

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24750163

研究課題名(和文)ドメインスワッピングによるタンパク質多量化を利用した機能性分子配列

研究課題名(英文)Functional molecular arrangements utilizing protein oligomerization by domain swapping

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：超分子は複数の分子が制御された分子間相互作用によって集合した分子である。本研究では、ドメインスワッピングによるタンパク質多量化を利用して機能性分子配列を行い、それらの構造と機能を調べた。ヘム鉄を亜鉛に置換して光応答性を付加したシトクロムcはドメインスワッピングにより多量体を形成し、単量体の構造と光化学的性質を保持したまま超分子化することが明らかとなった。また、ヘムタンパク質のミオグロビンとシトクロムc551のドメインスワップ多量体の構造と機能を明らかにした。これらの結果より、ドメインスワッピングを利用した機能性分子配列は多くのタンパク質に適用可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Supramolecules have been known as the molecules assembled with the regulated intermolecular interactions. In this research, we tried to arrange functional molecules with protein oligomerization by domain swapping and investigated their structure and function. We succeeded to construct zinc-substituted cytochrome c oligomers from monomers, and showed that the structural and photochemical properties did not change after oligomerization. We also showed that the carbon monoxide binding rate constant of dimeric myoglobin was about twice larger than that of the monomer, although the active site structure was similar between the monomer and dimer. We showed that cytochrome c551 formed dimers by domain swapping and retained the redox potential after dimerization. These results suggest that protein oligomerization by domain swapping can be useful to arrange functional molecules.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：タンパク質超分子 機能性分子 ドメインスワッピング 多量体

1. 研究開始当初の背景

(1) 超分子は複数の分子が共有結合以外の分子間相互作用によって集合した分子である。近年の超分子化学の発展は目覚ましく、超構造を有する分子や高度な機能をもつ分子など、従来の化学合成法ではつくるのが難しい新規分子が次々とつくられている。

(2) 生体内には二重らせん構造の DNA や脂質二重膜など天然の超分子が多く存在する。ポリペプチドからなるタンパク質にも超分子を形成して機能するものがある。例えば、光合成系の光捕集アンテナ分子(図1)のように、タンパク質が形成する超構造によってバクテリオクロフィルなどの機能性分子が規則正しく精密に配列し、単体では実現不可能な高率的の光エネルギー移動を行っている。

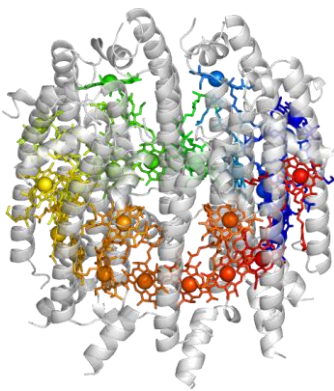


図1 光捕集アンテナ分子 LH2 の構造 (PDB: 1LGH)。バクテリオクロフィル Mg 錯体が環状に配列している。

2. 研究の目的

(1) 私達は超分子のさらなる機能化のため、高度に組織化されたタンパク質を使った超分子を人工的に作れるのではないかと考えた。タンパク質の中には前述のバクテリオクロフィル以外にも様々な機能性分子を有するものが存在し、そのようなタンパク質の超分子を自在に構築できれば、機能性分子を精密に配列することができる。

ヘムタンパク質は機能性分子の鉄ポルフィリン錯体(ヘム)を活性中心に有するタンパク質である。ヘムタンパク質はヘム鉄に結合する配位子やヘム周囲のアミノ酸残基によって機能が制御され、酸化還元反応や酸素結合など様々な機能を示す。また、ヘム鉄を亜鉛に置換した亜鉛ポルフィリンは光応答性をもつことも知られている。

(2) 1990年代に入り、単量体のタンパク質が部分構造を分子間で置き換えて(ドメインスワッピング)多量体をつくることになってきた。リボヌクレアーゼ A では、タンパク質の N 末端領域や C 末端領域を交換した異なる 2 量体や環状 3 量体などの多量体構造が報告されている。一方で、私達はこれまでにウ

