

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月30日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17935

研究課題名(和文)機能部位連携を志向したタンパク質多量体の構造制御法開発

研究課題名(英文)Development of structural control of protein oligomers toward cooperation of functional sites

研究代表者

長尾 聡 (Nagao, Satoshi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30452535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の様々なタンパク質多量体はボトムアップ型のプロセスで作られ、協同的な基質分子結合、金属原子の貯蔵などの機能を有している。本研究では、このようなユニークな機能の人工再現に向けて、タンパク質を決まった様式で会合させるナノレベルの構造制御法の開発を目的とした。本研究成果として、もともとは単量体のタンパク質であるミオグロビンのヘリックスを繋ぐヒンジループ領域のヘリックス形成能をアミノ酸変異により増大させると、部分構造が分子間で交換したドメインスワップ二量体が多く形成され、より高次の多量体の形成も促進されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、単量体のタンパク質をビルディングブロックとしたナノ構造体構築の手法は国内外で磨かれており、様々な構造体が生産されている。一方で、ナノ構造体をとることで新規な機能を発現させるのは未だ挑戦的であり、その達成にはより多くのナノ構造体構築の知識基盤が必要である。本研究では、他の研究グループとは異なり、ドメインスワッピングによる多量体形成を利用したアプローチを取っており、本研究成果は単量体のタンパク質を安定な二量体へと変換する新たな分子設計指針となる。この知見は、既存の化学的手法とは異なるボトムアップ設計による機能性生体分子の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Protein oligomers are produced by a bottom-up process in vivo, and have various functions such as cooperative binding of substrate and storage of metal atoms. In this study, we focused on development of structural control of protein oligomers possessing the unique functions by associating proteins in a manner defined at nano-level. As the results of the present study, it has been shown that a typical monomeric protein, myoglobin, can form a domain-swapped dimer by increasing helical propensities of the hinge loop region with amino acid mutation. Increase in the helical propensities also facilitated to form higher order oligomers.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：タンパク質超分子 ミオグロビン タンパク質デザイン 結晶構造解析 構造制御 ドメインスワッピング ヘリックス形成能

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内においてボトムアップ型のプロセスで作られる様々な形状・サイズのタンパク質多量体では、複数の機能部位が連携して働くことにより、協同的な基質分子結合、金属原子の貯蔵、回転・並進運動など、単分子には困難な機能発現がなされている(図1左)。天然では、このような多量体形成はタンパク質分子が決まった様式で会合して起こる。このような多量体をナノレベルの構造制御により人工的に構築出来れば、天然分子のユニークな機能の発現機構の理解が進み、今まで単分子をベースに開発されてきた生体材料の機能の多様化や集積化に寄与する。

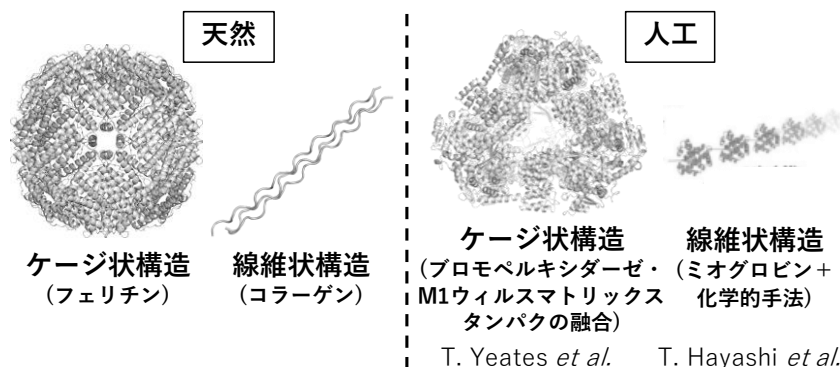


図1 タンパク質が集合して形成する代表的な構造体(左:天然、右:人工)

近年、T. Hayashi らのタンパク質の連続的ヘム取込反応を利用したワイヤー型多量体、A. Tezcan らの金属配位を利用したシート・チューブ型多量体や T. Yeates らの2種類の多量体形成ドメイン連結によるケージ型多量体などの構築がなされ、タンパク質多量体の人工構築法は磨かれつつある(図1右)。しかし、当該研究分野を天然のユニークな機能発現の域へとパラダイムシフトさせるには、多量体の構造形成原理をより詳細に理解し、機能部位連携に向けた分子設計に挑戦する必要がある。

研究代表者らは上述の手法とは別のタンパク質多量体の構築法として、分子内の相互作用を分子間に置き換えるドメインスワッピングを利用することを提案しており、タンパク質をビルディングブロックとしたc型シトクロムのポリマー構造およびb型シトクロムのケージ構造の構築に成功している(図2)。他にも、ミオグロビンがドメインスワップした二量体を形成し、その構造単位(プロトマー)の機能部位が単量体と同様の酸素結合能を有することを明らかにしている。つまり、本手法は多量体において機能部位が秩序立って配列可能であり、ビルディングブロックの構造と機能が担保される点において優れている。

