

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288080

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文) Development of supramolecular construction techniques of proteins and their functionalization using domain swapping

研究代表者

廣田 俊 (HIROTA, Shun)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90283457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウマcyt cを高タンパク質濃度で酸性モルテングロビュール状態から中性状態へフォールディングさせるとドメインスワップした多量体が形成すること、cyt cのヘム軸配位子であるMet80は2量体の安定性にはほとんど影響を与えないことを明らかにした。好熱菌cyt c552では、ヒンジループ変異体に2種類の2量体が存在すること、大腸菌高発現系でもドメインスワッピングが起こることが示された。ドメインスワップした2量体1つと単量体2つから構成される紅色硫黄細菌cyt cの4量体を構築した。ドメインスワッピングを利用して異なる2つのヘム活性部位を有する人工ミオグロビン2量体の構築にも成功した。

研究成果の概要(英文)：A certain amount of molten globule state oligomers of horse cyt c converted to domain-swapped oligomers by folding from the acid molten globule state to neutral pH state under high protein concentrations. Domain-swapped dimer stability of horse cyt c was less affected by the Met80 coordination to the heme. Two domain-swapped structures of thermostable cyt c552 were detected for its hinge loop mutant. Domain swapping was shown to also occur for thermostable cyt c552 when expressed in *E. coli* cells. A tetramer of cyt c was constructed with one domain-swapped dimer and two monomers. An artificial myoglobin heterodimer with two different heme active sites was constructed based on domain swapping.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：タンパク質 生体分子 ナノバイオ 超分子化学 多量体 立体構造 ドメインスワッピング

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質を自在に集積することができれば新しい分子技術に繋がるため、その普遍的な手法の開発が研究されている。金属配位や2つのタンパク質を連結させた融合タンパク質などを利用したタンパク質多量体の構築が報告されているが、報告数は依然少ない。一方、ドメインスワッピングによるタンパク質の構造変化は注目を集めている。ドメインスワッピングは同一タンパク質分子間で同じ構造領域を交換する現象である。近年、ドメインスワッピングするタンパク質の報告が増加しており、セリンプロテアーゼ阻害タンパク質や透析アミロイドーシスを引き起こす $\beta 2$ マイクログロブリンなどがドメインスワッピングした2量体の構造も報告されている。また、研究代表者らは2010年にドメインスワッピングによるシトクロム(cyt)cのポリマー化機構を明らかにした。

### 2. 研究の目的

研究代表者はcyt cなどのヘムタンパク質を対象に、タンパク質分子を構成する $\alpha$ ヘリックスを“のりしろ”として捉える新しい概念で、ドメインスワッピングによりタンパク質超分子(多量体)を創製するとともに、タンパク質多量体のサイズや形状の制御を試みている。ドメインスワッピングにより作製したタンパク質多量体の機能化も行い、細胞への影響を調べている。本研究では、ドメインスワッピングによるタンパク質多量体技術の確立と多量体の機能化を目指した。

### 3. 研究の方法

ウマcyt c、好熱菌cyt  $c_{552}$ 、cyt  $cb_{562}$ 、紅色硫黄細菌cyt c' (AVCP)、ウマミオグロビン(Mb)などの $\alpha$ ヘリックスに富むヘムタンパク質を扱った。cyt c、cyt  $c_{552}$ 、Mbの変異体も利用した。エタノールまたは酢酸を用いて、タンパク質多量体を作製し、各多量体をクロマトグラフィーにより精製した。円偏光二色性スペクトル、共鳴ラマン分光法、X線小角散乱法、X線結晶構造解析などを用いて、ドメインスワッピングにより得られた2量体の活性部位構造と立体構造を特定し、電気化学測定により酸化還元電位を求めた。Mb変異体を用いて、異なる2つの活性部位を有する人工タンパク質2量体も作製した。

### 4. 研究成果

(1) 高イオン濃度下、ウマcyt cを高タンパク質濃度で酸性モルテングロビュール状態から中性状態へフォールディングさせると、多量体が形成することを見出した。得られた2量体は、C末端 $\alpha$ ヘリックスをプロトマー間で交換し、これまでに報告した2量体と同じドメインスワッピングした構造を有することが分かった。125 mM  $\text{ClO}_4^-$ を含む酸性溶液中のcyt cモルテングロビュール状態では、cyt c分子の約25%がお互いに相互作用し、凝集し

