

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2006-2008  
 課題番号： 18608004  
 研究課題名 (和文) 超好熱菌の複合金属酵素のナノアッセムブリー機構解析  
 研究課題名 (英文) Exploring heterologous overexpression system and modular assembly of archaeal metalloenzyme complexes  
 研究代表者  
 岩崎 俊雄 (IWASAKI TOSHIO)  
 日本医科大学・医学部・講師  
 研究者番号： 40277497

研究成果の概要： 超好熱菌エネルギー代謝系の主要複合金属酵素は、学術上重要なだけでなく、バイオナノセンサーやエレクトロナノテクノロジー等への産業利用も見込まれる。ポストゲノム・ポストストラクチャー時代の応用展開を考え、超好熱菌の複合金属酵素をコードする遺伝子クラスターの簡易発現系ストラテジーの大枠を考案した。各種分光学的解析、結晶構造解析等と合わせて検討・改善を重ね、当初の主たる研究目標をほぼ達成できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	600,000	4,200,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：極限環境生物学

キーワード：酵素、蛋白質、極限環境生物、古細菌、微生物、機能生化学、鉄硫黄クラスター

## 1. 研究開始当初の背景

メタン・水素代謝関連酵素など、超好熱菌エネルギー代謝系の主要複合金属酵素は、学術上重要なだけでなく、バイオナノセンサーやエレクトロナノテクノロジー等への産業利用も見込まれる。これらの極限金属酵素は、有限種類の小さな scaffold タンパク質部品 (機能性モジュール) の組み合わせることで様々な代謝、分子認識、触媒活性など幅広い機能的多様性を獲得し、また各種金属イオンを結合することで、非常に温和な条件下、複雑な化学反応を触媒する能力を獲得してきた。すなわち、(重)金属コファクター生合成とタンパク質側の認識システムは互いに

相補的關係を保ちつつ、生命進化過程をたどってきたと考えられる。さらに言えば、現在の「超好熱菌酵素の特殊金属中心」の生合成・ナノアッセムブリー機構は、生命誕生以前 (約 38 億年以上前) の「化学進化」時代に遡り、これに続く「生物進化」時代を土台に築かれたと推察される。

超好熱菌の複合金属酵素は一般にモジュラー構造をとり、比較的小さいサブユニット (機能性モジュール) から構成される。このような構造は祖先型酵素の特徴と考えられ、好気性常温菌や真核生物ホモログでは複数の機能性モジュールが遺伝子レベルで融合し、巨大サブユニットに機能進化している例

も多い。本研究申請時において、国際的にも焦眉の課題は(1)酵素複合体をコードする遺伝子クラスターにつき、適当な大量発現系がほとんど無いこと、(2)金属コファクターの生合成系やナノアッセムブリ機構に不明な点が多く、リコンビナントタンパク質として精製できても活性をもつのはわずかなこと、(3)したがって酵素の人為的改変による詳細な解析や産業への応用が困難なことであった。また(4)個々の機能性モジュールを大腸菌発現させその活性中心を解析すると、金属酵素複合体中とは違う性質を示す例も知られていた。これは複合金属酵素の分子進化の足跡を想起させる。したがって、複雑な生命システムをより本質的なレベルで理解し、そこからのポストゲノム・ポストストラクチャー時代の応用展開をはかるのであれば、「複合金属酵素のナノアッセムブリ機構の実体」をまず把握する戦略が特に重要と考えた。

## 2. 研究の目的

構造が堅く扱いやすい超好熱菌の各種(複合)鉄硫黄酵素をモデル系とし、主たる3つの研究目的を設けた。

(1) 好熱菌タンパク質を用いた金属クラスターのナノアッセムブリ機構：超好熱菌リスケ型鉄硫黄タンパク質スルレドキシンは構造が堅く、従来予測されていなかった新規の酸化分解反応中間体のX線結晶構造決定(1.7Å分解能)に世界に先駆けて成功した。この立体構造に基づき、金属配位子に点変異導入した一連の変異酵素を作成、精製、結晶化し、系統的にX線結晶構造解析・分光学的解析することで、タンパク質高次構造に基づく、生体の鉄硫黄クラスター形成・構築原理の分子基盤の詳細解明を目指した。

