

様 式 Z - 7

平成 2 7 年度科学研究費助成事業 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 基盤研究(B) (一般) 4. 研究期間 平成 2 6 年度 ~ 平成 2 8 年度
5. 課題番号

2	6	2	8	8	0	8	0
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 ドメインスワッピングを利用したタンパク質の超分子化技術の開発と機能化

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
9 0 2 8 3 4 5 7	ヒロタ シユン	物質創成科学研究科	教授
	廣田 俊		

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

9. 研究実績の概要

研究代表者らはこれまでに、好熱性水素細菌由来シトクロム (cyt) c552がエタノール添加、凍結乾燥、再溶解の操作により多量体を形成し、2量体はドメインスワッピングしていることを報告したが、3量体以上の高次多量体の形成量はウマcyt cに比べて少なかった。本研究では、cyt c552の高次多量体形成量が少ない原因が、cyt c552のヒンジループが短く、プロトマー間で立体障害が生じるためと推測し、ヒンジループ中のAla18とLys19の間にグリシン残基3つを挿入することによりヒンジループを伸長させた変異体 (insG3変異体) を作製した。insG3変異体に対して野生型と同様のエタノール処理を行ったところ、高次多量体の形成量が増大した。さらに、insG3変異体には2種類の2量体が存在し、主成分の2量体ではN末端領域、副成分の2量体ではC末端領域がそれぞれプロトマー間でドメインスワッピングしていることを明らかにした。表面の疎水性を減らしたinsG3/W57K変異体を用いて多量体を作製し、透過型電子顕微鏡で観測したところ、直径7-10 nmの環状構造の像が得られた。Cyt c552を大腸菌内で発現させたところ、ドメインスワッピングによりN末端領域のヘリックスを交換した2量体が得られ、生体内でもドメインスワッピングが起こることが示された。また、野生型cyt c552と安定性を低下させた4種類の変異型cyt c552について大腸菌内で形成される多量体量を比較したところ、タンパク質の安定性が低下するほど高次多量体の形成量が減少することが明らかとなった。また、4ヘリックスバンドル構造を有するcyt cb562がドメインスワッピングにより2量体を形成することも明らかにした。

10. キーワード

- (1) 蛋白質 (2) 超分子 (3) 生体分子 (4) ナノバイオ
- (5) 多量体 (6) 立体構造 (7) ドメインスワッピング (8)

(注) ・印刷に当たっては、A 4 判 (縦長) ・両面印刷すること。

(1 / 9)

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)

Cyt c552のドメインスワッピングには、N末端領域を交換する場合とC末端領域を交換する場合の2種類が存在することを明らかにし、大腸菌内でcyt c552がドメインスワッピングすることも示した。さらに、cyt cb562がドメインスワッピングにより2量体を形成することを明らかにした。これらの研究成果をそれぞれ学術論文に報告した。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

昨年度に引き続き、他のタンパク質の多量体形成や細胞内でのドメインスワッピング、シトクロムcとリポソームとの相互作用について調べる。最後に、本研究により得られた結果を総括する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

大容量インキュベータ装置の故障により、試料の作製が遅れた。

(使用計画)

大容量インキュベータ装置の購入費の一部に使用する。

13. 研究発表(平成27年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(3)件/うち査読付論文 計(3)件/うち国際共著論文 計(0)件/うちオープンアクセス 計(2)件

著者名		論文標題				
Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota		Domain-swapped Cytochrome cb562 Dimer and Its Nanocage Encapsulating a Zn-SO ₄ Cluster in the Internal Cavity				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Chemical Science	有	6	2015	7336-7342	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1039/C5SC02428E						
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)						

著者名		論文標題				
Chunguang Ren, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota		Oligomerization Enhancement and Two Domain Swapping Mode Detection for Thermostable Cytochrome c552 via the Elongation of the Major Hinge Loop				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Molecular BioSystems	有	11	2015	3218-3221	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1039/C5MB00545K						
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				
Yugo Hayashi, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Hirofumi Komori, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota		Domain Swapping Oligomerization of Thermostable c-Type Cytochrome in E. coli Cells				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Scientific Reports	有	6	2016	19334	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)						
10.1038/srep19334						
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)						

(課題番号: 26288080)

(注)・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

〔学会発表〕 計(18)件/うち招待講演 計(4)件/うち国際学会 計(6)件

発表者名		発表標題	
宮本昂明、栗林麻衣、長尾聡、庄村康人、樋口芳樹、廣田俊		ドメインスワップしたシトクロムcb562の構造と性質	
学会等名		発表年月日	発表場所
第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム		2015年05月30日 ~ 2015年05月31日	長崎大学(長崎県長崎市)

発表者名		発表標題	
長尾聡、山中優、Ying-Wu Lin、Megha Subhash Deshpande、小森博文、庄村康人、樋口芳樹、廣田俊		ドメインスワッピングを利用したシトクロムcおよびミオグロビンの多量体形成	
学会等名		発表年月日	発表場所
第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム		2015年05月30日 ~ 2015年05月31日	長崎大学(長崎県長崎市)

