

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21350095

研究課題名（和文） 光応答性タンパク質およびペプチドの創製と構造機能制御

研究課題名（英文） Creation and Structure-Function Control of Photo-Reactive Proteins and Peptides

研究代表者

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

研究者番号：90283457

研究成果の概要（和文）：タンパク質やペプチドの立体構造と機能を高い空間分解能と時間分解能で制御できれば、生体内計測や医療などへの利用が期待できる新技術の開発に繋がる。本研究では、光応答性タンパク質やペプチドを作製し、これらの生体関連分子の立体構造を光制御するとともに、機能制御を行った。具体的には、タンパク質の光応答性を利用した構造機能解析、光応答性配位子の金表面固定化と金属イオンの結合制御、光応答性配位子による DNA 切断制御を行った。

研究成果の概要（英文）：Control of the structure and function of proteins and peptides with high space and time resolution will initiate new technologies, which include living body measurements and medical treatment. In this research, photo-reactive proteins and peptides were constructed, and photo-control of the structure and function of these biologically-related molecules was performed. The structure-function analysis of the protein with the use of its photoactivity, fixation of a photoactive ligand on a gold surface and regulation of its metal ion binding, and control of DNA cleavage with a photoactive ligand were performed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：光応答性・タンパク質・ペプチド・構造機能相関・機能制御

1. 研究開始当初の背景

タンパク質やペプチドは生体内で様々な機能を担っており、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。多くの場合、これらの立体構造は精密に構築されており、機能と密接に関係している。つまり、生体分子は決まった構造を取ることにより、初めて特定の機能を発揮することができ

る。そこで、生体関連分子の立体構造を高い空間分解能と時間分解能で制御できれば、生体内計測分析や医療などの分野で新技術の開発が期待できる。

2. 研究の目的

「光」は位置制御と時間制御が比較的容易であり、波長も変えることができるため、近

年、様々な分野で利用されている。光に応答して分子内の結合が切れる光解離性分子（ケージド化合物）や、アゾベンゼンなど光に応答して構造異性化する光異性化分子などが知られている。光応答性を有する生体関連分子を開発・利用できれば、構造の光制御に基づいた機能制御が可能となり、ライフサイエンスや医療など広い分野への応用が期待される。

3. 研究の方法

[NiFe]ヒドロゲナーゼの不活性酸化型の一つである Ni-A 型の光反応性を、光照射によるフーリエ変換赤外分光 (FT-IR) および電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルの変化により調べた。軟体動物や節足動物の酸素貯蔵・運搬タンパク質であるヘモシアニンの二核銅中心をメチルアミンで還元後、酸素分子と反応させることにより、酸素付加体を作製した。乳酸存在下、pH および酸素濃度を変えて、酸素付加体のフラッシュフォトリシス測定を行い、酸素結合定数を求めた。

金属結合部位をアゾベンゼン誘導体の両側にもつ配位子 (H_4L) を合成した。配位子合成は、NMR スペクトルおよび質量分析により確認した。配位子のシス体およびトランス体の光反応性を吸収および NMR スペクトルにより調べた。 H_4L 配位子を金表面に固定化し、トランス体の銅錯体およびシス体の銅錯体を作製した。配位子のシス体およびトランス体の銅イオン結合性をサイクリックボルタメトリーにより調べた。

亜鉛イオン結合部位 2 箇所をアゾベンゼンで架橋した配位子を合成した。得られた配位子で二核亜鉛錯体を作製し、トランス体の X 線結晶構造解析を行った。シス-トランス異性化により二核亜鉛錯体の亜鉛間距離を変え、シス体およびトランス体の DNA 切断活性をポリアクリルアミドゲル電気泳動により見積もった。

4. 研究成果

(1) タンパク質の光応答性を利用した構造機能解析

ヒドロゲナーゼは水素の分解・合成反応を常温常圧で触媒する酵素である。ヒドロゲナーゼには、[NiFe]型、[FeFe]型、[Fe]型の 3 種類が知られている。[NiFe]ヒドロゲナーゼの Ni-Fe 活性部位における水素活性化触媒反応機構の解明のため、Ni-A 型にレーザー光 (457.9–514.5 nm) を室温で照射した。レーザー照射により Ni-A 型の FT-IR スペクトルが変化し、Ni-A 型に光反応性があることが明らかとなった。光照射を停止すると FT-IR スペクトルの変化は観測されなくなったが、再度光照射を開始すると同様のスペクトル変化が観測され、光反応は可逆的であること

