

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24247030

研究課題名(和文) イェロープロテインの構造と光反応：一般性と多様性

研究課題名(英文) Structural and Photochemical Reactions of Photoactive Yellow Proteins:
Generality and diversity

研究代表者

片岡 幹雄 (Kataoka, Mikio)

奈良先端科学技術大学院大学・その他・理事・副学長

研究者番号：30150254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では種々のイェロープロテイン(PYP)を用いて、蛋白質が共通の構造基盤や反応機構(一般性)から多様性を生み出す分子機構を解明することを目的とした。中性子結晶構造解析、時間分解結晶構造解析の結果から、PYPの活性中心となる発色団の低障壁水素結合形成が、光反応の共通基盤として存在していること、その際に通常プロトン化しているアルギニン残基が脱プロトン化しているという特異な性質を示すことを見出した。また、この活性中心の周辺のループ部位やヘリックス表面残基の種類、C末端部位の構造変化によって多様な性質が調整されている点を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There are many divergent features even in a structurally homologous proteins. It is not clear how they realize these divergent functions on their same structural backbone. To evaluate these molecular divergent mechanism based on common structure, different PYP proteins have been investigated about their molecular mechanism for their features and functions. From the neutron-X-ray combined crystal analysis and very fast time resolved X-ray crystal analysis, there is a unique low barrier hydrogen bond (LBHB) system as a basic component for PYP features. In this basic system there is a special arginine residue which is deprotonated even in a neutral pH condition. Divergent features on PYP molecules were realized by several residues close or distal site from the LBHB. These residues are located on surface region on PYP molecules.

研究分野：生物物理

キーワード：イェロープロテイン 低障壁水素結合 光反応 結晶構造解析 アルギニン FTIR キメラ蛋白質 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

イエロープロテイン(PYP)は、アミノ酸 125 個からなる小さな水溶性の光受容蛋白質であり、情報伝達蛋白質に共通にみられる PAS ドメインの典型である。PAS ドメインの構造は共通しているが、機能は多様であり、共通の構造基盤から多様性を獲得する機構を研究するためのよい材料である。PAS 構造に、ヘムやフラビンなどの発色団を取り込むことで、光や酸素あるいは電位に応答するようになる。PYP は、光に応答するようになった PAS の一つで、発色団は p-クマル酸である。

PYP は、*H. halophila* から見出され (hPYP)、光走性の光受容体であるとされてきた。多くの PYP 種が欧米の研究者により見出されたが、その吸収スペクトルや光反応には多様性がみられた。hPYP の光反応サイクルの時定数は 0.3 秒であるが、Ppr の PYP ドメイン(PprPYP)の光反応サイクルの時定数は 300 秒、*R. capsulatus* の PYP(RcPYP)では約 30 時間に及ぶ。発色団や機能に重要なアミノ酸残基は全てに保存されているため、いくつかのアミノ酸あるいは領域の変化で広い範囲にわたって反応時間を制御できることを意味する。また、機能についても、走光性の他、カルコン合成 (RcPYP) やバイオフィーム形成 (*I. loihiensis*PYP) の光受容体と、小さな蛋白質にしては驚くべき多様性を示す。機能の多様性は標的蛋白質の多様性、すなわち活性中間体の構造の多様性を示唆する。また、存在形態にも多様性があり、マルチドメイン蛋白質の 1 ドメインとなる PYP は PprPYP を含めて存在する。PYP の光反応のドメイン間伝達機構の解明は、標的蛋白質が未同定の現在、PYP の機能を考える上で、重要な研究課題となる。また、PYP がマルチドメイン蛋白質の 1 ドメインを形成していることは、PYP を融合させることで、機能性蛋白質に光応答性を付与する可能性を期待させる。

我々は hPYP についての総合的な研究成果から、光活性中間体の溶液構造を明らかにし、発色団から蛋白質部分への情報伝達ルートを解明してきた。また、高分解能中性子結晶構造解析により、発色団と E46 の間に低障壁水素結合 (LBHB) が形成されていることを明らかにした。さらに、LBHB から通常の水素結合への緩和という新しい光情報伝達機構を提唱した。LBHB と通常の水素結合の転換により容易にプロトン移動が実現するため、この機構あるいは逆機構が蛋白質内のプロトン移動の一般的な機構と考えている。

