

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13744

研究課題名(和文)ドメインスワッピングを利用した新規タンパク質ケージの開発

研究課題名(英文)Development of new protein cages using domain swapping

研究代表者

廣田 俊 (HIROTA, Shun)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90283457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シトクロムcb562(cyt cb562)の多量体を作製し、cyt cb562 2量体がドメインスワップ構造を取ることを明らかにした。結晶中で3分子のcyt cb562 2量体は特異なケージ構造を形成し、タンパク質ケージは15個のZn²⁺と7個のSO₄²⁻から成るZn-SO₄クラスターを内包していた。さらに、異なる2種類のホモ多量体タンパク質のサブユニットを3ヘリックスバンドルタンパク質で繋いだ融合タンパク質を設計した。設計した融合タンパク質を用いて4量体および6量体を構築し、それらの構造をX線小角散乱法および高速原子力顕微鏡観察により分析した。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome (cyt) cb562 oligomers were constructed, and it was found that the dimer of cyt cb562 forms a domain-swapped structure. Three domain-swapped cyt cb562 dimers formed a unique cage structure with a Zn-SO₄ cluster inside the cavity. The Zn-SO₄ cluster consisted of fifteen Zn²⁺ and seven SO₄²⁻ ions, whereas six additional Zn²⁺ ions were detected inside the cavity. Fusion proteins comprising the subunits of different homo oligomeric proteins were designed. The two subunits were connected with a 3-helix bundle protein in the fusion proteins. A tetramer and a hexamer were constructed with the fusion proteins, and the structures of the tetramer and hexamer were analyzed by small-angle X-ray scattering and high-speed atomic force microscopy methods.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：タンパク質 生体分子 ナノバイオ 超分子化学 タンパク質構造体 タンパク質ケージ ドメインスワッピング

1. 研究開始当初の背景

近年、無機化合物を使ったケージ化合物や金属有機構造体が合成され、小分子の包摂が盛んに研究されている。自然界に存在するタンパク質には、複合体を形成してナノサイズの秩序だった構造を作り出すことにより、単独の分子では達成できない高度な機能を発揮するものも多い。また、タンパク質ナノ構造体を自在に設計・構築することができれば、医療・工業など様々な分野に貢献できるため、タンパク質ナノ構造体の構築に関する研究は注目を集めている。

ドメインスワッピングはタンパク質分子がその構造領域や2次構造(α ヘリックス、 β シート)を分子間で交換し多量化する現象であり、1994年にジフテリアトキシンで初めて報告された。研究代表者らはこれまでに、ヘムタンパク質であるシトクロム(cyt)cがドメインスワッピングによりポリマー化する機構を明らかにした。また、ドメインスワッピングを利用して、ミオグロビンや好熱菌 cyt c_{552} の2量体を作製し、それらの立体構造を明らかにした。ドメインスワッピングによるタンパク質多量体がタンパク質フォールディング過程で形成することや細胞毒性を有することも明らかにした。以上のように、タンパク質ドメインスワッピングに関する知見は増え、ドメインスワッピングを利用したタンパク質構造体の構築を目指す段階にある。

2. 研究の目的

タンパク質のみから形成されるケージ構造体は DDS など生体医療に利用でき、新規バイオ材料として非常に有用である。しかし、タンパク質構造体の構造制御が難しいため、人工タンパク質ケージに関する研究例は非常に少ない。2012年 Science 誌に、融合タンパク質を利用したタンパク質ケージ構造体の構築が報告されたが、ケージの大きさを制御することは依然難しい。そこで、本研究ではドメインスワッピングを利用し、金属イオンやクラスターなどの小分子を内包できるタンパク質ケージ構造体の構築を試みた。さらに、サイズ制御が可能なケージ構造体の構築を目指し、3つのユニットからなる融合タンパク質を設計し、ケージ構造体の新規構築法の開発を試みた。

3. 研究の方法

人工合成した大腸菌 cyt b_{562} 遺伝子を pET-29b ベクターの *NdeI*-*BamHI* 制限酵素サイトに導入した。さらに、ヘムとタンパク質がチオエーテル結合を形成する cyt b_{562} の変異体(cyt cb_{562})の遺伝子を有するプラスミドを作製した。作製したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)株のコンピテントセルに導入し、cyt b_{562} および cyt cb_{562} の高発現系を構築した。cyt b_{562} (または cyt cb_{562}) を高発現する大腸菌を LB 培地で培養し、菌体を破碎すること

