

平成23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 新学術領域研究 4. 研究期間 平成20年度～平成24年度
5. 課題番号

2	0	1	0	7	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 天然変性蛋白質のモデル系開発と揺らぎと構造形成相関の解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
30150254	カタオカ	物質創成科学研究科	教授
	片岡		
	ミキオ		
	幹雄		

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。

本研究では、タンパク質の構造形成や分子認識と揺らぎの相関を明らかにすることを目的としている。この目的を達成するために、黄色ブドウ球菌核酸分解酵素（SNase）を用いて、生理的条件下で構造を取らないが酵素活性を有する変異体や安定な構造を取りながら酵素活性を失う変異体を多種作製してきた。本年は、前者の変異体に対して、蛍光性の非天然アミノ酸を2種類導入した試料を作製し、FRETにより生理的条件下での構造を特徴づけ、さらに基質認識に伴う動力学の変化の検出を行おうとした。4塩基コドンおよびアンバーコドンを利用し、蛍光ドナーとアクセプターとなる2種類の非天然アミノ酸を導入した変異体を5種類作製できた。これらについてFRETを観測できたが、定量的な解析にはいたらなかった。タンパク質の精製に問題のあることが判明しており、現在その改善に取り組んでいる。この方法は、任意の箇所に蛍光性残基を導入できるため、変性構造の特徴づけには有効であると期待される。

SNaseのΩループを欠損させると、安定な構造を形成するが酵素活性を失う。また、このループをアラニンに置換すると活性をわずかに回復する。ループの揺らぎと活性の関係を理解するために、欠損変異体、ループを全てアラニンに置換した変異体について、リガンド結合状態の結晶構造解析を行った。着目するループの直前に触媒部位E43が存在する。E43を含め、温度因子を比較したところ、野生型は両者の中間の値を示した。揺らぎがなくても、強く揺らぎすぎても活性を制御できないことがわかった。また、切断されるリン酸基、活性に必要なCa²⁺と水及びE43の位置関係は、3者でほとんど保たれていたが、距離は0.3Å程、角度も1°程度のわずかな違いがあった。ループの揺らぎがこの微妙な位置関係のずれを制御していると考えている。

10. キーワード

- (1) 天然変性蛋白質 (2) 誘導折り畳み (3) 分子認識 (4) 変性構造
 (5) 結晶構造解析 (6) Staphylococcal nuclease (7) FRET (8)

11. 現在までの達成度

下欄には、交付申請書に記載した「研究の目的」の達成度について、以下の区分により自己点検による評価を行い、その理由を簡潔に記述すること。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。
 <区分>①当初の計画以上に進展している。 ②おおむね順調に進展している。 ③やや遅れている。 ④遅れている。

(区分) ②おおむね順調に進展している。
 (理由) 東日本大震災の影響で、日本の中性子源がすべてストップしたため、中性子散乱による動力学研究は中断せざるを得なかった。しかし、蛍光性非天然アミノ酸の導入に成功し、FRET を利用するめどが立ち、中性子実験中断の影響を最小限に抑えることができた。また、新規に見出された変異体の結晶構造解析が進んでおり、こちらは当初計画以上の成果が得られ始めている。以上から、研究はおおむね順調に進展していると判断している。
 研究全般に関して、成果は着実に進んでいるが、学会発表は別として、論文にするペースが遅く、公表が滞っているのが反省点である。

12. 今後の研究の推進方策

本研究課題の今後の推進方策について簡潔に記述すること。研究計画の変更あるいは研究を遂行する上での問題点があれば、その対応策なども記述すること。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。