ていることがX線小角散乱測定により示唆された。一方、cyt cを125 mM  $\text{ClO}_4^-$ を含む酸性モルテングロビュール状態から中性状態へフォールディングさせると、cyt c分子の約11%がドメインスワッピングした2量体として得られた。これらの結果は、cyt cのモルテングロビュール状態での凝集体が一定の割合でドメインスワッピングした多量体に折れ畳まることを示しており、ドメインスワッピングした多量体を形成するための相互作用はモルテングロビュール状態で既に存在することが示唆された。

(2) ウマcyt cのドメインスワッピングした2量体および3量体では、Met80がヘム鉄から解離する。そこで、cyt cのドメインスワッピングにおけるMet80のヘム鉄配位の役割を調べるため、Met80をアラニンに置換したヒトM80A cyt cを作製した。M80A cyt cの単量体および2量体は野生型cyt cの単量体および2量体と類似した2次構造を有することがCDスペクトルから示唆された。M80A cyt c 2量体の示差走査熱量曲線には、野生型cyt c 2量体と同様、単量体への解離に由来する負のピークが観測された。M80A cyt c 2量体の解離温度は61で野生型cyt c 2量体と同じ温度であったが、エンタルピー変化は-14 kcal/molであり、野生型cyt c 2量体の値(-30 kcal/mol)に比べて絶対値が小さかった。この結果より、野生型cyt cでは、2量体の解離後Met80はヘム鉄に配位し、単量体が安定化することが推測された。2量体の解離速度のアイリングプロットから2量体の解離に伴う活性化エンタルピー変化を求めたところ、野生型とM80A cyt cでそれぞれ120 $\pm$ 10と110 $\pm$ 10 kcal/molと同程度であり、Met80が2量体の安定性へ及ぼす影響は小さいことが示唆された。以上の結果より、cyt cのヘム軸配位子であるMet80は単量体の安定性に寄与するが、2量体の安定性にはほとんど影響を与えないことが判明した。

(3) 好熱菌cyt  $c_{552}$ の高次多量体形成量が少ない原因が、cyt  $c_{552}$ 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cyt  $c_{552}$ 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。

(4) 好熱菌 *cyt c<sub>552</sub>* 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  $\alpha$  ヘリックスを交換した 2 量体を得られ、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 c<sub>552</sub>* と安定性を低下させた 4 種類の変異体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判明した。

(5) AVCP のドメインスワップした 2 量体を作製し、ドメインスワップした 2 量体 1 つと単量体 2 つから構成される AVCP 4 量体の立体構造を明らかにした。ドメインスワップした 2 量体では、ヘリックス A とヘリックス B を含む構造領域をプロトマー間で交換していた。

(6) ウマ Mb の単量体とドメインスワップした 2 量体で活性部位構造が類似していても、ドメインスワッピングに伴うタンパク質構造の変化により一酸化炭素の結合特性が異なることが判明した。さらに、Mb 2 量体のプロトマー間の表面電荷を制御した 2 種類の変異体を利用することにより、異なる 2 つのヘム活性部位を有する人工 Mb 2 量体を構築することに成功した。

