

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30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	先端科学技術研究科		
	職	助教		
	氏名	山中 優		

1. 研究種目名 基盤研究(C)(一般) 2. 課題番号 18K04906

3. 研究課題名 センサータンパク質を駆動系とする人工タンパク質超分子マシンの構築

4. 補助事業期間 平成30年度～令和3年度

5. 研究実績の概要

平成30年度は、シトクロムc' (CP)とヤツメウナギヘモグロビン(LHb)を対象として以下の研究を実施した。

1) 好熱菌CP(PHCP)のCO応答性改変と超分子化：CO結合に伴い2量体単量体構造変化を示す常温菌CP(AVCP)では、既にドメインスワッピングにより超分子化すること、さらにこれがCO応答性構造変化を維持していることが明らかとなっている。そこで、AVCPの相同タンパク質でより安定性の高い好熱菌CP(PHCP)を標的として、同様に超分子化を試みた。大腸菌発現系で異種発現させ各種カラムで精製したPHCPのCO結合能を評価したところ、AVCPよりもCO親和性が著しく低いことが明らかになった。また、AVCPで見られるようなCO結合に伴う2量体単量体構造変化は、PHCPでは観測されなかった。そこで、PHCPの2量体界面の3残基をAVCPの対応する残基に置換した変異体(F11T、T18F、F71D)を作成し、CO親和性と応答性を調べたところ、全変異体でCO親和性が上昇し、さらにT18F、F71DではCO結合に伴う2量体単量体構造変化も示した。T18F・F71D変異体の超分子化を試みたところ、酢酸処理により4量体より大きい多量体が得られた。さらに、この多量体はCO結合に伴い2量体に解離することも見出した。現在この多量体の構造解析を進めている。

2) LHbの超分子化：酸素結合に伴い2量体単量体構造変化を示すLHbを標的に、ドメインスワッピング超分子化を試みた。LHbを各種アルコールで処理したが、多量体は得られなかった。現在は、その他の条件での超分子化の検討を進めるとともに、LHbと構造類似性があり既にドメインスワッピング超分子化することが分かっているミオグロビンの構造を参考にし、超分子化しやすくなるよう設計したLHb変異体を作製し、超分子化を調査中である。

6. キーワード

四次構造変化 タンパク質超分子

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
設定課題1、「センサータンパク質のドメインスワップ超分子化と動作機構への影響評価」に関して、CPのCO結合に伴う構造変化を維持した超分子化については、AVCPの実績をもとに、より安定なPHCPでも成果が得られつつある。その内、PHCPのCO応答性構造変化の改変について国際学術雑誌に掲載された。LHbについては、野生型でのアルコールでの条件検討を完了し、さらなる条件検討および超分子化しやすくなるよう設計した変異体の超分子化にも着手しており、計画通り順調に進展している。

3 版

8. 今後の研究の推進方策

設定課題1. 「センサータンパク質のドメインスワップ超分子化と動作機構への影響評価」に関して、CPとLHbについてのテーマを引き続き進展させるとともに、その他のセンサータンパク質、カルモジュリンおよびHrtRの超分子化についても着手する。さらに、CPについては設定課題2. 「タンパク質改変による任意構造をもつ超分子構築と動作機構への影響評価」にも着手する。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

消耗品等が現在研究室にあるもので研究遂行可能であった為、新規に購入する必要がなかった為。次年度使用額は、当初予定を変更して新たに導入予定の微量分光光度計の購入費用の一部に充てる。

10. 研究発表（平成30年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanaka Masaru, Nakayama Ryoko, Fujii Sotaro, Wakai Satoshi, Sambongi Yoshihiro, Hirota Shun	4. 巻 92
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

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依存的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 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 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Shun Hirota
2. 発表標題 Formation of Cytochrome c' tetramer Using Domain-Swapping and Carbon Monoxide-Dependent Control of Oligomer Association/Dissociation
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Chunguang Ren, Mohan Zhang, Akiya Oda, Yoshiaki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules Based on Domain Swapping
3. 学会等名 第19回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Chunguang Ren, Mohan Zhang, Akiya Oda, Yoshiaki Higuchi, Shun Hirota
2. 発表標題 Construction of Protein Supramolecules Based on Domain-Swapping Mechanism
3. 学会等名 33rd Annual Symposium of the Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

【研究代表者・所属研究機関控】

日本学術振興会に紙媒体で提出する必要はありません。

3版

〔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

-