

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410174

研究課題名(和文) 設計金属タンパク質の機能化の研究

研究課題名(英文) De novo design of functional metalloproteins

研究代表者

田中 俊樹(tanaka, toshiki)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70171775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：天然タンパク質の欠点を克服するため、3-ヘリックスバンドル型のタンパク質に2カ所のジスルフィド結合を入れることで、90度や50%エタノール中でも構造を持つタンパク質ができた。銅イオンの配位結合のデザインでは、天然には存在しない、2つのHisとCysが配位した銅イオンの配位構造を作成した。ヘモシアニンのタイプ3型銅イオンの作成はこれまでに例がない。今回、Cys残基を一時的な銅イオンとの結合に利用し、2つの銅イオンを接近した位置に導入できた。しかし酸素架橋はできなかった。しかし、これらの知見は、これから新規な機能性タンパク質の作成への期待がもたれる。

研究成果の概要(英文)：Natural proteins are usually unstable toward heat and in organic solvents. We introduced couple of disulfide bonds in designed 3-helical bundled proteins. The protein was stable at 90° and in 50% EtOH. As for the design of copper configuration, we constructed the noble copper configuration using two His and two Cys residues. Hemocyanin has two Cu ions bridged by two oxygens. This site has not constructed in the de novo designed helical proteins. Based on the knowledge obtained in blue copper protein, we utilized a Cys residue for a transient copper binding site, and succeeded to place the two His residues in nearby site. However, bridging by two oxygens was not attained so far. In conclusion, we succeeded in construction of the quite stable scaffold protein structure, noble copper configuration, and two copper proteins in vicinity. These techniques are quite promising to construct noble functional proteins, that does not exist in natural proteins, in near future.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：デノボタンパク質 金属タンパク質 銅タンパク質 銅配位構造 EPR測定

1. 研究開始当初の背景

プロテオームの約半数は金属タンパク質であると言われており、細胞内において重要な生物機能を担っている。これらタンパク質は特異的な分子認識や高活性な触媒能、迅速な電子伝達などの高機能性を持つ。そのため、多くの研究者らによってタンパク質の立体構造と機能との相関を探る研究がなされた。タンパク質の人工設計に於いては、天然タンパク質に無い構造や機能が作り出せることが特徴である。金属イオンの中で、特に銅イオンは重要な金属イオンの一つであり type1 から type3 の種々の配位構造をとる。これらは電子伝達、酸素添加酵素、酸化酵素、還元酵素、物質輸送などの機能を有し、それらの機能は銅イオンの配位構造と関連しているが詳細はわかっていない。このような系を人工的に作り出すことができれば、機能メカニズムの解明や抗酸化作用、活性酸素の除去、電子伝達などへの応用へとつながる。これまでに、DeGrado, Dutton(ペンシルバニア大)、Pecoraro(ミシガン大)、Regan(エール大)、Hellinga(デューク大)など多く国外の研究者が金属タンパク質の設計に精力的に取り組んできた。その結果、1個の金属イオンの結合の設計については多くの報告が出されてきている。一方、日本においてはこの分野は進んでいなく、世界から遅れをとっている。我々はこれまでに、タンパク質の一つの基本構造である α -ヘリカルコイルドコイル(以下コイルドコイルと略す)と呼ばれる構造を持つタンパク質を用いてデノボ設計を行なってきている。しかし、この分野は、将来、天然タンパク質にない新規な構造や機能を持ったタンパク質が設計できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

一般に、天然タンパク質の構造は不安定であり、熱や有機溶媒があるとその構造が壊れる。そこで、先ず、熱や有機溶媒存在下でも安定な構造が保たれているタンパク質の取得が必要となる。この方法はルテニウムを配位させるのに必要な条件を見だし、将来、酸化、還元反応にも利用できる。具体的には、炭酸ガスの還元反応などである。我々のこれまでの銅イオン結合設計タンパク質においては、タイプ1型の構造、2つの銅イオンを持つチトクローム-C-オキシダーゼ(COX)などの構造構築に成功している。タイプ1型の構造の解析中に、一時的にタイプ2型の構造が見られることが分かったので、これを利用して、レッド銅タンパク質の構造の作成を試みた。また、これまでにコイルドコイル構造に2つの銅イオンを接近して置くことができなかった。コイルドコイル構造を研究している他の研究者からの報告も無い。また、これまでのタイプ1型のタンパク質の解析中に、銅イオンに配位したシステインが酸化されることが分かっている。この事実を利用して、タ

イプ3型のヘモシアニンの配位構造この設計を行った。これらのことから新規な金属タンパク質の設計、構築、機能作成法の向上を目指す。

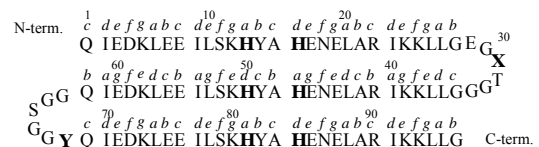
3. 研究の方法

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 GCN4-pLI 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。三本鎖のヘリックスバンドルタンパク質は、上記の前半の3/4のアミノ酸配列を使うことで行った。これらの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。ニッケルカラムで精製、トロンピン処理で融合タンパク質部分を切り離し、最後に逆相 HPLC 又はイオン交換クロマトグラフィーで精製した。金属イオン結合部位は本タンパク質の疎水場に His と Cys 残基を設けること、レッド銅タンパク質ではさらに Glu 残基を用いて設計した。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、核磁気共鳴スペクトル(NMR)、定温滴定カロリーメトリー(ITC)などの測定により行った。タンパク質の水溶液中での形状分析には、DLC 解析や X 線小角散乱解析により行った。

