

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04887

研究課題名(和文)革新的多機能性タグペプチドの開発

研究課題名(英文)Development of innovative and versatile tag-peptide sequences

研究代表者

藤枝 伸宇(Fujieda, Nobutaka)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00452318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、標的となるタンパク質・測定対象に与える影響を最小限にしたタグペプチドによるタンパク質標識を目指し、新奇な補因子を持ったペプチドやタンパク質の開発を行ってきた。金属結合ペプチドやタンパク質を用いて、その系中で金属による酸化自己修飾反応を制御し、翻訳後化学修飾を誘起して自発的に形成される新たなクロモフォア、フルオロフォアを持った人工タグペプチドやタンパク質の検索を行った。金属結合部位として銅に対して選択的に結合するATCUN配列や金属結合タンパク質に着目した。結合部位と反応部位を各々または同時に検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

緑色蛍光タンパク質などにおいては標的タンパク質が発現されるに伴って自発的に蛍光団が形成するため、利用部位を問わない。そのため、他の手法とは一線を画し、簡便でかつ、生きたままに最も近い生細胞の状態が直接観測可能となる。本研究ではこのタンパク質の小型化をはかり、生細胞に影響を与えないまま、適応範囲を拡張できる。

研究成果の概要(英文)：Some copper oxidases bear the cofactors which is generated by post-translationally chemical modification of the corresponding amino acid side chains near the copper active center. If such unusual cofactors are able to be formed on the small peptide and proteins, they will be promising tools for the modification of protein and the direct observation of the labeled-proteins in the cells. In this study, we have prepared rationally designed copper-binding peptides and proteins, which can induce the organic cofactors by posttranslationally chemical modifications. The structures and spectroscopic properties of the generated unusual amino acids were examined by several analytical methods including MS analysis and UV-vis spectroscopy.

研究分野：生体関連化学

キーワード：N末端修飾

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を選択的に標識する方法の開発は未だ重要な課題の一つである。標識されたタンパク質は対応する分析方法で検出可能となり、特定酵素種の定量、精製過程における追跡など臨床・研究を問わず、多様な応用が可能になる。また、近年では様々なコンパートメントに分割されている生細胞内で、相互に作用する複数のタンパク質が、いつ、どこで、どのくらい存在して機能しているかを詳細に調べることが、複雑な生命現象の理解において主要な研究対象として注目されている。そのため、いかに生体機能を保ったまま標識を行うかも考慮されるべきポイントの一つであり、その意味でタグペプチドは分子量も小さく、もとなるタンパク質にほとんど影響を与えない。通常、このようなペプチドをエピトープとして抗体などで修飾する方法、ペプチドの代わりに標的タンパク質に比較的大きなタグタンパク質を融合し、このタグに対して選択的に結合するプローブ分子を用いて標識する方法、タグタンパク質として自発的に蛍光を示すタンパク質を遺伝子工学的に融合する方法がある。標的への影響を考えるとタグは小さければ小さいほど良く、10 残基以下のペプチドで呈色・蛍光分子、もしくは生体直行性の高い有機分子が形成されれば技術革新が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、標的となるタンパク質・測定対象に与える影響を最小限にしたタグペプチドによるタンパク質標識を目指し、自発的に形成される補因子を模倣し、生体直行性の高い有機分子を持った N 末端ペプチドの開発を志向した。金属結合ペプチドやタンパク質を用いて、その系中で金属による酸化的自己修飾反応を制御し、翻訳後化学修飾を誘起して自発的に形成される新たなクロモフォア、フルオロフォアを持った人工タグペプチドやタンパク質の検索を行った。

3. 研究の方法

金属結合部位として銅に対して選択的に結合する ATCUN(Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding Motif)配列(X₁-X₂-His)や分子量の小さな金属結合タンパク質に着目した。前者では MBP タンパク質などの N 末端にこれら配列を結合させ、X₁-X₂の配列を変えた変異体と Ni セファロースを用いてその結合量から金属結合能を評価した。後者では小分子タンパク質の内部で生じる特殊なアミノ酸についても検討を行い、より精緻な設計方法の構築を目指し、その反応機構に焦点を当てた研究を行った。

