

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

タンパク質ポリマー化の機構解明とタンパク質超分子の創成

2. 研究代表者

廣田 俊（奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 教授）

3. 研究シーズ探索成果の概要

タンパク質はアミノ酸配列に従って特定の立体構造を形成し機能を発現するが、変性すると凝集体を形成することが多い。タンパク質凝集体はコンフォメーション病（アルツハイマー病、パーキンソン病、牛海綿脳症など）と関連が深く、その形成機構の解明は生命科学の最重要課題の一つである。電子伝達タンパク質であるシトクロム *c* (cyt *c*) は単量体で機能し、変性すると多量体を形成することが 50 年前から知られていたが、多量体形成機構は不明であった。本研究課題では、変性過程で生じる種々の大きさの cyt *c* 多量体を作製、単離することに成功した。Cyt *c* 2 量体と 3 量体の X 線結晶構造解析に成功し、C 末端領域の α ヘリックスを交換したドメインスワッピングにより、酸化型 cyt *c* 多量体が連続的に形成するポリマー化機構を明らかにした。また、cyt *c* 多量体の形成制御を行い、タンパク質超分子の創成を行った。目論見通りの結果が得られ、タンパク質超分子の研究は将来的に推進すべき研究シーズであることを確認できた。

4. 研究シーズ探索のねらい

本研究課題では、広い視野でタンパク質科学と超分子科学を融合し、タンパク質変異と生体超分子を新しい視点から研究することを目的とした。電子伝達タンパク質であるシトクロム *c* (cyt *c*) は単量体で機能し、変性すると多量体を形成することが 50 年前から知られていた。本研究課題では、cyt *c* における初期凝集体の構造を X 線結晶構造解析などにより見積もり、これまで不明であった cyt *c* ポリマー化の反応メカニズムを解明するとともに、タンパク質多量体の形成制御を行い、新規タンパク質超分子の創成を目指した。cyt *c* 多量体を作製後、中高圧クロマトグラフィーシステムにより種々な大きさの cyt *c* 多量体を精製し、cyt *c* 多量体の構造と機能を調べた。cyt *c* 多量体の形成制御は、ポリエチレングリコールとの相互作用やタンパク質変異体作製などにより試みた。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

酸化型ウマ cyt *c* 水溶液にエタノールを添加し、凍結乾燥することで cyt *c* 多量体を作製後、ゲルろ過クロマトグラフィーを繰り返し行い、cyt *c* 単量体、2~4 量体、約 40 量体を精製した。cyt *c* 単量体、2~4 量体、約 40 量体の活性部位と二次構造をそれぞれ紫外可視吸収スペクトルおよび円偏光二色性 (CD) スペクトルにより調べた。cyt *c* 2 量体と 3 量体の結晶構造と溶液構造をそれぞれ X 線結晶構造解析と X 線溶液散乱測定により調べた。示差走査熱量測定により

cyt *c* 2~4 量体の熱安定性を調べた。cyt *c* 2 量体と単量体のペルオキシダーゼ活性を比較するため、グアイアコールと 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)を基質として過酸化水素による酸化反応を調べた。緑膿菌由来 cyt *c*₅₅₁ の大腸菌発現系を用いて、メチオニンを除去した変異型タンパク質を作製し、多量体形成能を調べた。

5. 2 成果

酸化型 cyt *c* 2~4 量体の紫外可視吸収スペクトルでは、Soret 帯の吸収極大波長は単量体で観測される 409 nm から短波長シフトして 406.5 nm に観測され、Soret 帯の強度も増大した(図 1)。酸化型 cyt *c* の単量体で観測され、鉄-メチオニン (Met) 結合に由来する 695 nm の吸収帯は cyt *c* 2~4 量体では強度が著しく減少した。このことより、cyt *c* 2~4 量体では鉄-Met 結合が解離していることが示唆された。(図 2)。cyt *c* 2~4 量体は 70 °C で 5 分間