2. 研究の目的

本研究では、hPYP に関するこれまでの研究成果を踏まえ、光反応、存在形態の異なる RcPYP、PprPYP を用い、構造、光反応の比較研究を行い、PYP に共通する構造基盤、反応要素を解明するとともに、これら 3 者間の相違を生み出す相互作用を解明する。これらに基づき、構造や反応の共通基盤から多様性が生み出される分子

機構を明らかにする。

3. 研究の方法

PYP の構造、光反応の共通基盤の解明は、hPYP のこれまでの研究をより深化させるとともに、RcPYP、PprPYP の野生型および変異型の構造、光反応の比較研究を通して行う。多様性の発現機構は、三者間のキメラ蛋白質の構造、光反応の詳細な研究を通して明らかにする。構造は、主として CD 及び X 線溶液散乱により、光反応は時間分解分光法によって研究を進め、適宜中性子結晶構造解析、時間分解 X 線回折による研究を行う。RcPYP については、結晶化を試みる。

機能の多様性の解明のために、Ppr 全長蛋白質を精製し、PYP ドメインの光反応が各ドメインに伝搬する機構を研究する。hPYP 及び RcPYP について、標的蛋白質の同定を行う。標的蛋白質が得られたならば、各 PYP との相互作用を構造面から研究する。以上を統合し、共通の構造基盤から機能の多様性を生み出す分子機構を解明する。具体的には以下の点からアプローチした。

(1) hPYP について、これまでの研究で明らかになった LBHB の光反応に関する役割をさらに詳細に解明する。

(2) 3 つの PYP 間でキメラ蛋白質を作製し、その構造と光反応を調べ、光反応やスペクトルに影響を与える領域や部位を明らかにする。アミノ酸配列の相同性は高くないため、キメラの利用が有利である。

(3) PYP の相互作用蛋白質を同定し、PYP との光依存的相互作用について研究する。機能の多様性を理解する上で、重要な課題となる。

(4) 全長の Ppr について、PYP の変化がヒスチジンキナーゼドメインに伝わる分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) PYP の構造、光反応の共通基盤の解明のため、hPYP に見いだされた発色団と E46 の間に形成される LBHB の詳細を理論計算から検討した。その結果、低障壁水素結合は直接的に水素結合を形成していない R52 が脱プロトン化しているときのみ形成される可能性が示された。そこで、R52Q 変異体の解析を行い R52 のプロトン化状態と LBHB の関係を検討した。野生型には発色団周辺に 2 つのプロトン化部位があるが R52Q では一つしか存在しない。吸収スペクトルや光反応では両者に大きな差異はなく生理条件下で R52 が脱プロトン化していることが示唆された。光反応に伴う R52 のプロトン化状態を検討するためにアルギニンと同位体標識した hPYP の精密 FTIR 測定を行い、理論計算と併せて光反応に伴う R52 の振動モード変化を解析した。その結果暗状態において脱プロトン化している R52 は光反応中間体において R52 はプロト

ン化することが実験的に初めて見出された。LBHBの形成機構と光反応における構造転移を制御している機構が形成されていることが明らかになった。

hPYPの光反応に伴う構造変化を100ピコ秒時分割ラウエ構造解析により明らかにした。その結果、光照射後100ピコ秒以内に形成される初期中間体で発色団がトランス型とシス型の中間の捻じれた遷移状態のような構造を形成していることが明らかになった。タンパク質中における発色団のこのような状態は初めて見出された例である。このとき、LBHBを形成している発色団とE46の水素結合距離の変化が明らかになり、光反応の非常に初期でLBHBが解消していることが示された。

