

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770175

研究課題名（和文） PASドメインタンパク質の多様な情報伝達は共通の機構で駆動しているか？

研究課題名（英文） Is there common mechanism in the divergent PAS domain signal transduction?

研究代表者

山崎 洋一（YAMAZAKI YOICHI）

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：40332770

研究成果の概要（和文）：PASドメインタンパク質の駆動原理を解析するため、2つの異なるPYPタンパク質をモデルとして、PASドメイン共通構造に内在するタンパク質構造変化様式を検証した。その結果、①両者において機能上重要な部位がN末端部位に存在していること。②補欠分子の結合部位は基本的に相同であるが、微小な差異によってその性質を変化させていること、③構造の土台となるC末端領域が個々のPYPの性質を大きく決定づけ、その他の領域はこのC末端部位との関係においては同様の性質を制御していることが示された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate activation mechanism retained in PAS domain family protein, two different Photoactive Yellow Protein (PYP) were investigated as model proteins. In the results, 1) N-terminal regions in both PYPs owned functionally important part in each PYP, 2) co-factor binding region was almost same each other but small differences affects the co-factors features, 3) C-terminal structural scaffold mainly decided each PYP propensities, the other part in each sequence affected by coupling with the C-terminal region.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理

キーワード：光生物学、シグナル伝達、タンパク質間相互作用、PASドメイン

1. 研究開始当初の背景

PASドメインはPer, Arnt, Simという三つのタンパク質にその名を由来する100アミノ酸残基ほどのドメインで、ゲノム解析が進む中、

現在までに15000種以上におよぶタンパク質配列中に24000個程度のPASドメイン構造があることが提示されている。古細菌からヒトに至るあらゆる生物界に分布し

ているPASドメインタンパク質は、ヒトのダイオキシン受容体 (AhR) や、植物のフォトトロピンなど、環境変化に対する遺伝子転写制御に関与しているものが多い。その中でPASドメイン自身は、ヘムやフラビン、クマル酸、炭化水素などの補欠分子を結合し、環境変化に対するセンサーの働きをする部位でもあることが知られている。構造解析がなされたPASドメインは、類似の立体構造を持つことが示されており、類似の情報伝達機構を有すると予想されている。しかし、結晶構造から得られるPASドメインセンサータンパク質の相互作用様式は多様で、PASドメインのN-、C-末端に伸びた部位での相互作用や、中央部βシートでの相互作用など様々な形で得られている。これらのことは、情報伝達の直接的なインターフェースの異なる、多様なタンパク質の駆動メカニズムが、相同構造に内在していることを予想させる。しかしながら、これらのインターフェースを通じた情報伝達を駆動するダイナミクスの詳細は依然不明であり、タンパク質骨格構造に内在する機能発現機構の共通基盤に関しては詳細な検討が必要である。Photoactive Yellow Protein (PYP)はPASドメインのみからなる小型のタンパク質で、補欠分子としてクマル酸を有し、青色光を吸収するセンサータンパク質である。光による反応制御が可能な点などから、タンパク質の構造機能解析に適している。しかし現在まで、情報伝達の相互作用分子が未同定であることから機能解析ができず、PASドメイン全般にまで拡張した相互作用分子メカニズムの議論は殆どなされていない。本研究代表者は、PASドメインの多様性探索の研究過程でPYPタンパク質の一つに対する相互作用タンパク質を単離し、この相互作用分子との反応が、PASドメインタンパク質の相互作用機構のモデルとなると着想

した。

2. 研究の目的

以上のような背景をもとに、本研究では、異なる生物種から得られている2つのPYP (Hh-PYP: *Halorhodospira halophila*由来PYP、Rc-PYP: *Rhodobacter capsulatus*由来PYP)の反応過程における構造変化を明らかにすることを目指した。2種のPYPは吸収極大波長 (Hh-PYP 446nm, Rc-PYP 375nmと438nm) と、光反応サイクルの速度 (Hh-PYP 1秒以下、Rc-PYP 20時間以上) の点で分光学的性質が異なり、さらに、相互作用タンパク質との結合解離の有無 (Rc-PYPのみ相互作用が確認されている) で機能的に異なる。これらの差異が構造変化の様式の違いによるのか、局所的な残基の性質に依存しているかを明らかにすることで、多様な性質は共通の構造変化様式の上に階層的に形成されているのか、全く異なる構造変化様式の上に成り立っているかを明らかにしていく。異なる性質が階層的な構造変化の上層で実現されていけば、下層で生み出されている構造変化は、広く保存された構造変化であることが考えられることから、より大きなタンパク質ファミリーに適応できると考える。

3. 研究の方法

異なる生物種に由来する2種類のPYPとしては、Hh-PYPとRc-PYPを用いる。Hh-PYPは詳細な構造情報や、構造変化過程が得られており、構造変化過程を検証していく上での雛形として主に利用した。Rc-PYPに関しては、Hh-PYPには見出されていない、情報伝達における相互作用タンパク質を得ており、相互作用を生み出すRc-PYPの構造変化が、Hh-PYPの構造変化様式と共通な基盤の上に成り立っているかを検証した。具体的には、①Hh-PYP

