

様式 C - 7 - 1

平成 29 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	廣田 俊		

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 16H00839

3. 研究課題名 柔らかなループ部位の構造変化を利用した機能性タンパク質多量体の創成

4. 研究期間 平成 28 年度～平成 29 年度 5. 領域番号・区分 2503 公募研究

6. 研究実績の概要

3Dドメインスワッピングはタンパク質分子間で同一構造領域を交換する現象である。本研究では、様々なヘムタンパク質を対象に、ループ部位に着目してドメインスワッピングについて調査する。本年度は、好熱菌シトクロムc552と緑膿菌シトクロムc551間でN末端領域を交換した2種類のキメラタンパク質のドメインスワッピングを利用し、Met/His配位の活性部位を2つ有するヘテロ2量体タンパク質を作製した。さらに、片方のキメラタンパク質の活性部位構造を変異させることにより、Met/His配位とHis/H20配位の異なる活性部位を有するヘテロ2量体タンパク質を作製した。異なる活性部位を有するヘテロ2量体タンパク質のHis/H20部位への酸素分子の結合は共鳴ラマンスペクトルにより確認した。還元型ヘテロ2量体タンパク質を酸素分子と反応させると、Fe-O2伸縮振動（Fe-O2）に由来する振動バンドが580 cm⁻¹に観測され、1802結合型で Fe-O2は 554 cm⁻¹に低波数シフトした。これらの結果より、ドメインスワッピングが異なる活性部位を有する多ヘムタンパク質の構築に有用であることが示された。さらに、ドメインスワッピングしたシトクロムc 2量体をレーザートラッピング法により溶液中で局所的に集め、球状のアミロイド線維凝集体を作製することに成功した。アミロイド線維の形成はチオフラビンTによる蛍光および電子顕微鏡像により確認した。作製したアミロイド線維凝集体を直線および3次元に配列することにも成功した。また、シトクロムcの多量体形成メカニズムの解明を目指して、分子動力学シミュレーションと液体の積分方程式理論を用いて単量体と二量体の熱力学安定性の解析を行った。

7. キーワード

タンパク質 超分子 多量体 生体分子 バイオナノ ヘム ドメインスワッピング

8. 現在までの進捗状況

区分	
理由	29年度が最終年度であるため、記入しない。

2 版

9. 今後の研究の推進方策

29年度が最終年度であるため、記入しない。

10. 研究発表（平成29年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著論文 3件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ken-ichi Yuyama, Mariko Ueda, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara	4. 巻 56
2. 論文標題 A Single Spherical Assembly of Protein Amyloid Fibrils Formed by Laser Trapping	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angew. Chem. Int. Ed. (Hot Paper)	6. 最初と最後の頁 6739-6743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.201702352	査読の有無 有
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	国際共著 該当する
1. 著者名 Shun Hirota, Nobuhiro Yamashiro, Zonghua Wang, Satoshi Nagao	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Methionine80 Heme Coordination on Domain Swapping of Cytochrome c	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biol. Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 705-712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00775-017-1446-3	査読の有無 有
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	国際共著 該当する
1. 著者名 Mohan Zhang, Tukasa Nakanishi, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Sachiko Yanagisawa, Yasuhito Shomura, Naoki Shibata, Takashi Ogura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota	4. 巻 18
2. 論文標題 Rational Design of Domain-Swapping-Based c-Type Cytochrome Heterodimers by Using Chimeric Proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1712-1715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201700219	査読の有無 有
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	国際共著 -

1. 著者名 Norio Yoshida, Masahiro Higashi, Hideyoshi Motoki, Shun Hirota	4. 巻 148
2. 論文標題 Theoretical Analysis of the Domain-Swapped Dimerization of Cytochrome c: An MD and 3D-RISM Approach	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 25102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5009785	査読の有無 有
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	国際共著 -

1. 著者名 Ari Dwi Nugranehi, Chunguang Ren, Yorifumi Matsumoto, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Shun Hirota	4. 巻 182
2. 論文標題 Oxidative Modification of Methionine80 in Cytochrome c by Reaction with Peroxides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Inorg. Biochem.	6. 最初と最後の頁 200-207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2018.02.017	査読の有無 有
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	国際共著 -

1. 著者名 Akiya Oda, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Ikki Ueda, Hiroki Watanabe, Takayuki Uchihashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota	4. 巻 13
2. 論文標題 Construction of a Triangle-Shaped Trimer and a Tetrahedron Using an α -Helix-Inserted Circular Permutant of Cytochrome c555	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Asian J. (front cover)	6. 最初と最後の頁 964-967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201800252	査読の有無 有
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	国際共著 -

