

様式 C - 7 - 1

平成30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	先端科学技術研究科		
	職	教授		
	氏名	廣田 俊		

1. 研究種目名 基盤研究(B)(一般) 2. 課題番号 18H02088

3. 研究課題名 3Dドメインスワッピングに基づく蛋白質多量体の生体内形成と新規デザイン

4. 研究期間 平成30年度～令和3年度 5. 領域番号・区分 -

6. 研究実績の概要

ウマシトクロムc、好熱菌シトクロムc552、緑膿菌シトクロムc551などのc型シトクロムの生体内での多量体形成を調査するため、各タンパク質にヒスチジンタグを付加させた。好熱菌シトクロムc552に、タンパク質合成と同時にタンパク質をサイトプラズムからペリプラズムへ輸送するシグナルペプチドDsbAssを付加させた時とタンパク質合成の完了後にタンパク質をペリプラズムへ輸送するシグナルペプチドPhoAssを付加させた時で、大腸菌の発現系から得られるタンパク質多量体量は大きく変化しなかったことより、シトクロムc552はシグナルペプチドの種類に依存せず多量体を形成することが明らかとなった。常温菌シトクロムcは5配位ヘムを有し、酸化型ではホモ2量体を形成するが、還元型へのCO結合により単量体へ解離する。一方、常温菌シトクロムcと相動性が高い好熱菌由来シトクロムcは、酸化型及び飽和CO溶液中での還元型の両状態でホモ2量体を形成する。常温菌シトクロムcの2量体の構造安定性に寄与するPhe11とThr18を常温菌シトクロムcの相当する残基Thr11とPhe18に置換した変異体は、CO結合により単量体へ解離した。CO依存的2量体-単量体遷移特性を示す安定なタンパク質が構築できたことより、3Dドメインスワッピングを利用した高次タンパク質構造体の構築が期待される。さらに、シトクロムc、ミオグロビン及び関連するヘムタンパク質のドメインスワッピングに関する総説を執筆した。総説では、ヘムタンパク質のドメインスワッピングがタンパク質フォールディングの初期段階で起こることを示し、ナノリング、ケージ、異なる活性部位を有するヘテロダイマー、リガンド結合による可逆的単量体-多量体平衡を示すタンパク質など、ドメインスワッピングを利用した、様々なヘムタンパク質構造体の構築について紹介した。

7. キーワード

タンパク質 超分子 多量体 3Dドメインスワッピング ヘムタンパク質 タンパク質デザイン

8. 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
ウマシトクロムc、好熱菌シトクロムc552、緑膿菌シトクロムc551にヒスチジンタグを付加させることに成功し、生体内での多量体形成量を定量することが可能となった。また、シトクロムc552の生体内での多量化はシグナルペプチドの種類に大きく依存しないことが明らかとなった。さらに、ヘムタンパク質の3Dドメインスワッピングに関する総説を執筆した。

2 版

9. 今後の研究の推進方策

ヒスチジンタグを付加した、正に帯電したウマシトクロムc、好熱菌シトクロムc552、負に帯電した緑膿菌シトクロムc551を用いて、タンパク質の表面電荷が生体内での多量化に与える影響を調べる。さらに、銅タンパク質アズリンなど、他の金属タンパク質の多量化について検討する。また、金属タンパク質ではない24量体フェリチンの多量化についても検討する。

10. 研究発表（平成30年度の研究成果）

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

1. 著者名 Masaru Yamanaka, Ryoko Nakayama, Sotaro Fujii, Satoshi Wakai, Yoshihiro Sambongi, Shun Hirota	4. 巻 93
2. 論文標題 Conferment of CO-Controlled Dimer-Monomer Transition Property to Thermostable Cytochrome c by Mutation in the Subunit-Subunit Interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 702-709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20180311	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	4. 巻 194
2. 論文標題 Oligomerization of Cytochrome c, Myoglobin, and Related Heme Proteins by 3D Domain Swapping	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 170-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.002	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Supramolecular Assemblies of c-Type Cytochromes Based on 3D Domain Swapping
3. 学会等名 233rd ECS Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules by 3D Domain Swapping
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan (Workshop: 35th Anniversary of Protein Engineering since 1983) (招待講演)
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 球状蛋白質のドメインスワッピングを実現するループのリデザイン
3. 学会等名 第18回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Nagao, Hisashi Kobayashi, Shun Hirota
2. 発表標題 NMR Study on Dynamic Properties of Cytochrome c Bound to Lipid Bicelles
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi
2. 発表標題 Domain Swapping-Based Assemblies of c-Type Cytochromes
3. 学会等名 Tenth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

2 版

1. 発表者名 長尾聡、小林紀、廣田俊
2. 発表標題 バイセルと溶液NMRを組合せた手法で可能になるシトクロムcと脂質膜の相互作用の高分解能解析
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中優、中山諒子、藤井創太郎、岩井暁、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 サブユニット界面変異による耐熱性シトクロムc へのCo依存性の2量体-単量体遷移特性の付与
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018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 シトクロムcの多量体形成におけるアニオンの影響に関する理論的研究
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣田俊、太虎林、樋口芳樹、柳澤幸子、小倉尚志
2. 発表標題 Picobiology of Metalloproteins: Vibrational Spectroscopic Studies of Cytochrome c and Hydrogenase
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会（シンポジウム：ピコバイオロジーが目指すもの）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾聡、小林紀、廣田俊
2. 発表標題 脂質バイセルに結合したシトクロムcの動的性質のNMR研究
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hulin Tai, Shun Hirota, Koji Nishikawa, Yoshiki Higuchi, Liang-nian Ji, Zong-wan Mao
2. 発表標題 Activation/Inactivation Mechanism between the Ni-SI _r and Ni-SI _a States of [NiFe] Hydrogenase Studied by Utilizing Ni-SI _r -to-Ni-SI _a Photoactivation
3. 学会等名 中国化学会第十四次全国生物無機化学学术会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Cheng Xie, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of a Two-Dimensional Protein Array Utilizing a Cytochrome c555-Based Protein
3. 学会等名 99th Chemical Society of Japan Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Robby Noor Cahyono, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Shun Hirota
2. 発表標題 Oligomerization of Azurin from <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> and Characterization of Its Dimer
3. 学会等名 99th Chemical Society of Japan Annual Meeting
4. 発表年 2019年

2 版

1. 発表者名 Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Design of Stable Domain-Swapped Myoglobin Oligomers
3. 学会等名 99th Chemical Society of Japan Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中優、中山諒子、若井暁、藤井創太郎、三本木至宏、廣田俊
2. 発表標題 耐熱性シトクロムcのサブユニット界面変異によるCO応答性2量体-単量体変換特性の付与
3. 学会等名 日本化学会第99春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井戸本彩花、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 金属結合性を有するドメインスワップしたミオグロビン2量体のデザインと性質
3. 学会等名 日本化学会第99春季大会
4. 発表年 2019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	Sun Yat-Sen University	-	-	-
台湾	National Chiao Tung University	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-				

14. 備考

-