以上の結果は、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に役立つ。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. S. Hirota, M. Yamashiro, Z. Wang, and S. Nagao, Effect of methionine80 heme coordination on domain swapping of cytochrome *c*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 査読有, in press, DOI: 10.1007/s00775-017-1446-3.
2. K. Yuyama, M. Ueda, S. Nagao, S. Hirota, T. Sugiyama, and H. Masuhara, A single spherical assembly of protein amyloid fibrils formed by laser trapping, *Angew. Chem. Int. Ed. (Hot Paper)*, 査読有, 56, 2017, pp. 6739-6743, DOI: 10.1002/anie.201702352.
3. S. Yanagisawa, M. S. Deshpande, S. Hirota, T. Nakagawa, and T. Ogura, Improved stopped-flow time-resolved resonance Raman spectroscopy device for studying enzymatic reactions, *J. Raman Spectrosc.*, 査読有, 48, 2017, pp. 680-685, DOI: 10.1002/jrs.5100.
4. M. Yamanaka, M. Hoshizumi, S. Nagao, R. Nakayama, N. Shibata, Y. Higuchi, and S. Hirota, Formation and carbon monoxide-dependent dissociation of *Allochromatium vinosum* cytochrome *c'* oligomers using domain-swapped dimers, *Protein Sci.*, 査読有, 26, 2017, pp. 464-474, DOI: 10.1002/pro.3090.
5. H. Kobayashi, S. Nagao, and S. Hirota, Characterization of cytochrome *c* membrane-binding site using cardiolipin-containing bicelles with NMR, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 55, 2016, pp. 14019-14022, DOI: 10.1002/anie.201607419.
6. Y. Hayashi, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, Y. Higuchi, and S. Hirota, Domain swapping oligomerization of thermostable *c*-type cytochrome in *E. coli* cells, *Sci. Rep.*, 査読有, 6, 2016, p. 19334 (8 pages), DOI: 10.1038/srep19334.
7. C. Ren, S. Nagao, M. Yamanaka, H. Komori, Y. Shomura, Y. Higuchi, and S. Hirota, Oligomerization enhancement and two domain swapping mode detection for thermostable cytochrome *c<sub>552</sub>* via the elongation of the major hinge loop, *Mol. BioSyst.*, 査読有, 11, 2015, pp. 3218-3221, DOI: 10.1039/C5MB00545K.
8. T. Miyamoto, M. Kuribayashi, S. Nagao, Y. Shomura, Y. Higuchi, and S. Hirota, Domain-swapped cytochrome *cb<sub>562</sub>* dimer and its nanocage encapsulating a Zn-SO<sub>4</sub> cluster in the internal cavity, *Chem. Sci.*, 査読有, 6, 2015, pp. 7336-7342, DOI: 10.1039/C5SC02428E.
9. S. Nagao, M. Ueda, H. Osuka, H. Komori, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Higuchi, and S. Hirota, Domain-swapped dimer of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c<sub>551</sub>*: structural insights into domain swapping of cytochrome *c* family proteins, *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, p. e0123653 (16 pages), DOI: 10.1371/journal.pone.0123653.
10. S. Nagao, H. Ishikawa, T. Yamada, Y. Mizutani, and S. Hirota, Carbon monoxide binding properties of domain-swapped dimeric myoglobin, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 査読有, 20, 2015, pp. 523-530, DOI: 10.1007/s00775-014-1236-0.
11. M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, Y. Higuchi, and S. Hirota, Change in structure and ligand binding properties of hyperstable cytochrome *c<sub>555</sub>* from *Aquifex aeolicus* by domain swapping, *Protein Sci.*, 査読有, 24, 2015, pp. 366-375, DOI: 10.1002/pro.2627.
12. Y.-W. Lin, S. Nagao, M. Zhang, Y. Shomura, Y. Higuchi, and S. Hirota, Rational design of heterodimeric protein using domain swapping for myoglobin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 54, 2015, pp. 511-515, DOI: 10.1002/anie.201409267.
13. H. Tai, K. Nishikawa, M. Suzuki, Y. Higuchi, S. Hirota, Control of the transition between Ni-C and Ni-SI<sub>2</sub> states by the redox state of the proximal Fe-S cluster in the catalytic cycle of [NiFe] hydrogenase, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 53, 2014, pp. 13817-13820, DOI: 10.1002/anie.201408552.
14. M. S. Deshpande, S. Junedi, H. Prakash, S. Nagao, M. Yamanaka, and S. Hirota, DNA cleavage by oxymyoglobin and cysteine-introduced metmyoglobin, *Chem. Commun.*, 査読有, 50, 2014, pp. 15034-15036, DOI: 10.1039/C4CC06617K.
15. Z. Wang, Y. Ando, A. D. Nugraheni, C. Ren, S. Nagao, and S. Hirota, Self-oxidation of

cytochrome *c* at methionine80 with molecular oxygen induced by cleavage of the Met-heme iron bond, *Mol. BioSyst.*, 査読有, 10, 2014, pp. 3130-3137, DOI: 10.1039/c4mb00285g.