(2)光反応サイクルに大きな多様性をもつhPYPとRcPYPのキメラタンパク質解析から、PYPにおける多様性を生む領域を抽出した。hPYPが光反応中に大きな構造変化を示すのに対して、RcPYPは顕著な構造変化を示さないが、キメラタンパク質解析の結果このような多様性がPYPの活性部位であるLBHBから離れた表面残基である2つのリシン残基に起因することが示された。表面電荷による長距離相互作用の効果であると考える。また、PprPYPまで含めたキメラ解析では光反応サイクルの寿命を制御している領域がN末端に存在していること、RcPYPの特異な2峰性の吸収スペクトルの原因となる残基がタンパク質表面のループ構造近傍に位置していることなどが示された。世界で初めて成功したRcPYPの結晶構造解析の結果からは、ループ構造部位がhPYPのものに比べて伸展した構造を示し、この部位に多様性を生む構造的要因があると考えられた。LBHBを中心とした共通基盤に対して遠位効果によって性質を調整していることが考えられる。

(3)RcPYPの相互作用タンパク質との結合時に誘起される構造変化部位の解析をキメラタンパク質解析から推定されたC末端領域において行った。その結果、C末端ストランドに位置するシステイン残基が相互作用時に特異的に局所構造変化を示すことをFTIRの測定から明らかにした。この解析はシステインプローブを用いたタンパク質分子の局所構造変化の解析としても新しい。

(4)全長Pprにおいては、PYPドメインに存在する発色団とBphドメインに存在する発色団の2つの発色団が光反応をする複雑な光反応サイクルを示す。この全長Pprに対して、各発色団のみを持つPprを調整し、その光反応の解析を行った。その結果、PYPドメインの光反応状態がBphドメインの光反応を制御している機構が示唆された。これは、両ドメインを結ぶPYPドメインのC末端領域の効果であることが考えられ、(2)(3)に示した多様な性質を制御している領域と相同な部位であるといえる。

これらのことから、活性中心を基盤としたPYPがそれを囲む残基の効果によって多様性を形成していることが示された。

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19件)

1. Y. Yoshimura, N. A. Oktaviani, K. Yonezawa, H. Kamikubo, F. A. A. Mulder, Unambiguous Determination of the Ionization State of a Photoactive Protein Active Site Arginine in Solution by NMR Spectroscopy, *Angewandte Chemie*, 査読有, 56巻, 2016年, 239-242, 10.1002/anie.201609605
2. L. Zhang, H. Kondo, H. Kamikubo, M. Kataoka, W. Sakamoto, VIPP1 has a disordered C-terminal tail necessary for protecting photosynthetic membranes against stress in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 査読有, 171巻, 2016年, 1983-1995, 10.1104/pp.16.00532,
3. Y. Kanematsu, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Tachikawa, Vibrational analysis on the revised potential energy curve of the low-barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 査読有, 14巻 2015年, 16-19, 10.1016/j.csbj.2015.10.003
4. 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., *PLoS One*, 査読有, 10巻, 2015年, e0123653, 10.1371/journal.pone.0123653
5. 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, *Phys. Rev. E*, 査読有, 90巻, 2014年, 22723, 10.1103/PhysRevE.90.022723
6. Y. Kobayashi, H. Tsutsumi, T. Abe, K. Ikeda, Y. Tashiro, S. Unzai, H. Kamikubo, M. Kataoka, H. Hiroaki, D. Hamada, Decreased amyloidogenicity by mutational modulation of surface properties of the immunoglobulin light chain BRE variable domain, *Biochemistry*, 査読有, 53巻, 2014年, 5162-5173, 10.1021/bi5007892

