

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06174

研究課題名(和文)磁気受容蛋白質複合体の会合制御による構造機能相関の解明

研究課題名(英文)Elucidation of structure-function relationship by controlling the association of magnetoreceptor protein complex

研究代表者

新井 栄揮 (ARAI, Shigeki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・上席研究員(定常)

研究者番号：00391269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ISCA1は、クリプトクロムとともに、磁気を知覚する感覚(磁覚)の機構を担う可能性がある蛋白質である。本研究では、ISCA1の構造・物性を明らかにするために、磁場印加・非印加条件下においてX線小角散乱解析を実施した。その結果、(i)カワラバト由来ISCA1は構造多型性を有し、二種類の構造(球状と棒状)を形成すること、(ii)球状のISCA1は柱状自己会合体を形成し、その会合面に鉄硫黄クラスターを結合して磁化率や磁気異方性を増大しうること、(iii) ISCA1柱状自己会合体の成長は磁場によって制御されることなどが明らかになった。得られた知見は、磁覚の蛋白質分子基盤の解明に資する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ISCA1の構造・物性だけでなく、他の蛋白質では殆ど例の無い自己会合の磁氣的制御の可能性も明らかにした。本成果は、磁覚の蛋白質分子基盤の解明に大きく貢献するとともに、多くの新奇的技術・材料の創出につながる可能性がある。例えば、ISCA1と他の蛋白質を融合する分子設計を行うことで、磁気を使って蛋白質分子配向・細胞挙動などを操作する技術の開発、外部磁場に応じて機能や配向を変える磁気応答バイオアクチュエーターの開発、磁場により非侵襲的に生体内局所濃度や効能を制御できる新薬開発などが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The ISCA1 protein, together with the cryptochrome protein, may play a role in the mechanism of magnetoreception. In order to clarify the structural and physical properties of ISCA1, we performed the small-angle X-ray scattering analysis under both applied and non-applied magnetic fields. We found that (i) the pigeon's ISCA1 molecule exhibits the structural polymorphism and forms two types of protomers (spherical and rod-shaped), (ii) the spherical ISCA1 molecule forms columnar oligomers and can bind iron-sulfur clusters on the oligomer's interface to increase its magnetic susceptibility and magnetic anisotropy, and (iii) the growth of ISCA1 columnar oligomer is controlled by magnetic field. These findings will contribute to the understanding of the molecular basis of magnetoreception.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 立体構造 X線小角散乱 磁覚

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物は、磁気の方角・強さ・場所を知覚として捉える“磁覚”を有する[1]。現在、磁覚の機構を説明する仮説の一つとして、磁気受容蛋白質仮説が提唱されている。この仮説ではクリプトクロム(CRY)蛋白質が“量子コンパス”として機能していると考えられており、そのような機能は他の蛋白質では知られていない。CRYは、図1に示す量子論的機構・光化学反応スキームによって磁気情報を受容すると推測され[2,3]、その推測は多くの研究により立証されてきた[3-5など]。また、CRY遺伝子を不活化したショウジョウバエは磁覚を喪失することからも、CRYが磁覚に寄与することはほぼ確実視されている[5]。しかし、CRYが磁気情報を受容する反応場や、CRYが受容した磁気情報の伝達先、および、磁気情報を脳に伝達して知覚化する機構などは明らかにされていない。本研究開始当初、磁覚保有種であるカワラバト由来CRY4 (clCRY4)と相互作用する蛋白質として、唯一同定されていたのは鉄硫黄クラスター (Fe-S クラスター) 輸送蛋白質の一種 clISCA1 (旧名 MagR)である[6]。clISCA1はclCRY4と複合体を形成し、その複合体は地磁気程度の弱磁場(0.4~10G)にも応答・配向するといった、蛋白質としては極めて特殊な性質を有する(図2)。この性質から、clISCA1はclCRY4を起点とする磁覚の機構に何らかの寄与をしている可能性が考えられた。22~25 Å分解能のクライオ電子顕微鏡解析

および相同蛋白質の立体構造情報を用いた分子モデリングによる先行研究[6]では、clCRY4/clISCA1複合体はclISCA1の自己会合体を軸とし、その周辺をclCRY4が螺旋状に取り囲む構造を形成していると推察されている(図2)。しかし、これまでclISCA1の構造・物性・磁覚に関わる機能等は殆ど明らかにされていない。

