

様式 C - 7 - 1

平成25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 イェ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

水溶性の光需要蛋白質であるPYPを用いて、共通の構造基盤から機能や光反応の多様性を生み出す分子機構を明らかにすることを目的としている光反応時間が大きく異なるhPYPとRcPYP、存在形態の異なるPprPYPについて研究を進めた。前年度の野生型hPYPについての100ピコ秒時間分解能の時間分解結晶構造解析の成功を受け、E46Q変異体について時間分解結晶構造解析を開始した。野生型に比べ、光照射に対し結晶が不安定であることなど克服すべき問題が明らかになった。これらに対処しつつ時間分解回折データの収集が順調に行われている。一方、RcPYPの結晶構造解析に世界で初めて成功した。結晶構造解析の結果、シートがhPYP野生型よりも伸張しており、活性光中間体のX線溶液構造やNMR構造に類似していた。結晶化に際しては界面活性剤の添加が必須であり、結晶の吸収スペクトルは活性光中間体のスペクトルと類似している。また構造中には界面活性剤分子が見出された。光情報変換の理解に重要であると考えられる結果であり、現在構造精密化を進めている。

中性子結晶構造解析で脱プロトン化していると結論したR52の溶液中でのプロトン化状態を詳細に調べ、暗状態で脱プロトン化している可能性が示された。光反応に伴うR52由来のスペクトルの変化およびその酸素同位体効果は、プロトン化したR52では合理的に説明できない。引き続きFTIRによる検証を進める。

hPYPとRcPYPのキメラ蛋白質を用いた研究により、RcPYPの標的蛋白質結合サイトが同定された。また、光反応時間を制御していると考えられる部位を抽出し、関与しているアミノ酸残基が同定された。この結果から、光反応時間の測定がなされていない他のPYPについても光反応時間を推定した。今後この仮説を検証し、光反応時間を決定する要因の理解につなげようとしている。

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) 時間分解蛋白質結晶構造解析 | (4) 光反応 |
| (5) アルギニン | (6) キメラ蛋白質 | (7) FTIR | (8) 国際情報交換 |

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)

低障壁水素結合とアルギニン52のプロトン化状態の共役性について理解が進んだ。これらの存在に疑問を呈した理論計算があるが、この理論計算で予測される現象や説明を否定する実験結果を複数得ることができた。また、存在を肯定する理論計算の結果の報告もあり、水素結合を含めたこの分野の進歩に大いに貢献していると考えている。

時間分解結晶構造解析についても、変異体に対して適用が始まり、この分野をリードしている。また、これまで多くのグループの挑戦を退けていたRcPYPの結晶化に世界に先駆けて成功し、結晶構造解析ができたことも特筆される。

FTIRにおいても酸素原子の同位体効果を丁寧に測定することにより、アルギニン由来のスペクトルを同定できた。その変化は、このアルギニンが脱プロトン化していると考えると合理的に説明できるが、プロトン化していると仮定すると説明できない。光反応による変化についての同位体効果を精度よく、しかも再現性をもって観測できたことは、PYPのみならず蛋白質のFTIR研究にも貢献する成果である。

これらの結果は、国内外の学会で口頭及びポスター発表あるいは修士論文として発表を行っているが、投稿論文として公表することがやや遅れているのが反省材料である。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

当初の研究計画に沿って順調に研究が進展しているので、今後も研究計画に沿って研究を進めていく。時間分解結晶構造解析に関しては、E46Q変異体についての解析を優先し、2年間で構造解析まで行いたい。ビームタイムが限られているので、効率的に実験を進める。低障壁水素結合の存在を確立するために、変異体の中性子結晶構造解析を進めたい。結晶は得ており、JRR3での中性子回折実験の再開を待っている状態である。欧米の中性子回折系では代替が難しく、J-PARC iBIXの利用も考えているが、解析可能なデータ収集には限界があるように思われる。NMRやFTIRにより、低障壁水素結合、R52プロトン化状態の検証を進める。そのための実験条件の整備や同位体を含む試料調整の方法を確立した。

多様性獲得機構の研究には、RcPYPやPprPYPとの比較研究が不可欠である。昨年度までは試行錯誤を繰り返していたRcPYPの結晶化に成功し、構造解析に進んだことは大きな進歩である。またキメラ蛋白質の利用により性質を変化させる部位の同定が進んでいるので、今後はその分子機構の解明に全力を挙げたい。

全長Pprについて、apo-holo体、holo-apo体、holo-holo体の再構成に成功し、apo-apo体とあわせて、構造と機能を研究することが可能になった。PYPドメイン単体と全長Pprの光反応を比較することで、光情報伝達メカニズムの理解につなげる。これは、共通基盤機構の理解と多様性発現の理解の両目的を同時に研究するよい材料である。

先進的な結果が得られているので、投稿論文としてまとめることにも力を注ぐ。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(6)件 うち査読付論文 計(6)件

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	419	2 0 1 3	50-53	
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	419	2 0 1 3	212-223	
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. Commun.	有	49	2 0 1 3	4604-4606	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1039/c3cc40331a					

著者名	論文標題			
Mitsuhide Hamaguchi	Structural Basis of α -Catenin Recognition by EspB from Enterohaemorrhagic E. coli Based on Hybrid Strategy Using Low-Resolution Structural and Protein Dissection			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
PLoS One	有	8	2 0 1 3	e71618
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1371/journal.pone.0071618.				