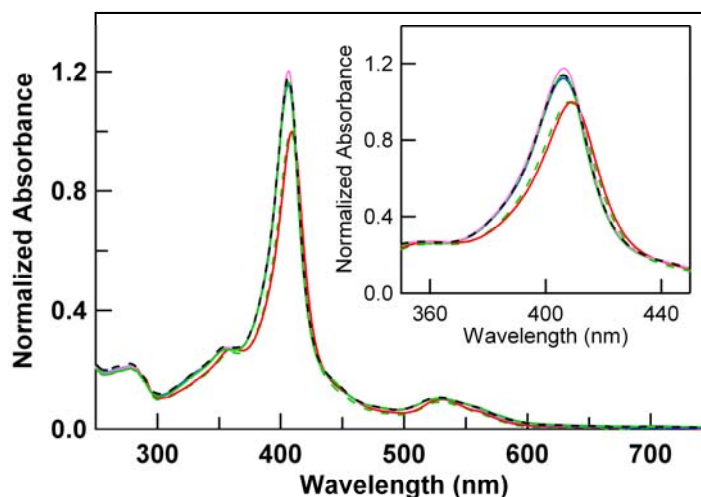


図 1. 酸化型 cyt *c* 単量体と多量体の吸収スペクトル。(挿入図) Soret 帯付近の拡大図。単量体(赤)、2量体(青)、3量体(緑)、4量体(桃)のスペクトルを示した。黒破線は 40 量体、緑波線は 3 量体を 70 °C、5 分間加熱した後のスペクトルを表す。

インキュベートすると単量体と同様の吸収スペクトルを示した。以上の結果より、cyt *c* 2~4 量体では鉄-Met 結合が解離しており、70 °C で 5 分間インキュベートすることにより多量体が単量体に解離し、Met がヘムに再配位することが明らかになった。CD スペクトルでは、2~4 量体の 208 nm のピーク強度は単量体より少し増大した(図 3)。また、40 量体付近の多量体の吸収および CD スペクトルは cyt *c* 2~4 量体のスペクトルとほぼ同様の

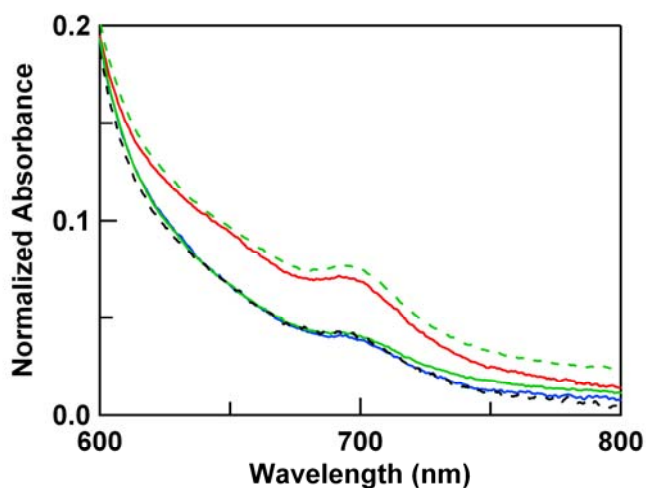


図 2. 酸化型 cyt *c* 単量体と多量体の吸収スペクトル。単量体(赤)、2量体(青)、3量体(緑)のスペクトルを示した。黒破線は 40 量体、緑波線は 3 量体を 70 °C、5 分間加熱した後のスペクトルを表す。

スペクトルを示した。以上の結果から、cyt *c* 2~4 量体や 40 量体の活性部位構造や二次構造はそれぞれ似ているが、単量体の構造とは若干異なることが明らかになった。

X線結晶構造解析により、cyt *c* 2量体および3量体は各cyt *c*モノマーユニットのC末端の α ヘリックスが外れ、この領域が別の分子の対応する部位に結合するドメインスワッピング構造を有することが判明した(図4、橙色の囲み構造)。ポリエチレングリコール200(PEG200)と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 存在下では、3量体は環状構造を形成することが分かった。結晶中のcyt *c* 2量体および3量体の構造では、鉄-Met結合が解離しており、代わりにOH⁻がヘムに配位していた。また、X線溶液散乱測定により、水溶液中のcyt *c* 2~4量体は直鎖状に連なって伸びた構造をしており、cyt *c* 3量体はPEG200と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を加えると直鎖状構造から環状

構造に変化することが分かった。以上の結果より、cyt *c*多量体は溶液中で直鎖状構造を形成するが、PEGと $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を加えると3量体は環状構造に変化することが示唆された。