マシトクロム *c* やウマミオグロビンなど様々なヘムタンパク質のドメインスワップ多量体の構造を明らかにしてきた。本研究では、ドメインスワッピングによるタンパク質多量体を利用した機能性分子配列を目的として、ドメインスワッピングによる多量化がタンパク質の構造および機能に及ぼす影響について検討した。具体的には、光応答性を有する亜鉛置換シトクロム *c* を多量化し、多量体の構造と光化学的特性を調べた。また、電子伝達を機能とする緑膿菌由来シトクロム *c*₅₅₁ と酸素や一酸化炭素(CO)と結合するミオグロビンの多量体の構造および機能をそれぞれ調べた。

3. 研究の方法

(1) ヘムタンパク質であるウマシトクロム *c* のヘム鉄をフッ化水素との反応により取り除き、その代わりに亜鉛挿入した光応答性の亜鉛置換シトクロム *c* を作製した。亜鉛置換シトクロム *c* のドメインスワップ多量体を形成させ、それらの亜鉛置換シトクロム *c* の吸収、円二色性(CD)、蛍光スペクトルを測定し、多量体における亜鉛ポルフィリン近傍の構造を調べた。また、溶液中の多量体構造を X 線小角散乱測定により調べた。

(2) 緑膿菌由来シトクロム *c*₅₅₁ とウマミオグロビンのドメインスワップ多量体を作製し、それぞれの二量体の構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。シトクロム *c*₅₅₁ 2 量体の酸化還元電位とミオグロビン 2 量体の CO 結合挙動を調べ、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) ウマシトクロム *c* をフッ化水素-ピリジン溶液と反応させ、その後酢酸亜鉛と混合することにより亜鉛置換シトクロム *c* を調製した。亜鉛置換シトクロム *c* 溶液に終濃度 60% (v/v) になるようにエタノールを添加した後、凍結乾燥し、試料を緩衝液に再溶解させると、2 から 4 量体までの亜鉛置換シトクロム *c* 多量体が形成した。それぞれの多量体をゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。亜鉛置換シトクロム *c* の 2 から 4 量体は単量体と吸収および蛍光スペクトルが類似していたことから、活性部位構造および光化学的特性は多量体と単量体で大きな違いが無いことが示された(図2)。また、CD スペクトル測定より、二次構造も多量体と単量体で類似していることが分かった。これらの結果は亜鉛置換シトクロム *c* が単量体の構造および光化学的性質を保持して多量体を形成可能であることを示唆している。X 線溶液散乱測定により、亜鉛置換シトクロム *c* は多量化すると、鎖状に連結した構造をとることが明らかとなった(図3)。多量体の鎖状構造は、天然のシトクロム *c* においても観測されており、ヘム鉄の亜鉛置換は多量体の溶液構造にも大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