(2) 超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする遺伝子クラスターの簡易発現系の構築：好熱菌よりクローニングした遺伝子クラスターをそのまま発現ベクターに組込むと、下流側 ORFs の発現効率が著しく低下する例が報告されている。この状況を踏まえ、超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする目的遺伝子クラスターにつき、主に分子生物学的手法により、下流側 ORF (群) の簡易かつ効果的な発現方法論の検討を第二の目的とした。

(3) 超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする遺伝子クラスターの効果的発現のための改善検討：鉄硫黄クラスターは生物に普遍的に存在し研究の歴史も長いが、鉄硫黄クラスター生合成系遺伝子 (*nif*, *isc*, *suf* など) の存在・生理機能(イオウ転移酵素など)・ミトコンドリア鉄異常蓄積等の病態との関連が

分かってきたのは最近である。鉄硫黄クラスターをはじめ、ヒドロゲナーゼ、タングステン酵素等の特殊な触媒中心をもつ酵素では、分子成熟に補欠分子族の生合成遺伝子群が必須であり、活性ある発現酵素を大量に得ることが困難である。すなわち、超好熱菌の複合鉄硫黄酵素を大腸菌で機能発現させる場合、単にポリペプチド鎖が揃うだけでは不十分であり、活性中心などにきちんと金属コファクター等が組み込まなければならない。このため、大腸菌発現ベクターの改変に加え、目的産物の発現条件を変えつつ検討し、問題解決をはかることを第三の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、私達独自の研究成果の上に構築してきた超好熱菌由来の(複合)金属酵素類 [Iwasaki *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 9129-9134; Kounosu, Iwasaki *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 12519-12528; Iwasaki *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13902-13903; Iwasaki *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4788-4789; Uchiyama, Iwasaki, Kumasaka *et al.* (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D* **60**, 1487-1489; Li, Iwasaki *et al.* (2003) *Biochemistry* **42**, 15003-15008; Iwasaki, Ohmori *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39642-39648; Cosper, Iwasaki *et al.* (2002) *Protein Sci.* **11**, 2969-2973; Zhang, Iwasaki *et al.* (1996) *J. Biochem.* **120**, 587-599 他] を主たる研究材料に用いた。

(1) 好熱菌タンパク質を用いた金属クラスターのナノアッセムブリ機構につき：超好熱菌スルフォロバスのリスケ型鉄硫黄タンパク質スルレドキシンの高度好熱菌サーマスの mitoNEET ホモログ (*Tth*-NEET0026) を材料に、金属配位子に点変異導入した一連の変異酵素を PCR 変異導入法で作成、精製、結晶化した。得た単結晶は、高輝度放射光施設 SPring-8 (兵庫県播磨) で逐次回折データ収集し、可能な場合は精密化した。各種変異酵素につき、可能な限り、電子スピン共鳴 (EPR)・パルス EPR (ESEEM, HYSCORE, ENDOR)・共鳴ラマンおよび基準振動解析・スタンフォード大放射光施設 SSRL での蛍光 X 線吸収スペクトル (XANES, EXAFS) 測定を、連携研究者(熊坂、大森)および研究協力者(ジョージア大・Robert A. Scott, イリノイ大・Sergei A. Dikanov, 立教大・漆山 秋雄)と密接に連携して行い、検討・解析した。

(2) 超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする遺伝子クラスターの簡易発現系の構築に

つき： 超好熱菌ゲノム DNA 配列情報をもとにクローニング・配列決定した各遺伝子クラスター（論文にて報告済）を本研究で用いた。まずモデル系として、ポリシストロン系発現ベクターを用いた大腸菌発現成功が報告されている古細菌スルフォロバスの 2-オキソ酸:フェレドキシン酸化還元酵素（ORF 2つ）をコードする遺伝子クラスター *oforAB* を、市販 pET 系ベクターに組込んだ。次に発現ベクター上で、下流側 ORF 上流の調節塩基配列（RBS 部位など）を適宜改変し、ホロ酵素の発現状況を生化学的・分光学的に検討した。さらに、得られた結果を、古細菌スルフォロバスのゲノム DNA 配列より見出した機能未知の 2-オキソ酸:フェレドキシン酸化還元酵素（ORF 4つ）とコハク酸:キノン酸化還元酵素（ORF 4つの膜結合タンパク質）をそれぞれコードする遺伝子クラスターの発現系構築に応用した。発現酵素産物につき、通常の酵素活性測定その他、EPR・共鳴ラマン法でも詳細に検討した。