- 7 . M. Deshpande, P. Parui, H. Kamikubo, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, M. Kataoka, Y. Higuchi, S. Hirota, Formation of Domain-Swapped Oligomer of Cytochrome c from Its Molten Globule State Oligomer, *Biochemistry* 査読有、53 巻、2014 年、4696-4703、10.1021/bi500497s
- 8 . 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*, 査読有、896 巻、2014 年、85-88、10.4028/www.scientific.net/AMR.896.85
- 9 . M. Hamaguchi, H. Kamikubo, K. N. Suzuki, Y. Hagihara, I. Yanagihara, I. Sakata, M. Kataoka, D. Hamada, Structural Basis of β -Catenin Recognition by EspB from Enterohaemorrhagic E. coli Based on Hybrid Strategy Using Low-Resolution Structural and Protein Dissection PLoS One, 査読有、8 巻、2013 年、e71618、10.1371/journal.pone.0071618
- 10 . N. Inoue, D. Hamada, H. Kamikubo, K. Hirata, M. Kataoka, M. Yamamoto, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Hagihara, Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion, *Development*, 査読有、140 巻、2013 年、3221-3229、10.1242/dev.094854
- 11 . J. Yuasa, T. Ohno, H. Tsumatori, R. Shiba, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Hasegawa, T. Kawai, Fingerprint signatures of lanthanide circularly polarized luminescence from proteins covalently labeled by a β -diketonate europium(III) chelate, *Chem. Comm.*, 査読有、49 巻、2013 年、4604-4606、10.1039/C3CC40331A
- 12 . J. Uewaki, H. Kamikubo, J. Kurita, N. Hiroguchi, H. Moriuchi, M. Yoshida, M. Kataoka, N. Utsunomiya-Tate, S. Tate, Preferential domain orientation of HMGB2 determined by weak intramolecular interactions mediated by the interdomain linker, *Chem. Phys.*, 査読有、419 巻、2013 年、212-223、10.1016/j.chemphys.2013.02.004
- 13 . Y. Kita, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Tachikawa, Theoretical analysis of the geometrical isotope effect on the hydrogen bonds in photoactive yellow protein with multi-component density functional theory, *Chem. Phys.*, 査読有、419 巻、2013 年、50-53、10.1016/j.chemphys.2012.11.022
- 14 . T. J. Pool, N. A. Oktaviani, H. Kamikubo, M. Kataoka, F. A. A. Mulder, ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of photoactive yellow protein, *Biomol. NMR Assign.* 査読有、7 巻、2013 年、97-100、10.1007/s12104-012-9387-9
- 15 . 上久保裕生, 片岡幹雄, 働いているタンパク質の構造を実時間で見た！ - 次世代構造生物科学への期待, *化学*, 68 巻、2013 年、74-75、www.kagakudojin.co.jp
- 16 . F. Schotte, H. S. Cho, V. R. I. Kaila, H. Kamikubo, N. Dashdorj, E. R. Henry, T. J. Graber, R. Henning, M. Wulff, G. Hummer, M. Kataoka, P. A. Anfinrud, Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有、109 巻、2012 年、19256-19261、10.1073/pnas.1210938109
- 17 . 片岡幹雄, 中性子生物物理学の展開、日本中性子科学会誌「波紋」査読無、22 巻、2012 年 132 - 138、www.jsns.net/jp
- 〔学会発表〕(計 115 件)
- 1 . C. Ota, H. Tanaka, Y. Yamazaki, M. Kataoka, H. Kamikubo, Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin, The Biophysical Society 60th Annual Meeting, Los Angeles, California, USA, 2016 年 2 月 27-3 月 2 日
- 2 . H. Kamikubo, K. Yoshida, N. Shimizu, Y. Yamazaki, M. Kataoka, Development of auto-sampling system designed for titration-saxs to investigate protein complexes under an equilibrium condition, The Biophysical Society 60th Annual Meeting, Los Angeles, California, USA, 2016 年 2 月 27-3 月 2 日
- 3 . M. Kataoka, H. Kamikubo, Mechanism of amyloid formation of human calcitonin, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15-20 日
- 4 . H. Kuramochi, S. Takeuchi, K. Yonezawa, H. Kamikubo, M. Kataoka, T. Tahara Femtosecond time-resolved impulsive stimulated Raman study of the primary process of photoactive yellow

protein, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15-20 日

5 . P. Anfinrud, F. Schotte, H. Sun Cho, J. Kyndt, H. Kamikubo, M. Kataoka, Picosecond photobiology: Watching a signaling protein function in real time via 150-picosecond time-resolved X-ray diffraction and solution scattering, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Honolulu, Hawaii, USA, 2015 年 12 月 15-20 日