4. 研究成果

(1) 熱や有機溶媒に安定なタンパク質の設計

先ず三本鎖コイルドコイル構造のアミノ末端とカルボキシ末端、及び1と3番目のループ構造にシステイン残基を置き、それぞれがジスフィド結合ができるように設計した。そのアミノ酸配列を図1に示す。同時にジスフィド結合のないタンパク質も作成し、ジスフィド結合の有無による性質を比べた。



Gb-3hlx : X = G, Y = K

Gb-3hlx-cys : X, Y = C

図1. 三本鎖コイルドコイル構造のアミノ酸配列(Gb-3hlx)とジスルフィド結合ができるように設計した配列(Gb-3hlx-cys)。Gb-3hlxはN、C末にGSAMAK、EGGLG配列を持つ。Gb-3hlx-cysにはN、C末にGSAMACK、EGCGQG配列を持つ。

Gb-3hlx と Gb-3hlx-cys のタンパク質を大腸菌で発現させ、イオン交換カラムで生成した。Gb-3hlx-cys のジスルフィド結合について、タンパク質を還元、及び非還元の SDS-PAGE、および DTNB 試薬で調べた所、自動的にジスルフィド結合が作られていた。どちらのタンパク質でも円偏光二色性(CD)スペクトル測定では 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、超遠心分析の結果から、多くはモノマーで存在していた。Gb-3hlx-cys タンパク質は熱に対して安定であった。有機溶媒として、ルテニウムの配位に使われるエタノールに対して安定性を CD スペクトル測定で調べた。ジスルフィド結合のない Gb-3hlx タンパク質では、エタノールの比率を高めるにつれ 222 nm と 208 nm の比が 1.04 から 0.93 になりその変極点が 40%EtOH にあった。この事はコイルドコイル構造が壊れ、1本の長い α -ヘリックス構造になったことがわかった。一方、ジスルフィド結合を作った Gb-3hlx-cys タンパク質は 222 nm と 208 nm の比が 1.02 から 0.95 に徐々に変化し、疎水部の相互作用が弱くなったがまだ三つの α -ヘリックスが集まった構造をしていることが予想された。これをさらに調べるために DLC 解析を行った。その結果、どちらのタンパク質でも水中では差異がなかったが、50%EtOH 中ではジスルフィド結合のない Gb-3hlx タンパク質の方が見かけ上大きな分子になっていることが分かった。さらに X 線小角散乱を用いた溶液構造解析で形を調べた所、水中ではどちらもコンパクトな 64 のコンパクトな構造であった。一方、50%エタノール中では、前者が長く伸びた細長い構造に変化したのに対し、後者は水と同じコンパクトである構造が示された。この結果は DLC の結果と一致した。このように、適切な位置にジスルフィド結合を入れることで熱や有機溶媒中でも構造が保たれることが分かった。

(2) レッド銅タンパク質の設計

天然に存在するレッドタンパク質としてニトロソシアニン(Cys と 2つの His と水でタイプ 2 型の構造で、垂直から Glu が配位している。一方、BSco タンパク質は 2つの Cys と一つの His ともう一つの不明の官能基と配位しタイプ 2 型の構造である。そこで、以前に作成したタイプ 1 型の構造をもとに、銅イオンの近くの位置全てに一つずつ Glu 又は Cys を置いた。赤色を呈したタンパク質は得られなかった。そこで銅イオンの配位場所をずらした設計を行った。銅イオンから一番近い位置に Glu あるいは Cys を置いた所、Cys を置いたタンパク質で銅イオンの存在下で、天然のレッド銅タンパク質と類似の 400nm と 540 nm に UV-vis 吸収を持ち、赤色を呈した。しかし、赤色はすぐに脱色した。これまでの研究から脱色は Cys の酸化反応であった。そこで酸化反応を防ぐ目的で、付近に

Phe を置いたところ酸化反応に若干安定になったが完全にはとめることができなかった。酸化反応についてマス分析、SDS-PAGE 分析から、2つの Cys でジスルフィド結合が形成されたことが分かった。より詳細に銅イオンの配位構造を調べた。ESR 解析より $A//$ 値が 10.3mT となり、この結果はタイプ 2 よりむしろタイプ 1.5 に近い。銅イオンへの配位残基と Cd への配位残基との間に相関があることが知られている。そこで、Cd の NMR 測定より銅イオンの配位残基を推定した。Cd の NMR 解析では 546 ppm にピークが現れ、Cd への NNSS 型と予想された。547 ppm にも小さいピークが見られ、ほぼ似た構造のものが二系あることが考えられる。次に Cd に結合しているプロトンについて調べた。 $^3J_{Cd-H} = 15\sim 20$ Hz の測定では 2 組の H2 と H4 のペアが見られた。また、 $^3J_{Cd-H} = 40$ Hz の測定では 4 本のシステインからのピークが見られた。この結果から Cd に結合したのは 2つの His と 2つの Cys であると決定できた。つまり、銅イオンには 2つの His と 2つの Cys でタイプ 1.5 型の構造であるといえる。この銅イオンの構造は天然タンパク質にはない新規な構造であった。

