

平成 27 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 25 年度～平成 29 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	理事・副学長

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応用した「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、放射光利用専用の微量試料自動サンプリングシステムを新たに作製し、放射光実験施設への導入、及び、実在系への応用を行った。実在系の機能性を生み出す分子集団として、「クラスリン被覆小胞輸送に関わる蛋白質分子集団」、及び、「神経軸索伸長に関わる蛋白質分子集団」を対象として解析を行った。以上の実験を通じ、微量試料自動サンプリングシステムを用いた滴定X線溶液散乱測定が多成分平衡状態中の構造・相互作用評価において有力な測定手法であることが検証できた。

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. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

当該年度は(1)放射光利用専用の微量試料自動サンプリングシステムを新たに作製し、放射光実験施設への導入し、実在系への応用として(2)クラスリン被覆小胞輸送に関わる蛋白質分子集団と(3)光応答性蛋白質分子集団への応用を予定していた。

(1)に関しては、放射光利用に適した流速を実現するために再設計したマイクロ流路を作製し、順調に導入試験を行うことができた。導入試験に引き続き、(2)についてGGA(VHS-GAT) /M6PR /Ub、4成分存在下での構造相互作用解析を試み、複数あると考えられてきたGGAに対するUb結合部位は、マルチドメイン状態では1カ所しか存在せず、この結合はGGAに対してM6PRが作用することに影響を受けないことが明らかとなった。(3)については、当初、光応答性蛋白質分子集団への応用を優先する計画であったが、領域内共同研究で進めている神経軸索伸長に関わる蛋白質分子集団の解析を優先して実施することとした。本研究においても、Shootin1の溶液構造解析を進めると同時に、アクチン繊維とShootin1の結合を仲介すると考えられているCortactinとの相互作用解析を行った。Shootin1とCortactinの結合はShootin1のリン酸化によって制御を受けていると考えられているが、非リン酸化状態でも μ M程度の解離定数を示す結合が生じることが明らかとなった。

(2)(3)について、まだ論文投稿にまで至っていないが、上述の通り、実在系への応用も順調に進み、微量試料自動サンプリングシステムを用いた滴定X線溶液散乱測定が多成分平衡状態中の構造・相互作用評価において有力な測定手法であることが検証でき順調に計画を進めることができている。

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。当該年度は、放射光専用の微量試料自動サンプリングシステムを作製し、導入を進めている。これまでの発表を通じ、放射光利用ユーザーからの反響も大きく、現在、ヒームライン担当者と協議を重ね、X線溶液散乱測定の標準測定法として利用を推進していくことを計画している。

実在系への応用についても、神経軸索伸長に関わる蛋白質分子集団を構成する蛋白質の大量発現系の構築も進み、次年度以降、Shootin1を中心とした集合離散現象の解析をさらに進める。ここでは特に、Shootin1のリン酸化に伴う構造変化を同定し、その上で、相互作用蛋白質群との構造・相互作用解析を行い、生化学的に予測されているリン酸化による相互作用の変調と最終的な複合体構造の同定を進める。クラスリン被覆小胞輸送に関わる蛋白質分子集団については、すでに多成分系での実験を実施しており、論文発表を念頭に再現性の確認とデータ精度の向上を進めていく。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(2)件/うち査読付論文 計(2)件/うち国際共著論文 計(0)件/うちオープンアクセス 計(1)件

著者名		論文標題				
Yusuke Kanematsu, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, Masanori Tachikawa		Vibrational analysis on the revised potential energy curve of the low-barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Computational and Structural Biotechnology Journal	有	14	2015	16-19	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1016/j.csbj.2015.10.003						
オープンアクセス						
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難						

著者名		論文標題				
S. Nagao, M. Ueda, H. Osuka, H. Komori, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Higuchi, S. Hirota		Domain-Swapped Dimer of Pseudomonas aeruginosa Cytochrome c551: Structural Insights into Domain Swapping of Cytochrome c Family Proteins.				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
PLOS ONE	有	10	2015	e0123653	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1371/journal.pone.0123653						
オープンアクセス						
オープンアクセスとしている(また、その予定である)						

(学会発表) 計(21)件/うち招待講演 計(4)件/うち国際学会 計(8)件

発表者名		発表標題	
Hironari Kamikubo		Designing an Artificial Protein by Using a Kind of Building Blocks Responsible for Structure and Function	
学会等名	発表年月日	発表場所	
IMS Asian International Symposium (招待講演)	2015年06月12日	分子科学研究所(愛知県岡崎市)	

発表者名	発表標題	
上久保裕生、岡部龍二、吉田佳人、山崎洋一	滴定溶液散乱測定用自動サンプリングシステムの開発と応用 Development of auto-sampling system designed for titration-SAXS and its applications.	
学会等名	発表年月日	発表場所
第15回日本蛋白質科学会年会	2015年06月24日	あわぎんホール(徳島県徳島市)