（3）超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする遺伝子クラスターの効果的発現のための改善検討につき： 単純鉄硫黄タンパク質（リスケ[2Fe-2S]タンパク質）の場合と異なり、コハク酸:キノン酸化還元酵素では金属クラスターが挿入されにくいサブユニット（SdhB の C 末端側ドメイン）があり、発現条件（生育温度、培地添加物等）を検討した。得られた結果を、高度好熱菌サーマスのロイシン合成系イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（IPMI イソメラーゼ、[4Fe-4S] クラスターに基質が直接結合）LeuCD をコードする *leuCD* 遺伝子クラスターのホロ酵素発現にも応用した。発現酵素産物については、EPR・共鳴ラマン法で詳細に検討した。

#### 4. 研究成果

##### （1）好熱菌タンパク質を用いた金属クラスターのナノアッセムブリ機構：

① 超好熱菌スルフォロバスのリスケ型鉄硫黄タンパク質スルレドキシンを超遠心分析・X線結晶構造解析し、新規二量体リスケ[2Fe-2S]タンパク質であることを明らかにした。結晶構造（1.7 Å 分解能）では、従来予測されていなかった新規の可逆的な酸化的分解反応中間体を見出し、学会発表した。この中間体形成メカニズムにつき専門家から当初批判があり、逐次真摯に検討を重ねた。結晶化の母液に Cd<sup>2+</sup>イオンが含まれたり、低 pH 条件のために鉄が抜け落ちた可能性については、Cd<sup>2+</sup>イオンによる効果、他の条件での結晶化および構造解析、結晶サンプルを用いた共鳴ラマン・基準振動解析・Fe K-edge EXAFS 測定、発現酵素ではなくスルフォロ

バスから直接精製した天然スルレドキシンの結晶化を検討した。これまでの結果を総合すると、この酸化的分解反応中間体は Fe(II) で、Cd<sup>2+</sup>イオンにより生成したわけではなく、リスケ型 [2Fe-2S] クラスターの Fe(III)-N 結合の切断により形成されることを明らかにした。また、過剰な FeSO<sub>4</sub> を単結晶にソーキングするだけで、ほぼ 8 割 [2Fe-2S] クラスターが再構成されたことから、無機スルフィド 2 つが結合した状態の新しい Fe(II) 中間体であることを実証した。

② 超好熱菌スルレドキシンの単結晶を長時間（6 ヶ月以上）放置すると完全に退色した単結晶になり、これを 3 Å 分解能で構造決定した。金属中心の電子密度のかさ高さ と B 因子、さらに 80 mM Cd<sup>2+</sup> 存在下スルレドキシンは少なくとも 1 ヶ月はほぼ退色しないことから、無機スルフィド 2 つが結合した状態の Fe(II) 中間体がほぼ残存していると考えた。これを検討するため、S への親和性が非常に高い Hg<sup>2+</sup> を、新たに調整した単結晶にソーキングし、退色産物を 3.2 Å 分解能で構造決定し、Fe<sup>2+</sup> 中心と Hg<sup>2+</sup> はごくわずかにしか置換しないことを確認した。これらを総合し、リスケ型 [2Fe-2S] クラスターの Fe(III)-N 結合の切断機構を考察した（論文として公表予定）。

③ 超好熱菌スルレドキシンの結晶構造で発見した Fe<sup>2+</sup> 中心を酵素的に再構成することを目的として、大腸菌の鉄硫黄クラスター生合成（ISC）系 *isc* 遺伝子クラスターとの共発現を検討した。従来、各種の鉄硫黄タンパク質は、共発現で産物収量が増すことが多例報告されてきたが、スルレドキシン遺伝子の場合には、予想に反して、むしろホロタンパク質生成が顕著に阻害された。発現酵素や培養法を検討し、スルレドキシンは、大腸菌内で ISC 系と Fe イオンを奪い合うと推察した。スルレドキシンの生理機能は不明だが、古細菌内で鉄代謝ないし鉄硫黄クラスター生合成に寄与する可能性がある。

