

様 式 C - 7 - 1

平成 26 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

水溶性の光受容蛋白質、イエロープロテイン（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、RcPYP、存在形態の異なるPprPYPについて研究を進めた。前年度、RcPYPについて結晶構造解析に成功した。結晶化には界面活性剤が必要であるため、水溶液中でスペクトルに対する界面活性剤の影響を測定した。結晶中では、長波長シフトするが、溶液中では短波長シフトすることが明らかになった。結晶のスペクトルは、活性中間体に標的蛋白質が結合した際のスペクトルに類似しているが、溶液中ではむしろ光反応途上のスペクトルに類似している。光反応による構造変化と類似の変化を界面活性剤がもたらし、結晶化するときさらに界面活性剤が特異的に結合すると推測している。hPYPでも同様の測定を進める予定である。

hPYP野生型およびR52Q変異体のN15ラベル体を作製し、光反応に伴うFTIRスペクトル変化を詳細に調べた。その結果、中性子結晶構造解析により脱プロトン化していると結論したR52は、L中間体でプロトン化することが明らかになった。暗状態のスペクトルの同位体効果は、プロトン化したアルギニンでは説明ができず、脱プロトン化していると解釈される。理論計算を含めさらに詳細に検討を進める。

全長のPprの光反応の測定から、PYPドメインが光反応した場合に、Bphドメインの光反応が抑制されることが示された。また、このときドメイン配置に変化が起きていることが示唆された。hPYPの活性中間体の構造やRcPYPの構造との比較研究から、情報の伝播機構の理解につなげたい。

hPYPとRcPYPのキメラ蛋白質を用いた研究より、吸収スペクトルを制御する領域のひとつが同定された。多様性を生むメカニズムの解析に進展している。

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) 光反応 | (4) 結晶構造解析 |
| (5) アルギニン | (6) FTIR | (7) キメラ蛋白質 | (8) 国際情報交換 (アメリカ、デンマーク) |

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)

R52のプロトン化状態のFTIRによる研究が進み、最初の光反応中間体であるL中間体において、R52がプロトン化することが明らかになった。基底状態でのFTIRスペクトルは、R52がプロトン化していると仮定すると、説明できないことも明らかになった。理論からの批判に耐える実験的証拠がそろってきている。

RcPYPの結晶構造解析から、hPYPとの違いを生む部位が明確になり、共通の構造基盤から多様性を生む分子機構の一端が解明されている。これは、キメラ蛋白質を用いた研究からも裏付けられている。

全長のPprの研究が進み、PYPで受容した光情報が下流に伝播する機構の理解につながっている。

一定の成果を得てきた時間分解結晶構造解析では、変異型に応用しようとしているが、変異型の結晶は光反応に弱く、低温実験を可能にするなど、現在実験系に工夫を加えているところである。

以上のように、共通性と個性(多様性)に着目した研究が順調に進捗しており、国内外の学会で口頭およびポスター発表を行い、高い評価を得ている。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

当初の計画に沿って順調に研究が進展しているため、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、終了時までにはE46QあるいはR52Q変異型について、データ収集から解析まで行いたいと考えている。FTIRおよびNMRを駆使して低障壁水素結合および脱プロトン化したR52の実験的証明を行う。否定的な理論計算があるが、計算と実験の齟齬の原因を明らかにし、PYP光反応の分子機構の全貌を解明したい。

hPYPでは、光反応に伴いN端のアミノ末端のアンフォールディングを含む構造変化が起き、この変化を標的蛋白質が認識すると考えられるが、他の二つではこのような大きな変化が起きないことが明らかになってきている。にもかかわらず、情報が伝達される。この事実が多様性の生じるヒントがあると考えている。光反応機構の比較研究を詳細に行い、違いを生む領域の同定に全力を挙げる。

最終年度であるため、特に多様性獲得の分子機構に焦点を定めてまとめるよう努力する。

先進的な結果が得られているため、学会で積極的に発表するとともに、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26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(3)件 うち査読付論文 計(3)件

著者名		論文標題			
Yuta Kobayashi, Hirotaka Tsutsumi, Tetsuyuki Abe, Kyohei Ikeda, Yuki Tashiro, Satoru Unzai, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, Hidekazu Hiroaki, Daizo Hamada		Decreased amyloidogenicity by mutational modulation of surface properties of the immunoglobulin light chain BRE variable domain			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biochemistry	有	53(31)	2014	5162-5173	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1021/bi5007892					

著者名		論文標題			
Megha Deshpande, Partha Parui, Hironari Kamikubo, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Hirofumi Komori, Mikio Kataoka, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota		Formation of Domain-Swapped Oligomer of Cytochrome c from Its Molten Globule State Oligomer			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biochemistry	有	53(28)	2014	4696-4703	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1021/bi500497s					

著者名		論文標題			
H. Nakagawa, Y. Yonetani, K. Nakajima, S. Ohira-Kawamura, T.Kikuchi, Y. Inamura, M. Kataoka, H. Kono		Local Dynamics Coupled to Hydration Water Determines DNA-sequence Dependent Deformability			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Physical Reiew E	有	90	2014	22723	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1103/PhysRevE.90.022723					

(学会発表) 計(29)件 うち招待講演 計(5)件

発表者名		発表標題	
Mikio Kataoka		FRET analysis of denatured staphylococcal nuclease	
学会等名		発表年月日	発表場所
8th IUPAP International Conference on Biological Physics (招待講演)		2014年06月18日 ~ 2014年06月22日	Institute of Physics, Chinese Academy of Science(Beijing, China)

