

平成21年度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 特別研究員奨励費 4. 研究期間 平成20年度～平成21年度
5. 課題番号 2 0 9 5 8 6

6. 研究課題名 中性子と高分解能X線結晶構造解析によるタンパク質の水素原子を介した相互作用の解明

7. 研究代表者

| 研究者番号 | 研究代表者名 | 所属部局名 | 職名 |
|-------|------------------------|-----------|---------------|
| | フリガナ ヤマグチ シゲオ 山口 繁生 | 物質創成科学研究科 | 特別研究員 (PD) |

8. 研究分担者(所属研究機関名については、研究代表者の所属研究機関と異なる場合のみ記入すること。)

| 研究者番号 | 研究分担者名 | 所属研究機関名・部局名 | 職名 |
|-------|--------|-------------|----|
| | フリガナ | | |
| | フリガナ | | |
| | フリガナ | | |
| | フリガナ | | |
| | フリガナ | | |

9. 研究実績の概要

下欄には、当該年度に実施した研究の成果について、その具体的内容、意義、重要性等を、交付申請書に記載した「研究の目的」、「研究実施計画」に照らし、600字～800字で、できるだけ分かりやすく記述すること。また、国立情報学研究所でデータベース化するため、図、グラフ等は記載しないこと。

本研究では光受容タンパク質Photoactive Yellow Protein (PYP) をモデルタンパク質として、中性子結晶構造をもとに機能発現機構における水素原子の役割を明らかにすることを目的としている。昨年度の研究においては、野生型PYPの発色団(pCA)-E46間に形成された低障壁水素結合を観測し、タンパク質における低障壁水素結合の形成を初めて実証した(Yamaguchi S. et al. 2009, PNAS)。本年度の研究では、低障壁水素結合形成部位、及びその周辺に変異を加えたE46Q, Y42F変異体の中性子回折実験用結晶の調製、及び中性子結晶構造解析を行った。

E46Q: PYPの結晶化に関する相図をもとに結晶化条件のスクリーニングを行い、最適な結晶化条件を得た。その結果5.1x1.2x0.7mm³の結晶が得られ、この結晶を用いて日本原子力研究開発機構において中性子回折実験を行った。露光時間4時間で221枚の回折パターンを測定した。このデータセットは分解能1.5 Åで処理することができた。中性子回折実験後、同じ結晶を用いてPFにおいて室温のX線回折実験を行い、分解能1.30 Åのデータセットを得た。得られた中性子/X線両方のデータを併用して構造解析を行った結果、分解能1.5 Å、信頼度因子R/Rfree=19.6%/21.8%で水素原子を含む立体構造を構築した。

Y42F: これまでの研究よりY42F変異体では、吸収極大波長が446nmから458nmまで長波長シフトした上、380nmにショルダーが観測されることがわかっている。このことから、Y42FにおいてはpCA-E46間の低障壁水素結合に、何らかの変化が生じていると考えられる。しかし、これまでに報告されているY42F変異体の結晶化条件では、結晶化剤の影響により458nmのみのシングルピークになってしまい、その結晶構造は野生型PYP様の構造になることが知られている。そこで本研究では新たにY42F変異体が380nmのショルダーを保ったまま結晶化できる結晶化条件のスクリーニング、及びその条件の最適化を行った。その結果、中性子結晶構造解析が可能だと考えられる大きさ3.1x0.7x0.7mm³の結晶が得られた。来年度、この結晶を用いて中性子回折実験を行う予定である。

10. キーワード

- (1) 低障壁水素結合 (2) タンパク質中性子結晶構造解析 (3) タンパク質X線結晶構造解析
 (4) Photoactive Yellow Protein (5) 光生物 (6)
 (7) (8) (裏面に続く)

11. 研究発表（平成21年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（ 1 ）件 うち査読付論文 計（ 0 ）件

| | | | | |
|-----------------|--|----|------|---------|
| 著者名 | 論文標題 | | | |
| 上久保裕生、山口繁生、片岡幹雄 | 中性子回折の基礎と応用(応用11) フォトアクティブイエロープロテインの中性子結晶構造解析 | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 |
| RADIOISOTOPES | 無 | 59 | 2010 | 289-297 |

| | | | | |
|-----|-------|---|-----|---------|
| 著者名 | 論文標題 | | | |
| | | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 |
| | | | | |

| | | | | |
|-----|-------|---|-----|---------|
| 著者名 | 論文標題 | | | |
| | | | | |
| 雑誌名 | 査読の有無 | 巻 | 発行年 | 最初と最後の頁 |
| | | | | |

〔学会発表〕 計（ 2 ）件 うち招待講演 計（ 1 ）件

| | | | |
|--------------------|---|------|--|
| 発表者名 | 発表標題 | | |
| 山口繁生 | Low-barrier hydrogen bond in Photoactive Yellow Protein | | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 | |
| 日本生物物理学会 第47回年会 | 2009.10.30 | 徳島 | |

| | | | |
|--------------------|---|------|--|
| 発表者名 | 発表標題 | | |
| 山口繁生 | Low-barrier hydrogen bond in Photoactive Yellow Protein | | |
| 学会等名 | 発表年月日 | 発表場所 | |
| 日本生物物理学会 第47回年会 | 2009.10.31 | 徳島 | |

〔図書〕 計（ 0 ）件

| | | | |
|-----|-----|-----|-------|
| 著者名 | 出版社 | | |
| | | | |
| | 書名 | 発行年 | 総ページ数 |
| | | | |

12. 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 |
| | | | | | |

13. 備考

※ 研究者又は所属研究機関が作成した研究内容又は研究成果に関するwebページがある場合は、URLを記載すること。

| |
|--|
| |
|--|