

平成22年度科学研究費補助金実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号 1 4 6 0 3 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 特定領域研究 4. 研究期間 平成22年度～平成23年度
5. 課題番号 2 2 0 1 8 0 1 9
6. 研究課題名 蛋白質中に存在する低障壁水素結合の特性解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
2 0 3 1 1 1 2 8	カミクボ ヒロナリ 上久保 裕生	物質創成科学研究科	准教授

8. 研究分担者（所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。）

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

低障壁水素結合（LBHB）は、疑似共有結合性を示す水素結合であり、高い結合エネルギーを示すと同時に、存在環境に応じて、容易に通常のイオン性の水素結合に緩和することができる。このことから、蛋白質内においても、LBHBを利用する機能が、一般に存在することが期待されるが、今日まで明らかにされていない。本研究では、これまでに唯一、LBHBの存在が実証された光センサー蛋白質（Photoactive Yellow Protein, PYP）をモデル蛋白質として、蛋白質中でのLBHBの物理化学的特性を明らかにし、分子内反応との関連性を明らかにすることを目的としている。

本研究では、LBHB形成能を失活するように変異を加えたPYP（E46Q変異体）を作成し、その物性評価を行い、野生型との比較から、現象論的にLBHBの関与を推定する。しかしながら、LBHBを失活するために導入する変異は、LBHB形成のみならず、他のアミノ酸残基とも相互作用していることから、LBHBの関与を正確に抽出するためには、変異体の、水素結合を含めた構造を決定し評価する必要がある。そこで、本年度は、E46Q変異体の巨大結晶を作成し、中性子結晶構造解析を行った。

結晶化条件の最適化により、1mm3を超える変異体PYPの巨大結晶の作製に成功した。放射光を用いた実験により、0.84Å分解能の回折データを収集することができた。E46Q巨大結晶を用い、日本原子力研究所JRR3に設置されたBIX-4を用い中性子回折測定を行い、分解能1.5Å、Completeness 93.5%のデータの収集に成功した。X線/中性子併用結晶構造解析を行った結果、発色団近傍に明瞭な核密度分布が観測された。LBHBに関与するE46をQに置換した結果、Q46-発色団間の水素結合は、通常の水素結合距離(>2.5Å)に緩和していることが明らかとなった。更に、近傍に存在するY42-発色団間の水素結合に注目すると、水素結合構造に違いは見られず、短距離イオン性の水素結合であることが明らかとなった。以上の結果から、野生型とE46Qにみられる、諸物性の違いは、LBHBと水素結合の違いに由来すると結論するに至った。

10. キーワード

- (1) 中性子結晶構造解析 (2) 水素結合 (3) 低障壁水素結合
- (4) 光センサー蛋白質 (5) (6)
- (7) (8) (裏面に続く)

11.研究発表（平成22年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 7 ）件 うち査読付論文 計（ 7 ）件

著者名	論文標 題			
Hiroshi Nakagawa	Effect of conformational states on protein dynamical transition			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Biochim. Biophys. Acta	有	1804	2 0 1 0	27-33

著者名	論文標 題			
Shingo Kato	Non-local interaction responsible for the tertiary structural formation of Staphylococcal nuclease			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Biophys. J.	有	98	2 0 1 0	678-786

著者名	論文標 題			
Atsushi Tanaka	Self-Assembly and Enhanced Magnetic Properties of Three-dimensional Superlattice Structures Composed of Cube- and Sphere-Shaped EuS Nanocrystals			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Chem. Mat.	有	22	2 0 1 0	1776-1781

著者名	論文標 題			
Shun Hirota	Cytochrome c polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	有	107	2 0 1 0	12854-12859

著者名	論文標 題			
Atsushi Tanaka	Size-controlled aggregation of cube-shaped EuS nanocrystals with magneto-optic properties in solution			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Langmuir	有	27	2 0 1 0	104-108

著者名	論文標 題			
Rumi Shiba	Systematic alanine insertion reveals the essential regions that encode structure formation and activity of dihydrofolate reductase			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
BIOPHYSICS	有	7	2 0 1 1	1-10

著者名	論文標 題			
上久保裕生	フォトアクティブイエロープロテインの中性子結晶構造解析			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
RADIOISOTOPES	有	59	2 0 1 0	289-297