発表者名		発表標題	
山崎洋一		Rhodobacter capsulatus PYP結晶構造に見られる活性中間体様構造の解析/Crystal structural analysis for active-state like structure of Rhodobacter capsulatus PYP	
学会等名		発表年月日	発表場所
第14回日本蛋白質科学会年会		2014年06月25日 ~ 2014年06月28日	ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

発表者名		発表標題	
Mikio Kataoka		Protein Dynamics and Structure Studied by Neutron Scattering	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 2nd International Symposium on Science (招待講演)		2014年07月12日 ~ 2014年07月15日	J-PARC(茨城県つくば市)

発表者名		発表標題	
Hironari Kamikubo		The potential uses of structure and function elements	
学会等名		発表年月日	発表場所
The 14th KIAS Conference on Protein Structure and Function (招待講演)		2014年09月17日 ~ 2014年09月20日	Korean Institute for Advanced Study(Seoul, Korea)

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki	Analysis for different property of light induced structural changes between two PYPs	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベクションセンター(北海道札幌市)

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52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベクションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Keito Yoshida	Relationship of the photoreactions between two sensor domains in PYP-Phytochrome Related Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベクションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Ryuji Okabe	Development of a microfluidics-based auto-sample changer for solution X-ray scattering	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベクションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Hiroko Tanaka	Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Sadatoshi Aoyagi	Characterization of the denatured structure of staphylococcal nuclease by tryptophan triplet state lifetime measurements	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Atuhiro Kawamura	The elucidation of the relationship between 4-5 loop region and the chromophore environment in PYPs	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Mai Arakawa	Acid induced proton transfer in Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第52回日本生物物理学会年会	2014年09月25日～2014年09月27日	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
米澤健人	Photoactive Yellow Proteinにおけるアルギニン52のプロトン化状態	
学会等名	発表年月日	発表場所
第1回「動的秩序と機能」若手研究会	2014年09月28日～2014年09月30日	ラフォーレ蔵王(宮城県刈田郡蔵王町)

発表者名	発表標題	
青柳貞利	トリプトファン三重項寿命を用いたStaphylococcal nucleaseの変性構造の評価	
学会等名	発表年月日	発表場所
第1回「動的秩序と機能」若手研究会	2014年09月28日～2014年09月30日	ラフォーレ蔵王(宮城県刈田郡蔵王町)

発表者名	発表標題	
岡部龍二	マイクロ流路を用いたX線溶液散乱測定サンプルチェンジャーの開発	
学会等名	発表年月日	発表場所
第1回「動的秩序と機能」若手研究会	2014年09月28日～2014年09月30日	ラフォーレ蔵王(宮城県刈田郡蔵王町)

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
16th International Conference on Retinal Proteins (招待講演)	2014年10月05日～2014年10月10日	長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

発表者名	発表標題	
Y. Yamazaki	Analysis for different property of light induced structural changes between two PYPs	
学会等名	発表年月日	発表場所
16th International Conference on Retinal Proteins	2014年10月05日～2014年10月10日	長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

発表者名	発表標題	
K. Yonezawa	Structural change in Arginine 52 of photoactive yellow protein during the photoreaction	
学会等名	発表年月日	発表場所
16th International Conference on Retinal Proteins	2014年10月05日～2014年10月10日	長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

発表者名	発表標題	
K. Yoshida	Light-induced structural change of PYP-phytochrome related protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
16th International Conference on Retinal Proteins	2014年10月05日～2014年10月10日	長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

発表者名	発表標題	
A. Kawamura	The elucidation of the relationship between 4-5 loop region and the chromophore environment in PYPs	
学会等名	発表年月日	発表場所
16th International Conference on Retinal Proteins	2014年10月05日～2014年10月10日	長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市)

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
OUS Physics and Chemistry joint colloquim(招待講演)	2014年11月04日～2014年11月06日	オクラホマ大学(Oklahoma, USA)

発表者名	発表標題	
H. 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 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2015年01月10日～2015年01月11日	合歡の郷(三重県志摩市)

発表者名	発表標題	
K. Yonezawa	Protonation State of Arginine 52 in Photoactive Yellow Ptoein	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2015年01月10日～2015年01月11日	合歡の郷(三重県志摩市)

発表者名	発表標題	
Y. Keito	Relationship of the photoreactions of two sensor domains in PYP-Phytochrome Related Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2015年01月10日～2015年01月11日	合歡の郷(三重県志摩市)

発表者名	発表標題	
H. Tanaka	Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2015年01月10日～2015年01月11日	合歡の郷(三重県志摩市)

発表者名	発表標題	
A. Kawamura	The elucidation of the relationship between b4-5 loop region and the chromophore environment in PYPs	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2015年01月10日～2015年01月11日	合歡の郷(三重県志摩市)

発表者名	発表標題	
S. Aoyagi	Characterization of the denatured structure of staphylococcal nuclease by tryptophan triplet state lifetime measurements	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions	2015年01月10日～2015年01月11日	合歡の郷(三重県志摩市)

発表者名	発表標題	
片岡幹雄	蛋白質の変性構造を掘る	
学会等名	発表年月日	発表場所
第4回生物系科学における学術研究の動向を探る	2015年01月11日	丸駒温泉旅館(北海道千歳市)

発表者名	発表標題	
片岡幹雄	イエロープロテインの時間分解X線結晶構造解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
表面力セミナー	2015年02月28日～2015年03月01日	東北大学片平キャンパス(宮城県仙台市)

〔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

--