

様 式 C - 7 - 1

平成 2 6 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

生命システムにおいては、弱い相互作用で関連づけられた多種多様な蛋白質が、集合・離散を繰り返し様々な秩序状態をとること（動的秩序）によって機能を実現している。蛋白質分子集団が示す動的秩序を理解するためには、構成要素の存在比や外的要因に依存して、系の平衡状態がどのように応答するのかを定量的に分析することが必要となる。そこで、本研究では、系中に存在する複合体を含む全ての構成要素を区別し、その存在比率を定量的に評価することが可能な新たな測定/解析手法の開発研究を進めている。

量子ビーム溶液散乱測定からは、溶液中に存在する蛋白質の形に依存した散乱曲線が測定される。さらに、測定に用いる溶液の、種々の蛋白質の組成比率を任意に変化させ測定すれば、系中に含まれる全ての構造を同定できるだけでなく、その複合体種を規定する相互作用を定量的に評価することが可能となる。そこで本研究では、マイクロ流路技術を用いた「微量試料自動サンプリングシステム」を開発し、量子ビーム溶液散乱測定法と組み合わせることで当初の目的を達成しようとしている。当該年度は、3液混合タイプのマイクロ流路を新規に設計しサンプリングシステムの実証機を作製し、所属研究科に設置されたX線発生装置導入し、光応答性蛋白質分子複合体系に対して実証実験を行った。その結果、光応答性蛋白質の活性種濃度の変調に伴う散乱曲線の変化を観測することに成功した。解析を進めたところ、活性種の存在比率に依存して、光応答性蛋白質と相互作用蛋白質の結合比が異なる複数の複合体種が形成されることが明らかとなった。この事実は、光応答性蛋白質自身は光に対してON/OFFの応答しか示さないにもかかわらず、相互作用蛋白質と共存する分子複合体系では、光の強度に依存したアナログ出力を実現していることが明らかとなった。

10. キーワード

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

(1) 諸問題を解決した新規マイクロ流路を設計し、実証機作製とオフラインでの性能評価試験を行い、(2) 放射光、X線発生装置に導入し標準試料等を用いた実証試験を行う予定であった。さらに、(3) 「光応答性を示す蛋白質分子集団」と「神経軸索伸長に関わる蛋白質群」に適用し、これらの分子集団が示す動的秩序を解析することを計画していた。

(1) に関しては、マイクロ流路上の溶液の置換効率に問題があったため、観測部のサイズ・形状の変更、並びに、観測部から試料を廃液する流路を新たに設計し、実証機用のマイクロ流路を新たに作製した。着色液を用い、紫外可視吸収分光測定を行った結果、当初予定していた置換効率を達成できたことが確認できた。(2) については、放射光での実験は初期トラブルによって十分な実験を実施することができなかったが、X線発生装置への導入試験から、任意の蛋白質を任意の比率で混合した溶液を、条件を変えながら連続測定することが可能であることが実証された。この結果を受け、(3) の光センサー蛋白質と相互作用蛋白質が共存する溶液に対し、光センサーの活性種の濃度を線形的に変調させながらX線溶液散乱測定を行った。その結果、光応答性蛋白質の活性種濃度の変調に伴う散乱曲線の変化を観測することに成功し、光応答性蛋白質自身は光に対してON/OFFの応答しか示さないにもかかわらず、相互作用蛋白質と共存する分子複合系では、光の強度に依存したアナログ出力を実現していることが明らかとなった。これは、動的秩序がもたらす新しい生理機能の可能性を示唆するものである。「神経軸索伸長に関わる蛋白質群」の測定を予定していたが、蛋白質の発現、精製条件の検討に時間を要し、本実験は次年度に繰り越すこととした。

一部、計画していた実験を実施することができなかったものの、上述の通り、順調に計画を進めることができています。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

「微量試料自動サンプリングシステム」の実用化には一定のめどが立ち、現在は多成分平衡状態から得られたデータの解析法の確立にフェーズがシフトしている。しかしながら、装置を放射光研究施設に持ち込み使用する際に、少なからずトラブルが発生し、ビームタイムを有効に利用できないことが問題となった。今後、測定効率を向上するために、放射光専用微量試料自動サンプリングシステムを新たに作製し導入する。本装置は、ビームライン担当者との協力のもと、一般ユーザーへの解放を進める。

システムの実用化にめどが立ったことを受け、今後は、生物学的意義、生物物理学的意義の高い蛋白質集団をターゲットとした応用研究を進める。すでに「光応答性を示す蛋白質分子集団」についてはデータ収集を始めており、動的秩序がもたらす新しい生理機能の可能性を示唆するに至っている。今後は、論文作成に向け、個々の複合体の溶液構造と安定性を定量的に評価する解析法の開発を進める。「神経軸索伸長に関わる蛋白質群」については、当該年度に発現、精製法を確立することができたので、トレッドミリングで実現される見かけの分子運動を駆動力に変換するメカニズムの解明を進める。さらに、本研究を実施するきっかけとなった「クラスリン被覆小胞輸送に関わる蛋白質群」として、マルチドメイン蛋白質(GGA)と多数の作用蛋白質群(Arf、積荷蛋白質受容体、ユビキチン)から構成される多成分平衡状態で生じる動的秩序の解析を進め、蛋白質分子が集団を形成して初めて実現される機能性の評価を進める。

