

様式 C - 7 - 1

平成28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）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究期間 平成28年度～平成29年度
5. 課題番号

1	6	H	0	0	8	3	9
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 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

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
9 0 2 8 3 4 5 7	ヒロタ シュン	物質創成科学研究科	教授
	廣田 俊		

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 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、*Allochromatium vinosum* 由来シトクロムc（AVCP）の2量体をドメインスワッピングにより作製し、この2量体を利用して4量体および高次多量体を構築した。AVCP 4量体はドメインスワップ2量体1つと単量体2つから構成されることがX線結晶構造解析により明らかとなった。ドメインスワップ2量体では、ヘリックスAとヘリックスBを含む領域をプロトマー間で交換していた。4量体でのドメインスワップ2量体サブユニットと単量体サブユニット間の相互作用はネイティブ2量体のサブユニット間の相互作用と類似していた。還元型AVCP 4量体は、ヘム鉄への一酸化炭素の結合により、1つのドメインスワップ2量体と2つの単量体に解離した。さらに、大部分の単量体を除去すると、酸化型ドメインスワップ2量体は高次多量体を形成し、一酸化炭素がヘム鉄に結合すると多量体はドメインスワップ2量体に解離した。また、デッドタイム3 ms、混合体積0.1 mLのストップフロー混合機を用いてストップフロー共鳴ラマン装置を作製した。本装置を用いて、ミオグロビンと過酸化水素の反応において、フェリルオキソ種の生成による共鳴ラマンスペクトル変化を観測することに成功し、本装置は高い分解能で酵素と基質の反応に広く適応できることが示された。これらの研究成果は柔らかな分子系の理解に寄与するものである。

10. キーワード

- | | | | |
|-----------|---------|----------------|----------|
| (1) 蛋白質 | (2) 超分子 | (3) 多量体 | (4) 生体分子 |
| (5) バイオナノ | (6) ヘム | (7) ドメインスワッピング | (8) |

11. 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)

Allochrochromatium vinosum由来シトクロムc のドメインスワップ2量体の作製し、ドメインスワップ2量体1つと単量体2つから構成される4量体のX線結晶構造解析に成功した。また、ドメインスワップ2量体のヘム鉄への一酸化炭素の結合・解離を利用した高次多量体の形成・解離制御に成功し、これらの研究成果を学術雑誌に報告した。さらに、新しいストップフロー共鳴ラマン装置を開発し、学術論文に報告した。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

タンパク質の柔らかなループ部位の置換による機能性人工タンパク質の構築を試みる。さらに、他のヘムタンパク質の多量化を試みるとともに、他の非ヘムタンパク質についても多量化および機能化を検討する。最後に、本研究により得られた結果を総括する。

13. 研究発表 (平成 28 年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計 (4) 件 / うち査読付論文 計 (4) 件 / うち国際共著論文 計 (1) 件 / うちオープンアクセス 計 (0) 件

著者名		論文標 題				
M. Yamanaka, M. Hoshizumi, S. Nagao, R. Nakayama, N. Shibata, Y. Higuchi, and S. Hirota		Formation and Carbon Monoxide-Dependent Dissociation of Allochromatium vinosum Cytochrome c' Oligomers Using Domain-Swapped Dimers				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Protein Science	有	26	2 0 1 7	464-474	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1002/pro.3090						
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						

著者名		論文標 題				
S. Yanagisawa, M. S. Deshpande, S. Hirota, T. Nakagawa, and T. Ogura		Improved Stopped-Flow Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy Device for Studying Enzymatic Reactions				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Journal of Raman Spectroscopy	有	48	2 0 1 7	680-685	-	
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1002/jrs.5100						
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						

著者名		論文標 題 【掲載確定】				
S. Hirota, N. Yamashiro, Z. Wang, and S. Nagao		Effect of Methionine80 Heme Coordination on Domain Swapping of Cytochrome c				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Journal of Biological Inorganic Chemistry	有	22	2 0 1 7	in press	-	
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						
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						

著 者 名		論 文 標 題 【掲載確定】				
K. Yuyama, M. Ueda, S. Nagao, S. Hirota, T. Sugiyama, and H. Masuhara		A Single Spherical Assembly of Protein Amyloid Fibrils Formed by Laser Trapping				
雑 誌 名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Angewandte Chemie International Edition		有	56	2 0 1 7	in press	該当する
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)						
10.1002/anie.201702352						
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						

〔学会発表〕 計(19)件/うち招待講演 計(5)件/うち国際学会 計(7)件

発 表 者 名		発 表 標 題	
山中優、星住誠人、長尾聡、廣田俊		四量体シトクロムc'の作製とCO分子結合・解離によるサイズ制御	
学 会 等 名		発 表 年 月 日	発 表 場 所
第16回日本蛋白質科学会年会		2016年06月07日～ 2016年06月09日	福岡国際会議場(福岡県福岡市)

発 表 者 名		発 表 標 題	
宮本昂明、長尾聡、庄村康人、樋口芳樹、廣田俊		ドメインスワップしたシトクロムcb562二量体が形成するZn-S04クラスター内包タンパク質ナノケージの結晶構造	
学 会 等 名		発 表 年 月 日	発 表 場 所
第16回日本蛋白質科学会年会		2016年06月07日～ 2016年06月09日	福岡国際会議場(福岡県福岡市)