16. M. S. Deshpande, P. P. Parui, H. Kamikubo, M. Yamanaka, S. Nagao, H. Komori, M. Kataoka, Y. Higuchi, and S. Hirota, Formation of domain-swapped oligomer of cytochrome *c* from its molten globule state oligomer, *Biochemistry*, 査読有, 53, 2014, pp. 4696-4703, DOI: 10.1021/bi500497s.

[学会発表](計 53 件)

1. Akiya Oda, Ikki Ueda, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Construction of a triangle-shaped structure with a unit protein based on cytochrome *c*<sub>555</sub>, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
2. Takaaki Miyamoto, Shun Hirota, Protein nanostructures constructed by fusing two oligomerization domains with a 3-helix bundle linker, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
3. Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Characterization of the cytochrome *c* membrane-binding site using solution NMR, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
4. Masaru Yamanaka, Ryoko Nakayama, Satoshi Nagao, Makoto Hoshizumi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Formation of cytochrome *c* oligomers using domain-swapped dimers and carbon monoxide-dependent control of oligomer association/dissociation, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
5. Hongxu Yang, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Effect of rare codons on *Hydrogenobacter thermophiles* cyt *c*<sub>552</sub> oligomerization in *E. coli* cells, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
6. Chieh-Ju Chang, Yugo Hayashi, Shun Hirota, Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Hirotashi Masuhara, Laser trapping dynamics of amyloid fibril formation of cytochrome *c* monomer and dimers, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
7. 久保田真史、宮本昂明、廣田俊、*Rhodopseudomonas palustris* 由来シトクロム *c*'の多量化、日本化学会第97春季年会、2017年3月16-19日、慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
8. Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Design of domain-swapped myoglobin dimer, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16-19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
9. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi, Cytochrome *c*: domain swapping, self-modification, and molecular recognition, 5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (keynote lecture), 2017年1月7-11日, Kolkata (India)
10. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi, Construction of heme protein supramolecules by domain swapping, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (keynote lecture), 2016年12月4-9日, Auckland (New Zealand)
11. Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Formation of myoglobin dimers by domain swapping, 第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25-27日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
12. Miyuki Sakaguchi, Masaru Yamanaka, Shun Hirota, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara, Analysis of environment dependent dynamics of cytochrome *c* on a lipid membrane by 2D fluorescence lifetime correlation spectroscopy, 第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25-27日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
13. Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Solution NMR characterization of the interaction between cyt *c* and cardiolipin-incorporated bicelles, 第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25-27日、つくば国際会議場(茨城県つくば市)
14. Shun Hirota, Structure and function of heme protein oligomers constructed by domain swapping, Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium (invited lecture), 2016年9月29-30日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
15. Shun Hirota, Application of supramolecular science for drug design, The Symposium of Annual Scientific Meeting 2016 of Indonesian Pharmacist Association (invited lecture), 2016年9月27-29日, Jogjakarta (Indonesia)
16. 坂口美幸、山中優、廣田俊、石井邦彦、田原太平、二次元蛍光寿命相関分光法によるウマシトクロム *c* のフォールディング機構の研究、第10回分子科学討論会、2016年9月13-15日、神戸ファッションマート(兵庫県神戸市)
17. 須田綾香、小林紀、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊、ミオグロビンのループ領域アミノ酸変異によるドメインスワップ二量体のデザイン、第10回バイオ関連化学シンポジウム、2016年9月7-9日、石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場(石川県金沢市)
18. 松本順文、REN Chunguang、山中優、長尾聡、廣田俊、過酸との反応によるシト

