

様式 C - 7 - 1

平成24年度科学研究費助成事業（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 基盤研究(B) 4. 補助事業期間 平成23年度～平成25年度

5. 課題番号

2	3	3	7	0	0	7	4
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 蛋白質の構造機能要素の抽出と応用の為の基盤整備

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

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名
3 0 1 5 0 2 5 4	カタオカ ミキオ 片岡 幹雄	物質創成科学研究科	教授
4 0 3 3 2 7 7 0	ヤマザキ ヨウイチ 山崎 洋一	物質創成科学研究科	助教

9. 研究実績の概要

我々は、蛋白質一般に、アミノ酸配列の分断によって、構造・機能に著しい影響が生じる領域が存在することを示してきた。本研究では、これらの領域が、構造や機能の基本要素(エレメント)になっているとの仮説を実証することを目的としている。本目的の達成のため、構造エレメントについては類似構造を有するものの機能が異なる蛋白質間で立体構造上の位置の保存性を検証し、機能エレメントについては機能エレメントを用いた機能改変の可能性について検討している。平成24年度は、類似構造を有するものの機能が異なる蛋白質として、すでにエレメントの同定に成功している核酸分解酵素Staphylococcal nuclease(SNase)と転写調節因子ヒト由来p100蛋白質SNDドメインを選択し、SNDの2ヘリックス領域、および、5ストランド領域に対してアラニン挿入変異解析を行った。SNDのこの領域には、3つの構造エレメントが存在し、いずれも、立体構造上Snaseと相同な位置に構造エレメントが保存されていることが明らかとなった。この事実は、これら構造エレメントが立体構造を規定する基本的な要素であることを強く示唆するものである。Snaseの機能エレメントを用いたSNDの機能改変については、機能エレメント移植SNDの発現精製を行い、核酸分解活性の評価を実施した。活性は、Snaseの約1000分の1程度であるものの、機能エレメントの移植によってSNDを核酸分解酵素に改変することに成功した。更に、すでに報告されている核酸分解活性に関与するアミノ酸残基についてSNDのアミノ酸残基を置換した変異体については活性を示さなかった。以上の結果は、機能エレメントの移植によって初めて機能の改変が可能であることを示しており、機能エレメントが機能を実現するための基本要素であることを強く示唆する結果であるといえる。

10. キーワード

(1) 蛋白質工学	(2) 分子設計	(3) フォールディング	(4) 酵素
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本年度の研究を通じ、類似構造蛋白質での構造エレメントの位置保存性が検証されつつある。更に、機能エレメントについては、機能エレメントの移植によって元の機能と異なる機能に改選することが可能であることを実証することに成功した。完全に異なる機能を有する蛋白質間での機能移植としては、本研究は初めての成果であり、機能エレメントが機能を実現するための基本要素であることを示す結果になり得ると考えられる。以上は、年度当初に予定していた研究であり、おおむね順調に進展していると考えられる。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

SNaseとTSNを用いた研究から、1)類似構造を有する2つの蛋白質間で の構造エレメントの位置保存性を示し、2)SNaseの機能エレメントをTSNに移植することによって核酸分解活性 を有する人工酵素を創製することに成功してきた。これらの事実は、構造エレメントや機能エレメントが蛋白質 の構造や機能を決定する基本因子であることを示唆していると同時に、人工蛋白質設計時の基本部品となり得る可能性を示すものである。

今後は、特に、機能エレメントによる機能移植に注目し、SNDの機能改変に必要なSNaseの機能エレメントの最適化を行い、機能を決定する最小機能因子を決定する。機能エレメントは、アミノ酸配列全域に対してアラニン挿入変異体を作製し、アラニン挿入による天然配列の分断が機能に与える影響を考慮することで同定される。実際には、アラニン挿入による酵素活性の低下は、挿入部位に応じて連続的に低下し、本研究では、挿入によって酵素活性が30%以下に低下する領域を機能エレメントとして実験に用いてきた。しかしながら、30%と言う目安は必ずしも実験事実に基づいて決定されたものではない。そこで、本年度は、1%まで酵素活性が低下する領域を機能エレメントとして再定義し、TSNドメインへの移植を行う。仮に、1%の基準で酵素活性を再現できなかった場合には、基準の見直しを行い、機能移植に必要な最小機能因子の同定を試みる。

13.研究発表(平成24年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(9)件 うち査読付論文 計(7)件