が判明した。Ni-A 型の ESR スペクトルも可視光照射により変化し、光照射を停止するとスペクトル変化は観測されなくなった。光照射によって生じた反応生成種の CO 伸縮振動 ($\nu(\text{CO})$) は 1971 cm^{-1} 、CN 伸縮振動 ($\nu(\text{CN}')$) は 2086 と 2098 cm^{-1} に観測された。ESR スペクトルの g 値は 2.29, 2.24, 2.02 と求まり、光照射により新たな種が生成したと考えられ、Ni-AL 型と名付けた。Ni-AL 型の g 値は Ni-A 型の g 値 (2.30, 2.23, 2.01) に非常に近いことから、Ni 原子の電子状態は Ni-A 型と類似していると推測された。一方、Ni-AL 型の $\nu(\text{CN}')$ 振動数は Ni-A 型の 2084 と 2094 cm^{-1} からあまり変化しなかったが、 $\nu(\text{CO})$ 振動数は Ni-A 型の 1956 cm^{-1} から 15 cm^{-1} 高波数シフトしたことより、Ni-AL 型は Ni-A 型に比べて Fe 原子に対して CO の反対側に位置する 2 原子分子配位子から Fe 原子への電子供与が弱くなったことが示唆された (図 1)。

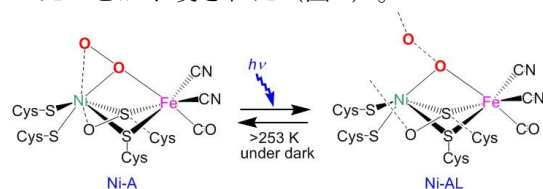


図 1. Ni-A 型[NiFe]ヒドロゲナーゼの光応答性

ヘモシアニンの構造機能相関を調べるため、フラッシュフォトリシス法により、乳酸存在下、様々な条件でヘモシアニンの酸素付加体の酸素結合定数を求めた。乳酸添加により、pH 6.5 では、ヘモシアニンの酸素再結合速度は低酸素濃度で 2 成分あり、2 成分の比が T 状態と R 状態の存在比に依存することが分かった。乳酸を共存させると、ヘモシアニンの平衡が T 状態から R 状態へ偏ることも判明した。

(2) 光応答性配位子の金表面固定化と金属イオンの結合制御

光照射によって金属イオンを「捕捉・脱離」できるシステムの構築を目指し、 H_4L を金表面に固定化し、銅イオンを結合させた (トランス体: $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{trans-L})]/\text{C}_6\text{-Au}$ 、シス体: $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{cis-L})]/\text{C}_6\text{-Au}$) (図 2)。トランス体とシス体のいずれの場合も、サイクリックボルタモグラムは Cu^{III} に由来する一対の酸化還元応答のみを示し、これらの酸化還元応答は掃引を繰り返すことで徐々に減少した。配位子がトランス体の場合、70 回目の掃引時にはピークがほぼ完全に消失した。このピーク強度の減少は銅イオンが表面上の配位子から解離したことを意味している。一方、シス体の場合、70 回目の掃引時にはピーク強度は減少したが、明確な酸化還元応答を示した。修飾に用いた cis- H_4L 溶液は trans- H_4L も含んでい

たため、 $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{cis-L})]/\text{C}_6\text{-Au}$ 上には *cis-L* と *trans-L* の両方が修飾されていた可能性が高く、*cis-L* は *trans-L* よりも強く銅イオンと結合していたことが示された。70 回掃引後の $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{cis-L})]/\text{C}_6\text{-Au}$ に可視光を照射し、配位子をトランス体からシス体に変化させると、掃引により酸化還元ピークの強度が再び減少した。以上より、光照射によって銅イオンの結合を光制御できる可能性が示された。