④ 超好熱菌スルレドキシンの結晶構造をもとに、軸配位子を系統的に変化させた変異体を作成、結晶化、1.6-1.65 Å 分解能で逐次結晶構造決定した。各種分光学的データと合わせ、結晶構造を相互比較することで、ポリペプチド骨格への [2Fe-2S] クラスターの組み込み機構における構造特異性を今後詳細に解析する予定である（論文として公表予定）。

⑤ 超好熱菌スルレドキシンのクラスター配位残基に点変異 His64→Cys 導入すると予想された [2Fe-2S](Cys)<sub>3</sub>(His)<sub>1</sub> クラスターはほとんど形成されず、主として単核 Zn

配位型になった。比較のため、天然型[2Fe-2S] (Cys)<sub>3</sub>(His)<sub>1</sub>クラスターをもつ mitoNEET ドメインをラット cDNA よりクローニング・発現し、EPR・HYSCORE・共鳴ラマン・EXAFS 解析し、さらに、高度好熱菌サーマスの mitoNEET ホモログ (*Tth*-NEET0026) を同定、発現、精製、結晶化した。これらの結晶構造を相互比較することで、ポリペプチド骨格への重金属イオン結合機構における構造特異性 (選択性) を今後研究する予定である。

## (2) 超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする遺伝子クラスターの簡易発現系の構築:

① 好熱菌よりクローニングした遺伝子クラスターをそのまま発現ベクターに組み込むと、下流側読み枠 (ORFs) の発現効率が著しく低下する例が知られている。ORF 2つをもつ超好熱性古細菌スルフォロバス 2-オキソ酸:フェレドキシン酸化還元酵素 *oforAB* 遺伝子クラスターでは、ポリシストロン系のデュアルプロモーター発現ベクターを用い、シャペロニン *groELS* 遺伝子と共発現系が報告されている。この発現系は優れているが、ORF 数が増大すると手技的に煩雑になり、高発現ハイスループット化が実質困難である。こうした観点から、まず超好熱菌 *oforAB* 遺伝子クラスターを直接、市販のシングルプロモーターをもつ pET 系ベクターに組み込み、下流側遺伝子発現の増減を調べた。一般に古細菌 16S rRNA 遺伝子は、大腸菌遺伝子とは進化的に大きく隔たる。このため、大腸菌内では古細菌型リボソーム結合 (RBS) 部位が正常に機能せず、下流側 ORF 発現量が端的に減少ないし抑制されると考えられていた。しかるに、私達のシングルプロモーター発現系では、下流側 *oforB* 遺伝子も有為に高発現した。また、大腸菌からの精製産物は、両サブユニットをもつ鉄硫黄ホロ酵素であり、EPR・共鳴ラマン解析から、[4Fe-4S] クラスターが正常に組み込まれていること、および基質 2-オキソグルタル酸添加により本酵素ファミリー特有な有機ラジカル中間体形成を確認した。

② 上記の予想外の結果に基づき、超好熱菌 *oforAB* 遺伝子クラスターの下流側 *oforB* 遺伝子の上流域を調べたところ、「大腸菌様 Shine-Dalgarno (SD) 配列」を見出した。この領域に一連の変異を導入し、系統的に解析したところ、本領域が下流側 *oforB* 遺伝子発現に寄与することを確認した。しかし、近年大腸菌リボソームの単分子観察実験で「翻訳アレスト」が起こると報告されている変異塩基配列を導入しても、下流側 *oforB* 遺伝子は有為に発現し、ホロ鉄硫黄酵素産物が得られた。これまで経験的に、鉄硫黄タンパク質の大腸菌内発現では、鉄硫黄クラスター挿入の効率化のため、Fe<sup>3+</sup> 添加 Luria-Bertani 培

地を用いた低温発現誘導が有効なことが分かっている。この条件では、大腸菌はコールドショック状態にあり、正常な翻訳系とは若干異なり、SD 配列に依存した翻訳調節を部分的バイパスするような機構が働いているか、あるいは、SD 配列認識そのものが少し甘くなっている可能性がある。