天然変性タンパク質のモデル系に関する中性子による動力学研究については、H24 年度は J-PARC が復旧し、実験が可能になることに加え、フランスの中性子源での実験が可能になったため、中断した実験を集中して行うことができる。これらにより、計画通り研究を進めることができる。天然変性タンパク質のモデル系の構造情報を得るために、非天然アミノ酸導入による FRET を駆使した研究を進める。現在、タンパク質精製段階に問題点が見出されている。克服のめども立っているため、FRET の定量的解析まで行う予定である。一方、構造形成をしながら活性を失う変異体については、リガンドフリーの状態の結晶構造解析を行う。現在、結晶化条件を探索中であるが、微小結晶は何とかなるので、今年度中には構造解析に着手できると期待している。
 今年度は、これまで得られた成果に基づき、できるだけ多くの論文を発表したいと考えている。

13. 研究発表（平成23年度の研究成果）

※ 「13. 研究発表」欄及び「14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況」欄において記入欄が不足する場合には、適宜記入欄を挿入し、それによりページ数が増加した場合は、左端を糊付けすること。

〔雑誌論文〕 計（5）件 うち査読付論文 計（3）件

著者名	論文標題						
Misao Mizuno	Changes in the hydrogen-bond network around the chromophore of photoactive yellow protein in the ground and excited states						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
J. Phys. Chem. B	有	115	2	0	1	1	9306-9310
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
10.1021/jp2029399							

著者名	論文標題						
Daniel. J. Sindhikara	Solvent penetration in photoactive yellow protein R52Q mutant: a theoretical study						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
J. Mol. Liq.	有	164	2	0	1	1	120-122
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
10.1016/j.molliq.2011.04.007							

著者名	論文標題						
N. Alia Oktaviani	Comprehensive determination of protein tyrosine pKa values for photoactive yellow protein using indirect ¹³ C NMR spectroscopy						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
Biophys. J.	有	102	2	0	1	2	579-586
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
10.1016/j.bpj.2011.12.024							

著者名	論文標題						
片岡幹雄	生物研究における中性子						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
波紋	有	21	2	0	1	1	243-246
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
なし							

著者名	論文標題						
中川洋, 片岡幹雄	中性子弾性散乱による生体高分子ダイナミックスの研究						
雑誌名	査読の有無	巻	発行年		最初と最後の頁		
高分子	無	60	2	0	1	1	195-196
掲載論文の DOI (デジタルオブジェクト識別子)							
なし							

【学会発表】計(29)件 うち招待講演 計(5)件

発表者名	発表標題	
Mikio Kataoka	Is tertiary structure required for a specific function?	
学会等名	発表年月日	発表場所
Telluride Conference on Protein Dynamics 2011 (招待講演)	2011年8月4日	Telluride, USA

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki	Solution structure of the complex states of Rhodobacter capsulatus PYP with its binding protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月18日	姫路市

発表者名	発表標題	
Mariko Yamaguchi	Difference in local structure between staphylococcal nuclease wild type and its non-native mutant studied by tryptophan triplet quenching	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月16日	姫路市

発表者名	発表標題	
Rumi Shiba	Classification of function element of dihydrofolate reductase by the systematic alanine insertion	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月16日	姫路市

発表者名	発表標題	
Yusuke Nishiguchi	Analysis of low barrier hydrogen bond in Photoactive Yellow Protein, Geometric restriction facilitates LBHB formation in PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月18日	姫路市

発表者名	発表標題	
Ryota Odani	The Role of N-terminal Region for Photoreaction of Various Photoactive Yellow Proteins	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月18日	姫路市

発表者名	発表標題	
Toshihiro Okada	Denatured Structure of Staphylococcal Nuclease Studied by Triplet State Quenching of Tryptophan by Cysteine	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月17日	姫路市

発表者名	発表標題	
Shinya Setoguchi	Development of Light dependent protein activity control system by use of interaction of the Rc-PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月18日	姫路市

発表者名	発表標題	
Takuya Muto	Structural Analysis of Intrinsically Disordered Protein Model using FRET	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月18日	姫路市

発表者名	発表標題	
Eri Sakai	Attempt of functional modification of a protein by element implantation	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月18日	姫路市