。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件 うち査読付論文 計(2)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)	2 0 1 4	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)	2 0 1 4	4696-4703	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1021/bi500497s					

(学会発表) 計(34)件 うち招待講演 計(6)件

発表者名		発表標題	
上久保裕生		BioSAXS論文投稿規定に関して	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第2回タンパク質X線溶液散乱講習会(招待講演)	2014年06月03日	高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所(茨城県つくば市)	

発表者名	発表標題	
上久保裕生	共役した蛋白質分子内プロトン移動反応の実験的検証	
学会等名	発表年月日	発表場所
第47回量子物理化学セミナー兼理数GPセミナー(招待講演)	2014年06月04日	横浜市立大(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題	
上久保裕生	マルチドメイン蛋白質におけるドメイン再配置と結合調整/Domain rearrangement of a multi-domain protein regulates the association and dissociation of its interaction partners	
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18日～2014年06月22日	ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題	
山崎洋一、松本寛史、上久保裕生、片岡幹雄	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18日～2014年06月22日	ワークピア横浜(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題	
上久保裕生	弱い相互作用で関連づけられたタンパク質分子集団の特性と制御	
学会等名	発表年月日	発表場所
東京理科大学総合研究機構「分子連関相乗系研究部門」セミナー(招待講演)	2014年07月26日	東京理科大学(東京都新宿区)

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(機能モジュール)の動的秩序の探査	
学会等名	発表年月日	発表場所
新学術領域研究「動的秩序と機能」班会議	2014年08月04日～2014年08月07日	粟津温泉 おびし荘(石川県小松市)

発表者名	発表標題	
上久保裕生	演習「タンパク質の形を見てみよう」講義「光散乱・小角散乱に関する基礎」X線溶液散乱デモデータの処理	
学会等名	発表年月日	発表場所
「第8回大学生のための素粒子・原子核、物質・生命スクール」サマーチャレンジ2014	2014年08月23日～2014年08月24日	高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市)

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka	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	Seoul (Korea)

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo	Molecular actions of the light sensor protein, Photoactive Yellow Protein, as a prototype for sensor proteins	
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	札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki, Yoshiaki Matsumoto, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka	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	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Kento Yonezawa, Hironari Kamikubo, Keito Yoshida, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	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	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Keito Yoshida, Hironari Kamikubo, Kento Yonezawa, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	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	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Ryuji Okabe, Hironari Kamikubo, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	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	札幌コンベションセンター(北海道札幌市)

発表者名	発表標題	
Hiroko Tanaka, Hironari Kamikubo, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	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, Mariko Yamaguchi, Hironari Kamikubo, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	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, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka	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	
Masayoshi Noji, Mai Arakawa, Hironari Kamikubo, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	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, 上久保裕生, 吉田桂人, 山崎洋一, 片岡幹雄	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, 山口真理子, 上久保裕生, 山崎洋一, 片岡幹雄	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, 上久保裕生, 山崎洋一, 片岡幹雄	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	
上久保裕生	機能性を生み出す複雑系分子システムの動作機構と構築	
学会等名	発表年月日	発表場所
第270回 光ナノサイエンス特別講義	2014年10月01日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市)

発表者名	発表標題	
Y. Yamazaki, Y. Matsumoto, H. Kamikubo, M. Kataoka	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, H. Kamikubo, K. Yoshida, Y. Yamazaki, M. Kataoka	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, H. Kamikubo, K. Yonezawa, Y. Yamazaki, M. Kataoka	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, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka	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	
H. Kamikubo	Molecular actions in the light sensor protein, Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 7th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations (招待講演)	2014年11月26日 ~ 2014年11月28日	Seoul (Korea)

発表者名	発表標題	
上久保裕生	溶液散乱の出版ガイドラインについて	
学会等名	発表年月日	発表場所
分子システム研究における溶液散乱 (招待講演)	2014年12月20日	分子科学研究所(愛知県岡崎市)

発表者名	発表標題	
H. Kamikubo, M.Kataoka	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, H. Kamikubo, K. Yoshida, Y. Yamazaki, M. Kataoka	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, H. Kamikubo, K. Yonezawa, Y. Yamazaki, M. Kataoka	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, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Kataoka	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, Y. Yamazaki, H. Kamikubo, M. Kataoka	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, M. Yamaguchi, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Kataoka	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	
上久保裕生	X線溶液散乱測定用AUTO-SAMPLING装置の開発と応用	
学会等名	発表年月日	発表場所
第3回物構研サイエンスフェスタ	2015年03月17日～2015年03月18日	つくば国際会議場(茨城県つくば市)

〔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

--