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo	Structural characterization of a denaturant denatured state	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月14日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Yoichi Yamazaki, Atsuhiko Kawamura, Mikio Kataoka, Hironari Kamikubo	Analysis of interaction sites on β -scaffold region of Rhodobacter capsulatus Photoactive Yellow Protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月14日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Kento Yonezawa, Hironari Kamikubo, Yusuke Kanematsu, Yoichi Yamazaki, Masanori Tachikawa, 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53回日本生物物理学会年会	2015年09月14日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Keito Yoshida, Kento Yonezawa, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka, Hironari Kamikubo	Effects of chromophores of PYP - Phytochrome Related Protein on the structure	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月15日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Yuji Konno, Takeshi Inagaki, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka	Intramolecular interaction as a determination factor for structure elements of proteins	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月14日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Miho Shinohara, Hironari Kamikubo, Keito Yoshida, Yoichi Yamazaki, Kazuhisa Nakayama, Soichi Wakatsuki, Mikio Kataoka	Interaction/Structure analysis of GGA-Ubiquitin complex by using titration SAXS Measurement	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月15日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Junko Makino, Hironari Kamikubo, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka, Keito Yoshida, Naoyuki Inagaki, Yusuke Kubo, Kentarou Baba	Structural investigation of direct interaction between Shootin1 and cortactin by the titration SAXS measurements	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月13日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
Tomoyuki Yasumuro, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka, Hironari Kamikubo	The role of N-terminal region of PYP binding protein at the formation of complex with Rc-PYP	
学会等名	発表年月日	発表場所
第53回日本生物物理学会年会	2015年09月13日	金沢大学(石川県金沢市)

発表者名	発表標題	
上久保裕生	水-蛋白質界面の電荷状態と蛋白質内部で生じる化学反応	
学会等名	発表年月日	発表場所
第64回高分子討論会(招待講演)	2015年09月16日	東北大学川内キャンパス(宮城県仙台市)

発表者名	発表標題	
上久保裕生	BioSAX論文投稿規定に関して	
学会等名	発表年月日	発表場所
第3回タンパク質X線溶液散乱講習会(招待講演)	2015年11月19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	
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 4rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions(国際学会)	2015年11月22日	西新プラザ(福岡県福岡市)

発表者名	発表標題	
J. Makino, K. Yoshida, Y. Kubo, K. Baba, Y. Yamazaki, N. Inagaki, M. Kataoka, H. Kamikubo	Structural investigation of direct interaction between Shootin1 and cortactin by the titration SAXS measurements	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)	2015年11月22日	西新プラザ(福岡県福岡市)

発表者名	発表標題	
C. Ota, H. Tanaka, T. Aizawa, Y. Yamazaki, M. Kataoka, H. Kamikubo	Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 4rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)	2015年11月22日	西新プラザ(福岡県福岡市)

発表者名	発表標題	
Philip Anfinrud, Friedrich Schotte, Hyun Sun Cho, John Kyndt, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka	Picosecond photobiology: Watching a signaling protein function in real time via 150-picosecond time-resolved X-ray diffraction and solution scattering	
学会等名	発表年月日	発表場所
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (国際学会)	2015年12月15日	Honolulu, USA

発表者名	発表標題	
Hikaru Kuramochi, Satoshi Takeuchi, Kento Yonezawa, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, Tahei Tahara	Femtosecond time-resolved impulsive stimulated Raman study of the primary process of photoactive yellow protein	
学会等名	発表年月日	発表場所
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (国際学会)	2015年12月15日	Honolulu, USA

発表者名	発表標題	
Mikio Kataoka, Hironari Kamikubo	Mechanism of amyloid formation of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (国際学会)	2015年12月18日	Honolulu, USA

発表者名	発表標題	
Hironari Kamikubo, Keito Yoshida, Nobutaka Shimizu, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka	Development of auto-sampling system designed for titration-saxs to investigate protein complexes under an equilibrium condition	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Biophysical Society 60th Annual Meeting (国際学会)	2016年02月28日	Los Angeles, USA

発表者名	発表標題	
Chiaki Ota, Hiroko Tanaka, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka, Hironari Kamikubo	Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Biophysical Society 60th Annual Meeting (国際学会)	2016年03月01日	Los Angeles, USA

発表者名	発表標題	
上久保裕生	蛋白質溶液散乱を用いた多成分平衡状態の構造/相互作用解析の試み	
学会等名	発表年月日	発表場所
PF研究会「徹底討論！小角散乱の魅力～基礎・応用・産業利用」(招待講演)	2016年03月30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)

(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. 科研費を使用して開催した国際研究集会

(国際研究集会) 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16.本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1)国際共同研究: 国際共同研究である

共同研究相手国	相手方研究機関			
Denmark	Aarhus university	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	/	/	/	/

17.備考