発表者名		発表標題	
Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi		Domain Swapping of c-Type Cytochromes and Myoglobin	
学会等名		発表年月日	発表場所
"Metals in Biology" in Wako(国際学会)		2015年06月16日 ~ 2015年06月17日	Riken Wako Campus (Wako, Saitama)

発表者名		発表標題	
Shun Hirota		Cytochrome c and Myoglobin Oligomers Formed by Domain Swapping	
学会等名		発表年月日	発表場所
International Symposium on Metal Complexes (ISMEC2015)(招待講演)(国際学会)		2015年06月24日 ~ 2015年06月27日	Hotel Plaza (Wroclaw, Poland)

発表者名	発表標題	
山中優、長尾聡、小森博文、樋口芳樹、廣田俊	Change in Structure and Ligand Binding Properties of Cytochrome c555 from Hyperthermophile by Domain Swapping	
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 ~ 2015年06月26日	あわぎんホール(徳島県徳島市)

発表者名	発表標題	
小林紀、長尾聡、廣田俊	NMRによるシトクロムcとカルジオリピンの相互作用解析	
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 ~ 2015年06月26日	あわぎんホール(徳島県徳島市)

発表者名	発表標題	
Shun Hirota	Construction of Dimeric Heme Proteins by Domain Swapping	
学会等名	発表年月日	発表場所
17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC17) (招待講演) (国際学会)	2015年07月20日 ~ 2015年07月24日	China National Convention Center (Beijing, China)

発表者名	発表標題	
Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota	Formation of Cytochrome cb562 Oligomers by Domain Swapping	
学会等名	発表年月日	発表場所
29th Annual Symposium of The Protein Society(国際学会)	2015年07月24日 ~ 2015年07月26日	Palau de Congressos de Barcelona (Barcelona, Spain)

発表者名	発表標題	
Ken-ichi Yuyama, Mariko Ueda, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Teruki Suigiya, Hiroshi Masuhara	Spatio-Temporal Formation of Amyloid Aggregates by Laser Trapping of Domain-swapped Dimeric Cytochrome c	
学会等名	発表年月日	発表場所
Optical Trapping and Optical Micromanipulation XII, SPIE NanoScience + Engineering Conference (国際学会)	2015年08月09日 ~ 2015年08月13日	San Diego Convention Center (San Diego, USA)

発表者名	発表標題	
廣田俊	ドメインスワッピングとは？：タンパク質の超分子化	
学会等名	発表年月日	発表場所
第28回生物無機化学夏季セミナー(招待講演)	2015年08月28日 ~ 2015年08月30日	山喜旅館(静岡県伊東市)

発表者名	発表標題	
長尾聡, Ying-Wu Lin, Mohan Zhang, 庄村康人, 樋口芳樹, 廣田俊	ドメインスワップ構造に基づくミオグロビン二量体のデザイン	
学会等名	発表年月日	発表場所
第9回バイオ関連化学シンポジウム	2015年09月10日 ~ 2015年09月12日	熊本大学(熊本県熊本市)

発表者名	発表標題	
小林紀, 長尾聡, 廣田俊	シトクロムcとカルジオリピン含有脂質膜の相互作用解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第9回バイオ関連化学シンポジウム	2015年09月10日 ~ 2015年09月12日	熊本大学(熊本県熊本市)

発表者名	発表標題	
林有吾、山中優、長尾聡、小森博文、樋口芳樹、廣田俊	好熱菌シトクロムc552のドメインスワップ多量体形成	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本生物高分子学会2015年度大会	2015年09月19日 ~ 2015年09月20日	香川大学(香川県高松市)

発表者名	発表標題	
Shun Hirota	Construction of Heme Protein Oligomers by Domain Swapping	
学会等名	発表年月日	発表場所
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015)(招待講演)(国際学会)	2015年12月15日 ~ 2015年12月20日	Hilton Hawaiian Village (Honolulu, USA)

発表者名	発表標題	
Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, Shun Hirota	Characterization of the Interaction of Cytochrome c with Cardiolipin-incorporated Lipid Bicelle	
学会等名	発表年月日	発表場所
96th Spring Conference of the Chemical Society of Japan	2016年03月24日 ~ 2016年03月27日	Doshisha University (Kyotanabe, Kyoto)

発表者名	発表標題	
Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota	Domain-swapped Cytochrome cb562 Dimer and Its Nanocage Encapsulating a Zn-SO ₄ Cluster in the Internal Cavity	
学会等名	発表年月日	発表場所
96th Spring Conference of the Chemical Society of Japan	2016年03月24日 ~ 2016年03月27日	Doshisha University (Kyotanabe, Kyoto)

発表者名	発表標題	
須田綾香、小林紀、長尾聡、廣田俊	ドメインスワップ構造に基づいた安定なミオグロビン二量体のデザイン	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本化学会第96春季年会	2016年03月24日 ~ 2016年03月27日	同志社大学(京都府京田辺市)

発表者名	発表標題	
山中優、星住誠人、廣田俊	Construction of Cytochrome c' Tetramer and Its Size Control by CO Binding	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本化学会第96春季年会	2016年03月24日 ~ 2016年03月27日	同志社大学(京都府京田辺市)

〔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: -

17. 備考

--