により cyt b_{562} (または cyt cb_{562}) を含む溶液を得た。cyt b_{562} および cyt cb_{562} は陽イオン交換カラムグラフィー (pH 5.0)、FPLC システムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (pH 8.0) により精製後、FPLC システムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。酸化型 cyt b_{562} (または cyt cb_{562}) 単量体 (1 mM) の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に酢酸を 40% (v/v) になるように添加した後、凍結乾燥により酢酸を除去した。凍結乾燥して得た粉末を 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に再溶解させることにより cyt b_{562} (または cyt cb_{562}) の多量体を得た。cyt cb_{562} 2量体は FPLC システムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

異なるホモ多量体タンパク質のサブユニット2つを3ヘリックスバンドルタンパク質で連結した融合タンパク質の遺伝子を有するプラスミドを大腸菌 Rosetta 2 (DE3) 株に導入し、融合タンパク質の高発現系を構築した。融合タンパク質を高発現する大腸菌を LB 培地で培養し、菌体破碎後の懸濁液を遠心分離することにより、融合タンパク質の封入体を沈殿として得た。沈殿を 0.2% Tween 20 および 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁させた後、遠心分離により膜成分を除去した。沈殿を 150 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁させ、遠心分離により Tween 20 を除去した。得られた沈殿にリフォールディング緩衝液 (6 M グアニジン塩酸塩、100 mM アルギニン、10 mM ジチオスレイトール、10 mM EDTA、500 mM NaCl、25 mM Tris-HCl) を加え、沈殿を溶解させ、融合タンパク質を含む溶液を得た。融合タンパク質は FPLC システムを用いた固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

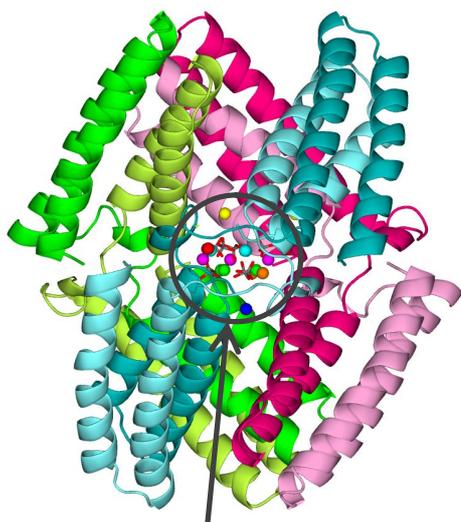
4. 研究成果

(1) シトクロム cb_{562} のドメインスワッピングとケージ形成

4ヘリックスバンドル構造を有するヘムタンパク質 cyt b_{562} および cyt cb_{562} を精製した。cyt b_{562} 溶液および cyt cb_{562} 溶液への酢酸添加、凍結乾燥、残渣再溶解の一連の操作により cyt b_{562} および cyt cb_{562} を多量化させることに成功した。cyt b_{562} 多量体溶液と cyt cb_{562} 多量体溶液をそれぞれ4で2時間および12時間静置後、サイズ排除クロマトグラフィーにより分析し安定性を比較したところ、cyt cb_{562} 多量体が cyt b_{562} 多量体より安定であることが分かった。吸収および CD スペクトルから、cyt cb_{562} の2量体が単量体に類似した活性部位構造と2次構造を有することが示唆された。また、cyt cb_{562} の2量体の酸化還元電位は単量体の電位とほぼ同じ198 mV (NHE基準) を示した。cyt cb_{562} の2量体の詳細な立体構造はX線結晶構造解析により決定した。cyt cb_{562} はドメインスワッピングにより2量体を形成し、2量体では一方のプロトマーに属する N

末端側の2本の α ヘリックスがもう一方のプロトマーに属するC末端側の2本の α ヘリックスと相互作用していることが明らかとなった。cyt *cb*₅₆₂の2量体では、N末端から数えて2番目と3番目の α ヘリックス(ヘリックス2とヘリックス3)を結ぶループ上のLys51-Asp54がヒンジループとして働いており、2量体のヘム配位構造は単量体のヘム配位構造と類似していることも明らかとなった。アポ cyt *b*₅₆₂では、タンパク質フォールディングの初期過程でヘリックス2とヘリックス3が相互作用することが報告されており、cyt *cb*₅₆₂ 2量体のドメインスワップした構造はフォールディングの初期過程で最初に形成されるヘリックス2とヘリックス3が分子間で相互作用することにより形成されると推測される。