発表者名	発表標題	
Sho Ueyanagi	Comparison of structural elements between Staphylococcal nuclease and the C-terminal domain of Human p100	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月16日	姫路市

発表者名	発表標題	
Satoshi Nagao	Cytochrome c polymerization by domain swapping	
学会等名	発表年月日	発表場所
第49回日本生物物理学会年会	2011年9月17日	姫路市

発表者名	発表標題	
片岡幹雄	タンパク質動力学と水和	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本分光学会テラヘルツ分光部会シンポジウム「テラヘルツ分光法の最先端V」～バイオテラヘルツ分光～（招待講演）	2011年9月28日	横浜市

発表者名	発表標 題	
Hironari Kamikubo	The roles of the low barrier hydrogen bond involved in Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
17th International Biophysics Congress (IUPAB)	2011年11月2日	Beijing, China

発表者名	発表標 題	
Rumi Shiba	Refinement of function element of dihydrofolate reductase by the systematic alanine insertion	
学会等名	発表年月日	発表場所
17th International Biophysics Congress (IUPAB)	2011年10月31日	Beijing, China

発表者名	発表標 題	
Mariko Yamaguchi	Local structural change of staphylococcal nuclease wild type and its non-native mutant with guanidine hydrochloride monitored by tryptophan triplet quenching	
学会等名	発表年月日	発表場所
17th International Biophysics Congress (IUPAB)	2011年10月31日	Beijing, China

発表者名	発表標 題	
Sho Ueyanagi	Comparison of structural elements between Staphylococcal nuclease and the C-terminal domain of Human p100	
学会等名	発表年月日	発表場所
17th International Biophysics Congress (IUPAB)	2011年10月31日	Beijing, China

発表者名	発表標 題	
Hironari Kamikubo	Physicochemical properties of low barrier hydrogen bonds involved in Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
1st Asia-Oceania Conference on Neutron Scattering (招待講演)	2011年11月24日	つくば市

発表者名	発表標 題	
Mikio Kataoka	The formation and role of low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
物構研シンポジウム'11 量子ビーム化学の展望 (招待講演)	2011年12月7日	つくば市

発表者名	発表標 題	
Mikio Kataoka	Incorporation of Fluorescent Non-natural Amino Acids into Staphylococcal Nuclease for FRET Analyses of Induced Folding	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月8日	奈良市

発表者名	発表標 題	
Hironari Kamikubo	The Roles of the Low Barrier Hydrogen Bond Involved in the Light Sensor Protein, Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月7日	奈良市

発表者名	発表標題	
Mariko Yamaguchi	Study on the Denatured Structure of Staphylococcal Nuclease by Using Tryptophan Triplet State Quenching	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月8日	奈良市

発表者名	発表標題	
Rumi Shiba	Refinement of Function Element of Dihydrofolate Reductase by the Systematic Alanine Insertion	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月7日	奈良市

発表者名	発表標題	
Sho Ueyanagi	Comparison of Structural Elements between Staphylococcal Nuclease and the C-terminal Domain of Human p100	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月8日	奈良市

発表者名	発表標題	
Ryota Odani	The Role of N-terminal Region for Photoreaction of Various Photoactive Yellow Proteins	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月7日	奈良市

発表者名	発表標題	
Eri Sakai	Attempt of Functional Modification of a Protein by Element Implantation	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月8日	奈良市

発表者名	発表標題	
Yusuke Nishiguchi	Geometric Restriction Facilitates LBHB Formation in Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月7日	奈良市

発表者名	発表標題	
Toshihiro Okada	Denatured Structure of Staphylococcal Nuclease Studied by Quenching of Tryptophan Triplet State by Cysteine	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 5th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年1月8日	奈良市

発表者名	発表標題	
Mikio Kataoka	Molecular Anatomy of Staphylococcal Nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations (招待講演)	2012年1月9日	奈良市

【図 書】 計 (0) 件

著 者 名	出 版 社				
書 名				発 行 年	総ページ数

14. 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
				出願年月日	

15. 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。

--