

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570194

研究課題名(和文) PASドメインタンパク質の相互作用多様化機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism for divergent interactions in PAS domain proteins

研究代表者

山崎 洋一 (Yamazaki, Yoichi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：40332770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：構造の類似した相同なタンパク質の一群が、生体中で多様な機能を実現している分子基盤の解明をめざし、PASドメインタンパク質の中で機能の異なる、2つPYP分子をモデルにして、その機能の違いを生む分子機構を検証した。その結果、未解明であった、PYP分子の相互作用タンパク質の溶液中での構造を決定した。さらに、相互作用時の複合体構造の溶液構造の決定も行った。複合体は、溶液中で特徴的な環状ヘテロ八量体を形成していた。相互作用に関わるPYP上の残基を同定して、相互作用という機能の多様化を生み出す部位を決定した。さらに、結晶構造解析を行い、この結合部位の周辺が相互作用時に構造変化を示す可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：There are many different functions even in a structurally homologous proteins. It is not clear how they realize these divergent functions on their same protein backbone. To evaluate these molecular divergent mechanism, two different PYP proteins classified as PAS domain proteins have been investigated about their molecular mechanism for structural changes and protein-protein interaction. As the results, (1) solution structure of the interaction protein for PYP has been identified. And then complex formation of this protein and PYP has been successfully identified. This complex was characteristic ring shape composed by hetero octamer. (2) a surface residue on the PYP has been identified as an interaction site. (3) X-ray crystal analysis for this PYP suggested that structural change was introduced around the interaction residue.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物学 情報伝達 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

PAS ドメインは Per, Arnt, Sim という三つのタンパク質にその名を由来する 100 アミノ酸残基ほどのドメインで、ゲノム解析が進む中、20000 種以上におよぶタンパク質配列中に 40000 個程度の PAS ドメイン構造があることが提示されている。古細菌からヒトに至るあらゆる生物界に分布している PAS ドメインタンパク質は、ヒトのダイオキシン受容体 (Ahr) や、植物のフトロピンなど、環境変化に対する遺伝子転写制御に関与しているものが多い。その中で PAS ドメイン自身は、ヘムやフラビン、クマル酸、炭化水素などの補欠分子を結合し、環境変化に対するセンサーとして働き、情報伝達系を駆動する起点となることが知られている。

構造解析がなされた PAS ドメインは、類似の立体構造を持つことが示されており、類似の情報伝達機構を有すると予想されている。しかし、結晶構造から考えられる相互作用様式は多様で、PAS ドメインの N, C 末端に伸びた部位での相互作用や、中央部 シートでの相互作用など様々な形で得られている。これらのことは、情報伝達の直接的なインターフェースの異なる、多様なタンパク質の駆動メカニズムが、相同構造に内在していることを予想させる。しかしながら、これらのインターフェースを通じた情報伝達メカニズムの詳細は議論の余地を残し、タンパク質骨格構造に内在する機能発現機構の共通基盤に関しては詳細な検討が必要である。

Photoactive Yellow Protein (PYP) は PAS ドメインのみからなる小型のタンパク質で、補欠分子としてクマル酸を有し、青色光を吸収するセンサータンパク質である。光による反応制御が可能な点などから、タンパク質の構造機能解析に適している。理論計算、実験を通じたタンパク質の機能解析を原子レベルから階層的に理解するうえで、特に優れた系であると国内外で考えられている。しかし現在まで、情報伝達の相互作用分子が未同定であったことから

機能解析ができず、PAS ドメイン全般にまで拡張した相互作用分子メカニズムの議論は殆どなされていない。このような中、研究代表者は、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* 由来の PYP タンパク質に対する新規の相互作用タンパク質の単離に成功し、機能に直結した相互作用の解析を含めた検討が可能になった。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、PAS ドメインの多様性が如何にして実現されているかを、分子レベルで明らかにすることを目的に、共通のタンパク質基盤の上に異なる相互作用能を形成している PYP タンパク質が、PAS ドメインタンパク質の相互作用機構のモデルとなると着想した。そこで本研究では、PYP - 相互作用蛋白質の結合に関わる直接的なインターフェース部位の抽出と、相互作用を引き起こす PYP のタンパク質構造変化様式を明らかにする。これらのことから、PAS ドメインにみられる、多様な性質が共通の構造変化様式の上に階層的に形成されているのか、全く異なる構造変化様式の上に成り立っているのかを明らかにしていくことを目指した。多様な性質を生む機構が情報伝達過程のどの階層で実現されているかを議論する。

3. 研究の方法

(1) 相互作用タンパク質の溶液構造の決定と複合体形成時の溶液構造の決定

PYP の相互作用タンパク質は光を受容した PYP に対してのみ結合するタンパク質で、結合状態を安定に形成する。そこで、PYP との複合体形成機構の解明を目指して、相互作用タンパク質の溶液中での会合状態と、その形状を X 線小角散乱測定から決定した。さらに、PYP との光依存的な複合体の溶液構造を決定した。複合体の形成は、PYP の光反応に対応するので、遮光条件下と、光を照射した状態での測定を行った。

(2) 複合体形成を生む相互作用領域の決定

PYP は光情報のセンサー部位として機能することから、相互作用の有無を決定している構造変化は PYP に内在している。相互作用領域の決定は、PAS ドメインタンパク質に見られる相互作用様式の多様性を検討するためには必須になる。PYP 光反応に伴う詳細な構造変化解析から、PAS ドメインの構造的基盤を形成する、C 末端部位 シートとその間をつなぐループ部位、また、補欠分子の結合多様性を生むヘリカルコネクター部位などが構造変化部位、相互作用部位と予測されていた。これらの部位の相互作用に与する可能性を包括的に検討するため、PYP に対するキメラタンパク質の相互作用能の検証を行った。PYP には相同タンパク質がいくつか存在しており、相互作用タンパク質には、結合しないものも存在する。これらの PYP とのキメラタンパク質を用いて、相互作用領域を同定した。