さらに、結晶中で3つの cyt *cb*₅₆₂の2量体が特異なケージ構造を形成していた。ケージの内部空間には15個のZn²⁺と6個のSO₄²⁻から成るZn-SO₄クラスターが存在し、クラスターに含まれない6個のZn²⁺もケージ内に観察された。2量体のプロトマー間には水素結合や疎水性相互作用は見られなかったが、ケージ構造はケージ内に包まれたZn²⁺と cyt *cb*₅₆₂の2量体のアミノ酸側鎖との配位結合により安定化されていた。また、ドメインスワップした2量体では、2つの4ヘリックスバンドル構造がヒンジループを介して繋がっており、構造自由度があるヒンジループもケージ構造の安定化に寄与していると推測される。



Zn-SO₄ クラスター

図1 3つのドメインスワップした cyt *cb*₅₆₂ 2量体によるケージ構造と内包された Zn-SO₄ クラスター

ドメインスワッピングには、新たな相互作用界面などを設計することなく、新たな構造体を作り出せる利点がある。ドメインスワップした cyt *cb*₅₆₂ 2量体が金属配位によりケージ構造を形成したように、ドメインスワッピングを金属配位やタンパク質融合などの手法と組み合わせることで、新たなタンパク

質ナノ構造体が構築できると期待される。以上より、ドメインスワッピングが新しいナノ構造体の構築に有用であることが示された。

(2) 新規タンパク質構造体構築法の開発とタンパク質ケージ形成

ドメインスワッピングによるタンパク質ケージの構築を発展させ、融合タンパク質を用いて様々な形状の構造体を構築できる手法を開発し、この手法を用いて四角形やケージ構造を有するタンパク質構造体の構築を試みた。安定なホモ2量体タンパク質のサブユニット(A)のC末端 α ヘリックスに3ヘリックスバンドルタンパク質(B)を連結し、タンパク質BのC末端にフレキシブルなペプチドリンカー(GSGSG)を介して別の安定なホモ2量体タンパク質のサブユニット(C)を連結し、直線状の融合タンパク質A-B-Cを設計した。この設計では、融合タンパク質A-B-CのA部位は別のA-B-C分子のA部位、C部位は別のA-B-C分子のC部位とそれぞれ分子間で相互作用し、融合タンパク質A-B-Cが四角形の4量体を形成することを期待した。サイズ排除クロマトグラフィーとSDS-PAGEによる分析の結果、融合タンパク質A-B-Cは目的の4量体のほか、2量体や高次多量体も形成したが、精製した4量体はタンパク質濃度を変化させても安定に存在した。また、X線小角散乱分析および高速原子力顕微鏡観察により、4量体は溶液中でひずんだ四角形構造を取ることが分かった。

さらに、融合タンパク質のC部位を安定なホモ3量体タンパク質のサブユニットに変えることにより、融合タンパク質は6量体を形成した。X線小角散乱分析および高速原子力顕微鏡観察により、6量体の構造は4量体の構造よりも強固であることが示唆された。

以上の結果より、ホモ多量体タンパク質の融合タンパク質を利用することによりナノ構造体の構築に成功した。本研究で開発した手法は簡便であり、四角形やケージなど様々な構造を有するナノ構造体が構築でき、新規バイオ材料への利用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. S. Hirota, N. Yamashiro, Z. Wang, and S. Nagao, Effect of Methionine80 Heme Coordination on Domain Swapping of Cytochrome *c*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 査読有, in press
DOI: 10.1007/s00775-017-1446-3.
2. 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,