- クロム *c* の Met80 の酸化修飾、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 7-9 日、石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場（石川県金沢市）
19. Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Characterization of the interaction between cytochrome *c* and cardiolipin-incorporated by solution NMR, 30th Anniversary Symposium of the Protein Society, 2016 年 7 月 16-19 日, Baltimore (USA)
  20. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Construction of Zn-SO<sub>4</sub> cluster-encapsulating protein nanocage by domain swapping, 30th Anniversary Symposium of the Protein Society, 2016 年 7 月 16-19 日, Baltimore (USA)
  21. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Partha Pratim Parui, Megha Subhash Deshpande, Chunguang Ren, Yugo Hayashi, Takaaki Miyamoto, Yin-Wu Lin, Yoshiki Higuchi, Domain swapping in *c*-type cytochromes and myoglobin, 30th Anniversary Symposium of the Protein Society, 2016 年 7 月 16-19 日, Baltimore (USA)
  22. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Yugo Hayashi, Takaaki Miyamoto, Chunguang Ren, Masaru Yamanaka, Ying-Wu Lin, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Domain swapping of *c*-type cytochromes and myoglobin, Ninth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (invited lecture), 2016 年 7 月 3-8 日, Nanjing (China)
  23. 小林紀、長尾聡、廣田俊、溶液 NMR によるシトクロム *c* とカルジオリピン含有バイセルの相互作用解析、第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2016 年 6 月 17-18 日、北海道大学（北海道札幌市）
  24. 宮本昂明、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 *cb*<sub>562</sub> 二量体が形成する Zn-SO<sub>4</sub> クラスター内包タンパク質ナノケージの結晶構造、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年 6 月 7-9 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）
  25. Masaru Yamanaka, Makoto Hoshizumi, Shun Hirota, Construction of cytochrome *c*' tetramer and its size control by CO binding, 日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学（京都府京田辺市）
  26. 林有吾、山中優、長尾聡、小森博文、樋口芳樹、廣田俊、発現系における *c* 型シトクロムのドメインスワッピング、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学（京都府京田辺市）
  27. 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、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学（京都府京田辺市）
  28. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Domain-swapped cytochrome *cb*<sub>562</sub> dimer and its nanocage encapsulating a Zn-SO<sub>4</sub> cluster in the internal cavity, 96th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学（京都府京田辺市）
  29. Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Characterization of the interaction of cytochrome *c* with cardiolipin-incorporated lipid bicelle, 96th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2016 年 3 月 24-27 日、同志社大学（京都府京田辺市）
  30. Shun Hirota, Construction of heme protein oligomers by domain swapping, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (invited lecture), 2015 年 12 月 15-20 日, Honolulu (USA)
  31. 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 *C*<sub>552</sub> のドメインスワップ多量体形成、日本生物高分子学会 2015 年度大会、2015 年 9 月 10-12 日、香川大学（香川県高松市）
  32. 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、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9 月 10-12 日、熊本大学（熊本県熊本市）
  33. 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、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年 9 月 10-12 日、熊本大学（熊本県熊本市）
  34. Ken-ichi Yuyama, Mariko Ueda, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Teruki Suigiyama, Hiroshi Masuhara, Spatio-temporal formation of amyloid aggregates by laser trapping of domain-swapped dimeric cytochrome *c*, Optical Trapping and Optical Micromanipulation XII, SPIE NanoScience + Engineering Conference, 2015 年 8 月 9-13 日, San Diego (USA)
  35. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Formation of cytochrome *cb*<sub>562</sub> oligomers by domain swapping, 29th Annual Symposium of The Protein Society, 2015 年 7 月 22-25 日, Barcelona (Spain)
  36. Shun Hirota, Construction of dimeric heme proteins by domain swapping, 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (invited lecture), 2015 年 7 月 20-24 日, Beijing (China)
  37. 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、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 24-26 日、あわぎんホール（徳島県徳島市）
  38. 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 *c*<sub>555</sub> from hyperthermophile by domain swapping, 第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 24-26 日、あわぎんホール（徳島県徳島市）
  39. Shun Hirota, Cytochrome *c* and myoglobin oligomers formed by domain swapping, International Symposium on Metal