(3) PYP の結晶構造解析

相互作用部位の同定、相互作用を主導する構造変化の解析を、原子レベルへの議論へと展開して、PAS ドメインタンパク質全般との比較を行う目的で、相互作用を示す PYP の X 線結晶構造解析を行った。結晶化条件の探索から始めて、結晶構造解析を行った。この結晶状態が相互作用状態を議論する際にどのような構造状態にあるものなのか、結晶分光や X 線小角散乱測定などの測定も行った。

4 . 研究成果

(1)相互作用タンパク質の溶液中での会合状態とその形状を、X 線小角散乱測定を用いて決定した。その結果、PYP 相互作用タンパク質は溶液中で異方的な 2 量体を形成していることが明らかになった。さらに、PYP との光依存的に形成される複合体の溶液構造を測定し、多様な複合体構造中、最大になる複合体にリング状構造を見出した。この結果は、PYP

における相互作用の状態を初めて示したものである。

(2)光依存的 PYP 複合体構造の形成要因を PYP 分子内の残基レベルで明らかにするため、キメラ PYP を用いた、相互作用解析から、その相互作用部位が発色団近傍領域に存在することを見出した。さらに、残基レベルでの変異体解析から、この領域に存在するリシン残基が相互作用の中心的役割を担っていることを明らかにした。また、キメラを用いた解析により、相互作用部位の単純な置換は、相互作用能の移植を生まないこと、それらキメラ PYP の光反応の二次構造変化の解析から、相互作用の維持に必要な構造の維持が、PYP の全配列に依存して存在していること等を明らかにできた。

(3)相互作用を示す PYP の X 線結晶構造解析の結果、結晶の晶出に用いた添加剤が、PYP 分子に結合した状態の結晶構造を得ることに成功した。結晶分光や、X 線溶液散乱測定などの結果から、この構造は、反応中間体の構造を模しているものと考えられた。この結晶構造からは、相互作用残基の近傍の分子表面に溝が新たに形成されており、この部位に相互作用の ON/OFF を誘起している機構が考えられた。この相互作用部位は、PAS ドメインの補欠分子の結合で、多く実現されているものと考えられ、PAS ドメインの共通の作用機構であると考えられる。さらに、PYP の構造変化に関するキメラ変異体の解析の結果から、構造変化を制御している要因の一部が、分子内部の活性部位から離れた、分子表面の荷電残基であることも明らかにできた。このような、表面電荷の配置などを制御することで、PAS ドメインタンパク質が多様性を獲得していることが考えられる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoichi Yamazaki, Tomoko Nagata, Akihisa Terakita, Hideki Kandori, Yoshinori Shichida, Yasushi Imamoto
Mapping of the local environmental changes in proteins by cysteine scanning
Biophysics 10, 1-7 (2014) 査読有

D. Novitasari, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, M. Kataoka
Excited-State Proton Transfer in Fluorescent Photoactive Yellow Protein Containing 7-Hydroxycoumarin
Advanced Materials Research **896**, 85-88 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

1: Y. Yamazaki, M. Shimada, H. Kamikubo, M. Kataoka
Analysis of interaction sites on the Photoactive Yellow Protein of *Rhodobacter capsulatus*, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013.10.29, 京都市

2: H. Matsumoto, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka
X-ray crystal structure analysis of the Photoactive Yellow Protein of *Rhodobacter capsulatus*, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013.10.29, 京都市

3: Y. Matsumoto, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka
Analysis of Equilibrium of intermediate states of PYP by use of chimera proteins, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013.10.29, 京都市

4: D. Novitasari, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, M. Kataoka
Excited-state proton transfer in fluorescent Photoactive Yellow Protein containing 7-hydroxycoumarin, The International Conference on Advanced Materials Science and Technology, 2013.9.17, Yogyakarta, Indonesia

5: Y. Yamazaki, M. Shimada, H. Kamikubo, M. Kataoka
The role of hydrogen bonding network around the chromophore for the interaction of Rc-PYP, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012.9.23, 名古屋市

6: M. Shimada, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka

7: Analysis of interaction sites on the Photoactive Yellow Protein of *Rhodobacter capsulatus* with chimeric proteins, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012.9.23, 名古屋市

8: M. Sakonji, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka
Effect of N-terminal region to the structure formation of PYP, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012.9.23, 名古屋市

9: M. Narumi, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, H. Kamikubo, M. Kataoka
Roles of hydrogen bonds around chromophore in Photoactive Yellow Protein studied by OH-deficient cinnamic acid, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012.9.23, 名古屋市

10: Y. Yamazaki, M. Hayashi, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka
Solution structure of the complex states of *Rhodobacter capsulatus* PYP with its binding protein, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011.9.17, 姫路市

11: R. Odani, Y. Yamazaki, K. Matsumoto, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka
The Role of N-terminal Region for Photoreaction of Various Photoactive Yellow Proteins, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011.9.17, 姫路市

12: S. Setoguchi, H. Kubo, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Yamaguchi, M. Kataoka
Development of Light dependent protein activity control system by use of interaction of the Rc-PYP, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011.9.17, 姫路市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/kataoka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 洋一 (YAMAZAKI YOICHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教

研究者番号：40332770

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

上久保 裕生 (KAMIKUBO HIRONARI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：20311128