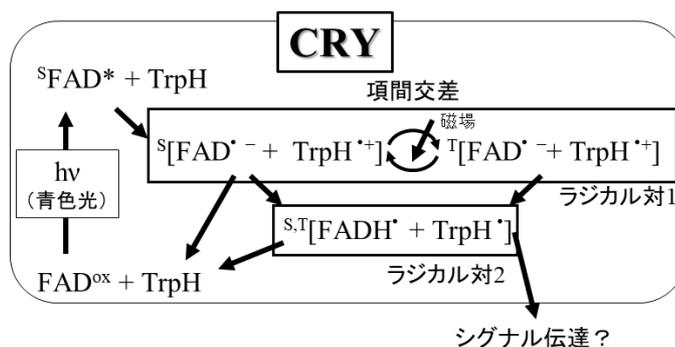


図1 CRYの光化学反応スキーム。FADはCRYが含有するフラビン補酵素。上付き文字Sは一重項、Tは三重項を表す。酸化型FAD<sup>ox</sup>が青色光により励起S状態へ移行した後、近傍のトリプトファン(Trp)からFADへ電子が移動し、FADとTrpから成るラジカル対を生成する。このラジカル対を形成する原子と磁力線との相対角に応じて電子の項間交差(S/T状態間の確率的遷移)の効率が変化し、ラジカル対の化学反応性が電子スピン選択的に変化する。この化学反応性の変化がシグナル伝達に影響する可能性がある。

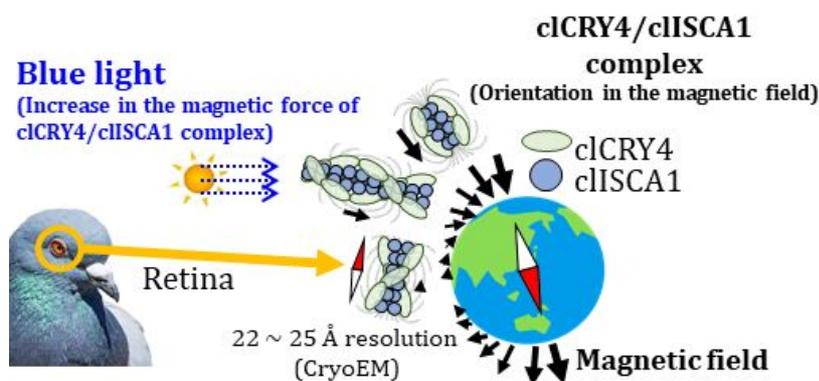


図2 clCRY4/clISCA1複合体の局在部位と地磁気応答の模式図。clCRY4/clISCA1複合体は、clISCA1自己会合体の軸上をclCRY4が螺旋状に配置した構造をとると考えられる。実線矢印の長さや方向は、地磁気の磁力強度と伏角を示す。

## 2. 研究の目的

磁気受容蛋白質候補、特にclISCA1について下記の目的達成を目指した。

- clISCA1の構造的特徴、及び、自己会合体形成機構を明らかにする。
- clISCA1の構造・物性(自己会合体形成など)への磁場効果を解明する。また、そのために必要となる手法・装置を改良し応用する。
- 得られた知見に基づき、clISCA1の機能を推定する。また、同蛋白質を利用した応用的研究への展開の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

大腸菌の遺伝子組換えにより調製した cIISCA1 を用い、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の BL10C を利用した X 線小角散乱解析 (SAXS) により、cIISCA1 の構造的特徴を明らかにした。より具体的には、得られた SAXS データをプログラム *Oligomer* [7] により解析し、試料溶液中に含まれる cIISCA1 粒子の形状・会合数・各会合体の体積分率などを求めた。cIISCA1 の相同蛋白質としては 1X0G (相同性: 29.3%) が Protein Data Bank に登録されている。1X0G は A,B,C,D 鎖からなるホモ 4 量体が生物学的単位だが、構造多型性を有し、同一のアミノ酸配列でも A, C 鎖は球状、B, D 鎖は棒状のサブユニットを構成している。そこで、*Oligomer* 解析に必要となる cIISCA1 の分子モデルとして、分子モデリングプログラム *Rosetta* [8] の *Ab Initio* modeling から球状モデル (Type-A) を、同プログラムの *comparative* modeling から棒状モデル (Type-B) を構築した。更に、研究協力者が開発した試料磁場印加装置 (図 3) [9] を Photon Factory・BL10C に設置するための改良設計を行い、同装置を用いて SAXS 測定を行うことで、cIISCA1 の構造・物性への磁場効果を調査した。