著者名	論文標題			
Hisayoshi Makyio	Structural basis for Arf6–MKLP1 complex formation on the Flemming body responsible for cytokinesis			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
EMBO J.	有	31	2 0 1 2	2590-2603
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			
Friedrich Schotte	Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography			
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	109	2 0 1 2	19256-19261
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			
Shun Hirota	Maintenance of the secondary structure of horse cytochrome c during the conversion process of monomers to oligomers by addition of ethanol			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
J. Biochem.	有	152	2 0 1 2	521-529
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			
Woojung Chung	Time-resolved observation of chiral-index-selective wrapping on single-walled carbon nanotube with non-aromatic polysilane			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
J. Am. Chem. Soc.	有	135	2 0 1 3	2374-2383
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			
上久保裕生	結晶構造解析と溶液散乱測定から見た光センサー蛋白質の局所構造と全体構造			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
日本結晶学会誌	無	55	2 0 1 3	52-57
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			
上久保裕生	働いているタンパク質の構造を実時間で見た！ - 次世代構造生物学への期待			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
化学	無	68	2 0 1 3	74-75
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			
Yukiumi Kita	Theoretical analysis of the geometrical isotope effect on the hydrogen bonds in photoactive yellow protein with multi-component density functional theory			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Chem. Phys.	有	印刷中	2 0 1 2	印刷中
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1016/j.chemphys.2012.11.022				

著者名	論文標題			
Jun-ichi Uewaki	Preferential domain orientation of HMGB2 determined by weak intramolecular interactions mediated by the interdomain linker			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Chem. Phys.	有	印刷中	2 0 1 3	印刷中
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1016/j.chemphys.2013.02.004				

著者名	論文標題			
Junpei Yuasa	Fingerprint signatures of lanthanide circularly polarized luminescence from proteins covalently labeled by a β -diketonate europium(III) chelate			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Chem. Commn.	有	印刷中	2 0 1 3	印刷中
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(21)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名	発表標題	
上久保裕生	Element-based molecular design can reproduce an artificial protein with an expected enzymatic activity	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月22日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
芝るみ	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12回日本蛋白質科学会年会	2012年06月20日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Rumi Shiba	The role of the flexible loop in Staphylococcal nuclease on its catalytic activity	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月22日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Naoharu Kouduki	Amyloid fibril inhibition mechanism of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月22日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki	The role of hydrogen bonding network around the chromophore for the interaction of Rc-PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月23日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Mitsuhiro Sakonji	Effect of N-terminal region to the structure formation of PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月23日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Mayu Shimada	Analysis of interaction sites on the Photoactive Yellow Protein of Rhodobacter capsulatus with chimeric proteins	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月23日	愛知県名古屋市

発表者名	発表標題	
Masatoshi Narumi	Roles of hydrogen bonds around chromophore in Photoactive Yellow Protein studied by OH-deficient cinnamic acid	
学会等名	発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会	2012年09月23日	愛知県名古屋市

発表者名		発表標題	
Keito Yoshida		Photoreaction of PYP domain regulates the structural change during the photoreaction of phytochrome domain of Ppr	
学会等名		発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会		2012年09月23日	愛知県名古屋市

発表者名		発表標題	
Kento Yonezawa		Protonation state of arginine 52 near the low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein	
学会等名		発表年月日	発表場所
第50回日本生物物理学会年会		2012年09月23日	愛知県名古屋市

発表者名		発表標題	
Rumi Shiba		The role of the flexible loop in Staphylococcal nuclease on its catalytic activity	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions		2012年12月05日	京都府京都市

発表者名		発表標題	
Dian Novitasari		Fluorescence properties of chromophore fluorescence properties of chromophore modified photoactive yellow protein	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions		2012年12月06日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
Emi Ohta	The comparison of fluorescent spectra between wild type staphylococcal nuclease and the mutants based on FRET	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月06日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
Naoharu Kohzuki	Amyloid fibril inhibition mechanism of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月05日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
Mitsuhiro Sakonji	Extraction of the structure elements from PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月05日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
Mayu Shimada	Analysis of interaction sites on the Photoactive Yellow Protein of Rhodobacter capsulatus with chimeric proteins	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月06日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
Masatoshi Narumi	Roles of hydrogen bonds around chromophore in Photoactive Yellow Protein studied by OH-deficient cinnamic acid	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月06日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
Keito Yoshida	Structural analysis of PYP-Phytochrome Related Protein during its photoreaction by using small angle X-ray scattering	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月05日	京都府京都市

発表者名	発表標題	
片岡幹雄	イエロープロテインの光反応中の構造変化を見る	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本物理学会第68回年次大会	2013年03月26日	広島県東広島市

発表者名	発表標題	
山口真理子	変性剤がスタフィロコッカルスクレアーゼの変性構造に与える影響	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本物理学会第68回年次大会	2013年03月26日	広島県東広島市

発表者名	発表標題		
遠藤仁	中性子小角中角散乱で観測した水溶液中のStaphylococcal Nucleaseの構造		
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本物理学会第68回年次大会	2013年03月29日	広島県東広島市	

〔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

A large, empty rectangular box with a black border, intended for the student to write their preparation notes for question 15.