示差走査熱量測定では、cyt *c* 2~4量体はすべて約58°Cで単量体に解離した。2量体、3量体および4量体が単量体に解離するときのエンタルピー変化(ΔH)はそれぞれ約-40、-60および-80 kcal/molであった。この結果は、各多量体が単量体に解離するとき、モノマーユニット当たり約20 kcalのエネルギーを放出することを示しており、このエネルギーはMetがヘムに再配位することによる安定化エネルギーに対応すると推測された。

グアイアコールまたはABTSを基質としてペルオキシダーゼ活性を測定したところ、cyt *c* 2量体のほうが単量体よりも大きかった。この原因は、cyt *c* 2量体で鉄-Met結合が解離するため、ヘム鉄と過酸化水素との結合が促進したためと解釈した。

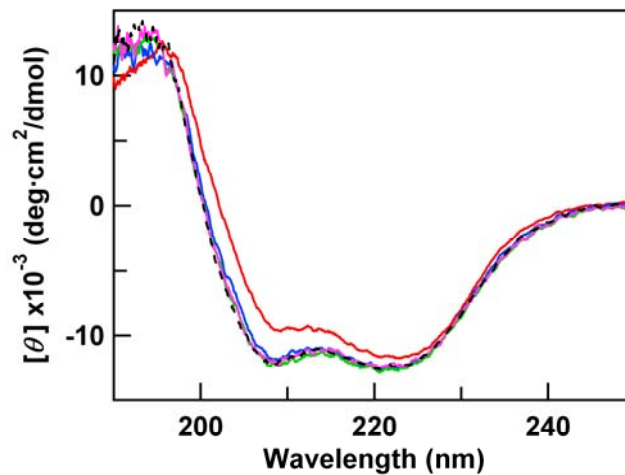


図3. 酸化型 cyt *c* 単量体と多量体の CD スペクトル。単量体(赤)、2量体(青)、3量体(緑)、4量体(桃)のスペクトルを示した。黒破線は40量体のスペクトルを表す。