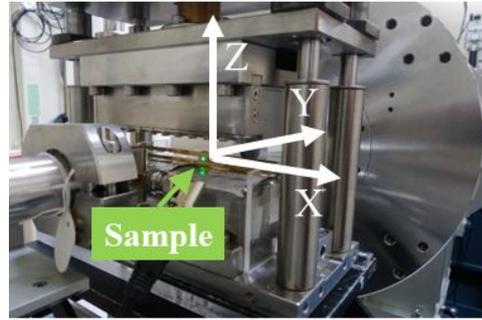


図 3 SAXS 用試料磁場印加装置の外観。Y 軸は X 線の入射方向。

### 4. 研究成果

(1) cIISCA1 の磁化・自己会合・多機能化を可能にする構造可変性を発見

磁場非印加条件下における SAXS 測定によって得られた cIISCA1 試料溶液の散乱曲線  $I(q)$  から平均回転半径  $R_g$  及び断面方向の回転半径  $R_c$  を算出した結果、 $R_g$  は 24 Å から 28 Å へ濃度依存的に増加する傾向があるのに対し、 $R_c$  はほぼ一定 ( $10.5 \pm 0.5$  Å) であることが明らかになった (図 4a)。この結果は、cIISCA1 濃度の増加とともに cIISCA1 の会合が進行し、柱状会合体を形成したことを示唆している。更に、図 4a の  $I(q)$  に対して前述の *Oligomer* プログラムによる解析を行った結果、試料溶液中には Type-A によって構成される 4 量体以上の自己会合体が含まれることが明らかになった (図 4b)。一方、Type-B の自己会合は 2 量体に止まること、及び、Type-A/Type-B 複合体は検出されないことも明らかになった。

続いて、サイズ排除クロマトグラフィー-X 線小角散乱法 (SEC-SAXS) 及び紫外可視吸収分光法により、ゲルろ過カラムから分取した cIISCA1 粒子の構造的特徴を明らかにした (図 5)。溶出ピークを細分化し、各画分の  $I(q)$  について *Oligomer* 解析を行った結果、溶出ピーク前半の画分