③ 上記知見をもとに、超好熱菌スルフォロバスのゲノム DNA 配列で見出した機能未知 2-オキソ酸:フェレドキシン酸化還元酵素をコードする遺伝子クラスターにつき、①と同様に、下流側遺伝子上流の RBS 部位を全く変更することなく、発現させた。この遺伝子はゲノム DNA マップでは ORF 3つと予測されていたが、発現産物はポリペプチド鎖 4本からなる  $\alpha\beta\gamma\delta$  型酵素であった。ゲノム塩基配列を再検討した結果、4つめの  $\delta$  サブユニット遺伝子がアノテーションされていないことがわかった。発現酵素は酸素感受性が非常に高く、EPR・共鳴ラマン解析から、本来 3つある [4Fe-4S] クラスターの 1つ (分子外側近傍の遠位クラスター) が、発現・精製時に、[3Fe-4S] クラスターに酸化分解され、完全失活していることがわかった。この遠位クラスターは、嫌気条件下、Fe<sup>2+</sup> と DTT 処理で、[4Fe-4S] クラスターに部分的に再構成し、再構成  $\alpha\beta\gamma\delta$  型酵素の基質特異性解析より、超好熱菌スルフォロバスの分岐アミノ酸合成系鍵酵素 (2-オキソ吉草酸:フェレドキシン酸化還元酵素) と同定できた。以上の研究成果は、部分的に学会発表した他、今後論文として詳細に報告する予定である。

## (3) 超好熱菌の複合鉄硫黄酵素をコードする遺伝子クラスターの効果的発現のための改善検討:

① 超好熱性古細菌ゲノム DNA 配列に見られる種々の遺伝子クラスターを検討した結果、下流側 ORF 上流域に、しばしば「大腸菌様 SD 配列」があることがわかった。例えば、上記 (2) ③ の  $\alpha\beta\gamma\delta$  型酵素では、下流側 ORF 3つ全ての上流域に大腸菌様 SD 配列が存在した。これらが古細菌で実際に同様な機能しているか否かは不明であるが、大腸菌簡易発現ハイスループット化に際し、こうした大腸菌様 SD 配列を技術利用できそうか否か、さらに別遺伝子クラスターでも検討した。超好熱菌スルフォロバスの呼吸系複合膜酵素 コハク酸:カルダリエラキノン酸化還元酵素 (SdhABCD 複合体) はサブユニット 4つからなり、共有結合性 FAD、4-5 個の鉄硫黄クラスターをもつ祖先型複合体 II である。4つのサブユニットのうち、SdhA, B, D は大腸菌で発現可能 (Iwasaki, Ohmori *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39642-39648) であるが、[2Fe-2S] 1つ、[4Fe-4S] クラスター 2つをも

つSdhBサブユニットは大腸菌で正常発しない。このため、単純に*sdhABCD*遺伝子クラスターを(2)の簡易発現系に組込んでも、ホロ酵素複合体は得られず、最上流ORFに該当するHis-tag付きSdhAサブユニットのみが主として得られる(未発表)。培養条件を詳細に検討した結果、(シャペロニンやISC系遺伝子クラスターを共発現させなくても)リボフラビン、 $\text{FeSO}_4$ 、L-システイン、ピリドキサル塩酸塩をLuria-Bertani培地に添加し、低温誘導発現するだけでホロSdhABCD複合体が得られることがわかった。リボフラビンと $\text{Fe}^{2+/3+}$ 添加のみでは、ホロ酵素複合体はほとんど得られなかった。ピリドキサルリン酸とシステインは、ISC系遺伝子産物のイオウ転移酵素IscSの補酵素および基質である。これらを十分補充することでSdhBサブユニットC末端側の2つの[4Fe-4S]クラスター挿入効率が上がり、結果として大腸菌内でSdhABCDホロ酵素複合体が形成されることが示唆された。

