

様 式 C - 7 - 1

## 平成 2 4 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(A)      4. 研究期間 平成24年度～平成27年度
5. 課題番号 

2	4	2	4	7	0	3	0
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 イエロープロテインの構造と光反応：一般性と多様性

## 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	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

## 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
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
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

生物が共通の構造基盤から多様性を獲得する分子機構を、イエロープロテインを材料に明らかにしようとする目的で本研究は進められている。本年度は、特に共通の構造基盤として、*H. halophila*のイエロープロテインの構造解析を中心に進めた。われわれの発見した発色団とE46の間の低障壁水素結合について、溶液中でも実際に形成されているかどうかを調べた。理論計算により、R52が脱プロトン化しているときにのみ低障壁水素結合が形成される可能性のあることが分かったため、R52のプロトン化状態を詳細に検討した。野生型には、発色団周囲に2つのプロトン化部位があるがR52Qでは1つしかない。吸収スペクトルや光反応は両者で大きく異なることから、野生型のプロトン化部位は発色団とR52であり、生理的条件下ではR52が脱プロトン化していることが示唆された。

光反応に伴う構造変化を100ピコ秒時間分解能の時分割ラウエ構造解析により明らかにした。その結果、光照射後100ピコ秒以内に形成される初期中間体では、発色団がトランスとシスの中間の90°捻じれた遷移状態の構造を形成していることが明らかになった。タンパク質中で遷移状態の構造が安定化されることを示した世界で初めての例である。また、発色団とE46の水素結合距離の変化も詳細に理解され、初期中間体で低障壁水素結合が解消していることが示された。

また、イエロープロテイン中のすべてのチロシン残基のpKaをNMRにより求めた。その結果、チロシンには三種類の存在状態の違いがあり、発色団と水素結合しているY42のpKaは異常に高いことがわかった。

*R. capsulatus*のイエロープロテインは、*H. halophila*のイエロープロテインと比べて光反応時間が1,000倍以上遅い。両者のキメラタンパクを作成し、光反応時間を制御していると思われる領域が同定された。

## 10. キーワード

- |               |              |              |              |
|---------------|--------------|--------------|--------------|
| (1) イェロープロテイン | (2) 低障壁水素結合  | (3) 時間分割ラウエ法 | (4) 光反応      |
| (5) アルギニン     | (6) チロシンのpKa | (7) NMR      | (8) キメラタンパク質 |

## 11. 現在までの達成度

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

低障壁水素結合の存在の証明は、中性子結晶構造解析だけによっていたが、pH滴定やFTIRによりその存在を検証できる可能性を示した。また、当初予定していなかった理論計算により、低障壁水素結合の形成条件が示されたため、その検証が格段に進んだ。時間分解ラウエ構造解析により、タンパク質の時間分解結晶構造解析ではこれまで実現されていなかった100ピコ秒という速い分解能が実現でき、また4つの光反応中間体の構造が1.65Å分解能で解析された。これらは、タンパク質では世界で初めての成果である。この解析は、データ収集に2年、解析に1年を予測していたがわれわれの調整した結晶がきわめて良質であったことから、高精度のデータが短期間で得られたことによる。

## 12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

時間分解ラウエ解析は、今年度以降いくつかの変異体に対して適用する予定である。これにより、低障壁水素結合の生理的役割が明らかになると期待している。また、この方法を溶液散乱に応用することにより、溶液中での構造変化も研究していきたい。時間分解溶液散乱は、今秋以降に実験ができるよう現在準備を進めている。

変異体の中性子結晶構造解析を行い、低障壁水素結合形成の要因を明らかにする。結晶化はすでにあり、中性子回折実験の再開を待っている状態である。中性子結晶構造解析は、日本のJRR3のB1X4が最も性能がよく、欧米の回折計では代替ができない、または代替できても十分な実験時間を確保できないため、解析可能なデータ収集には問題がある。また、NMRやFTIRを用いて、R52のプロトン化状態と低障壁水素結合の形成の関係を明らかにしていく。そのための試料調整や実験条件整備を進める。

多様性の獲得機構に関しては、*R. capsulatus*のイエロープロテイン、*R. sphaeroides*のイエロープロテイン-フィトクロム融合タンパク質のイエロープロテインドメインを用いた比較研究を進める。結晶構造解析のための結晶化の条件探索を行っている。いまだに有望な条件が見つからないが、これまでの経験から乗り越えられると考えている。結晶化ができれば、結晶構造解析、*H. halophila*のイエロープロテインとの比較研究と進める。一方、キメラタンパク質を利用し、光反応時間を制御する領域や吸収スペクトルを制御する領域を同定する。キメラタンパク質のDNAは作製済みである。領域が明らかになれば、その領域内での部位特異的置換により、関係するアミノ酸を明らかにしたい。多様性を獲得する分子機構に迫ることができると期待している。

## 13.研究発表(平成24年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(4)件 うち査読付論文 計(2)件

著者名		論文標題			
片岡幹雄		中性子生物物理学の展開			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
波紋		無	22	2   0   1   2	132-138
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			
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   2	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			
Trijntje J. Pool		1H, 13C, and 15N resonance assignment of photoactive yellow protein			
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Biomol. NMR Assign.		有	7	2   0   1   2	97-100
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(15)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名		発表標題	
片岡幹雄		Structure and photoreaction of photoactive yellow protein	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 4th Japan-France Joint Symposium(招待講演)		2013年01月07日～2013年01月11日	兵庫県佐用郡佐用町

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25日～2013年03月29日	広島大学、広島県東広島市

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22日～2012年09月24日	名古屋大学、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22日 ~ 2012年09月24日	名古屋大学、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22日 ~ 2012年09月24日	名古屋大学、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22日 ~ 2012年09月24日	名古屋大学、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22日 ~ 2012年09月24日	名古屋大学、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22日 ~ 2012年09月24日	名古屋大学、愛知県名古屋市

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05日 ~ 2012年12月06日	京都テルサ、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 ~ 2012年12月06日	京都テルサ、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05日 ~ 2012年12月06日	京都テルサ、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05日 ~ 2012年12月06日	京都テルサ、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 ~ 2012年12月06日	京都テルサ、京都府京都市

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
The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions	2012年12月05日 ~ 2012年12月06日	京都テルサ、京都府京都市

発表者名	発表標題	
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	
学会等名	発表年月日	発表場所
第38回量子物理化学セミナー	2012年12月21日 ~ 2012年12月21日	横浜市立大学、神奈川県横浜市

〔図書〕計(1)件

著者名	出版社		
片岡幹雄	化学同人		
書名	発行年	総ページ数	
ひかりエネルギー革命 - グリーンフォトニクス -	2   0   1   2	121	

## 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

--