の光反応に伴う構造変化部位としてN末端部位の変化や、ループ部位、 β ストランドのダイナミクス変化などが活性化機構に重要であると考えられている。しかし、これらの状態はいずれも、Hh-PYP単独で見られる構造変化であることから、どの変化が実際に相互作用を誘導するものかは、不明であった。この点から、Re-PYPのN末端部位、ループ部位、 β シート構造部位の変異タンパク質を中心に、光依存的に相互作用する分子との結合の有無を、プルダウンアッセイやゲルろ過分析、また、解離結合に伴う可視吸収変化等から検証した。ここから、相互作用における結合領域と、その過程における構造変化の制御部位を決定した。②Re-PYPとHh-PYPの顕著な可視吸収スペクトル上の違いは、クマル酸水酸基と水素結合を形成しているグルタミン酸とチロシン残基に由来することがHh-PYPの研究から知られている。これらの残基はRe-PYPでもその役割を保持しているが、微調節されている。このような、微細な変化がタンパク質構造変化に与える影響を精査するため、Re-PYPの光反応時におけるグルタミン酸、チロシン残基の局所的な構造変化を低温可視吸収変化と低温赤外吸収変化から解析した。ここから、光反応初期に起こる発色団近傍の差異がタンパク質構造のどのような部位に依存しているかを検討した。③Re-PYP, Hh-PYPの構造変化に対して、両方で保存されている部位と、違いを生み出している部位を明らかにする目的で、両者のキメラタンパク質を作製して、光反応の可視吸収変化やCD、X線小角散乱による2次、3次構造変化を測定した。さらに、相互作用タンパク質との相互作用の有無も結合活性から検証した。このようにして、両者のキメラタンパク質の性質をマッピングすることで、PYPに見られる、構造変化の基盤部位と多様性を獲得する部

位が明らかにできると考えた。

4. 研究成果

①の結果、Hh-PYPにおいて構造変化等重要な機構を担う、N末端部位の欠損変異体をRe-PYPに導入したところ、相互作用能の著しい低下を確認した。しかし、相互作用自体は保持されており、N末端部位が効率的な結合に必須な領域であることが示された。このことは、N末端配列が直接的な結合部位の一部を形成しているか、結合構造の保持に必須であることが示された。Hh-PYPと同様にN末端部位に機能発現の制御部位が存在していることが考えられた。②の結果、吸収スペクトルの違いに関しては、発色団の分子内プロトン移動によって実現されていることが示された。2つのPYPは発色団環境の微細な変化を利用して、同じ発色団、補欠分子を用いて、異なる性質を獲得していることが示された。③の結果、Hh-PYPとRe-PYPのタンパク質の性質は、主にC末端 β スカルド構造部位に依存していることが示された。構造形成の土台としてのC末端領域の性質が多様性を生む主要因を形成していることが示された。さらに、N末端領域や補欠分子結合部位を形成している部位などとの協調によって、光反応性や、相互作用などが形成されていることが分かった。以上のことから、異なるPYP種における性質の違いは、補欠分子の結合部位のみに依存するのではなく、タンパク質全体の構造に由来しており、個々のタンパク質領域の機能的役割には相同性が見られ、共通の分子基盤の上に成り立っていることが考えられる。

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2件)

① R. Shiba, M. Umeyama, S. Tsukasa, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, M. Iwakura and M. Kataoka, Systematic alanine insertion reveals the essential regions that encode structure formation and activity of dihydrofolate reductase、BIOPHYSICS、7巻、1-10、2011、査読有

② Kato S, Kamikubo H, Hirano S, Y. Yamazaki, Kataoka M.、Nonlocal interactions are responsible for tertiary structure formation in staphylococcal nuclease. Biophys J. 98巻、678-686、2010査読有

〔学会発表〕(計10件)

①M. Hayashi, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka, Analysis of solution state of the interaction protein of Rc-PYP, 第48回日本生物物理学会年会, , 2010. 9. 21、仙台

②Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka Substitution effects of basic residues in the photoactive yellow protein of Rhodobacter capsulatus、第48回日本生物物理学会年会, , 2010. 9. 21、仙台

③ 山崎洋一, 上久保裕生, 片岡幹、Photoactive Yellow Proteinにおける発色団の機能変調、第16回日本光生物学協会年会、2010. 8. 11、大阪

④山崎洋一、上久保裕生、片岡幹雄、2種類のPYPにおける発色団の機能変調、分子研究会、2010.3.23、岡崎

⑤H. Kubo, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka, Light dependent enzyme activity control by use of interaction of the Rc-PYP, 第47回日本生物物理学会年会, 2009. 10. 30, 徳島

⑥Y. Yamazaki, N. Ota, H. Kamikubo, M. Kataoka, Interaction mechanism of the photoactive yellow protein of Rhodobacter capsulatus, 第47回日本生物物理学会年会,

2009. 10. 30, 徳島

⑦Y. Hamaguchi, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka, The low-temperature spectroscopy of Rc-PYP, 第47回日本生物物理学会年会, 2009. 10. 30, 徳島

⑧K. Matsumoto, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka, Analysis of the different properties in two PYPs by use of chimera proteins, 第47回日本生物物理学会年会, 2009. 10. 30, 徳島

⑨S. Yamaguchi, H. Kamikubo, K. Kurihara, R. Kuroki, Y. Yamazaki, M. Kataoka, Low-barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein, , 第47回日本生物物理学会年会, 2009. 10. 30, 徳島

⑩Y. Yamazaki, M. Sakoguchi, H. Kamikubo, M. Kataoka, 光合成細菌 Rhodobacter capsulatus 由来PYPの光反応のpH依存性, 第15回日本光生物学協会年会, 2009. 8. 19、岡崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 洋一 (YAMAZAKI YOICHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：40332770