

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657073

研究課題名（和文）金属含有タンパク質における原子別酸化還元状態決定法の開発

研究課題名（英文）Research and development toward the determination for the redox state of individual metal atoms in proteins

研究代表者

竹田一旗（TAKEDA KAZUKI）

京都大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30332290

研究成果の概要（和文）：4Fe-4S 型の鉄イオウクラスターを持つ光合成細菌由来の高電位鉄イオウタンパク質と 2Fe-2S 型の鉄イオウクラスターを持つ Rieske タンパク質について、単結晶 X 線回折実験を吸収端近傍のさまざまなエネルギーの X 線を使用しておこない、回折データに含まれる異常分散効果から吸収スペクトルを金属原子ごとに再構成して酸化還元状態を決定する方法について研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Research and development toward the determination for the redox states of individual metal atoms in proteins from X-ray diffraction data sets collected near the absorption edges of the metals were performed by using the high-potential iron sulfur protein having the 4Fe-4S cluster and the Rieske protein having the 2Fe-2S cluster.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：異常分散、金属、タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

光合成や呼吸に関与するタンパク質の多くには、補因子として複数の金属原子が含まれていて、機能発現において中心的な役割を担っている。したがって、金属原子の酸化還元

状態を知ることは機能発現機構を解明するためには重要である。ところが、タンパク質の X 線結晶構造解析からは酸化還元状態についての直接的な情報は得ることができない。タンパク質中の金属原子の研究で最もよ

く使用されている方法が、X線吸収スペクトル法である。とくに、吸収端近傍のX線吸収スペクトルからは、金属原子の酸化還元状態を決定することが可能である。しかしながら、同種の金属が複数含まれているこのようなタンパク質の場合には、個々の金属原子についての情報を取り出すことが困難である。タンパク質結晶構造解析の分野ではこれまでに、位相決定において異常分散効果を利用してきた。通常は多波長異常分散法を適用するためにX線吸収スペクトルを測定し、異常分散効果が最大のX線エネルギーを割り出している。逆に、吸収端近傍のさまざまなエネルギーのX線を使用して測定した回折データから異常分散効果を抽出してプロットした実験 (Takeda et al., *Acta Cryst.* **D59**, 1440-1446. (2003)) からは、実際に吸収スペクトルが再現できることを確認した。この方法では、吸収スペクトルを原子ごとに決定できるため、新規なX線吸収スペクトルの測定方法に発展する可能性がある。

## 2. 研究の目的

金属原子の酸化還元状態、電子状態に関する情報は、光合成や電子伝達に関与するタンパク質における機能発現機構を解明するためには必要不可欠であるにもかかわらず、従来の計測手法では研究することが困難である。また、遷移金属はさまざまな電子配置を取る可能性があり、複数の遷移金属原子を含む系では、適切な量子化学計算を実行することも困難である。X線吸収スペクトル測定は含有金属の状態を測定する最も強力かつ汎用的な方法であるが、金属クラスターなど同種の

金属が複数含まれる場合には結果の一義的な解釈が不可能である。そこで、単結晶X線回折実験を吸収端近傍のさまざまなエネルギーのX線を使用しておこない、回折データに含まれる異常分散効果から吸収スペクトルを金属原子ごとに再構成して酸化還元状態を決定する新規な方法を開発して、複数の同種原子が存在していても、原子ごとの吸収スペクトルを決定することをめざす。本研究が実用化されれば、複数の同種金属を含む場合であっても、分子の心臓部ともいべき金属原子の電子状態に関する情報を実験的に導き出すことが可能となり、既存の常識に左右されない議論が可能となる。

## 3. 研究の方法

確立されたデータ収集方法や解析方法がないので、以下の方針 (i~v) に沿って研究をすすめていき、必要な個所は条件検討をおこなうことにした。(i) Fe-S クラスターなど複数の同種金属元素をもつタンパク質について大型の結晶を作製する。(ii) 放射光施設において含有金属の吸収端近傍で2eVおきに回折データを収集する。その際、エネルギーごとにX線の照射位置を変更し、X線損傷の影響をできるだけ除外する。(iii) 収集した回折データセットのひとつについて構造精密化を行い、各構造因子の位相を決定する。(iv) この位相情報を用いて、すべてのエネルギーのデータセットについて異常分散差フーリエ図を作成する。(v) 各金属原子における異常分散ピークの強度を数値化してエネルギーに対してプロットすることで、各原子の吸収スペクトルを個別に再構成する。

#### 4. 研究成果

好熱性光合成細菌 (*Thermochromatium tepidum*) 由来の酸化型高電位鉄イオウタンパク質 (HiPIP) の大型結晶 ( $0.6 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}^3$ ) を作製して、吸収端近傍 ( $1.74 \text{ \AA} = 7.1 \text{ keV}$ ) で  $2 \text{ eV}$  おきに 14 個の回折データを収集することができた (図 1)。同様に、還元型結晶についても同様のデータ収集をおこなった。また、それぞれの状態の結晶から X 線吸収スペクトルを収集した。波長校正用にフェロセン ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe(II)}$ ) 溶液の X 線吸収スペクトルも収集した。現在、14 個ものデータセットの間のスケーリング方法について試行中であり、今後は異常分散差フーリエ図の作成方法、プロット方法を検討しながら解析を進めていく予定である。

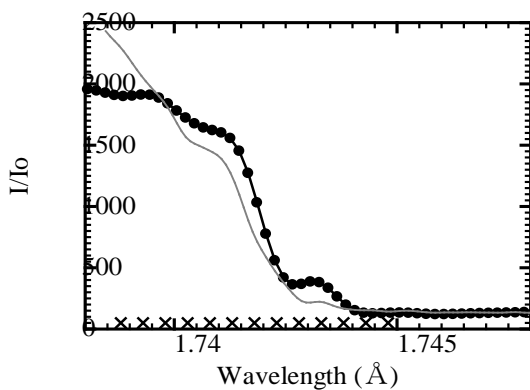


図 1 : HiPIP の X 線吸収スペクトルを黒線で、参照データとして測定したフェロセン ( $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Fe(II)}$ ) のスペクトルを灰線で示した。また、回折データを収集した 14 のエネルギー (波長) を×印で示した。

2Fe-2S 型の鉄イオウクラスターを持つ金属タンパク質に適用するために、好熱性シア

ノバクテリア (*Thermosynechococcus elongatus*) 由来の Rieske タンパク質について結晶を作製し、回折データの収集と構造解析を行った。また、金属イオンの同定のために吸収端近傍において回折データを収集して異常分散効果を検出した。

#### 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 3 件)

(1) Veit, S., Takeda, K., Tsunoyama, Y., Rexroth, D., Roegner, M. and Miki, K. Structure of a thermophilic cyanobacterial  $b_6f$ -type Rieske protein. *Acta Cryst.*, **D68**, 1400-1408 (2012). (査読有)

DOI:10.1107/S0907444912034129

(2) 竹田一旗、三木邦夫. 超高分解能・超高精度のタンパク質結晶構造解析. *生物物理*, **51**, 96-97 (2011). (査読無)

DOI: 10.2142/biophys. 51.096

(3) Takeda, K., Hayashi, T., Abe T., Hirano, Y., Hanazono, Y., Yohda, M. And Miki, K. Dimer structure and conformational variability in the N-terminal region of an archaeal small heat shock protein, StHsp14.0. *J. Struct. Biol.*, **174**, 92-99 (2011). (査読有)

DOI:10.1016/j.jsb.2010.12.006

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuchem.kyoto-u.ac.jp/organization/member/ktakeda.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹田 一旗 (TAKEDA KAZUKI)

京都大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30332290