- Complexes (keynote lecture), 2015 年 6 月 24-27 日, Wrocław (Poland)
40. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Domain swapping of c-type cytochromes and myoglobin, "Metals in Biology" in Wako, 2015 年 6 月 16-17 日, Riken Wako Campus, Wako (Saitama, Japan)
  41. 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, 第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2015 年 5 月 30-31 日, 長崎大学 (長崎県長崎市)
  42. 宮本昂明, 栗林麻衣, 長尾聡, 庄村康人, 樋口芳樹, 廣田俊, ドメインスワッピングしたシトクロム  $cb_{562}$  の構造と性質, 第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2015 年 5 月 30-31 日, 長崎大学 (長崎県長崎市)
  43. Chunguang Ren, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Construction of high-order domain-swapped oligomers of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome  $c_{552}$  by hinge loop mutation, 95th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2015 年 3 月 26-29 日, 日本大学 (千葉県船橋市)
  44. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Crystal structure and function of a domain-swapped cytochrome  $cb_{562}$  dimer, 95th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2015 年 3 月 26-29 日, 日本大学 (千葉県船橋市)
  45. Satoshi Nagao, Ying-Wu Lin, Haruto Ishikawa, Takuya Yamada, Mohan Zhang, Yasuhito Shomura, Yasuhisa Mizutani, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Design and properties of domain-swapped dimeric myoglobin, 95th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2015 年 3 月 26-29 日, 日本大学 (千葉県船橋市)
  46. 中西司, 山中優, 廣田俊, 緑膿菌由来シトクロム  $c_{551}$  と好熱性水素細菌由来シトクロム  $c_{552}$  のキメラタンパク質を用いたヘテロダイマーの構築, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 26-29 日, 日本大学 (千葉県船橋市)
  47. Yugo Hayashi, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Hirofumi Komori, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Formation of domain-swapped oligomer of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome  $c_{552}$  in an expression system, 95th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2015 年 3 月 26-29 日, 日本大学 (千葉県船橋市)
  48. 廣田俊, ヘムタンパク質の多量化: タンパク質変性と機能化 (2), 分子研研究会「生物無機化学の最先端と今後の展望: 金属と生体分子の相互作用機序解明とモデル化および応用への展開」, 2015 年 1 月 6-7 日, 岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
  49. Shun Hirota, Design and construction of protein supramolecules for anticancer agent and DDS, Medan International Conference on Advanced Pharmaceutical Sciences (invited lecture), 2014 年 11 月 2-3 日, Medan (Indonesia)
  50. 林有吾, 中山璃子, 長尾聡, 山中優, 小森博文, 樋口芳樹, 廣田俊, 生理的条件下でのシトクロム c 多量体形成, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 2014 年 9 月 11-13 日, 岡山大学 (岡山県岡山市)
  51. 宮本昂明, 栗林麻衣, 長尾聡, 庄村康人, 樋口芳樹, 廣田俊, シトクロム  $cb_{562}$  の多量化と二量体構造, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 2014 年 9 月 11-13 日, 岡山大学 (岡山県岡山市)
  52. 廣田俊, ドメインスワッピングによるヘムタンパク質の会合, 第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (招待講演), 2014 年 6 月 14-15 日, 京都薬科大学 (京都府京都市)
  53. 廣田俊, ドメインスワッピングを利用したヘムタンパク質の超分子化, 第 41 回生体分子科学討論会 (招待講演), 2014 年 6 月 6-7 日, 九州大学 (福岡県福岡市)
- 〔図書〕(計 4 件)
1. 廣田俊, 長尾聡, 山中優, 日本分析化学会, タンパク質ドメインスワッピングの構造・機構解析, ぶんせき, 印刷中
  2. 廣田俊, 三共出版, 錯体化学会フロンティア選書「フロンティア生物無機化学(伊東忍, 青野重利, 林高史編著, 第 2 章  $O_2$  の運搬・貯蔵・活性化, 2-1 運搬・貯蔵, 2016, pp. 34-51
  3. 山中優, 廣田俊, 日本農芸化学会, ドメインスワッピング機構によるタンパク質超分子化, 化学と生物 5月号, 54, 2016, pp. 315-317
  4. 廣田俊, 日本生物物理学会, シトクロム c のモルテングロビュール状態と会合体形成, 生物物理, 55, 2015, pp. 87-88
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
廣田 俊 (HIROTA, Shun)  
 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授  
 研究者番号: 9 0 2 8 3 4 5 7
- (2)連携研究者  
樋口 芳樹 (HIGUCHI, Yoshiki)  
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
 研究者番号: 9 0 1 8 3 5 7 4
- 長尾 聡 (NAGAO, Satoshi)  
 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: 3 0 4 5 2 5 3 5
- 山中 優 (YAMANAKA, Masaru)  
 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: 6 0 6 3 2 8 2 5