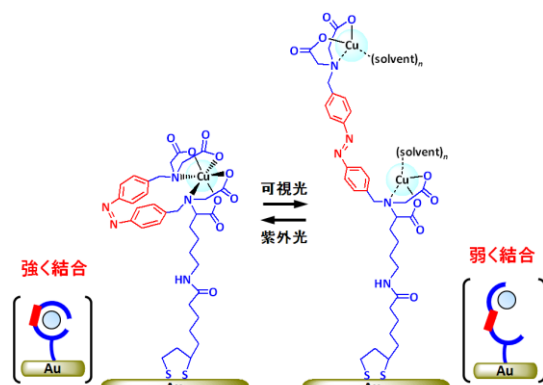


図 2. 金表面に固定化した光応答性配位子とその銅錯体

(3) 光応答性配位子による DNA 切断制御

これまでに CysGly 銅錯体をアゾベンゼン誘導体で連結し、異なる波長の光を照射することにより、二つの銅サイト間の距離を変え、DNA 切断活性を制御することに成功した。しかし、銅錯体は酸化的に DNA を切断する可能性があり、人工酵素などには適さない。本研究では、加水分解的にのみ DNA を切断する亜鉛錯体を新しく合成したアゾベンゼン配位子で連結した。アゾベンゼン連結二核亜鉛錯体のトランス体を X 線結晶構造解析により確認したところ、各亜鉛イオンに硝酸イオンが 2 つ結合できることが分かった (図 3)。二核亜鉛錯体のトランス体に 355 nm 付近の紫外光を照射するとシス体に、シス体に 430 nm 付近の可視光を照射するとトランス体に可逆的に変換できた。また、二核亜鉛錯体のシス体のほうがトランス体よりも DNA 切断が速く、切断により DNA のコンフォメーションは超らせん構造から損傷環状構造に変化した (図 3)。この二核亜鉛錯体のシス体の DNA 切断活性は pH に対して鐘形を示し、pH 8.5 付近で最大であった。得られた pH 依存性は、他の亜鉛錯体による DNA の加水分解切断で報告されている pH 依存性と同じ傾向を示し、二核亜鉛錯体のシス体は DNA を加水分解的に切断すると推測された。この二核亜鉛錯体のシス体の DNA 切断活性は、DNA のメジャーグループに結合するメチルグリーンを共存させてもほとんど変化しなかったが、マイナーグループに結合する

4',6-diamidino-2-phenylindole を共存させると著しく低下し、二核亜鉛錯体が DNA のマイナーグループに結合することが分かった。以上より、2 つの亜鉛錯体をアゾベンゼン誘導体で連結し、DNA 切断活性を光制御することに成功した。

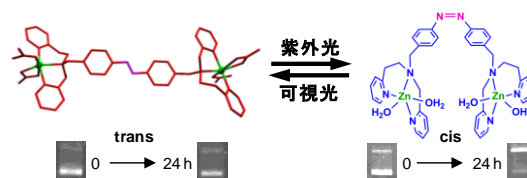


図 3. アゾベンゼン連結亜鉛錯体のトランス体とシス体の構造変化 (上図) と DNA 切断 (下図) の光制御

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 6 件)

1. H. Osuka, Y. Shomura, H. Komori, N. Shibata, S. Nagao, Y. Higuchi, S. Hirota, Photosensitivity of the Ni-A State of [NiFe] Hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F with Visible Light, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 430, 284-288 (2013).
2. A. Panja, T. Matsuo, S. Nagao, S. Hirota, DNA Cleavage by the Photocontrolled Cooperation of Zn^{II} Centers in an Azobenzene-Linked Dizinc Complex, *Inorg. Chem.*, 査読有, 50, 11437-11445 (2011).
3. S. Nagao, O. Asami, H. Yasui, S. Hirota, Efficient Reduction of Cys110 Thiyl Radical by Glutathione in Human Myoglobin, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 1814, 480-486 (2011).
4. 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*, 査読有, 107, 12854-12859 (2010).
5. 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.*, 査読有, 285, 19338-19345 (2010).
6. I. Takahashi, Y. Honda, S. Hirota, Regulating Copper-Binding Affinity with Photoisomerizable Azobenzene Ligand by Construction of a Self-Assembled Monolayer,

Angew. Chem. Int. Ed., 査読有, 48, 6065-6068 (2009).

[学会発表] (計 16 件)