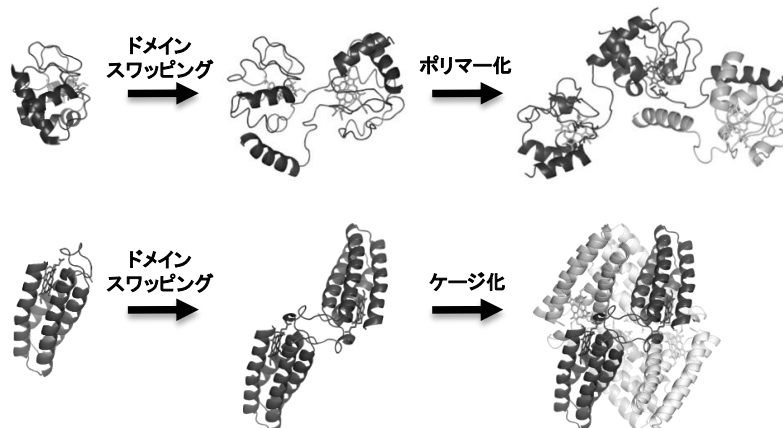


図2 c型シトクロムのポリマー構造(上)およびb型シトクロムのケージ構造(下)の形成。

2. 研究の目的

上述の通り、ボトムアップ型のプロセスで作られる天然のタンパク質多量体のユニークな機能の人工再現には、タンパク質を決まった様式で会合させるナノレベルの構造制御が必要となるが、その知識基盤は十分に確立していない。本研究では、多量体構築原理の理解と機能部位連携に向けた多量体構築を目的とし、ミオグロビンをモデルタンパク質として、ドメインスワッピングにより形成させた二量体の安定化方法と、高次多量体の作製方法について検討した。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでに、ミオグロビンのヒンジ領域は単量体ではループ構造であるが、ドメインスワッピングして二量化すると α ヘリックス構造に変化することを明らかにしてきた。そこで、このミオグロビンにおけるループヘリックス構造変換に着目し、ヒンジ領域上のア

ミノ酸のヘリックス形成能によるドメインスワッピング傾向の制御を試みた。W.F. DeGrado (UCSF, 米国)らによるペプチドを用いたアミノ酸残基の二次構造形成の研究より、Ala、Ile、Leu などが高いヘリックス形成能を有することが知られている。本課題では、ヒンジ領域のアミノ酸を高ヘリックス形成能アミノ酸残基に系統的に置換し、それぞれの変異体の X 線結晶構造および多量体形成能の解析を行った。

4. 研究成果

ウマ由来ミオグロビンのヒンジ領域に位置する 80 番目のアミノ酸を Gly から Ala に変えた一置換変異体と、80、81、82 番目のアミノ酸をすべて Ala に変えた三置換変異体をそれぞれ大腸菌で発現させ、硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換カラムおよびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより、一置換変異体では約 3 割、三置換変異体では約 9 割が二量体として得られ、また、それぞれの変異体の二量体と単量体が精製出来た(図 3)。吸収スペクトル測定により、変異体の二量体と単量体の活性部位構造は野生型と類似していることが示された。円二色性スペクトル測定では、三置換変異体の二量体のみヘリックス含有量の増大がみられ、Ala の導入によるヒンジ領域のヘリックス構造の安定化が示唆された。また、変異体の二量体は野生型ミオグロビンの二量体と同じ条件で結晶化に成功し、SPring-8 にて構造決定を行った(図 4)。その結果、変異体においても野生型と同じ位置でドメインスワッピングをしており、ヒンジ領域がループからヘリックス構造に変換されていた。次に、変異体の単量体(0.1 mM)をそれぞれ 70°C、30 分間加熱すると、一置換変異体では約半分、三置換変異体では約 8 割が二量体に変換された。以上の結果より、ミオグロビンのヒンジ領域のアミノ酸をヘリックス形成能が高いアミノ酸に変異させると、二量体が単量体よりも安定になることが示された。次に、エタノールを終濃度 10% (v/v)となるように変異体に加え、凍結乾燥し、水に再溶解させると、野生型と比較して二量体が多く形成され、高次の多量体まで形成されることが明らかとなった。特に、三置換変異体では、四量体が三量体よりも多く形成されたことから、ドメインスワップした二量体構造を安定化することで、二量体構造がビルディングブロックとなった高次多量体が構築可能であることが示唆された。

以上の結果より、ドメインスワップ構造に基づいてヒンジ領域を安定化するような変異導入を行うことにより、ドメインスワップ二量体が安定化され、高次多量体形成も促進されることが明らかとなった。生体材料の機能化には材料の構成要素の安定性が重要となるため、ヘリックス構造の安定化を通じて多量体構造全体を安定化出来ることは、今後のタンパク質多量体の分子設計の新たな指針となると考えられる。