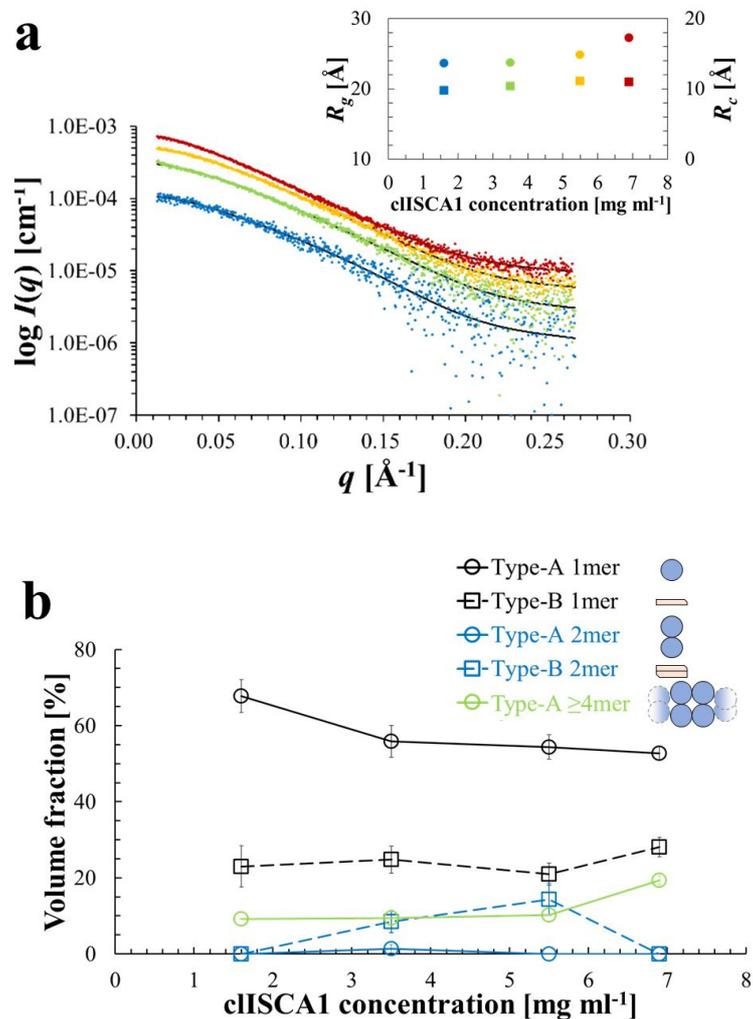


図 4 磁場非印加時における cIISCA1 の SAXS 解析結果。(a) は散乱曲線  $I(q)$  の蛋白質濃度依存性。点は実測した  $I(q)$ 、実線は *Oligomer* 解析によりモデルから算出した  $I(q)$ 。挿入図の  $R_g$  は平均回転半径、 $R_c$  は断面方向の回転半径。(b) は cIISCA1 モデル (図中の模式図) 及び (a) の  $I(q)$  を用いて *Oligomer* 解析により算出した各成分の体積分率。

には Type-A によって構成される 2~4 量体以上の会合体が含まれ(図 5a,b) これらの画分は Fe-S クラスタに由来する紫外吸収ピーク(330 nm, 420nm)を示すことが明らかになった(図 5c)。即ち、Type-A の自己会合体は Fe-S クラスタ結合能を有する。一方、Type-A 単量体、Type-B 単量体、Type-B 2 量体を主成分とする溶出ピーク後半の画分は 330 nm, 420nm の紫外吸収ピークが小さく、これらの粒子は Fe-S クラスタに対する親和性が低いことが明らかになった。

蛋白質分子上の Fe-S クラスタ結合部位は、少なくとも 4 つ以上のシステイン側鎖によって構成される。しかし、cIISCA1 が有するシステイン残基は単量体当たり 3 個である(Cys60, Cys124, Cys126)。従って、cIISCA1 は、Type-A が多量体化して会合面に 4 つ以上のシステインを集合させることで、Fe-S クラスタ結合部位を構成することが明らかになった。以上の結果から、cIISCA1 の構造的特徴及び会合機構について下記のように考察した。

- Type-A は蛋白質濃度依存的に柱状会合体を形成し、その会合面には Fe-S クラスタが空間的に配置しうる。この Fe-S クラスタの結合・配置は、cIISCA1 自己会合体の磁化率や磁気異方性を増大する可能性がある。
- Type-A と Type-B 間の構造可変性は、cIISCA1 の自己会合性や Fe-S クラスタとの親和性に影響し、Fe-S クラスタの輸送・転移に必要な機能と考えられる。

即ち、cIISCA1 は構造多型を利用して磁気応答機能と Fe-S クラスタ輸送機能を使い分ける多機能蛋白質の可能性はある。

## (2) 磁場印加による cIISCA1 自己会合現象を発見

試料磁場印加装置(図 3)を用いた cIISCA1 試料溶液の SAXS 測定の結果を図 6 に示す。60 分間・約 10kG の磁場印加の結果、 $I(q)$  の経時変化が観測された(図 6a)。また、 $I(q)$  のフーリエ変換処理により、粒子の実空間像を反映する距離分布関数  $P(r)$  を求めた結果、そのプロファイルは左右対称に近い形状から左右非対称な形状へと経時変化することが明らかになった(図 6b)。また、 $I(q)$  及び  $P(r)$  から  $R_g$ ,  $R_c$ , 最大径  $D_{max}$  を求めた結果、 $R_g$ ,  $R_c$  と比較して、 $D_{max}$  は磁場印加により大きく増大することが明らかになった(図 6c)。これらの結果は、磁場印加により cIISCA1 の会合が進行して柱状会合体が長軸方

