

様式 C - 7 - 1

平成28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）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究代表者	部局	物質創成科学研究科		
	職	教授		
	氏名	上久保 裕生		

1. 研究種目名 新学術領域研究（研究領域提案型） 2. 課題番号 25102003

3. 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

4. 研究期間 平成25年度～平成29年度 5. 領域番号・区分 2501 計画研究

## 6. 研究実績の概要

本申請研究では、多成分からなる蛋白質分子複合系の構造及び相互作用評価が可能な計測・解析方法構築を目的として研究を進めている。形状によって分子種の区別が可能なX線溶液散乱法を用い、構成成分の比率を無数に変化させた溶液からのX線散乱曲線を収集し、多変量解析による再構成技術によって本計測・解析手法の実現を目指している。その実現に向け、平成25年度から27年度にかけ、要素技術の一つであるμ流路型自動サンプリングシステムの開発を進め、研究室系X線発生装置、並びに、放射光での試験を行ってきた。前者については平成25から26年の期間内に、期待していた性能を示すμ流路デバイスの開発に成功し、後者については平成27年度に実在する多成分混合系（GGA蛋白質及びUb系）をモデル系とした実証試験を行い良好な結果が得られた。

本年度（平成27年度）は、反応過程で多種多様な複合体（オリゴマー）が形成されることが推測されていた光情報伝達系（PYP/PBP系）を研究対象として、光強度に依存したオリゴマー形成過程の構造・相互作用解析を行うと同時に、成分が増えた際の本計測・解析技術の適用可能性について検討した。その結果、オリゴマー形成のように、類似した散乱曲線を示す対象では、単独での成分分離が困難であることがわかった。しかしながら、Native-MSのように定量性には劣るものの、原理的に質量によって対象を区別することが可能な測定手法と相互利用することによって、10成分を上回る反応であっても反応モデルの構築とその後の解析が可能であることが示された。さらに、この結果を基に、PYP/PBP系においては、PYPそれ自身は光に対してOn/Offの応答しかできない分子であるにもかかわらず、システム全体としては、光強度に応じたオリゴマー種の変動によって、環境光強度に依存した生理応答を実現している可能性が示唆された。

## 7. キーワード

蛋白質 動的秩序 X線溶液散乱 マルチドメイン蛋白質

## 8. 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  
申請者らのグループでは、紅色光合成細菌由来の水溶性光センサー蛋白質（PYP）について精力的に研究を行ってきた。長年、その相互作用蛋白質は同定されていなかったが、本研究期間内に、光を吸収し活性型になったPYPに特異的に結合する蛋白質（PBP）の同定に成功した。予備的実験から、活性型PYPとPBPの存在比率に応じて、異なるサイズの多種多様な複合体が形成されることが示唆された。しかしながら、混合比に応じて数多くの種類の複合体が存在するために、適当な測定手法がなく実際の反応機構や複合体の構造は未同定のままであった。

そこで本年度は、これまでに開発してきたμ流路型自動サンプリングシステムを用い活性型PYPとPYPの比率を逐次変化させ、その都度、X線溶液散乱測定を行うことで反応機構の同定を試みた（連続滴定X線溶液散乱測定）。期待した通り、得られた冗長に測定した散乱曲線に対して多変量解析を適用することによって、成分比に依存して独立に存在量が変化する散乱曲線を分離することに成功した。その一方で、類似した散乱曲線を示す成分を分離することが困難であったため、反応モデルの構築に問題が残った。本学術領域内の内山らのグループの協力を得て、Native-MS測定を行うことで、系中に存在するすべての成分を同定することができた。Native-MSと連続滴定X線溶液散乱測定の結果を相補的に解釈することによって、オリゴマーの形成反応モデルを得るに至り、反応モデルとX線散乱曲線が多変量解析の結果から、主要なオリゴマーの構造と反応を規定する解離定数を解析することができた。以上の研究の過程で、連続滴定X線溶液散乱測定で得られたデータの基本的な解析方法の構築にめどが立ち、さらに、他の計測手法を相互利用することによって複雑な分子複合系に対しても適用可能であることを示すことができた。

2 版

## 9. 今後の研究の推進方策

本年度は、存在比率に応じて多種多様な複合体が形成される光情報伝達系に $\mu$ 流路型自動サンプリングシステムを用いた連続測定X線溶液散乱測定を適用した。この研究を通じ、一連の測定手順を標準化することができた。さらに、そのデータ解析の過程で適用限界を評価することができた。本対象のように、オリゴマー形成に伴って分子が伸長していくような反応である場合、散乱強度変化の縮退が生じ、X線散乱曲線のみからすべての成分種を同定することが困難となる。しかしながら、この問題も、Native-MS等の超分子を非破壊的に分析することが可能な測定手法と組み合わせることで対応可能であることが示せた。本申請研究の目的の一つに、放射光施設での常時運用を掲げている。今年度の実験を通じ一定のめどが立った。この装置を使って実験をしてきた博士後期課程学生が博士研究員として高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設に勤務することになっており、今後さらに連携を深めていく。