発 表 者 名		発 表 標 題	
Shun Hirota, Satoshi Nagao, Yugo Hayashi, Takaaki Miyamoto, Chunguang Ren, Masaru Yamanaka, Ying-Wu Lin, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, and Yoshiki Higuchi		Domain Swapping of c-Type Cytochromes and Myoglobin	
学 会 等 名		発 表 年 月 日	発 表 場 所
Ninth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (招待講演)(国際学会)		2016年07月03日～ 2016年07月08日	Nanjing, China

発表者名	発表標 題	
Shun Hirota, Satoshi Nagao, Partha Pratim Parui, Megha Subhash Deshpande, Chunguang Ren, Yugo Hayashi, Takaaki Miyamoto, Yin-Wu Lin, and Yoshiki Higuchi	Domain Swapping in c-Type Cytochromes and Myoglobin	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
30th Anniversary Symposium of the Protein Society (国際学会)	2016年07月16日 ~ 2016年07月19日	Baltimore, USA

発表者名	発表標 題	
Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota	Construction of Zn-S04 Cluster-encapsulating Protein Nanocage by Domain Swapping	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
30th Anniversary Symposium of the Protein Society (国際学会)	2016年07月16日 ~ 2016年07月19日	Baltimore, USA

発表者名	発表標 題	
松本順文、REN Chunguang、山中優、長尾聡、廣田俊	過酸との反応によるシトクロムcのMet80の酸化修飾	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第10回バイオ関連化学シンポジウム	2016年09月07日 ~ 2016年09月09日	石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

発表者名	発表標 題	
須田綾香、小林紀、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊	ミオグロビンのループ領域アミノ酸変異によるドメインスワップ二量体のデザイン	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第10回バイオ関連化学シンポジウム	2016年09月07日 ~ 2016年09月09日	石川県立音楽堂・もてなしドーム地下イベント広場 (石川県金沢市)

発表者名	発表標 題	
Shun Hirota	Application of Supramolecular Science for Drug Design	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
The Symposium of Annual Scientific Meeting 2016 of Indonesian Pharmacist Association (招待講演) (国際学会)	2016年09月27日 ~ 2016年09月29日	Jogjakarta, Indonesia

発表者名	発表標 題	
Shun Hirota	Structure and Function of Heme Protein Oligomers Constructed by Domain Swapping	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium (招待講演) (国際学会)	2016年09月29日 ~ 2016年09月30日	岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

発表者名	発表標 題	
Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota	Formation of Myoglobin Dimers by Domain Swapping	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
第54回日本生物物理学会年会	2016年11月25日 ~ 2016年11月27日	つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

発表者名	発表標 題	
Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, and Yoshiki Higuchi	Construction of Heme Protein Supramolecules by Domain Swapping	
学 会 等 名	発表年月日	発 表 場 所
8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演) (国際学会)	2016年12月04日 ~ 2016年12月09日	Auckland, New Zealand

発表者名	発表標 題	
Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, and Yoshiki Higuchi	Cytochrome c: Domain Swapping, Self-Modification, and Molecular Recognition	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (招待講演) (国際学会)	2017年01月07日 ~ 2017年01月11日	Kolkata, India

発表者名	発表標 題	
Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota	Design of Domain-Swapped Myoglobin Dimer	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
97th Chemical Society of Japan Annual Meeting	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標 題	
久保田真史, 宮本昂明, 廣田俊	Rhodospseudomonas palustris由来シクロムc の多量化	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
日本化学会第97春季年会	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標 題	
Chieh-Ju Chang, Yugo Hayashi, Shun Hirota, Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, and Hirotashi Masuhara	Laser Trapping Dynamics of Amyloid Fibril Formation of Cytochrome c Monomer and Dimers	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
97th Chemical Society of Japan Annual Meeting	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標 題	
Hongxu Yang, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, and Shun Hirota	Effect of Rare Codons on Hydrogenobacter thermophiles cyt c552	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
97th Chemical Society of Japan Annual Meeting	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標 題	
Masaru Yamanaka, Ryoko Nakayama, Satoshi Nagao, Makoto Hoshizumi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota	Formation of Cytochrome c Oligomers Using Domain-Swapped Dimers and Carbon Monoxide-Dependent Control of Oligomer Association/Dissociation	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
97th Chemical Society of Japan Annual Meeting	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標 題	
Takaaki Miyamoto and Shun Hirota	Protein Nanostructures Constructed by Fusing Two Oligomerization Domains with a 3-Helix Bundle Linker	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
97th Chemical Society of Japan Annual Meeting	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標 題	
Akiya Oda, Ikki Ueda, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, and Shun Hirota	Construction of a Triangle-shaped Structure with a Unit Protein Based on Cytochrome c555	
学 会 等 名	発表年月日	発表場 所
97th Chemical Society of Japan Annual Meeting	2017年03月16日 ~ 2017年03月19日	慶応義塾大学(神奈川県横浜市)

〔図書〕 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究：-

17. 備考

