

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	教授		
	氏名	廣田 俊		

1. 研究種目名 挑戦的研究（萌芽） 2. 課題番号 18K19146

3. 研究課題名 レーザートラッピング法を利用したシトクロムcのアミロイド線維形成機構の解明

4. 補助事業期間 平成30年度～令和元年度

## 5. 研究実績の概要

シトクロムcのヘム鉄に配位しているMet80と同じループ領域に含まれるAla83をCysに置換したA83C変異体と、C末端のGlu104をCysに置換したE104C変異体を作製した。各変異体をイオン交換カラムクロマトグラフィー及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した後、挿入したCysを介して各変異体を分子間ジスルフィド架橋し、2量体を作製した。各変異体の2量体ではCys近傍の構造が固定化されるため、これらの領域の柔軟性がアミロイド線維形成に及ぼす影響が特定できる。波長1064 nmの連続波レーザーを用いたレーザートラッピング法により、分子間ジスルフィド架橋されたE104C 2量体のアミロイド線維形成を調べた。対物レンズでレーザー光をE104C 2量体を含む重水溶液中に集光すると、集光点に直径約4 μmの凝集体が形成されることが顕微鏡観察により判明した。この現象は、ドメインスワッピングした野生型シトクロムcの2量体のレーザートラッピングの結果と類似していた。光圧により生成したE104C変異体の凝集体にレーザー光を照射し続けると、直径約2 μmの凝集体の中心部分の透過率が減少した。その後、凝集体の中心部分は直径1 μm程度に収縮するとともに、共存させたチオフラビンTによる蛍光強度が著しく増大した。さらに、集光点を移動することによりE104C変異体の凝集体を連続的に作製し、凝集体を超音波処理によってほどいた後、透過型電子顕微鏡で観察したところ、幅数nmのアミロイド線維が集まって幅数十nmのバンドル構造を形成していた。以上より、シトクロムcのE104C変異体の分子間ジスルフィド架橋2量体は光圧によってアミロイド線維化し、Glu104周りの構造を固定化しても、アミロイド線維が形成されることが分かった。これらの情報はシトクロムcのアミロイド線維形成機構の解明に有用である。

## 6. キーワード

タンパク質 レーザートラッピング法 光圧 アミロイド線維 ドメインスワッピング ジスルフィド結合

## 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  
シトクロムcのA83C変異体とE104C変異体を作製した。各変異体を精製後、各変異体を分子間ジスルフィド架橋し、2量体を作製した。E104C 2量体のレーザートラッピング法による顕微鏡観察、共存チオフラビンTの蛍光観察、さらに凝集体の透過型電子顕微鏡を行うことができた。

2 版

## 8. 今後の研究の推進方策

A83C変異体 2量体のレーザートラッピング法による顕微鏡観察、共存チオフラビンTの蛍光観察、凝集体の透過型電子顕微鏡を行う。さらに、得られたデータをもとに、シトクロムcのアミロイド線維形成に重要な部位を特定する。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

ジスルフィド結合で架橋したシトクロムc変異体の2量体の作製と精製法を確立するのに時間を要したため。  
新しいシトクロムc変異体の2量体のアミロイド形成挙動を調べるため、タンパク質の作製や精製、レーザーラッピング法などの消耗品費として使用する。

## 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 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4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 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

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 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

〔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

2 版

## 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

共同研究相手国	相手方研究機関			
台湾	National Chiao Tung University	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-				

## 1 4 . 備考

-