## 10. 研究発表（平成28年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著論文 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang Lingang, Kondo Hideki, Kamikubo Hironari, Kataoka Mikio, Sakamoto Wataru	4. 巻 171
2. 論文標題 VIPP1 Has a Disordered C-Terminal Tail Necessary for Protecting Photosynthetic Membranes against Stress	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 1983 ~ 1995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1104/pp.16.00532	査読の有無 有
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）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimura Yuichi, Oktaviani Nur Alia, Yonezawa Kento, Kamikubo Hironari, Mulder Frans A. A.	4. 巻 56
2. 論文標題 Unambiguous Determination of Protein Arginine Ionization States in Solution by NMR Spectroscopy	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 239 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201609605	査読の有無 有
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）	国際共著 該当する
1. 著者名 Endow Joshua K., Rocha Agostinho Gomes, Baldwin Amy J., Roston Rebecca L., Yamaguchi Toshio, Kamikubo Hironari, Inoue Kentaro	4. 巻 11
2. 論文標題 Polyglycine Acts as a Rejection Signal for Protein Transport at the Chloroplast Envelope	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0167802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0167802	査読の有無 有
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）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuramochi Hikaru, Takeuchi Satoshi, Yonezawa Kento, Kamikubo Hironari, Kataoka Mikio, Tahara Tahei	4. 巻 9
2. 論文標題 Probing the early stages of photoreception in photoactive yellow protein with ultrafast time-domain Raman spectroscopy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 660 ~ 666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nchem.2717	査読の有無 有
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)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 3件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 上久保 裕生
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成28年度新学術領域研究「動的秩序と機能」全体班会議
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 上久保 裕生
2. 発表標題 システムズバイオロジーを指向した構造生物学的手法の開発
3. 学会等名 平成28年度第1回生物構造学研究会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Dynamical characterization of a denaturant denatured state by using the lifetime measurement of Trp-triplet state
3. 学会等名 The 9th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2016年

2 版

1. 発表者名 Yoichi Yamazaki, Yohei Shibata, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Rhodobacter capsulatus PYP の複合体形成に伴う構造変化 Complex induced structural changes of Rhodobacter capsulatus Photoactive Yellow Protein
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yohei Shibata, Yoichi Yamazaki, Keito Yoshida, Shoki Nakata, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Rc-PYP の光依存的に形成する複数種の複合体解析 Analysis of light dependent multiple complex formation of Rc-PYP
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Chiaki Ota, Hiroko Tanaka, Tomoyasu Aizawa, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 キメラカルシトニンによるヒトカルシトニンアミロイド凝集阻害機構の解明 Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin by chimera calcitonin
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yugo Hayashi, Miho Shinohara, Keito Yoshida, Yoichi Yamazaki, Kazuhisa Nakayama, Soichi Wakatsuki, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 滴定X線溶液散乱測定を用いたアダプター蛋白質GGA-ユビキチン相互作用の解析 An analysis of the interaction of GGA with ubiquitin by using titration SAXS measurement
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shoki Nakata, Keito Yoshida, Kentarou Baba, Yohei Shibata, Yoichi Yamazaki, Naoyuki Inagaki, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 X線小角散乱法を用いた神経軸索伸長系関連蛋白質shootin1の動的な構造変化の解析 Structural alteration of shootin1 upon phosphorylation revealed by using small angle x-ray scattering
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yohei Shibata, Yoichi Yamazaki, Keito Yoshida, Shoki Nakata, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Exploring regulatory association and dissociation processes of biological molecules constituting a functional module
3. 学会等名 The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shoki Nakata, Yugo Hayashi, Kentarou Baba, Keito Yoshida, Yohei Shibata, Yoichi Yamazaki, Naoyuki Inagaki, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Structural change of shootin1 upon phosphorylation revealed by using small angle x-ray scattering
3. 学会等名 The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Chiaki Ota, Yasumichi Yakase, Kentaro Ishii, Tomoyasu Aizawa, Yoichi Yamazaki, Mikio Kataoka, Susumu Uchiyama, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Analysis of amyloid formation and inhibition mechanisms of human calcitonin by chimera calcitonin
3. 学会等名 The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions (国際学会)
4. 発表年 2016年

2 版

1. 発表者名 Endo Natsumi, Yugo Hayashi, Miho Shinohara, Keito Yoshida, Yoichi Yamazaki, Hironari Kamikubo
2. 発表標題 An analysis of the interaction of gga with ubiquitin by using titration saxs measurement
3. 学会等名 The 5th International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hironari Kamikubo
2. 発表標題 Structural Exploring Multi-component Equilibrium in Biological Systems by using Continuous Titration SAXS
3. 学会等名 第78回岡崎コンファレンス Grand Challenges in Small-angle Scattering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

1 1. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件 (うち出願0件 / うち取得0件)

1 2. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

1 3. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
USA	UC Davis	-	-	-
Denmark	Aarhus University	-	-	-
The Netherlands.	University of Groningen	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

1 4. 備考

-