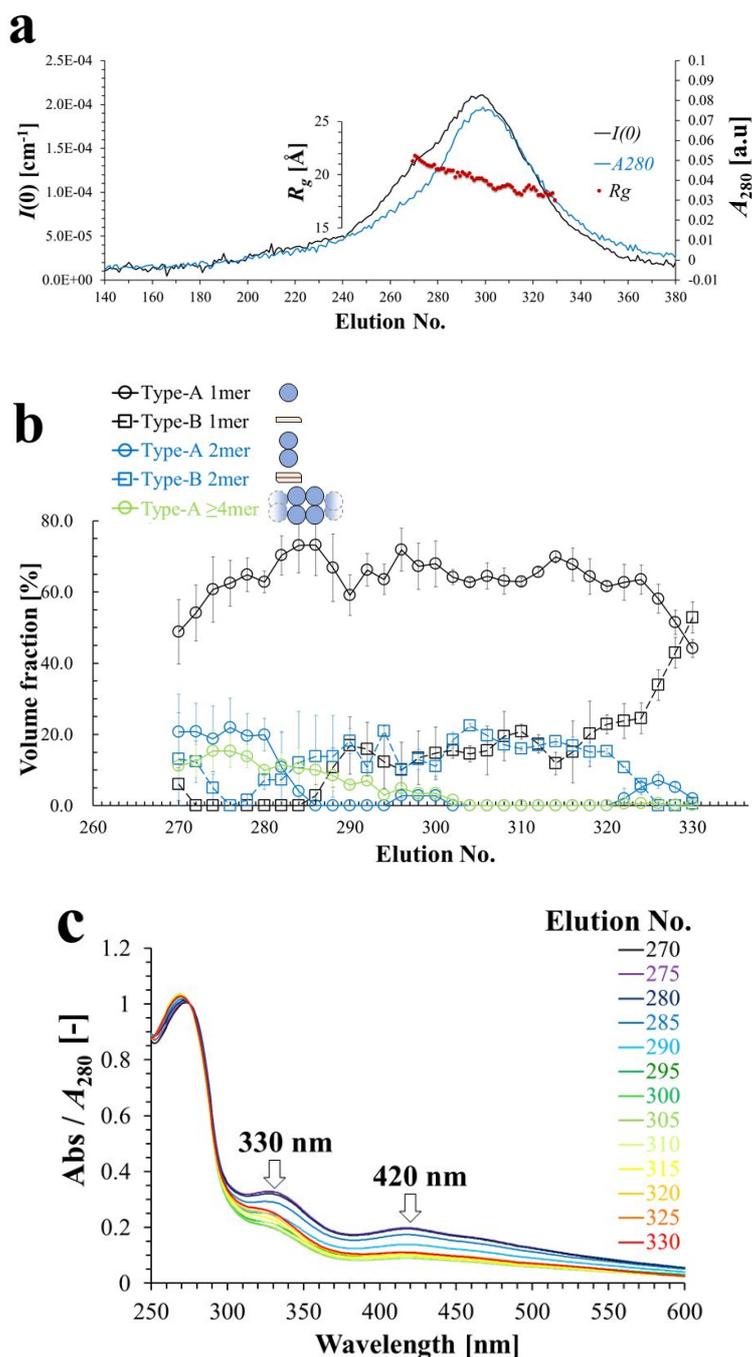


図 5 磁場非印加時における cIISCA1 の SEC-SAXS 解析結果。ゲルろ過カラムへは 6.9 mg ml<sup>-1</sup> cIISCA1 溶液を 0.5 ml 注入した。(a)は溶出ピークプロファイル。縦軸左は SAXS における  $I(0)$ 、縦軸右は 280 nm の紫外吸収、横軸は溶出画分番号。(b)は各画分の  $I(q)$  から Oligomer 解析により算出した各成分の体積分率。(c)は各画分の紫外可視吸収スペクトル。