〔学会発表〕 計（ 24 ）件 うち招待講演 計（ 0 ）件

発表者名	発表標 題	
Hiroki Sawada et al.	The effect of alanine insertion mutation for folding process.	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology	2010年8月9日	Shanghai-Jiashan, China

発表者名	発表標題	
Rumi Shiba et al.	Extraction of the regions encoded foldability and/or functionability from dihydrofolate reductase by the systematic alanine insertion	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology	2010年8月9日	Shanghai-Jiashan, China

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo et al.	Fluctuation controls enzymatic activity of Staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"	2010年12月1日	大津

発表者名	発表標題	
Hiroki Sawada et al.	The investigation of the relationship between non-local interaction and the effect of single alanine insertion in staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"	2010年11月30日	大津

発表者名	発表標題	
Rumi Shiba et al.	Classification of the functional element of dihydrofolate reductase by the systematic alanine insertion	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"	2010年12月1日	大津

発表者名	発表標題	
Yusuke Kishi et al.	FRET analysis of structural changes in staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"	2010年12月1日	大津

発表者名	発表標題	
Mariko Yamaguchi et al.	Measurements of loop formation in the denatured state of staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"	2010年11月30日	大津

発表者名	発表標題	
Zhonghua Wang et al.	Cytochrome c polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions"	2010年12月1日	大津

発表者名	発表標 題	
萩原義久 et al.	精子由来蛋白質IZUMO, その構造と受精膜融合での役割	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第10回日本蛋白質科学会年会	2010年6月18日	札幌

発表者名	発表標 題	
芝るみ et al.	網羅的アラニン挿入変異解析法を用いたジヒドロ葉酸還元酵素の機能発現及び構造形成領域の抽出	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第10回日本蛋白質科学会年会	2010年6月16日	札幌

発表者名	発表標 題	
山崎洋一 et al.	Photoactive Yellow Proteinにおける発色団の機能変調	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第16回日本光生物学協会年会	2010年8月11日	吹田

発表者名	発表標 題	
Shun Hirota et al.	Cytochrome c polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月22日	仙台

発表者名	発表標 題	
Daizo Hamada et al.	A case of EspB from enterohaemorrhagic Escherichia coli	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月22日	仙台

発表者名	発表標 題	
Yoko Ogawa et al.	Property of a structural element of SNase-like domain in human p100	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月22日	仙台

発表者名	発表標 題	
Hiroki Sawada et al.	The investigation of the relationship between non-local interaction and the effect of single alanine insertion in staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月22日	仙台

発表者名	発表標 題	
Junko Miura et al.	Solution structure of the light sensor histidine kinase of Ppr comprised of the PYP and Bph domains	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月21日	仙台

発表者名	発表標 題	
Maiko Naruse et al.	Solution structural analysis of Drosophila GGA	
学会等名	発表年月日	発表場 所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月21日	仙台

発表者名	発表標題	
Miki Hayashi et al.	Analysis of solution state of the interaction protein of Rc-PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月21日	仙台

発表者名	発表標題	
Yusuke Kishi et al.	FRET analysis of structural changes in Staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月22日	仙台

発表者名	発表標題	
Changjun Ahn et al.	The role of each residue in the flexible Ω loop of Staphylococcal nuclease on the catalytic activity	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月21日	仙台

発表者名	発表標題	
Mariko Yamaguchi et al.	Urea denaturation of staphylococcal nuclease monitored by tryptophan-cysteine distance	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月20日	仙台

発表者名	発表標題	
Rumi Shiba et al.	Classification of the functional element of dihydrofolate reductase (DHFR) by the systemic alanine insertion	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月21日	仙台

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo et al.	Synthesis of an artificial enzyme by implanting the functional elements of SNase	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月21日	仙台

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki et al.	Substitution effects of basic residues in the photoactive yellow protein of <i>Rhodobacter capsulatus</i>	
学会等名	発表年月日	発表場所
第48回日本生物物理学会年会	2010年9月20日	仙台

【図書】計(1)件

著者名	出版社		
上久保 裕生	共立出版		
	書名	発行年	総ページ数
	「入門 構造生物学」編集：加藤龍一 2章3節X線溶液散乱	2010	8ページ

12. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出願】 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

【取得】 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

--