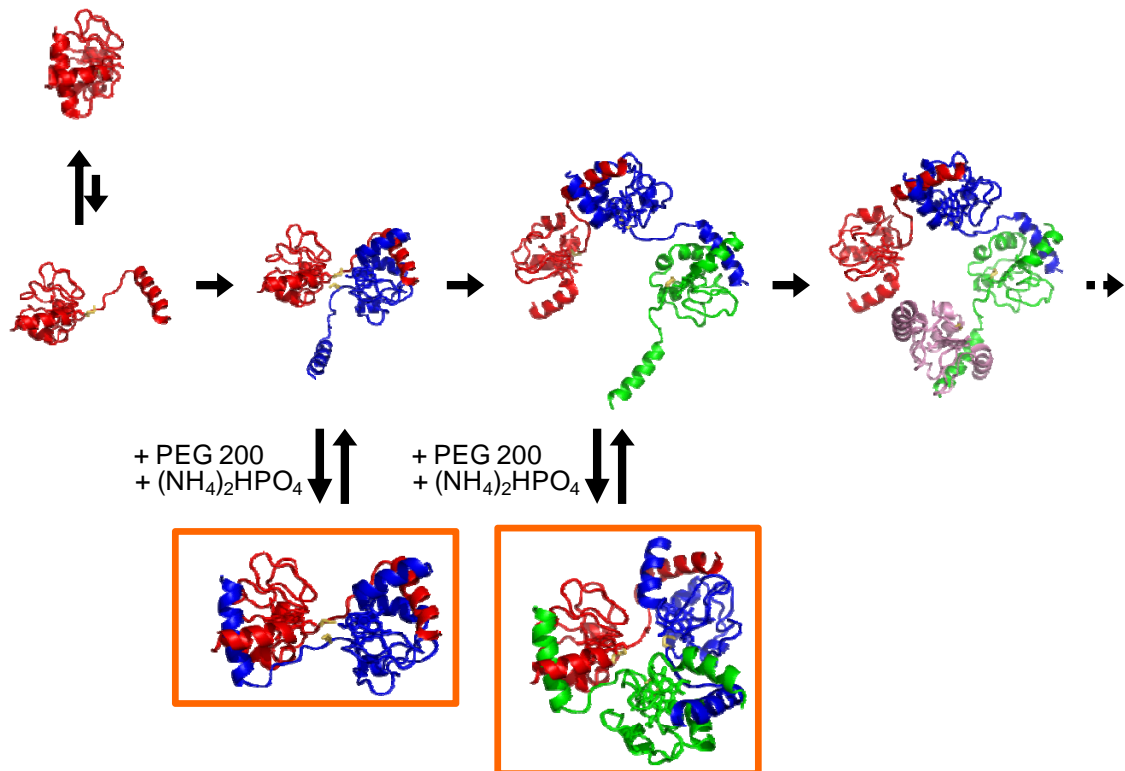


図 4. cyt *c* のポリマー化機構

多量体形成にヘムに配位したメチオニン残基が影響すると考え、緑膿菌由来 cyt c_{551} のメチオニンを除去した変異型タンパク質を作製した。野生型 cyt c_{551} は 80%エタノール添加により多量体を形成したが、変異型 cyt c_{551} は野生型タンパク質と比べて α ヘリックスの安定性が低下したため、多量体を形成することができなかった。

以上より、cyt *c* 2~4 量体と 40 量体付近の多量体のヘム配位構造と二次構造はそれぞれ類似しており、酸化型ウマ cyt *c* は C 末端領域が連続的にドメインスワッピングし、タンパク質が直鎖状に連なってポリマー化することが判明した(図 4)。また、PEG 200 と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を加えることで、cyt *c* を直鎖状構造から環状構造に変換させることができた。しかし、変異型タンパク質を用いて多量体を作製することはできなかった。変異体を用いてタンパク質超分子を作製するには、さらに詳細な分子設計が必要となる。

6. 自己評価

本研究課題の当初の目標は、タンパク質としてヘムを有する cyt *c* を取り上げ、初期凝集体の構造を X 線結晶構造解析などにより見積もり、これまで不明であった cyt *c* ポリマー化の反応メカニズムを解明するとともに、タンパク質多量体の形成制御を行い、新しいタンパク質超分子を創成することであった。本研究課題では、cyt *c* 2~4 量体と 40 量体付近の多量体のヘム配位構造と二次構造を紫外可視吸収スペクトルや CD スペクトルにより調べ、C 末端領域が連続的にドメインスワッピングすることにより酸化型ウマ cyt *c* が直鎖状に連なってポリマー化する機構を明らかにした。約 50 年間不明であった cyt *c* のポリマー化機構を明らかにし、新しいタンパク質変性機構を発見した学術的意義は非常に大きい。さらに、タンパク質多量体形成を cyt *c* や他のタンパク質で行い、一年間の目標は概ね達成できた。しかし、変異体を使ったタンパク質多量体の形成制御など、まだ残されている課題も多い。研究成果は出始めたばかりであるので、今後、本研究課題で推進したタンパク質多量体の研究が新規タンパク質超分子の創製へと発

展することを期待する。

7. PO の見解

本研究はタンパク質多量体の作製法を確立し、そのポリマー化機構を解明し、新規機能性タンパク質多量体の開発につなげようとするものである。エタノール添加によりシトクロム *c* や他のタンパク質の多量体分子を作製し、精製を行った。また、その多量体を分離、結晶化し、その構造を明らかにするとともに、ポリマー化機構を説明している。

アミロイド繊維はアルツハイマー病、パーキンソン病等で観測されており、ポリマー化機構の解明はこれらの病気への対処にもつながることが期待される。生体内でのこのような単量体から多量体への構造変化が生理的にどのような意味を持つのかが解明できれば、医薬、薬学との連携により、おおきな発展が考えられる。タンパク質の構造変化の一般化、生理学的意味、病気との関連等、これからの一層の研究が必要である。融合分野の端緒を示したものといえる。

8. 研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

©S. Hirota, N. Tanaka, I. Micetic, P. Di Muro, S. Nagao, H. Kitagishi, K. Kano, R. S. Magliozzo, J. Peisach, M. Beltramini, L. Bubacco, Structural Basis of the Lactate-Dependent Allosteric Regulation of Oxygen Binding in Arthropod Hemocyanin, *J. Biol. Chem.*, 285, 19338-19345, 2010, DOI: 10.1074/jbc.M109.076067.

©S. Hirota, Y. Hattori, S. Nagao, M. Taketa, H. Komori, H. Kamikubo, Z. Wang, I. Takahashi, S. Negi, Y. Sugiura, M. Kataoka, Y. Higuchi, Cytochrome *c* Polymerization by Successive Domain Swapping at the C-Terminal Helix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 12854-12859, 2010, DOI: 10.1073/pnas.1001839107.