6 . H. Kamikubo, M. Kataoka, Exploring regulatory association and dissociation processes of biological molecules constituting a functional module, The 3rd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions, 合歓の郷(三重県志摩市), 2015 年 1 月 10-11 日

7 . M. Kataoka, Structure and photoreaction of photoactive yellow protein, OUS Physics and Chemistry joint colloquim, Oklahoma, USA 2014 年 11 月 4-6 日、招待講演

8 . M. Kataoka, Structure and photoreaction of photoactive yellow protein, 16th International Conference on Retinal Proteins, 長浜ロイヤルホテル(滋賀県長浜市), 2014 年 10 月 5-10 日、招待講演

9 . H. Kamikubo, M. Kataoka, The potential uses of structure and function elements, The 14th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul, Korea, 2014 年 9 月 17-20 日、招待講演

10 . M. Kataoka, Protein Dynamics and Structure Studied by Neutron Scattering, The 2nd International Symposium on Science, J-PARC(茨城県那珂郡東海村), 2014 年 7 月 12 - 15 日、招待講演

11 . M. Kataoka, FRET analysis of denatured staphylococcal nuclease, 8th IUPAP International Conference on Biological Physics Beijing, China, 2014 年 6 月 18 - 22 日、招待講演

12 . D. Novitasari, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, M. Kataoka, Excited-state proton transfer in fluorescent Photoactive Yellow Protein containing 7-hydroxycoumarin, International Conference on Advanced Materials

Science and Technology 2013, Yogyakarta, Indonesia, 2013 年 9 月 17 日-18 日

13 . M. Kataoka, The mechanism of induced folding of Staphylococcal nuclease, Telluride Science Research Center Workshop on Protein Dynamics 2013, Telluride, USA, 2013 年 8 月 5-9 日、招待講演

14 . M. Kataoka, Is tertiary structure required for a specific function?, The 8th Asian Biophysics Association Symposium, Jeju, Korea, 2013 年 5 月 26-29 日

15 . M. Kataoka, Is tertiary structure really required for specific function of a protein?, American Physical Society (APS) March Meeting 2013, Baltimore, USA, 2013 年 3 月 18-22 日、招待講演

16 . M. Kataoka, Is the protein tertiary structure necessary for a specific function?, International Symposium on Protein Folding and its Biological Significance, 分子科学研究所(愛知県岡崎市), 2013 年 3 月 4-6 日、招待講演

17 . M. Kataoka, Structure and photoreaction of photoactive yellow protein, The 4th Japan-France Joint Symposium "Imaging of spatiotemporal hierarchies in living cells - An overview of dynamics from molecules to cells-" Kyoto, Spring8(兵庫県佐用町), 2013 年 1 月 7-11 日、招待講演

18 . M. Kataoka, Structure, dynamics and function of staphylococcal nuclease, The 6th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions, 京都テルサ(京都府京都市), 2012 年 12 月 5-6 日、招待講演

19 . M. Kataoka, Protein dynamics and hydration water, The 10th International Conference on Quasielastic Neutron Scattering (QENS 2012), 日光総合会館(茨城県日光市), 2012 年 9 月 30 日-10 月 4 日、招待講演

[図書] (計 4 件)

1 . 片岡幹雄, 朝倉書店、光と生命の事典 中性子散乱、2016 年、354-355

2 . F. Schotte, H.-S. Cho, H. Kamikubo, M. Kataoka, P. A. Anfinrud, Springer Tokyo, Chapter 3 Watching a Signaling Protein Function in Real Time via Picosecond Time-resolved Laue Crystallography in

Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions、2016年、65-85

3. M. Kataoka, Springer Tokyo, Dynamics, and Function of Staphylococcal Nuclease in Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions、2016年、151-161

4. 片岡幹雄、化学同人、ひかりエネルギー革命 - グリーンフォトニクス、2012年、121〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 幹雄 (Kataoka, Mikio)
奈良先端科学技術大学院大学・その他・理事・副学長
研究者番号：30150254

(2) 研究分担者

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

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()