② 上記(3)①で検討した系を用い、超好熱菌*sdhABCD*遺伝子クラスターの下流側遺伝子*sdhB*、*C*、*D*それぞれの上流域に、市販高発現ベクターで使われる大腸菌様RBS配列を、人為的に導入した。リボフラビン、 $\text{FeSO}_4$ 、L-システイン、ピリドキサル塩酸塩をLuria-Bertani培地に添加した系で低温誘導発現させたところ、精製SdhABCDホロ酵素複合体の収量は3-5倍程度に増加した。これを用いたEPR・共鳴ラマン解析等から、SdhB、Cサブユニットの[2Fe-2S]および[4Fe-4S]クラスターは正常に組込まれているが、SdhAのFADは非共有結合であることが分かった。呼吸鎖複合体IIでのFAD翻訳後修飾(共有結合化)機構は不明だが、他の共有結合性フラビン酵素の研究から、一般には酸化還元反応と考えられている。すなわち、SdhABCD複合体の分子成熟には、超好熱菌の生理条件下に近い高温での酸化還元反応が必要な可能性がある。なお、本リコンビナントSdhABCD複合体は結晶化した。高輝度放射光施設SPring-8で回折データ収集し、現時点での最大分解能は6-7Å分解能程度である。位相決定には至っていないが、精製法・結晶化条件等を今後検討することで、超好熱菌の祖先型呼吸鎖複合体IIの立体構造解明へと繋がる可能性がひらけた。

③ ヒドロゲナーゼ、タングステン酵素等の特殊な触媒中心をもつ酵素では、分子成熟に補欠分子族の生合成遺伝子群が必須であり、活性ある発現酵素を大量に得ることが困難である。上記(2)(3)の結果を総合すると、私達のプロトタイプ簡易発現系は、ある程度これらの問題に対処できよう。しかし、

目的遺伝子クラスターのORF数が増大すれば、下流側遺伝子産物の発現効率低下や(3)②の結果から、技術的限界は当然予想される。より普遍的難題として、微生物の複合金属酵素の構成遺伝子群は、必ずしも全て単一遺伝子座にクラスターとして並んでいるわけではなく、(a)1つまたは複数遺伝子が二つ以上の遺伝子座に離れて局在し、かつ(b)その翻訳後修飾等のため、さらに別遺伝子座の遺伝子群が必須な場合がありうる。さらに、(c)ゲノムGC塩基含量が高い好熱菌などでは、典型的な大腸菌様SD配列の存在率も下がるかもしれない。このような極端な場合、上記簡易ストラテジーのみでは、高発現系作成に困難を極める。こうした観点から、上記発想とは全く異なるストラテジーも検討した。

高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8(以下、サーマス)は、好熱菌丸ごと一匹プロジェクト標的微生物であり、網羅的なハイスループット構造機能解析が進行中である。そのロイシン合成系の祖先型イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼLeuCD複合体は、一次構造からTCA回路アコニターゼと相同で活性中心に[4Fe-4S]クラスターをもつと予想されてきたが、不安定で精製・発現報告例が皆無であった。私達は、サーマス*leuC*、*leuD*遺伝子をそれぞれ市販pET系ベクターに組み込み、別々に大腸菌発現させた。精製LeuCサブユニット産物は[3Fe-4S]クラスターを結合したが、熱処理に耐えず、耐熱性を完全に喪失していた。一方、*leuC*、*leuD*を別個に発現した大腸菌を培養・集菌し、両者を混合後、超音波破碎して熱処理したところ、熱安定なホロLeuCD複合体として大量精製できた。すなわち、サーマスLeuCDの場合、遺伝子クラスターとして共発現させなくとも、個別に大腸菌発現後、*in vitro*熱処理で簡単に耐熱性ホロ酵素複合体として再構成できることがわかった。EPR・共鳴ラマン解析から、精製LeuCD複合体には[4Fe-4S]クラスターが主として結合しており、基質添加に伴い、TCA回路アコニターゼと同様のスペクトル変化が観測された。

#### (4) 研究総括と今後の展望

国内外で連携研究チームをつくり、精力的に尽力した結果、当初の研究主目的の大枠をほぼ達成できた。途中、研究室移転などにより若干のスピードダウンを余儀なくされたが、今後細部を可能な限り詰め、論文として適宜公表していく展望が開けた。すなわち、遺伝子工学的技術と各種分光学・X線結晶構造解析技術を併用する多角的手法により、超好熱菌の単純および複合金属酵素のナノアッセンブリー機構を解明してゆく分子論的研究の展望が開けた。とくに、研究成果(2)(3)で報告したとおり、

