

平成 21年 4月 9日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19550162

研究課題名 (和文) 加水分解機能を持つ金属タンパク質の設計

研究課題名 (英文) De novo Design of metalprotein capable of hydrolytic function

研究代表者

田中俊樹 (TANAKA TOSHIKI)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

70171775

研究成果の概要：

天然に存在する金属タンパク質は、通常とは異なった金属イオンの配位構造を有している。従って、歪んだ金属配位構造を自由に設計することは、機能をつくる上で重要である。4-ヘリックスバンドルを鋳型として、この疎水場に金属結合サイトを設けた。アミノ酸の種類、場所を選択することで歪んだ銅イオンの配位構造を作成できた。一方、4-ヘリックスバンドルに His 残基を導入したタンパク質はわずかなエステルの加水分解機能が見られた。さらに機能の向上には、基質結合部位の設計と歪んだ配位構造の金属イオンの設計を組み合わせることが必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：デノボデザイン、コイルドコイル、金属イオン結合、金属イオン配位構造

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造や機能を人為的に作り出すことは、化学者の究極的な目的の一つである。特にトリプシンやキモトリプシンなどにおいてみられるアミド結合の加水分解、DNase, RNase などのリン酸ジエステル結合の加水分解等には高い興味を持たれている。これに対し、これらと類似の酵素機能 (具体的にはカルボン酸エステルの加水分解) の設計がこれまでに多くの研究者によって行わ

れ、幾つか報告されている。例えば設計タンパク質として酵素の活性残基を配置したキモヘリザイム (*Science*, **248**, 1544-1547 (1990)) やペプザイム (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 8282-8286 (1993)) などがあがるが、興味深い事に後に他の研究者の追試によりいずれも非常に低活性か、あるいは酵素活性を全く示さないことまでも示されている (他の研究者が追試を行なうほど注目の的になっている)。また抗体触媒においては、

それぞれの基質に応じた擬似反応中間体を設計することで、同様にエステルを加水分解する抗体が得られているが、その活性は依然低いと言わざるを得ない。このように、より簡単そうにみえるカルボン酸エステルの加水分解反応においてさえも、十分な活性を持った酵素の構築手法は確立されていない段階にある。

2. 研究の目的

基質結合サイトの構築、触媒機能を持った金属配位部位の構築が可能なベースとなるデザイン蛋白質構造の選択は、本研究の目的達成において、最も重要である。この為には、まずはある程度構造的に頑丈な蛋白質構造の選択が望ましい。これに対し、我々はこれまでに、コイルドコイル蛋白質のデノボデザインを行ってきた。コイルドコイル蛋白質とは、 α -ヘリックスが2本から5本程度束なった構造を持ち、7残基で2回転（3.5残基で1回転）することから、1次構造から多次構造の構造予測、引いてはそれぞれのアミノ酸残基の空間配置予測が容易であるという特徴を持っている。また、天然蛋白質においてそれぞれのアミノ酸残基に考えられる環境である、①疎水場、②親水場、③疎水場と親水場の界面、をいずれもその構造の中に持っている事から、様々な機能をデザインする上での鋳型構造としては真に適していると思われる。これまでに我々は、この鋳型となる3本鎖、及び4本鎖のコイルドコイル蛋白質に対する設計を行い、これらの中への金属イオン配位場の設計に成功している。また一方で、4本鎖のコイルドコイル蛋白質疎水場に疎水空孔を設ける事により、種々の有機小分子を取り込む事が可能である事も分かってくる。従ってこれらの知見を統合する事で、目的実現の足がかりがつかむ。

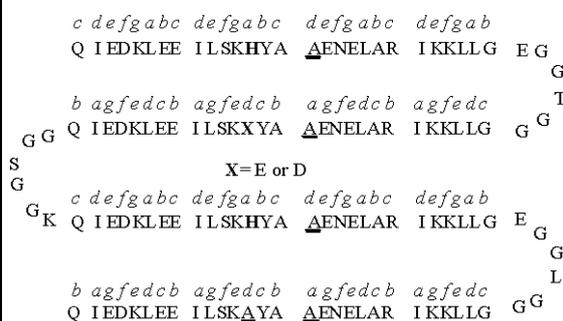
3. 研究の方法

本研究で用いた4-ヘリックスバンドルタンパク質は、平行四本鎖コイルドコイル構造を作る GCNpLI のアミノ酸配列を参考にし、短いリンカーでつなぐことにより設計した。このタンパク質の遺伝子を14本の合成オリゴヌクレオチドを用い PCR 反応により作成した。本遺伝子を大腸菌内で発現させ、チオレドキシンの融合タンパク質として得た。ニッケルカラムで生成、トロンビン処理で融合タンパク質部分を切り離し、最後に HPLC で生成した。金属イオン結合部位は本タンパク質の疎水場に His、Cys、Asp、Glu 残基を設けることで設計した。金属イオンの結合、および、配位構造の確認は円偏光二色

