cys 導入 SDX と TthNEET0026 サンプルについては、S/N が悪く、次年度前半に再測定し、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を系統的に比較解析する予定である。



・ 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、上記以外に ^{15}N -Val FdxB, ^{14}N -Val FdxB, $^{15}\text{N}_\alpha$ -Lys FdxB, ^{14}N -Lys FdxB, $^{15}\text{N}_\alpha$ -Lys ARF を調整、HYSCORE 測定した。シミュレーション結果では、 $^{15}\text{N}_\alpha$ -Lys ARF サンプルで ~ 1 MHz 以上の splitting を期待したが、実測データでは十分なシグナル強度の $^{15}\text{N}_\alpha$ -Lys cross-peaks を観測できず、次年度に新しいサンプルで再測定し検証する予定である

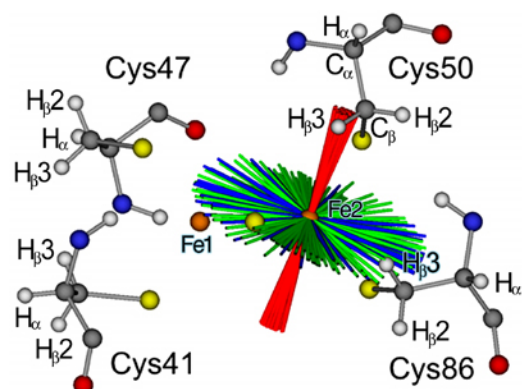
以上の結果から、金属酵素における ^{15}N HYSCORE スペクトルでは、単純なモデル錯体に基づく以前の解釈とは異なり、複数の ^{15}N 核の寄与が複雑に重なっていることを世界で初めて実証した。また、2次元パルス EPR における ^{15}N スペクトル分解能(前ページ図 b)の問題から、現時点で最善の方法論としては、本研究課題にある安定同位体ラベル酵素を用いた系統的解析が必須であることも明確となった(前ページ図 c, d)。従って次年度以降は、S/N のよい実験データを系統的にデータベース化して逐次蓄積するとともに、より予測精度がよく、なるべく実測値を反映するようなシミュレーションパラメータを検討するための道筋をつけたい。

2) 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:

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 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がないことを示した。また、JASRI 熊坂らとの共同研究により、放射光専用の顕微分光計を用いて 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/損傷する過程を解析したが、このための大量サンプル調整を行った。これらの結果の一部を学会発表で成果公表した他、現在投稿論文発表をすすめている。

3) 単結晶 EPR 予備解析とプロトン ENDOR:

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・決定し、この情報を踏まえた上でシミュレーションする必要がある。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、次年度から実施予定である。結晶サイズの問題については、soaking 等により、SDX と ARF 単結晶を十分なサイズまで成長できることがわかった。しかし結晶単位胞あたりの分子数の多さが問題であり、次年度以降に問題解決をはかる。結晶単位胞あたりの蛋白質分子数を減少することができれば、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。

FdxB については、結晶構造とプロトン ENDOR データに基づく g 因子の主軸方向を決定し、 g_{max} 軸が $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 平面の鉛直方向ではなく、配位子 Cys50 の C_β 方向に約 27° 傾いていることが示唆された(投稿中、左図、赤線部分)。

本年度のこれら主要成果を基盤とし、次年度以降、本国際共同研究の更なる深化・展開をはかりたい。