向に成長したことを示唆しており、cIISCA1 濃度の増大による会合促進効果と類似していた。Type-B の会合は2量体が上限であることから、観測された柱状会合体の成長はType-A の会合促進に起因すると考えられる。即ち、Type-A 自己会合体の長軸に沿って空間規則的に結合したFe-S クラスターの鉄原子は外部からの磁場印加によって磁化した可能性があり、これによりType-A 自己会合体どうしの磁氣的相互作用・濃縮効果等が生じて会合体が成長した可能性がある。

### (3) まとめ

本研究により、分子会合を磁氣的に制御できる可能性がある蛋白質が初めて発見された。cICRY4 は cIISCA1 自己会合体との相互作用によって細胞内局所濃度を増大し、その結果、磁気情報受容の要となる生成ラジカルの細胞内局所濃度も増大して、磁覚を高感度化する可能性がある。と申請者は考察中である（論文投稿中）。また、本発見は磁覚の分子基盤の解明に資するだけでなく、磁場を利用した分子挙動制御技術開発等に活用できる可能性がある。例えば、cIISCA1 に他の蛋白質を融合する分子設計を行うことで、磁気を使って細胞内蛋白質挙動を操作する技術の開発、外部磁場に応じて機能を変える磁気応答バイオアクチュエーターの開発、磁場により非侵襲的に生体内局所濃度や機能を制御できる新薬開発などが期待できる。

一方、今回発見された磁氣的な cIISCA1 の会合現象は、地磁気 (0.3~0.6G) よりも大幅に強い磁場下 (10kG 付近)、且つ、cIISCA1 単独の条件下で観測された現象である。また、磁場印加時も SAXS の二次元散乱像は等方的であったことから、磁力線に沿った cIISCA1 自己会合体の分子配向は観測されなかった。即ち、cICRY4/cIISCA1 複合体の磁場配向性は、cICRY4 の結合によって付与される性質であると考えられる。従って、cICRY4 が cIISCA1 自己会合体の磁化率や磁気異方性を更に増大する未知の機構が存在する可能性がある。今後、より低強度の磁場下や、cICRY4 との相互作用時における cIISCA1 の磁場応答性を精査し、今回見出した新たな謎や磁覚の分子機構全容の解明に挑む。

#### 【引用文献】

- Johnsen S. & Lohmann KJ, *Nat. Rev. Neurosci.* (2005) **6**, 703  
 Ritz T. *et al.*, *Biophys J.* (2000) **78**, 707  
 Maeda K. *et al.*, *PNAS* (2012) **109**, 4774  
 Mitsui H. *et al.*, *Biochemistry* (2015) **54**, 1908  
 Gearhart RJ. *et al.*, *Nature*. (2008) **454**, 1014  
 Qin S. *et al.*, *Nat Mater* (2016) **15**, 217  
 Konarev PV *et al.*, *J. Appl. Cryst.* (2003) **36**, 1277  
 Song Y. *et al.*, *Structure*. (2013) **21**, 1735  
 Hirai M. *et al.*, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* (2001) **367**, 3249