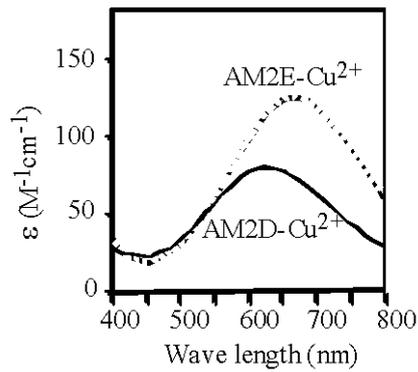
性 (CD) スペクトル、紫外・可視 (UV-vis) 吸収スペクトル、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル、等温滴定カロリメトリー (ITC) などの測定により行った。

4. 研究成果

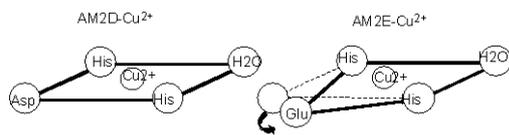
(1) 歪んだ配位構造を持つ金属タンパク質の設計
四本鎖コイルドコイル構造の疎水場に金属イオンの結合のために、二つの His と Asp または Glu を導入した AM2D、AM2E を作成した。これらのアミノ酸残基付近は空洞を設けるために側鎖の短い Ala を配した。



AM2D、AM2E は円偏光二色性(CD)スペクトル測定の結果、いずれも金属イオンが存在しなくても 208 と 222 nm に極小値を持ち、 α -ヘリカルコイルドコイル構造を有していることがわかった。従って、金属イオンを加えても、CD スペクトルの変化は見られず、金属イオンの結合は観察できなかった。しかし、Zn²⁺や Cu²⁺の金属イオンの添加により、熱安定性が向上したので金属イオンの結合が示唆された。そこで、等温滴定カロリメトリー (ITC) で調べたところ、AM2D、AM2E は Zn²⁺ や Cu²⁺ と一対一で結合していることがわかった。興味あることに、Zn²⁺ については AM2D、AM2E と同じ解離定数 (それぞれ 5.7 μ M、8.8 μ M) であったが、Cu²⁺ については、AM2E は AM2D に比べ 10 倍強く結合していた (それぞれ 1.4 μ M、12 μ M)。このことから、AM2D、AM2E 中の Cu²⁺ の配位構造が異なっていることが示唆された。そこで紫外可視(UV-vis)吸収スペクトルを調べたところ、AM2E -Cu²⁺ は 680nm に AM2D -Cu²⁺ は 620nm に極大があった。さらにモル吸光係数を比べると前者が約 2 倍大きかった。これらのことから AM2E -Cu²⁺ と AM2D -Cu²⁺ の Cu²⁺ はともに平面四配位構造であるが、両者で Cu²⁺ イオンの配位構造が若干異なっていることが考えられた。



次に、配位構造を詳細に調べるために電子スピン(ESR)スペクトルを測定した。その結果、AM2D-Cu²⁺のAパラレル値が17.5mT、一方AM2E-Cu²⁺のそれは15.5mTとなった。このことから、AM2E-Cu²⁺ではCu²⁺イオンの平面四配位構造からのゆがみが大きいことが考えられた。モデル系を作成し、密度汎関数理論(DFT)による歪みを検証した。その結果、AM2D-Cu²⁺ではCu²⁺イオンは平面四配位構造から-7.8度、一方AM2E-Cu²⁺ではCu²⁺イオンは-34.2度歪んでいることがわかった。AspとGluでは一つのメチレンの長さが異なるが、このためにCu²⁺の配位構造が変化したと考えられる(下図)。タンパク質内に歪んだ金属イオンを作成した初めての例である。



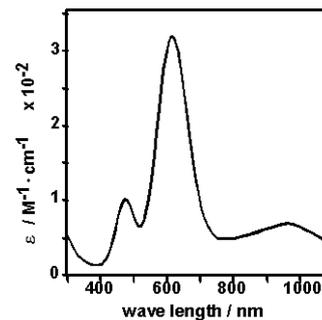
(2) ブルー銅タンパク質の設計

一般的には銅イオンは平面四配位構造を取りやすい。しかし、ブルー銅サイトに代表される type1 サイトは平面三配位構造を基調とした四面体型の trigonal pyramidal もしくは trigonal bipyramidal 構造を持つ。これらは His、His、Cys の強い相互作用により形成される平面三配位構造で保存されている。今までにこのようなブルー銅サイトの設計はペプチドあるいは天然タンパク質の変異で行われてきた。しかし、水分子の配位により平面四配位構造の安定化した。そこで、今回の設計にあたって、水分子が付加しないように、また Cu²⁺酸化によるジスルフィド形成の阻止のために Cu²⁺結合場所を 4-ヘリックスバンドルタンパク質の疎水場においた。具