- Protein Sci.*, 査読有, 26, 2017, pp. 464–474
DOI: 10.1002/pro.3090.
3. T. Miyamoto, M. Kuribayashi, S. Nagao, Y. Shomura, Y. Higuchi, and S. Hirota, Domain-swapped Cytochrome *cb*₅₆₂ Dimer and Its Nanocage Encapsulating a Zn-SO₄ Cluster in the Internal Cavity, *Chem. Sci.*, 査読有, 6, 2015, pp. 7336–7342
DOI: 10.1039/C5SC02428E.
- [学会発表](計 15 件)
1. Takaaki Miyamoto, Shun Hirota, Protein Nanostructures Constructed by Fusing Two Oligomerization Domains with a 3-Helix Bundle Linker, 97th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2017年3月16–19日, 慶應義塾大学(神奈川県横浜市)
 2. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi, Cytochrome *c*: Domain Swapping, Self-Modification, and Molecular Recognition, 5th Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry (SABIC) (keynote lecture), 2017年1月7–11日, Kolkata (India)
 3. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Masaru Yamanaka, Yoshiki Higuchi, Construction of Heme Protein Supramolecules by Domain Swapping, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC8) (keynote lecture), 2016年12月4–9日, Auckland (New Zealand)
 4. Shun Hirota, Structure and Function of Heme Protein Oligomers Constructed by Domain Swapping, Japan-Korea-Taiwan Bioinorganic Chemistry Symposium (invited lecture), 2016年9月29–30日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
 5. Shun Hirota, Application of Supramolecular Science for Drug Design, The Symposium of Annual Scientific Meeting 2016 of Indonesian Pharmacist Association “Developing Pharmacist Role for Better Quality of Life in ASEAN Economic Community (AEC) Era” (invited lecture), 2016年9月27–29日, Jogjakarta (Indonesia)
 6. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Construction of Zn-SO₄ Cluster-encapsulating Protein Nanocage by Domain Swapping, 30th Anniversary Symposium of the Protein Society, 2016年7月16–19日, Baltimore (USA)
 7. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Partha Pratim Parui, Megha Subhash Deshpande, Chunguang Ren, Yugo Hayashi, Takaaki Miyamoto, Yin-Wu Lin, Yoshiki Higuchi, Domain Swapping in *c*-Type Cytochromes and Myoglobin, 30th Anniversary Symposium of the Protein Society, 2016年7月16–19日, Baltimore (USA)
 8. Shun Hirota, Satoshi Nagao, Yugo Hayashi, Takaaki Miyamoto, Chunguang Ren, Masaru Yamanaka, Ying-Wu Lin, Hirofumi Komori, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Domain Swapping of *c*-Type Cytochromes and Myoglobin, Ninth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-9) (invited lecture), 2016年7月3–8日, Nanjing (China)
 9. 宮本昂明、長尾駿、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 *cb*₅₆₂ 二量体が形成する Zn-SO₄ クラスター内包タンパク質ナノケージの結晶構造、第16回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7–9日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
 10. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Domain-swapped Cytochrome *cb*₅₆₂ Dimer and Its Nanocage Encapsulating a Zn-SO₄ Cluster in the Internal Cavity, 96th Chemical Society of Japan Annual Meeting, 2016年3月24–27日、同志社大学(京都府京田辺市)
 11. Shun Hirota, Construction of Heme Protein Oligomers by Domain Swapping, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), Section: Novel Heme Proteins and Model Systems (invited lecture), 2015年12月15–20日, Honolulu (USA)
 12. Takaaki Miyamoto, Mai Kuribayashi, Satoshi Nagao, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Formation of Cytochrome *cb*₅₆₂ Oligomers by Domain Swapping, 29th Annual Symposium of The Protein Society, 2015年7月22–25日, Barcelona (Spain)
 13. Shun Hirota, Construction of Dimeric Heme Proteins by Domain Swapping, 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC17) (invited lecture), 2015年7月20–24日, Beijing (China)
 14. Shun Hirota, Cytochrome *c* and Myoglobin Oligomers Formed by Domain Swapping, International Symposium on Metal Complexes (ISMEC2015) (keynote lecture), 2015年6月24–27日, Wrocław (Poland)
 15. 宮本昂明、栗林麻衣、長尾駿、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 *cb*₅₆₂ の構造と性質、第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2015年5月30–31日、長崎大学(長崎県長崎市)
6. 研究組織
(1)研究代表者
廣田 俊 (HIROTA, Shun)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・教授
研究者番号：90283457

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
樋口 芳樹 (HIGUCHI, Yoshiki)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：90183574

長尾 聡 (NAGAO, Satoshi)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・助教
研究者番号：30452535

(4)研究協力者
なし