

2024 年度年次報告書

原子・分子の自在配列・配向技術と分子システム機能

2020 年度採択研究代表者

廣田 俊

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
教授

3Dドメインスワッピングを利用したタンパク質の自在配列と機能化

主たる共同研究者:

重田 育照 (筑波大学 計算科学研究センター 教授)

一二三 恵美 (大分大学 研究マネジメント機構 教授)

研究成果の概要

ミオグロビン(Mb)のヒンジ領域にアラニンを1～3個挿入した変異体を用いて、アポ型Mbの3Dドメインスワッピング(3D-DS)2量体の安定性とヘム挿入の関係を調査した。Mbの3D-DS 2量体のヒンジ領域のヘリックスの安定性が2量体の形成割合に影響することを示し、生体内でのMb 2量体の形成量が折り畳み反応中のアポ単量体-2量体の平衡に依存することを提唱した¹⁾。抗体軽鎖#4の可変領域である#4V_Lは2つの3D-DS 2量体により4量体を形成し、単量体と4量体の平衡状態にあるが、#4C214AのストランドAのVal2とストランドG(スワッピング領域)のThr97をCys残基に置換し、異なるプロトマーのストランドAとGでCys2-Cys97ジスルフィド結合を導入することにより、単量体と4量体を安定化することに成功した²⁾。実験において#4V_Lの2量体が検出されない理由を理解するため、新たに開発した溶媒和に基づく統合主成分分析(3D-RISM/PCA)法と空間クラスタリングを用いて#4V_Lの3D-DS 2量体のシミュレーションを行い、4量体を形成しないと#4V_Lの3D-DS 2量体が自発的に解離することを示した³⁾。シトクロムc₅₅₅を基に作製した3D-DSを示す人工タンパク質と紅色硫黄菌シトクロムc'を組み合わせて、還元条件下でのCO添加や空気下でのイミダゾール添加など、リガンド結合によって超分子化が制御される3D-DS 2量体のリング状および直線状集合体を構築した⁴⁾。空孔を有する安定な正三角形構造の環状タンパク質を作製するため、開環構造のOP-(c₅₅₅)₃を作製した後、ソルターゼAを用いてOP-(c₅₅₅)₃のN末端とC末端をペプチド結合で繋いで閉環構造のCL-(c₅₅₅)₃を作製した。CL-(c₅₅₅)₃はOP-(c₅₅₅)₃より熱安定性が高く、CL-(c₅₅₅)₃は結晶中で積み重なって、直径約16 Åと30 Åの2つの細孔を有するナノ多孔性超分子構造を構築した⁵⁾。

【代表的な原著論文情報】

- 1) Novientri, G., Takeda, K., Duan, L., Hengphasatporn, K., Shigeta, Y., Xie, C., Mashima, T., Hirota, S. Apoprotein Intermolecular Interactions and Heme Insertion for 3D Domain Swapping in Myoglobin. *ACS Omega*, **10**, 7039-7047 (2025).
- 2) Fitriana, W., Sakai, T., Duan, L., Hengphasatporn, K., Shigeta, Y., Mashima, T., Uda, T., Hifumi, E., Hirota, S. Experimental and Computational Studies on Domain-Swapped Structure Stabilization of an Antibody Light Chain by Disulfide Bond Introduction. *Journal of Medicinal Chemistry*, **67**, 22313-22321 (2024).
- 3) Duan, L., Hengphasatporn, K., Sakai, T., Fujiki, R., Yoshida, N., Hirota, S., Shigeta, Y. Why is Dimeric 3D Domain Swapping in Antibody Light Chains Missing from the Solution? Atomistic Insights Mechanisms. *Journal of Physical Chemistry B*, **128**, 9086-9093 (2024).
- 4) Mashima, T., Yamanaka, M., Yoshida, A., Kobayashi N., Kanaoka, Y., Uchihashi, T., Hirota, S. Construction of Ligand-Binding Controlled Hemoprotein Assemblies Utilizing 3D Domain Swapping. *Chemical Communications*, **60**, 9440-9443 (2024).
- 5) Novientri, G., Fujiwara, K., Mashima, T., Matsuura, H., Ogata, H., Uchihashi, T., Fujii, S., Sambongi, Y., Hirota, S. Construction of a Cyclic Regular-Triangle Trimer of Cytochrome c₅₅₅ with a Central Hole Using Sortase A. *Chemistry – A European Journal*, **31**, e202404736 (2025).