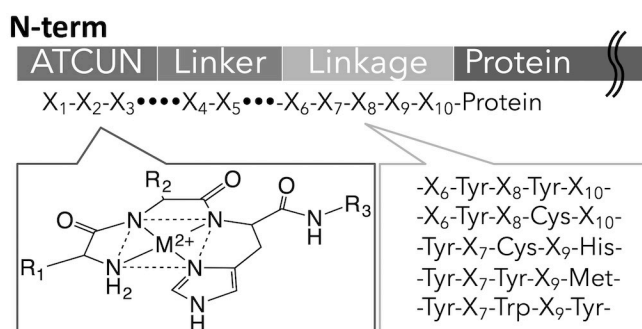


Figure 1. Design of tag peptides and proteins.

4. 研究成果

金属結合部位として銅もしくはニッケルイオンに対して選択的に結合する ATCUN(Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-binding Motif)配列 (X₁-X₂-His)に着目した。ATCUN 配列はトリペプチドの状態でも金属イオンに対して mM-μM オーダーの解離定数を示すことが知られている。さらに、タンパク質の N 末端に導入された場合でも同等の結合能が報告されている。また、ATCUN トリペプチド銅錯体では DNA 酸化的切断活性を示すことから自己酸化能を持ち合わせていると考えられる。そこで、分子量 10kDa 程度のタンパク質やマルトース結合タンパク質(MBP)の N 末端配列上にこれら配列を挿入し、縮重プライマー法により、ランダムライブラリーを作成した。そのライブラリーで形質転換した大腸菌を自動誘導培地にて培養後、ライセートを使い Ni セファロース樹脂を用いて、金属結合能をもつ配列のランキングを作成した。最終的に SDS-PAGE 上でバンドが観測された配列が 10 程度観測された。ランキング上位には予想されたように配位性のアミノ酸であるアスパラギン酸とシステインが入った配列が確認された。一方で、配位性ではないアミノ酸残基も見られ、末端部位としての機能が期待された。

ATCUN 配列後の数残基に二つのアミノ酸を導入し、その組み合わせと挿入位置を変えるこ

とで、チロシンダイマーの形成を検討した。まず、GYGYG と YGGYG の二種類のペプチドを固相合成し、銅酵素であるチロシナーゼを用いて酸化反応を行った。チロシナーゼはチロシンを水酸化し、生じたドーパをドーパキノンに酸化する。チロシンを含むペプチドに対して反応した場合、それらが架橋し、ジドーパが形成されると期待される。反応後、ペプチド溶液は赤く呈色していたため、液体クロマトグラフィーによって検出したところ、水酸化されたペプチドおよび架橋構造が形成されたペプチドが検出された。そこで、金属結合部位の ATCUN モチーフ、リンカー、修飾部位である GYGYG から構成されるペプチドを合成した。銅を 4 等量加え錯体を生成させた後、アスコルビン酸を 4 等量加え反応させた。チロシナーゼの時と同様に酸化されたと思われるペプチドの MS スペクトルが得られ、GYGYG と比べると低いものの呈色も示した。これらのペプチドを用いて、pH やイオン強度に関する反応条件や還元剤について最適化を行うため、反応条件を検討した。還元剤としてヒドロキシルアミンやアスコルビン酸を用いて反応させた。結果としてチロシンダイマーの量は還元剤の種類で大きく変化することがわかった。また、液体クロマトグラフィーを用いて分離、質量分析で検出したところ、チロシンダイマー、さらに酸素原子付加物(+16, +32)が検出された。これらの結果より、チロシンダイマー、チロシン-ドーパ、ドーパダイマーの形成が示唆された。

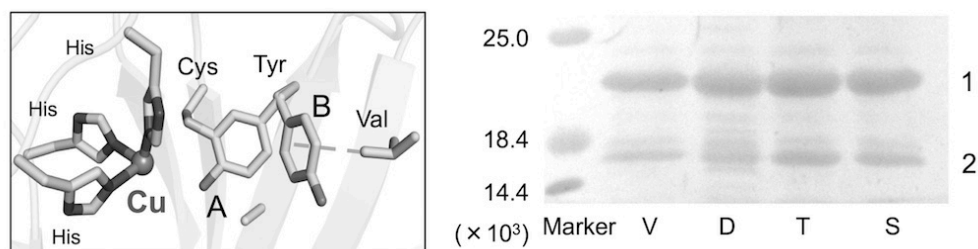


Figure 2. Structures of the (left) and SDS-PAGE analysis (right) of the mutant.