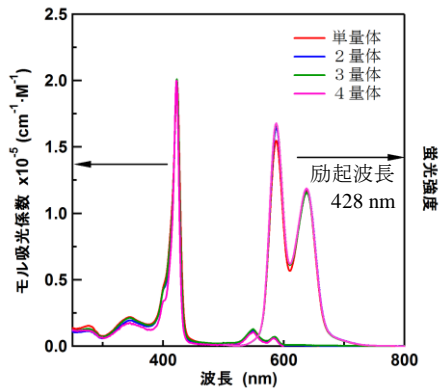


図2 亜鉛置換シトクロム *c* の単量体(赤)、2量体(青)、3量体(緑)、4量体(桃)の吸収および蛍光スペクトル。

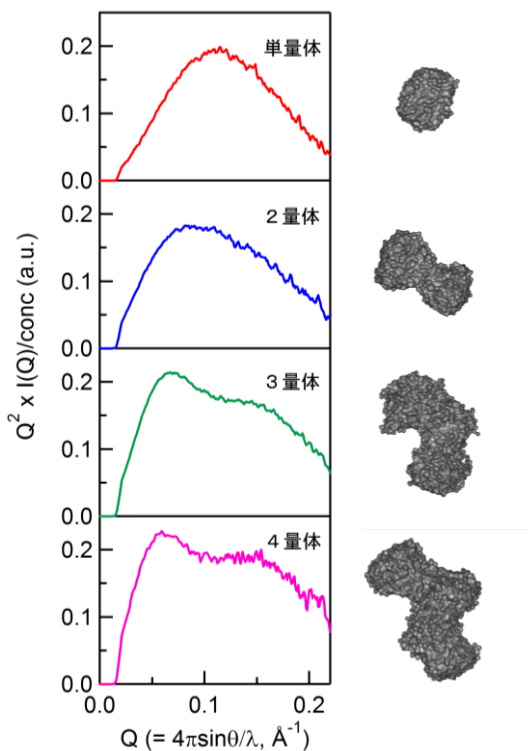


図3 亜鉛置換シトクロム *c* の X 線溶液散乱曲線(左)と散乱曲線より計算されたモデル構造(右)。

(2) 緑膿菌由来シトクロム *c*₅₅₁ に終濃度 80% (v/v) になるようにエタノールを添加し、得られた沈殿を緩衝液に再溶解させ、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分析すると、2 から 4 量体のシトクロム *c*₅₅₁ 多量体が形成していた。吸収および CD スペクトルにより、精製したシトクロム *c*₅₅₁ 2 量体は単量体で類似した活性部位および二次構造を有することが示された。サイクリックボルタンメトリー測定により、シトクロム *c* は 2 量化しても単量体と酸化還元電位がほとんど変わらないことが明らかとなった。X 線結晶構造解析により、シトクロム *c*₅₅₁ 2 量体は N 末端ヘリックスとヘムを含む領域を分子間で交換した構造をとっており、C 末端ヘリックスを交

換するウマシトクロム *c* とは異なるドメインスワップ構造をとることが明らかとなった(図4)。これらの構造の違いから、同じシトクロム *c* ファミリーに属するタンパク質であっても、ドメインスワッピングにおいて交換する構造領域と残りの構造領域を繋ぐヒンジープと呼ばれる部分がシトクロム *c* の種類によって異なることが分かった。緑膿菌由来シトクロム *c*₅₅₁ とウマシトクロム *c* のドメインスワッピングにおけるヒンジープはそれぞれのタンパク質において知られている最も不安定な部分構造と一致していたことから、構造の不安定な領域がヒンジープになる傾向があることが示唆された。また、ヘムの配位子である 61 番目のメチオニン残基をアラニンに置換するとタンパク質の二次構造が僅かに崩れ、多量体をほとんど形成しなかったため、タンパク質の二次構造の安定性が多量体形成に重要であることが分かった。

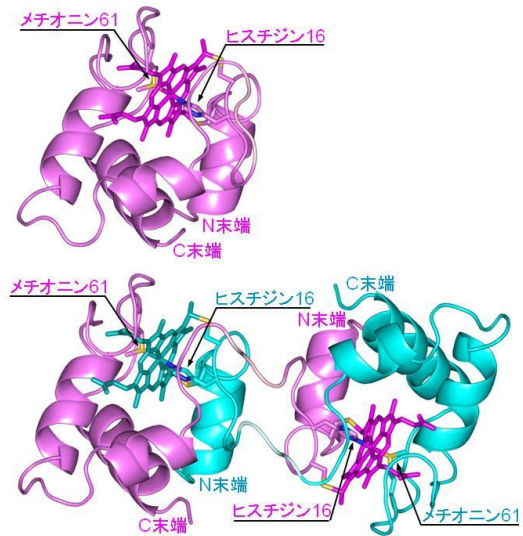


図4 シトクロム *c*₅₅₁ 単量体(上、PDB:351C)と2量体(下、PDB: 3X39)の構造。

(3) ウマミオグロビンに終濃度 10% (v/v) となるようにエタノールを添加した後、凍結乾燥し、得られた粉末を緩衝液に溶解した。ゲルろ過クロマトグラフィーにより、2 量体を精製した。2 量体のヘム鉄を CO 雰囲気下においてジチオナイトで還元し、CO 結合型ミオグロビンを調製した。吸収、赤外振動、ラマン共鳴スペクトル測定により、ミオグロビンのヘム鉄に結合している CO 周辺の環境は 2 量体と単量体で類似していることが示された。光照射したミオグロビンではヘム鉄から CO が外れ、デオキシ状態と呼ばれるヘム 5 配位構造をとる。光照射後のミオグロビン 2 量体と単量体のナノ秒時間領域における構造変化の速度には大きな差が見られなかった。一方、CO 再結合は 2 量体の方が単量体よりも約 2 倍速いことが明らかとなった。2 量体では、CO を取り込むと考えられている

部位が単量体よりも拡張しており（図5）、この構造の違いがCO結合速度の増加に繋がったと考えられる。

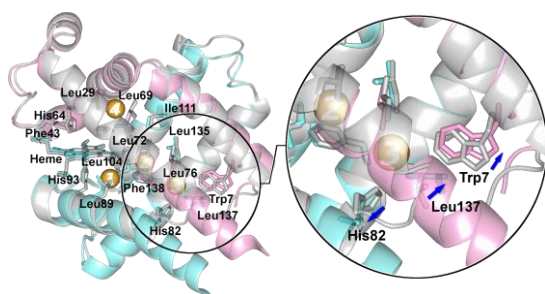


図5 ミオグロビン2量体（水色と桃色、PDB: 3VM9）と単量体（灰色、PDB: 1WLA）の構造を重ねた図。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計5件）

① Satoshi Nagao, Mariko Ueda, Hisao Osuka, Hirofumi Komori, Hironari Kamikubo, Mikio Kataoka, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Domain-Swapped Dimer of *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome *c*₅₅₁: Structural Insights into Domain Swapping of Cytochrome *c* Family Proteins, *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0123653

DOI: 10.1371/journal.pone.0123653

② Satoshi Nagao, Haruto Ishikawa, Takuya Yamada, Yasuhisa Mizutani, Shun Hirota, Carbon Monoxide Binding Properties of Domain-Swapped Dimeric Myoglobin, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 査読有, 20, 2015, 523–530

DOI: 10.1007/s00775-014-1236-0

③ Ying-Wu Lin, Satoshi Nagao, Mohan Zhang, Yasuhito Shomura, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Rational Design of Heterodimeric Protein Using Domain Swapping for Myoglobin, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有, 54, 2015, 511–515

DOI: 10.1002/anie.201409267

〔学会発表〕（計7件）

① Satoshi Nagao, Ying-Wu Lin, Haruto Ishikawa, Takuya Yamada, Mohan Zhang, Yasuhito Shomura, Yasuhisa Mizutani, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Design and properties of domain-swapped dimeric myoglobin, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月27日、日本大学（千葉県・船橋市）

② Satoshi Nagao, Hisao Osuka, Takuya Yamada, Takeshi Uni, Yasuhito Shomura, Kiyohiro Imai, Yoshiki Higuchi, Shun Hirota, Structural and

ligand binding properties of dimeric horse myoglobin, The 28th Annual Symposium of the Protein Society, 2014年7月28日, San Diego (USA)

③ 小林 紀、北田 有希恵、長尾 聡、廣田俊、シトクロム*c*とリン脂質二分子膜の相互作用に関する分光学的研究、日本化学会第94春季年会、2014年3月30日、名古屋大学（愛知県・名古屋市）

④ 長尾 聡、富岡 勇也、諸井 麻希、廣田俊、亜鉛置換ヘムタンパク質多量体の分子構造と光化学的性質、日本化学会第94春季年会、2014年3月30日、名古屋大学（愛知県・名古屋市）

⑤ 長尾 聡、富岡 勇也、諸井 麻希、廣田俊、ドメインスワッピングを利用した亜鉛置換シトクロム*c*の多量体形成、日本化学会第93春季年会、2013年3月23日、立命館大学（滋賀県・草津市）

⑥ 長尾 聡、富岡 勇也、諸井 麻希、廣田俊、ドメインスワッピングを利用した亜鉛置換ヘムタンパク質の多量体形成、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月8日、北海道大学（北海道・札幌市）

〔その他〕

① 廣田 俊、長尾 聡、タンパク質超分子をパズルのように創る、月刊化学、69、2014、45-49

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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

上久保 裕生 (KAMIKUBO, Hironari)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

富岡 勇也 (TOMIOKA, Yuya)

諸井 麻希 (MOROI, Maki)