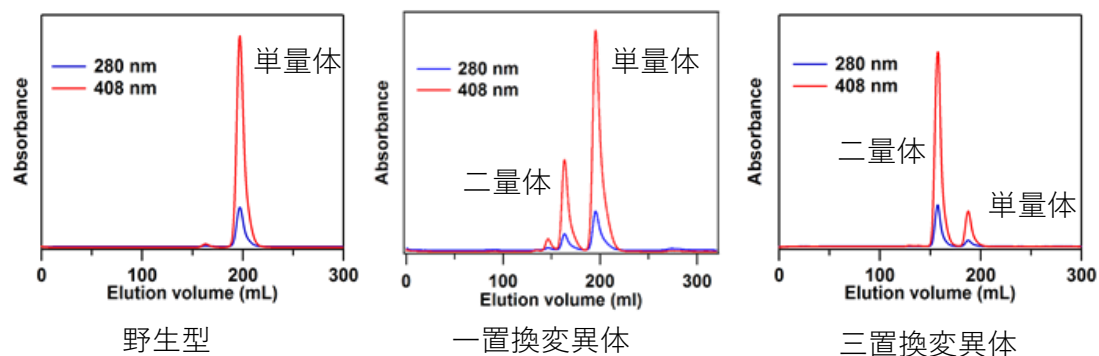


図 3 大腸菌から得られたミオグロビンのゲルろ過溶出曲線。

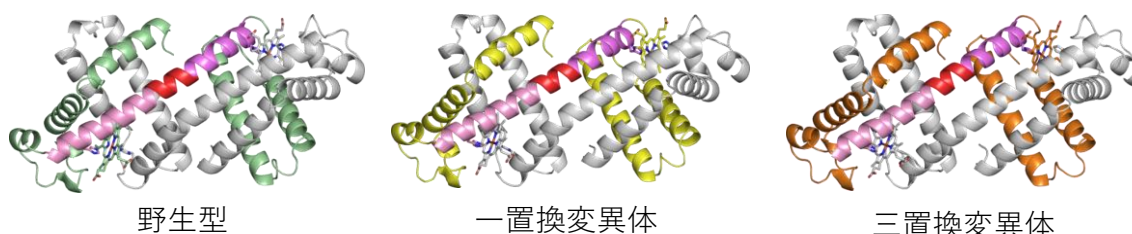


図 4 ミオグロビン二量体の X 線結晶構造。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Akiya Oda, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Ikki Ueda, Hiroki Watanabe, Takayuki Uchihashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Construction of a Triangle-Shaped Trimer and a

Tetrahedron Using an α -Helix-Inserted Circular Permutant of Cytochrome *c*₅₅₅, *Chemistry An Asian Journal*, 査読有, 13, 2018, 964-967.

doi: 10.1002/asia.201800252

②Ken-ichi Yuyama, Mariko Ueda, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara, A Single Spherical Assembly of Protein Amyloid Fibrils Formed by Laser Trapping, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, 56, 2017, 6739-6743.

doi: 10.1002/anie.201702352

③Hisashi Kobayashi, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Characterization of Cytochrome *c* Membrane-binding Site Using Cardiolipin-containing Bicelles with NMR, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, 55, 2016, 14019-14022.

doi: 10.1002/anie.201607419

[学会発表] (計 6 件)

①Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, “Design of stable domain-swapped myoglobin oligomers”, 99th Chemical Society of Japan Annual Meeting, Okamoto Campus, Konan University (Kobe, Japan), 2019.3.17 (Conference Period: 2019.3.16-19)

②井戸本彩花、長尾聡、柴田直樹、樋口芳樹、廣田俊、「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」、日本化学会第 99 春季大会、甲南大学岡本キャンパス(兵庫県神戸市)、2019.3.17(学会期間:2019.3.16-3.19)

③Satoshi Nagao, Suda Ayaka, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, “Design and properties of domain-swapped myoglobin dimer”, 98th Chemical Society of Japan Annual Meeting, Funabashi Campus, Nihon University, (Funabashi, Chiba), 2018.3.20 (Conference Period: 2018.3.20-23)

④Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, “Design of domain-swapped myoglobin dimer”, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, (Keio University, Yokohama), 2017.3.16 (Conference Period: 2017.3.16-19)

⑤Satoshi Nagao, Ayaka Suda, Hisashi Kobayashi, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, “Formation of myoglobin dimers by domain swapping”, 第 54 回日本生物物理学会年会、(つくば国際会議場、茨城県つくば市)、2016.11.27 (Conference Period: 2016.11.25-27)

⑥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」、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、(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)、2016.9.7(学会期間:2016.9.7-9)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：廣田 俊

ローマ字氏名：HIROTA, Shun

研究協力者氏名：小林 紀

ローマ字氏名：KOBAYASHI, Hisashi

研究協力者氏名：須田 綾香

ローマ字氏名：SUDA, Ayaka

研究協力者氏名：井戸本 彩花

ローマ字氏名：IDOMOTO, Ayaka

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。