著者名	論文標題			
Naokazu Inoue	Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Development	有	140	2 0 1 3	3221-3229
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.1242/dev.094854.2013				

著者名	論文標題			
Dian Novitasari	Excited-State Proton Transfer in Fluorescent Photoactive Yellow Protein Containing 7-Hydroxycoumarin			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Advanced Materials Research	有	896	2 0 1 4	85-88
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(25)件 うち招待講演 計(4)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
The 8th Asian Biophysics Association Symposium(招待講演)		2013年05月26日～2013年05月29日	Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea

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 8th Asian Biophysics Association Symposium		2013年05月26日～2013年05月29日	Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea

発表者名		発表標題	
上久保裕生		Photoactive Yellow Protein中の低障壁水素結合と近傍アルギニンの解離性	
学会等名		発表年月日	発表場所
第13回日本蛋白質科学会年会(招待講演)		2013年06月12日～2013年06月14日	とりぎん文化会館、鳥取県鳥取市

発表者名		発表標題	
芝るみ		黄色ブドウ球菌由来核酸分解酵素におけるループの揺らぎと機能の関係	
学会等名		発表年月日	発表場所
第13回日本蛋白質科学会年会		2013年06月12日～2013年06月14日	とりぎん文化会館、鳥取県鳥取市

発表者名	発表標題	
Mikio Kataoka	The mechanism of induced folding of Staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics 2013 (招待講演)	2013年08月05日 ~ 2013年08月09日	Telluride Intermediate School, Telluride, USA

発表者名	発表標題	
Dain Novitasari	Excited-state proton transfer in fluorescent Photoactive Yellow Protein containing 7-hydroxycoumarin	
学会等名	発表年月日	発表場所
International Conference on Advanced Materials Science and Technology 2013	2013年09月17日 ~ 2013年09月18日	University Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

発表者名	発表標題	
松本昇紘	トリプトファン三重項寿命を用いたStaphylococcal nucleaseの主鎖の運動性評価	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本物理学会 2013年秋季大会	2013年09月25日 ~ 2013年09月28日	徳島大学、常三島キャンパス、徳島県徳島市

発表者名	発表標題	
Mikio Kataoka	Time-resolved Laue crystallography of photoactive yellow protein with 150psec time resolution	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日 ~ 2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Hiroshi Nakagawa	Translation diffusion dynamics of protein hydration water and its dynamical coupling with protein dynamics	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Megha Deshpande	Domain-Swapped Oligomerization and Molten Globule State of Cytochrome c	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki	Analysis of interaction sites on the Photoactive Yellow Protein of Rhodobacter capsulatus	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

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51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Dain Novitasari	Exited State Proton Transfer of Fluorescent Photoactive Yellow Protein Reconstituted with Hydroxycoumarin	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日 ~ 2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Kento Yonezawa	Protonation State of Arginine 52 in Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日 ~ 2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Keito Yoshida	X-ray Solution Scattering Studies of PYP-Phytochrome Related Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日 ~ 2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Emi Ohta	Analysis of unfolded structure of Staphylococcal nuclease mutants by using FRET	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日 ~ 2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Takahiro Matsumoto	Main-chain dynamics of staphylococcal nuclease in microsecond timescale	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Toshiyuki Minemura	Local flexibility of denatured structure and its relationship to non-local interaction in staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Toshio Morimoto	Extraction of Function Elements from Green Fluorescent Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Mai Arakawa	Roles of functional elements transplanted into the artificial enzyme	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Hiroshi Matsumoto	X-ray crystal structure analysis of the Photoactive Yellow Protein of Rhodobacter capsulatus	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Yoshiaki Matsumoto	Analysis of Equilibrium of intermediate states of PYP by use of chimera proteins	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Masayoshi Noji	Protonation state of R52 at the PYPM intermediate state	
学会等名	発表年月日	発表場所
第51回日本生物物理学会年会	2013年10月28日～2013年10月30日	国立京都国際会館、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Mikio Kataoka	Structure and photoreaction of photoactive yellow protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第1回ピコバイオリジー研究所国際シンポジウム(招待講演)	2014年01月07日～2014年01月08日	理化学研究所播磨事業所、兵庫県佐用郡佐用町

発表者名	発表標題	
富士香奈	核酸分解酵素staphylococcal nucleaseの分子動力学に対する時系列解析: 活性低下における水、リガンド、ループの関係性	
学会等名	発表年月日	発表場所
第69回日本物理学会年次大会	2014年03月27日～2014年03月30日	東海大学湘南キャンパス、神奈川県、平塚市

〔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	
揺らぎ・ダイナミクスと生体機能(寺嶋正秀編)「物理化学的視点から見た生体分子」	2013	347	

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

--