

様式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成29年度）

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	助教		
	氏名	長尾 聡		

1. 研究種目名 若手研究(B) 2. 課題番号 16K17935

3. 研究課題名 機能部位連携を志向したタンパク質多量体の構造制御法開発

4. 補助事業期間 平成28年度～平成30年度

5. 研究実績の概要

生体内の様々な形状・サイズのタンパク質多量体はボトムアップ型のプロセスで作られ、協同的な基質分子結合、金属原子の貯蔵、回転・並進運動などの機能を有している。このようなユニークな機能の人工再現には、タンパク質を決まった様式で会わせるナノレベルの構造制御が必要となるが、その知識基盤は十分に確立していない。本研究では、多量体の人工構築法を発展させるため、タンパク質の部分構造が分子間で交換するドメインスワッピングにより、同一分子間または異種分子間において形成させた二量体と、それをビルディングブロックとした四量体を構築し、多量体構築原理の理解と機能部位連携する多量体構築を目指す。

平成29年度は、ミオグロビンのヒンジ領域のアミノ酸を系統的に別のアミノ酸に置換し、ドメインスワップ二量体形成に重要なアミノ酸を特定した。また、特定した重要なアミノ酸を二次構造形成能が異なる様々なアミノ酸に変異させ、ヘリックス形成能がドメインスワップ二量体形成能と強く相関することを明らかにした。ドメインスワップ二量体形成能が高い変異型ミオグロビンは、エタノール処理により多量化させると、二量体の他に四量体、六量体と思われる多量体が安定に形成することが示唆された。このような大きな多量体は天然のミオグロビンでは非常に不安定であった。以上の結果より、ヒンジ領域のアミノ酸の二次構造形成能をコントロールすることで大きな多量体を安定に作製可能であり、四量体やさらに大きな構造体の構築が可能であることが示された。

6. キーワード

ヘムタンパク質 ミオグロビン タンパク質工学 生体超分子

7. 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
研究実施計画では、平成29年度は二量体をビルディングブロックとした四量体構築に取り組む予定であった。アプローチの仕方は変更したが、予定通りに目標とした安定な四量体の作製に成功し、さらに大きな多量体の形成も示唆されているため、おおむね順調に進展していると判断した。平成29年度に得られた結果は、タンパク質の多量体形成において新規な知見であるため、学術論文として報告する。現在、不足分のデータを収集し、論文を執筆中である。

2 版

8. 今後の研究の推進方策

平成29年度は予定通りに研究が進展したため、平成30年度は研究実施計画に記した通り、ヘテロな四量体構築および機能部位間の連携を狙ったタンパク質デザインと機能評価を行う。具体的には、ヒンジ領域に二次構造形成能の高いアミノ酸を導入した変異体をベースとして、二量体分子間のヘリックス-ヘリックス界面に疎水性相互作用が生まれるような変異導入を加えプロトマー間のコンタクトを強くし、各プロトマーの機能性部位に生じる構造変化がプロトマー間で伝わるようなデザインをミオグロビンに施す。X線結晶構造解析による構造決定と機能評価をプロトマー界面のデザインにフィードバックし、ミオグロビン多量体の連携機能の向上を目指す。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

(理由)当初、微量分光光度計を購入予定であったため予算計上していたが、研究実施場所において購入予定であった微量分光光度計と同等の性能を有する機械を利用できることになったため、購入を中止した。しかし、次年度以降の研究期間に購入する必要があるため、次年度に予算を利用することとした。
(使用計画)現在利用している微量分光光度計が利用不可能となった場合、微量分光光度計を購入するために使用し、利用不可能とならなかった場合は消耗品および旅費として使用する。

10. 研究発表(平成29年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小林紀、長尾聡、廣田俊
2. 発表標題 負電荷脂質二分子膜との相互作用によって生じる部分変性したシトクロムcの溶液NMR解析
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾聡、小林紀、廣田俊
2. 発表標題 NMR characterization of cytochrome c membrane-binding site using cardiolipin-containing bicelle
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山中優、中山諒子、長尾聡、星住誠人、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 CO-Dependent Control of Oligomer Association/Dissociation Using Domain-Swapped Dimers of Cytochrome c
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長尾聡、小林紀、廣田俊
2. 発表標題 リン脂質バイセルを用いた膜結合シトクロムcの動的挙動に関する溶液NMR解析
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小田祥也、上田一凱、山中優、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 Construction of a Nanostructure with a Designed Protein Based on Cytochrome c555
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山中優、中山諒子、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 シトクロムc ドメインスワップ2量体を用いたCO依存的な多量体形成・解離
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2017年度合同大阪大会
4. 発表年 2017年

2 版

1. 発表者名 Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 Construction of Heme Protein Oligomers be 3D Domain Swapping
3. 学会等名 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Nagao, Hisashi Kobayashi, Shun Hirota
2. 発表標題 NMR characterization of cytochrome c membrane-binding site using cardiolipin-containing bicelles
3. 学会等名 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hongxu Yang, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Shun Hirota
2. 発表標題 Effect of Rare Codon Positions on Hydrogenobacter thermophiles cyt c552 Oligomerization in E. coli Cells
3. 学会等名 98th Chemical Society of Japan Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiya Oda, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Ikki Ueda, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of a supramolecule with an artificial protein based on cytochrome c555
3. 学会等名 98th Chemical Society of Japan Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Nagao, Suda Ayaka, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Design and properties of domain-swapped myoglobin dimer
3. 学会等名 98th Chemical Society of Japan Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林紀、長尾聡、廣田俊
2. 発表標題 脂質二分子膜への結合によるシトクロムc部分変性に関する溶液NMR解析
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018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

-

1 4. 備考

-