1. Shun Hirota, Structural Changes of Metalloproteins and Metal-Peptide Complexes, *Third Dalton Transactions International Symposium: Bioinorganic Chemistry*, Suita, 2012 年 11 月 14 日
 2. Shun Hirota, Investigation and Regulation of Protein and Peptide Structural Changes, *Japanese-German Scientific Cooperation in the 21st Century: Biocatalysts for Future Feedstock Utilization*, Nara, 2011 年 4 月 26 日
 3. Shun Hirota, Protein and Peptide Structural Changes: Protein Aggregation and Photoactive Biomaterials, *Nanotechnology and Medical Sciences (ICNMS-2010)*, Kolhapur, India, 2010 年 10 月 22 日
 4. Isao Takahashi, Yuichiro Honda, Shun Hirota, Miki Hasegawa, Photoregulation of Copper-Binding Affinity to the Azobenzene Ligand on Au Surface, *International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science*, Chiba, 2010 年 9 月 20 日
 5. 高橋勇雄、本田裕一郎、廣田俊、長谷川美貴、光異性化可能なアゾベンゼン配位子の表面固定による銅イオンの結合制御、*第22回配位化合物の光化学討論会*、富山市、2010 年 8 月 3-5 日
 6. Shun Hirota, Isao Takahashi, Halan Prakash, Satoshi Nagao, Proteins, Peptides, and Inorganic Compounds Incorporated with Photo-Triggering and Photo-Regulating Properties, *5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMCS 2010)*, Nara, Japan, 2010 年 6 月 9 日
 7. Shun Hirota, Investigation and Regulation of Protein and Peptide Structural Changes, *International Symposium on Protein Structures: Stability, Interaction and Dynamics*, Nara, 2009 年 12 月 18 日
 8. Shun Hirota, Proteins, Peptides and Inorganic Compounds Incorporated with Photo-Triggering and Photo-Regulating Properties, *The 9th GIST/NAIST Joint Symposium on Advanced Materials*, Gwangju, Korea, 2009 年 11 月 18 日
 9. Shun Hirota, Isao Takahashi, Halan Prakash, Yuichiro Honda, Satoshi Nagao, Proteins, Peptides and Inorganic Compounds Incorporated with Photo-Triggering and Photo-Regulating Properties, *The 1st NCTU-NAIST Workshop on "Molecular/Nano Science" 2009*, Hsinchu, Taiwan, 2009 年 11 月 13 日
 10. Hisao Osuka, Shin-ichi Terawaki, Yasuhito Shomura, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Shun Hirota, Yoshiki Higuchi, [NiFe] ヒドロゲナーゼの X 線結晶構造解析と赤外分光測定 (X-ray crystallographic and FT-IR studies on [NiFe] hydrogenase), *The 47th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan*, Tokushima, 2009 年 10 月 30 日
 11. 高橋勇雄、本田裕一郎、廣田俊、アゾベンゼン配位子の表面固定を利用した銅イオンの結合制御、*第59回錯体化学討論会*、長崎市、2009 年 9 月 25 日
 12. Isao Takahashi, Yuichiro Honda, Shun Hirota, Photoregulated Metal Binding to the Azobenzene Ligand on Au Surface, *14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14)*, Nagoya, 2009 年 7 月 25-30 日
 13. Hisao Osuka, Shun Hirota, Shin-ichi Terawaki, Yasuhito Shomura, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Bridging Ligand at the Active Site of Oxidized [NiFe] Hydrogenase, *14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14)*, Nagoya, 2009 年 7 月 25-30 日
 14. Satoshi Nagao, Osamu Asami, Shun Hirota, Effect of Cysteine Residue on Reaction of Human Myoglobin with Hydrogen Peroxide, *14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14)*, Nagoya, 2009 年 7 月 25-30 日
 15. Shun Hirota, Takumi Kawahara, Mariano Beltramini, Paolo Di Muro, Richard S. Magliozzo, Jack Peisach, Linda S. Powers, Naoki Tanaka, Satoshi Nagao, Luigi Bubacco, Structural Origin for the Bohr Effect in Arthropod Hemocyanin, *14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14)*, Nagoya, 2009 年 7 月 25-30 日
 16. 廣田俊、田中直輝、長尾聡、北岸宏亮、加納航治、I. Micetic、M. Bertamini、L. Bubacco、節足動物由来ヘモシアニンの酸素結合挙動に対する pH および乳酸の影響、*第36回生体分子科学討論会*、札幌市、2009 年 6 月 19 日
- [図書] (計 1 件)
1. 廣田俊、光で生体関連分子の構造を制御する、現代化学 10 月号、東京化学同人、475、36-40 (2010).
- [産業財産権]
- 取得状況 (計 3 件)
- 名称：リンカーを有するアゾ化合物及び当該

アゾ化合物を用いた金属イオン回収方法
発明者：廣田俊、高橋勇雄、本田裕一郎
権利者：奈良先端科学技術大学院大学
種類：特願
番号：5211362
取得年月日：2013年3月8日
国内外の別：国内

名称：アゾペプチド複合体
発明者：廣田俊、ハランプラカシュ
権利者：奈良先端科学技術大学院大学
種類：特願
番号：5190594
取得年月日：2013年2月8日
国内外の別：国内

名称：光制御ペプチド及び光制御ペプチドを用いたペプチド-蛋白質複合体形成の制御方法
発明者：廣田俊、濱崎勇二
権利者：奈良先端科学技術大学院大学
種類：特願
番号：4645650
取得年月日：2010年12月17日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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
研究者番号：90283457

(2) 研究分担者

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