体的には二つの His と Cys を導入した AM2C を作成した。



本タンパク質は CD スペクトル測定の結果、コイルドコイル構造を有していた。このタンパク質に Cu²⁺を添加したところ、溶液が青色を呈した。このことは AM2C が Cu²⁺イオンを配位し、ブルー銅タンパク質の type1 サイトができたことを示唆している。そこで UV-vis 吸収スペクトルを調べたところ、AM2C-Cu²⁺は 616nm に非常に大きい吸収帯 ($\epsilon \approx 3,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を示した。これは天然のブルー銅タンパク質と同じ性質である。



さらに ESR による構造評価を行ったところ、A パラレルの値が非常に小さく、g パラレル領域に明確な hyperfine splitting が認められなかった。この性質も天然のブルー銅タンパク質と同じである。従って、設計によりブルー銅タンパク質と同じ Cu²⁺イオンの配位構造が作り出せたといえる。これは、世界で初めての例である。この内容は、現在 J.Am.Chem.Soc.誌に論文として投稿中であるが 3 人のレフェリー中 2 人から top 5% の評価を得ている。

(3) p-ニトロフェニルアセテートを加水分解するタンパク質の設計

1) 2) で用いた 4-ヘリックスバンドルタンパク質の疎水部に His 残基を順次 1, 2, 3 個入れたタンパク質を同様の方法で作成した。本タンパク質に p-ニトロフェニルアセテートを加え、加水分解生成物の p-ニトロフェノレートの濃度を UV 測定した。His 残基を導入していないタンパク質、His 残基を一つ

導入したタンパク質では加水分解反応速度の向上は見られなかった。一方、His 残基を複数個導入したタンパク質では加水分解反応速度の向上が見られた。最も活性のみられた His 残基を二つ導入したタンパク質の p-ニトロフェニルアセテートに対する $K_{cat}/K_M (s^{-1} \cdot M^{-1})$ 値は 10.75 であった。この値は対象としてイミダゾールを用いた時に比べ 22 倍の活性が見られた。また溶液の pH を変化させ活性を調べたところ、pH8-10 において一定の $\log k_2$ が得られたことから 2 個の His 残基が一般酸塩基触媒として働くことが示唆された。しかし、活性の強さは非常に弱い。その理由としては、基質のタンパク質内部への結合が弱いことが考えられる。そのため、基質としてより疎水性である p-ニトロフェニルアダマンタンアセテートを用いた。加水分解反応は見られたが、基質の水の中での溶解性が悪く詳しく調べることができなかった。今後、基質の結合部位をタンパク質内に設ける設計が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ①鈴木将太、志賀大悟、田中俊樹、エステル加水分解能を有する α -ヘリカルコイルドコイルタンパク質の設計、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成20年9月18日、東工大
- ②志賀大悟、中根大輔、猪俣智彦、船橋靖博、増田秀樹、織田昌幸、野田勝紀、内山進、福井望一、田中俊樹、タイプ1ブルー銅タンパク質の de novo 設計、第8回日本蛋白質科学会年会、平成20年6月10日、千葉
- ③志賀大悟、中根大輔、猪俣智彦、船橋靖博、増田秀樹、田中俊樹、ブルー銅タンパク質の新規設計、第18回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、平成20年6月5日、名古屋市立大学
- ④宇野雄也、中根大輔、船橋靖博、増田秀樹、田嶋邦彦、田中俊樹、SOD 活性の向上を目指した金属タンパク質の新規設計、平成20年6月5日、名古屋市立大学
- ⑤志賀大悟、中根大輔、猪俣智彦、船橋靖博、増田秀樹、織田昌幸、野田勝紀、内山進、福井希一、田中俊樹、ブルー銅活性サイトを持つコイルドコイルタンパク質の de novo 設計、第72回日本生化学会中部支部、平成20年5月24日、岐阜大学

- ⑥志賀大悟、水野稔久、中根大輔、織田昌幸、船橋靖博、増田秀樹、田中俊樹、人工酵素プロトタイプとなるモデル系 de novo 金属蛋白質の設計、第22回生体機能関連化学シンポジウム、平成19年9月28日、東北大学、
- ⑦志賀大悟、水野稔久、中根大輔、織田昌幸、船橋靖博、増田秀樹、田中俊樹、デザイン蛋白質による Cu^{2+} 配位構造の歪みと検証、錯体化学討論会、平成19年9月25日、名古屋工業大学
- ⑧志賀大悟、水野稔久、中根大輔、織田昌幸、船橋靖博、増田秀樹、田中俊樹、酵素活性サイトを疑似した金属蛋白質の新規設計、第19回生体機能関連化学若手の会サマースクール、平成19年8月6日、東京工業大学
- ⑨志賀大悟、水野稔久、田中俊樹、加水分解能を有するデノボ蛋白質の設計、第7回日本蛋白質科学会、平成19年5月24日、東北大学
- ⑩志賀大悟、水野稔久、田中俊樹、エステル加水分解能を有する4本鎖コイルドコイル蛋白質の設計、日本生化学会中部支部、平成19年5月19日、名古屋大学

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中俊樹 (TANAKA TOSHIKI)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70171775

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし