

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）（令和元年度）

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	長尾 聰		

1. 研究種目名 基盤研究(C)(一般)

2. 課題番号

19K05695

3. 研究課題名 ドメインスワッピングの熱力学的制御による選択的かつ安定なタンパク質分子複合体構築

4. 補助事業期間 令和元年度～令和3年度

## 5. 研究実績の概要

天然ではタンパク質や核酸、脂質分子などから成るナノスケールの分子複合体が分子の自己集合により形成している。近年、このような単分子にはないユニークな機能を有する分子を人工的に制御して創るために、アミノ酸デザインや化学的手法などを用いた分子複合体の構築法が国内外で磨かれている。本研究では申請者がこれまで取り組んできた、単量体タンパク質の部分構造が分子間で交換して多量化するドメインスワッピングについての知見を基盤とした金属イオンや熱などによるタンパク質の多量体形成制御を目的とする。

令和元年度は、まず金属イオンへの配位性を有するアミノ酸をミオグロビンに導入し、ドメインスワッピングにより形成したミオグロビン二量体の金属結合性と構造について検討を行った。ミオグロビンのヒンジ領域はEヘリックスとFヘリックス間のEFループに位置しており、その前後で分子間構造交換を行うことでドメインスワッピング二量体を形成する。そこで、二量体を形成したときにヒンジ領域付近で金属イオンを結合可能なアミノ酸環境を構築するため、ミオグロビンのヒンジ領域へのヒスチジン導入を行った。X線結晶構造解析により、変異型ミオグロビン二量体では導入したヒスチジンが配位子となってNi<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>と結合することが明らかとなった。次に、ヒンジ領域のアミノ酸残基の中で最もヘリックス形成能が低い180番目のグリシンをセリン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アラニンに変異させると、アミノ酸のヘリックス形成能の順にドメインスワッピング傾向が高くなることが明らかとなった。ドメインスワッピング傾向が高い変異型ミオグロビンでは、70℃で30分加熱することにより、単量体から二量体が形成可能であった。以上より、金属イオンと結合可能な変異型ミオグロビン二量体の構築と、熱によってドメインスワッピング二量体が形成可能な変異体の作製に成功した。

## 6. キーワード

タンパク質超分子 ミオグロビン ドメインスワッピング タンパク質デザイン 金属結合性 ヘリックス形成能 結晶構造解析

## 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

本研究課題において目的とする、金属イオンや熱などの外部刺激によってドメインスワッピングによる多量体形成を制御するために、令和元年度はアミノ酸変異により、ヒンジ領域において金属イオンと結合可能なミオグロビン二量体の構築と、ヒンジ領域のアミノ酸のヘリックス形成能を増大させることによるドメインスワッピング傾向の向上に成功した。前者の知見は金属イオン、後者の知見は熱によってドメインスワッピングによるタンパク質の多量体形成制御に重要であり、今後の高次の多量体構造を有するタンパク質超分子の形成制御に役立つと考えられる。以上により、令和元年度はおおむね順調に進展していると判断した。

## 8. 今後の研究の推進方策

令和元年度では、金属イオンとの結合性を有する変異型ミオグロビン二量体の構築に成功し、そのX線結晶構造も明らかにしたことから、次の段階として金属イオンと結合したミオグロビンの熱安定性を調べ、構造に基づき二量体が単量体よりも安定になるアミノ酸デザインを検討する。一方、ヘリックス形成能を増大させた変異型ミオグロビンでは、二量体だけでなく四量体も安定化されていたことから、その構造を詳細に調べ、四量化の分子機構の理解を進める。

## 9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

本年度は研究課題の実施に必要な微量分光光度計のNanophotometer (NP80、インプレン社)を設備備品費として計上し、購入した。一方で、研究代表者が2019年8月から2020年2月までミシガン大学（ミシガン州、米国）に滞在していたことから、予定よりも消耗品費と旅費が少なくなったため、次年度使用額が生じた。本研究課題の成果を既に学術論文を投稿し、掲載決定されていることから、次年度使用額は翌年度分と合わせて論文掲載料としての使用を予定している。

## 10. 研究発表（令和元年度の研究成果）

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

1. 著者名 Majumder Rini、Roy Snigdha、Okamoto Kentaro、Nagao Satoshi、Matsuo Takashi、Parui Partha Pratim	4. 巻 36
2. 論文標題 Porphyrin-Based Probe for Simultaneous Detection of Interface Acidity and Polarity during Lipid-Phase Transition of Vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 426 ~ 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.9b02781	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

## 〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾聰、井戸本彩花、須田綾香、小林紀、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊
2. 発表標題 タンパク質超分子構築のためのドメインスワッピングにおけるヒンジ領域のアミノ酸配列設計
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名  
井戸本彩花、長尾聰、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊

2. 発表標題  
金属結合部位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  
第19回日本蛋白質科学会年会

4. 発表年  
2019年

1. 発表者名  
井戸本彩花、長尾聰、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊

2. 発表標題  
金属結合部位を導入したドメインスワップミオグロビン2量体の構造と性質

3. 学会等名  
第9回CSJ化学フェスタ

4. 発表年  
2019年

1. 発表者名  
井戸本彩花、長尾聰、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊

2. 発表標題  
ドメインスワッピングを利用したミオグロビンへの金属結合部位の導入

3. 学会等名  
第13回バイオ関連化学シンポジウム

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			
	Department of Chemistry	Jadavpur University	-	-
インド	Department of Chemistry	Jadavpur University	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

## 14. 備考