一方、より汎用性を拡張するため、金属結合タンパク質中ではチロシンダイマーではなく Tys-Cys 近傍のアミノ酸残基に部位飽和変異誘発を利用してより修飾効率の良い変異体を獲得し、構造などの評価により、立体制御による形成メカニズムを検討した。すでに、58 番目のヒスチジンをシステイン、106 番目のシステインをアラニン、108 番目のイソロイシンをチロシンに変異させた三重変異体でわずかに架橋形成が見られていたため、この変異体において、より架橋構造の形成が進行する変異体を探索することとした。結晶構造において 108 番目のチロシンが複数のロータマーを示し、片方が 37 番目のバリンと CH- π 相互作用していることが予想されたため(図 2 左)、目的の 58 番目のシステインと距離が最小になる状態を安定化させるために、この相互作用を喪失させることを考えた。そこで、このアミノ酸残基にターゲットに絞り、部位飽和変異を行なった。この変異を加えるためのプライマーを設計し、PCR によって発現ベクターを作成した。SDS-PAGE のバンドシフト(図 2 右)から、変異体のスクリーニングを行ったところ、アスパラギン酸、スレオニン、セリンへの変異が架橋構造の形成量を向上させることが明らかとなった。これらの変異体を大腸菌にて発現誘導し、菌体破碎した後精製を行なった。精製したタンパク質を銅と反応させることにより、システイン-チロシンの架橋形成が促進されるかどうかを SDS-PAGE にて確認したところ、これらの変異体で形成が確認された。このように、架橋形成にはそれぞれのアミノ酸残基間での距離が適切に配置されることが必須であるとわかった。つまり、タグペプチドにおいてもアミノ酸配列上の配置に加えて立体的な配置が重要であることが予想され、今後、プロリンなどのコンフォメーションが少ないアミノ酸を利用し、立体配座を固定することで形成効率の向上が見込まれることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujieda Nobutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 His-Cys and Trp-Cys cross-links generated by post-translational chemical modification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 445 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1696178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Krug Roxanne, Schroder Dennis, Gebauer Jan, Suljic Sanel, Morimoto Yuma, Fujieda Nobutaka, Itoh Shinobu, Pietruszka Jorg	4. 巻 -
2. 論文標題 Tyrosinases in Organic Chemistry: A Versatile Tool for the -Arylation of -Dicarbonyl Compounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1789 ~ 1796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201800188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujieda Nobutaka, Umakoshi Kyohei, Ochi Yuta, Nishikawa Yosuke, Yanagisawa Sachiko, Kubo Minoru, Kurisu Genji, Itoh Shinobu	4. 巻 59
2. 論文標題 Copper-Oxygen Dynamics in the Tyrosinase Mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 13385 ~ 13390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202004733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nobutaka Fujieda
2. 発表標題 Artificial Metalloenzymes Bearing a Cupin Fold
3. 学会等名 ArtZymes 2.0 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 特異な翻訳後修飾アミノ酸を有する金属酵素の機能解析および新規創製
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会関西支部大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 高機能性配位子としてのタンパク質
3. 学会等名 生体機能関連化学若手の会 第30回サマースクール（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 チロシナーゼの成熟過程と反応機構
3. 学会等名 第91回生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 殿村篤史・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 繊維状ペプチド集積体を用いた不斉錯体触媒の開発
3. 学会等名 第45回生体分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 越智祐太・馬越恭平・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 チロシナーゼと阻害剤複合体の結晶構造解析
3. 学会等名 第45回生体分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤枝伸宇・殿村篤史・伊東 忍
2. 発表標題 線維状ペプチド集積体を用いた不斉銅錯体触媒の開発
3. 学会等名 第31回生物無機夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山脇沙耶香・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 有機ラジカル活性種を含む人工金属酵素の設計と特性評価
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山脇沙耶香・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東 忍
2. 発表標題 新規なペプチド架橋構造を有する人工金属酵素の構築
3. 学会等名 日本化学会第98回春季年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------