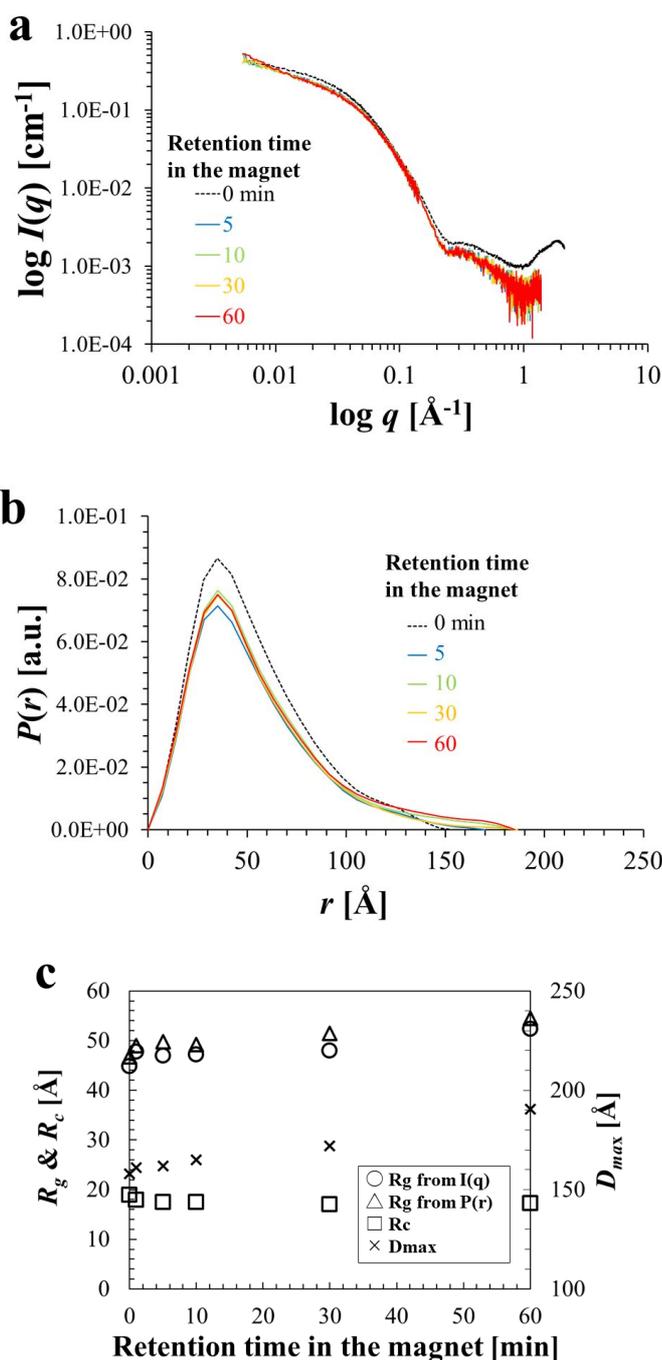


図6 約10kGの磁場印加時におけるcIISCA1のSAXS解析結果。(a)及び(b)は、それぞれ、 $I(q)$ 及び $P(r)$ の磁場印加時間依存性。(c)は(a)及び(b)から求めた $R_g$ ,  $R_c$ ,  $D_{max}$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 新井栄揮, 清水瑠美, 安達基泰, 味戸聡志, 平井光博	4. 巻 38
2. 論文標題 磁気受容体候補ISCA1の構造可変性と多量体化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi, Mitsuhiro Hirai	4. 巻 38
2. 論文標題 Fe-S cluster binding mechanism of pigeon's ISCA1 clarified by SEC-SAXS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Report	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi, Satoshi Ajito, Mitsuhiro Hirai
2. 発表標題 Structure and molecular behavior of the second magnetoreceptor candidate protein ISCA1
3. 学会等名 3rd QST International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井栄揮, 清水瑠美, 安達基泰, 味戸聡志, 平井光博
2. 発表標題 磁気受容蛋白質候補ISCA1のSAXS解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi, Satoshi Ajito, Mitsuhiro Hirai
2. 発表標題 Magnetic effects on the ISCA1 protein
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi, Satoshi Ajito, Mitsuhiro Hirai
2. 発表標題 SAXS Analysis of the Magnetoreceptor Candidate Protein ISCA1
3. 学会等名 2020WCPS, 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井栄揮
2. 発表標題 磁覚研究の基礎と最前線
3. 学会等名 2020年度第1回名古屋産学官・医連携研究会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeki Arai, Rumi Shimizu, Motoyasu Adachi, Satoshi Ajito, Mitsuhiro Hirai
2. 発表標題 Molecular behavior of the second magnetoreceptor candidate protein ISCA1
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会(BSJ2020)(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

早稲田大学・岡野俊行教授とともに、本課題の関連分野の研究者を集め、第58回日本生物物理学会年会にてシンポジウム3S-3「磁覚と磁気応答生体物質の生物物理学」を企画・主催（2020年9月、参加者約100人）。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	安達 基泰  (ADACHI Motoyasu)  (60293958)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・上席研究員   (82502)	
研究協力者	平井 光博  (HIRAI Mitsuhiro)  (00189820)	群馬大学・大学院理工学府・名誉教授   (12301)	
研究協力者	鈴木 淳市  (SUZUKI Jun-ichi)  (40354899)	一般財団法人総合科学研究機構・総合科学研究センター及び中性子科学センター・主任研究員   (82121)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------