1. 著者名 Shun Hirota, Ying-Wu Lin	4. 巻 23
2. 論文標題 Design of Artificial Metalloproteins/Metalloenzymes by Tuning Noncovalent Interactions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biol. Inorg. Chem.	6. 最初と最後の頁 7-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00775-017-1506-8	査読の有無 有
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	国際共著 該当する

2版

1. 著者名 廣田俊、長尾聡、山中優	4. 巻 2017
2. 論文標題 タンパク質ドメインスワッピングの構造・機構解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 464-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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	国際共著 -

1. 著者名 根木秀佳、吉田紀生、廣田俊、東雅大	4. 巻 17
2. 論文標題 シトクロム cの多量体形成に関する理論的研究 の多量体形成に関する理論的研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Comput. Chem. Jpn.	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2477/jccj.2018-0006	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25件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 根木秀佳、吉田紀生、廣田俊、東雅大
2. 発表標題 シトクロムcの多量体形成に関する理論的研究
3. 学会等名 研究会「凝集系の理論化学2017」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂口美幸、山中優、廣田俊、石井邦彦、田原太平
2. 発表標題 二次元蛍光寿命相関分光法による脂質膜上シトクロムcの構造ゆらぎの研究 (Study of Conformational Fluctuation of Cytochrome c on a Lipid Membrane by 2D Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy)
3. 学会等名 平成29年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Heme Protein Supramolecules Constructed by Domain Swapping
3. 学会等名 14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC14) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 志賀翔多、山中優、廣田俊、真壁幸樹
2. 発表標題 ミニマルなデザインで実現するライム病関連蛋白質OspAのドメインスワッピング
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 中山諒子、山中優、藤井創太郎、越澤大典、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 耐熱性シトクロムc の2量体界面残基置換によるCO応答性4次構造変化の付与
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 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

2 版

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 Hideyoshi Motoki, Norio Yoshida, Shun Hirota, Masahiro Higashi
2. 発表標題 MD and 3D-RISM Study on the Domain-Swapped Cytochrome c Oligomer
3. 学会等名 The 9th Conference of the Asian Consortium on Computational Materials Science (ACCMS-9) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chieh-Ju Chang, Yugo Hayashi, Shun Hirota, Ken-ichi Yuyama, Hiroshi Masuhara, Teruki Sugiyama
2. 発表標題 Fluorescence Analysis on Laser Trapping-Induced Amyloid Fibril Formation of Cytochrome c
3. 学会等名 2017年光化学討論会
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 (Solution NMR Studies on the Dynamic Properties of Membrane-Bound Cytochrome c Using Phospholipid Bicelles)
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 シトクロムc555をベースに設計した人工タンパク質を用いたナノ構造体構築 (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 根木秀佳、吉田紀生、廣田俊、東雅大
2. 発表標題 分子化学討論会MDシミュレーションと3D-RISM理論を用いたシトクロムcの多量体形成に関する理論的研究 (Theoretical Study on Oligomer Formation of Cytochrome c with MD Simulation and 3D-RISM Theory)
3. 学会等名 第11回分子化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyuki Sakaguchi, Masaru Yamanaka, Shun Hirota, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara
2. 発表標題 Site-selective Observation of Folding Dynamics of Cytochrome c by Two-dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy (二次元蛍光寿命相関分光法によるシトクロムcのフォールディング過程の部位選択的な観測)
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

2 版

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

1. 発表者名 中山諒子、山中優、藤井創太郎、越澤大典、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 異なるCO応答性を示す相同シトクロムc の変異導入解析
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

1. 発表者名 Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 Construction of Heme Protein Oligomers by 3D Domain Swapping
3. 学会等名 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017) (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 (ISBC2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyuki Sakaguchi, Masaru Yamanaka, Shun Hirota, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara
2. 発表標題 Observation of the Cooperative Collapse in the Spontaneous Folding Process of Cytochrome c by Two-Dimensional Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018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

2 版

1. 発表者名 山中優、中山諒子、若井暁、藤井創太郎、越澤大典、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 耐熱性シトクロムcへのCO ₂ 応答性四次構造変化の付与と多量化
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
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

1. 発表者名 志賀翔多、山中優、廣田俊、真壁幸樹
2. 発表標題 ドメインスワッピングを実現するミニマルなデザイン
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

13. 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			
中国	China West Normal University	University of South China	-	-
台湾	National Chiao Tung University	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-				

14. 備考

-