超好熱菌の複合金属酵素をコードする遺伝子クラスターの簡易発現ストラテジーの大枠を、期間内にはほぼ考案できた。今後この点をもっとも重要な成長点とするとともに、より詳細な構造機能生理解析へと展開をはかり、極限環境生物分野で日本発の新しい潮流をつくっていきたいと考えている。

## (5) 謝辞

この研究の遂行にあたり多くの皆さんの協力を頂きました。とくに実験・測定の遂行につき、鴻巣 麻子（日本医科大、上級研究技術員）、大森 大二郎（順天堂大）、熊坂 崇（東工大、JASRI/SPring-8）、内山 琢郎（東工大）、漆山 秋雄（立教大）、石川 裕之（立教大）、大島 泰郎（共和加工（株））、林・岩崎 容子（共和加工（株））、今井 竹夫（立教大）、小澤 由希子（立教大）、Sergei A. Dikanov（イリノイ大）、Derrick Kolling（イリノイ大）、Antony R. Crofts（イリノイ大）、Robert A. Scott（ジョージア大）、Jürgen Hüttermann（ザールラント大学）博士 諸氏の助言と協力を頂きました。また日本医科大の西野 武士博士の貴重な助言と協力、SPring-8 および SSRL ビームラインスタッフの協力を頂きました。その他多くの皆さんからも助力を頂きました。ここにしるして感謝致します。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

Asako Kounosu, Toshio Iwasaki, Seiki Baba, Yoko Hayashi-Iwasaki, Tairo Oshima, Takashi Kumasaka (2008) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the prototypal homologue of mitoNEET (*Th*-NEET0026) from the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr. Sect. F* **64**, 1146-1148. 査読有.

Toshio Iwasaki, Daijiro Ohmori, Nobutaka Shimizu, Takashi Kumasaka (2007) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the ISC-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Pseudomonas putida* JCM 20004. *Acta Crystallogr. Sect. F* **63**, 1014-1016. 査読有.

Toshio Iwasaki, Daijiro Ohmori, Asako Kounosu. (2007) Modular structure and assembly of archaeal respiratory complex II. *Proceedings of International Symposium on Extremophiles and Their Applications* **2005**, 329-329. 査読無.

Toshio Iwasaki, Asako Kounosu, Daijiro Ohmori, Takashi Kumasaka (2006)

Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the hyperthermophilic Rieske protein variant (SDX-triple) with an engineered rubredoxin-like mononuclear iron site. *Acta Crystallogr. Sect. F* **62**, 993-995. 査読有.

Toshio Iwasaki, Asako Kounosu, Derrick R.J. Kolling, Sangmoon Lhee, Antony R. Crofts, Sergei A. Dikanov, Takuro Uchiyama, Takashi Kumasaka, Hiroyuki Ishikawa, Miwa Kono, Takeo Imai, Akio Urushiyama. (2006) Resonance Raman characterization of archaeal and bacterial Rieske protein variants with modified hydrogen bond network around the [2Fe-2S] center. *Protein Sci.* **15**, 2019-2024. 査読有.

Toshio Iwasaki, Asako Kounosu, Rimma I. Samoilova, Sergei A. Dikanov. (2006) <sup>15</sup>N HYSCORE characterization of the fully deprotonated, reduced form of the archaeal Rieske [2Fe-2S] center. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2170-2171. 査読有.

〔学会発表〕（計 3 件）

鴻巣 麻子 他、大腸菌を宿主とする超好熱性古細菌の遺伝子クラスターの簡易発現系. 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸.

大森 大二郎 他、インシュリン抵抗性改善薬標的タンパク質 mitoNEET と好熱菌ホモログの新規鉄硫黄クラスターの解析. 第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸.

鴻巣 麻子 他、モデル系としての [2Fe-2S] タンパク質の結晶構造と <sup>15</sup>N HYSCORE 解析. 第 3 0 回日本分子生物学会年会・第 8 0 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 14 日、横浜.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 俊雄 (IWASAKI TOSHIO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40277497

(2) 研究分担者

熊坂 崇 (KUMASAKA TAKASHI)  
高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・副主席研究員  
研究者番号：30291066

(3) 連携研究者

大森 大二郎 (OHMORI DAIJIRO)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：00124967