© M. Taketa, H. Komori, Y. Hattori, S. Nagao, S. Hirota, Y. Higuchi, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Dimeric and Trimeric Cytochromes *c* from *horse* Heart, *Acta. Crystallogr. Sect. F*, 66, 1477-1479, 2010, DOI: 10.1107/S1744309110034913.

他 6 報

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) 口頭発表

①学会

国内 10 件, 海外 0 件

・服部洋子、長尾聡、竹田翠、上久保裕生、根木滋、杉浦幸雄、片岡幹雄、樋口芳樹、廣田俊、「シトクロム *c* 二量体と三量体の構造および熱力学的性質」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月

・上田真理子、長尾聡、廣田俊、「緑膿菌由来シトクロム *c*₅₁ 多量体の作製」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月

- ・山田卓矢、大須賀久織、長尾聡、廣田俊、「ミオグロビン二量体の構造とリガンド結合挙動に関する研究」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月
- ・長尾聡、雨貝真実、山田卓矢、廣田俊、「ミオグロビン二量体の構造に関する NMR 研究」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月
- ・雨貝真実、長尾聡、廣田俊、「ミオグロビン二量体の NMR による構造解析」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月
- ・廣田俊、服部洋子、長尾聡、竹田翠、上久保裕生、根木滋、杉浦幸雄、片岡幹雄、樋口芳樹、「酸化型ウマシトクロム *c* の多量体構造とポリマー化機構」、第 37 回生体分子科学討論会、2010 年 6 月
- ・Shun Hirota, Yoko Hattori, Satoshi Nagao, Midori Taketa, Hirofumi Komori, Hironari Kamikubo, Zhonghua Wang, Isao Takahashi, Shigeru Negi, Yukio Sugiura, Mikio Kataoka, Yoshiki Higuchi, “C 末端ヘリックスの連続ドメインスワッピングによるシトクロム *c* ポリマー化 (Cytochrome *c* Polymerization by Successive Domain Swapping at the C-terminal Helix)”, The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2010 年 9 月
- ・上田真理子、長尾聡、廣田俊、「シトクロム *c* およびシトクロム *c*₅₅₁ の構造変化と多量体生成」第 4 回バイオ関連化学シンポジウム(第 25 回生体機能関連化学シンポジウム)、2010 年 9 月
- ・廣田俊、服部洋子、長尾聡、竹田翠、上久保裕生、根木滋、杉浦幸雄、片岡幹雄、樋口芳樹、「酸化型ウマシトクロム *c* の多量体形成とポリマー化」、第 2 回 メタロミクス研究フォーラム、2010 年 11 月
- ・長尾聡、雨貝真実、宇仁武史、廣田俊、「ウマミオグロビン二量体の NMR による構造研究」、NMR 討論会、2010 年 11 月

②その他

国内 0 件、 海外 0 件

(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

招待講演

- ・Shun Hirota, “Protein Supramolecules and Photoactive Bio-Related Compounds”, 2nd WCU Symposium on Nanobio Materials and Electronics (WCU-02), (Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, Korea), 2010 年 4 月
- ・Shun Hirota, “Protein and Peptide Structural Changes: Protein Aggregation and Photoactive Biomaterials”, Nanotechnology and Medical Sciences (ICNMS-2010), (Kolhapur, India), 2010 年 10 月

講演

- ・Shun Hirota, “Proteins, Peptides and Inorganic Compounds Incorporated with Photo-Triggering and Photo-Regulating Properties”, Seminar at Department of Chemistry and Chemical Biology, Cornell University, (Cornell University, Ithaca, New York), 2010 年 3 月
- ・Shun Hirota, “Investigation and Regulation of Protein and Peptide Structural Changes”, Seminar at Department of Chemistry, Fudan University, (Shanghai, China), 2010 年 5 月
- ・Shun Hirota, “Investigation and Regulation of Protein and Peptide Structural Changes”, Seminar at Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole Polytechnique, (Paris, France), 2010 年 9 月
- ・Shun Hirota, “Investigation and Regulation of Protein and Peptide Structural Changes”, Seminar at Department of Chemistry, Birla Institute of Technology & Science, Pilani - Goa, (Goa, India), 2010 年 10 月