

様 式 C - 7 - 1

## 平成 2 5 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 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究期間 平成 2 5 年度～平成 2 9 年度
5. 課題番号 

2	5	1	0	2	0	0	3
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 機能を生み出す単位生体分子集団（機能モジュール）の動的秩序の探査

## 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

## 9. 研究実績の概要

本研究では、溶液中でのタンパク質集団の集合・離散過程を観測することができる量子ビーム溶液散乱の新しい手法を開発することによって、機能を生み出す単位分子集団（機能性モジュール）が示す動的秩序を解析し、生理機能の関連性を明らかにすることを目的としている。本年度は、本研究の基盤となるX線溶液散乱自動測定システムの構築を行った。

互いに弱い相互作用で関連づけられた多数の分子からなる溶液中には様々な複合体が存在する。このような多成分平衡系で生じる集合離散現象を解析するためには、活性種の濃度に連続的に変調を加え、その時々々の散乱曲線を観測する必要がある。1つの構成要素に線形的な濃度変調を与える場合でも数10点、活性種が複数ある場合にはその数だけ測定する必要があり、試料の使用量をできるだけ減らし、迅速な測定を可能とする自動計測システムの構築が不可欠である。当該年度は、試料の使用量を減らし、測定の自動化を実現するために、送液部、混合部、モニター部をオンチップ化したマイクロ流路チップの設計作製を行った。2液混合流路を試作し試験を行い、Mixing流路、観測部流路の最適化を行い、送液速度1マイクロL/minで均一な混合状態を再現することが可能な流路の作製に成功した。作製したマイクロ流路チップに無脈動マイクロシリンジポンプを接続し、流速を制御することで多成分の溶液の混合比率を自在に変調することが可能なシステムを構築した。可視光をプローブとした、X線を用いないオフラインでの試験を通じ、測定の自動化のためのソフトウェアの開発、性能評価を行った結果、当初予定した性能が実現されていることを確認した。

## 10. キーワード

(1) 蛋白質	(2) 蛋白質集団	(3) X線溶液散乱	(4) マルチドメイン蛋白質
(5) 動的秩序	(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)

マイクロ流路を用いた自動測定システムの構築はおおむね順調にその開発が進んでいる。年度当初は、本年度予算で購入した光子計数型X線検出器を、研究室のX線発生装置に導入し、X線を用いた試験を開始する予定であった。しかしながら、新しい検出器の性能評価、X線発生装置のトラブルもあり、年度内の実施に至らなかった。しかしながら、オフラインでのテストは順調に進み、次年度早々には、本システムのX線発生装置へのインストールが可能な状態になっている。

## 12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

現時点で、X線発生装置への本年度予算で購入した光子計数型X線検出器の本格運用を開始している。オフラインでの試験が順調に推移したことから、早急にX線を用いた試験を開始する。次年度は、本装置を用い、複数種の蛋白質が共存する溶液中で生じる集合離散現象の測定を開始する。本実験では、同時に数多くの蛋白質を用意する必要があり、試料の準備に一定の期間を要する。装置が立ち上がり次第、本実験が開始できるよう、ターゲットとなる蛋白質群の精製とストックの作製を開始している。この目的のため、蛋白質精製用クロマトグラフィーを追加購入し、作業の効率化を図っている。

## 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	2013	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	2013	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 $\beta$ -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	2013	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			
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			
Mitsuhide Hamaguchi	Structural Basis of $\alpha$ -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			
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 Reserch	有	896	2   0   1   3	85-88
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
10.4028				

(学会発表) 計(35)件 うち招待講演 計(5)件

発表者名		発表標題	
上久保裕生		光センサー-蛋白質の局所状態変化と全体構造変化	
学会等名		発表年月日	発表場所
第3回CIMoSセミナー(招待講演)		2013年06月28日	分子科学研究所協奏分子システム研究センター、愛知県岡崎市

発表者名		発表標題	
国際高等研究所研究プロジェクト「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」2013年度第2回研究会プログラム		光センサー-蛋白質からみた階層間の連続性	
学会等名		発表年月日	発表場所
上久保裕生		2013年08月08日	国際高等研究所、京都府木津川市

発表者名		発表標題	
上久保裕生		折り畳み機構を踏まえた蛋白質分子設計方の開発	
学会等名		発表年月日	発表場所
NAIST未来開発コロキウム - 明日をつくる分子・人材ネットワーク(招待講演)		2013年08月09日	奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科、奈良県生駒市

発表者名		発表標題	
上久保裕生		X線溶液散乱法を用いたタンパク質構造の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
分子・物質合成プラットフォーム技術研修会 - 先端施設の利用機会と高度な技術支援の提供 - (招待講演)		2013年08月22日～2013年08月23日	ホテル京阪 京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Dian 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	
上久保裕生	機能を生み出す単位生体分子集団	
学会等名	発表年月日	発表場所
生命システムにおける動的秩序形成と高次機能発現 第1回公開シンポジウム(招待講演)	2013年10月02日	岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市

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	
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	
Dian 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	
Hironari Kamikubo	Functional modification of a protein by using element implantation	
学会等名	発表年月日	発表場所
Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences; Experiments and Simulations (招待講演)	2013年11月25日～2013年11月27日	岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo	Exploring regulatory association and dissociation processes of biological molecules constituting a functional module	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki	Interaction sites analysis for the photoactive yellow protein of Rhodobacter capsulatus	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Mariko Yamaguchi	Local disordered structure of staphylococcal nuclease studied by tryptophan triplet state lifetime measurement	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Takahiro Matsumoto	Loop dynamics of staphylococcal nuclease in microsecond timescale	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Toshiyuki Minemura	Local flexibility around tryptophan140 and its relationship to non-local interaction in disordered staphylococcal nuclease	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、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
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Masayoshi Noji	Protonation state of R52 at the pymp intermediate state	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、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
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、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
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
Emi Ohta	Statistical characteristics of unfolded staphylococcal nuclease studied	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、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
The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2014年01月11日～2014年01月12日	キャンパスプラザ京都、京都府京都市

発表者名	発表標題	
上久保裕生	溶液散乱を用いた多成分平衡系における構造解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
Spring-8ワークショップ「Spring-8とユーザーのさらなる連携をめざして」	2014年02月01日～2014年02月02日	理化学研究所播磨事業所、兵庫県、佐用町

〔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

--