(3) ヘモシアニンタンパク質の設計

以前に銅イオン誘導型の 3 本鎖コイルドコイル構造に 2つの銅イオンを接近して入れる方法を試みたが一つの銅イオンしか入らなかった。今回さらに、2つの接近した銅イオンが 2つの His 残基と一つの Cys 残基と結合したパープル銅タンパク質の Cys 残基を His 残基に変えたタンパク質を作成したが、この場合も一つしか銅イオンが結合しなかった。一方、ブルー銅タンパク質の解析から銅イオンに配位した Cys 残基が酸化され銅イオンと配位できなくなることが分かっている。そこで、Cys 残基を一時的な銅イオンと配位させる方法を試みた。そのスキームを図 2 に示す。

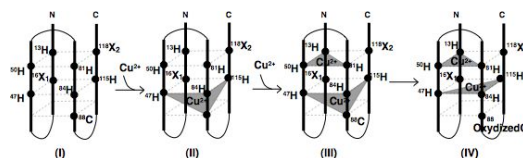


図 2. 4-ヘリックスバンドル型タンパク質中にタイプ 3 銅イオンの設計

2つの銅イオンの結合場所を IV に示す。最初の銅イオンは Cys 残基を含む場所に入る(II)。2 番目の銅イオンはその上に入る(III)。Cys の酸化により、最初の銅イオンの配位が全て His になる(IV)。

銅イオンを 1 等量添加までは 420 nm の UV-vis 吸収の増加が見られ、ESR で $A//$ が 11.8 mT、 $g//$ が 2.14 となり、銅イオンが Cys

残基に結合している。さらに銅イオンを2等量加えると、UV-vis 吸収が、徐々に410 nmに移り強度も減少した。ESR 値には新たに A_{\parallel} が 18.1 mT、 g_{\parallel} が 2.24 となるピークが現れた。この事は新たに、His 残基のみに配位した銅イオンを示している。数時間おくと、Cys 残基の酸化が起こり、400 nm 付近の吸収がなくなった。一方、ESR 値は A_{\parallel} が 17.4 mT、 g_{\parallel} が 2.26 となった。また、原子吸光でタンパク質に結合した銅イオンの数を計算すると 1.7 となり、ほぼタンパク質 1 分子に 2 つの銅イオンが結合していた。この事から、タンパク質中に 2 つの銅イオンを接近して配置することに初めて成功した。次に過酸化水素を用いて銅イオン間に酸素架橋を試みた。酸化反応に伴う 300 nm に UV-vis 吸収が見られた。しかし、ESR 測定でタイプ 3 銅に特徴なサイレントにならず、まだピークが見られた。この事はタイプ 3 銅の配位構造ができていないことを示している。銅イオンの位置や向きがタイプ 3 銅の形成に向いていないことが考えられた。しかし、今回の研究では、二つの銅イオン His 残基だけで接近して配置できた初めての例である。

(4) 結論

タンパク質の機能は通常水中で行われる。今回、反応条件を有機溶媒でも使えるようにするため、3-ヘリックスバンドル型の設計タンパク質中に 2 つのジスルフィド結合を導入することで 50%EtOH 中でも構造が安定なロックタンパク質を作成することができた。このタンパク質を用いれば、水に不溶性の基質まで使え、反応性が広がる。

レッド銅タンパク質から、天然タンパク質で見いだされていない銅イオンの配位構造が作れた。デノボタンパク質の特質の一つに天然に存在しない新規な構造の構築があるが、この例はその一つの例に当たる。酸化還元電位に違いがあるかに興味を持たれるが、まだ正確には出されていない。しかし、天然に無い構造が作られたということは、将来、新規な機能も作り出される可能性も示しているといえる。

スーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニン、主に His 残基に銅と亜鉛イオンまたは二つの銅イオンが配位している。今回の結果から、His 残基だけでは 2 つの銅イオンを配位させることはできなかったが、Cys 残基を加えると 2 つの銅イオンの配位させることができた。2 つの銅イオンの配位させる戦略として 2 つのことが考えられる。1) His 残基の場所を固定するため、立体障害の大きいアミノ酸残基を銅イオンの近傍に配置する。2) Cys 残基は銅イオンが配位場所を固定することが考えられた。そこで 1 つの Cys 残基を使って銅イオンの配位を固定し、空いた場所に二つ目の銅イオンを配位させる。このようにして二つ目

の銅イオンを配位させることができる。このことが可能になれば、前述のように Cys 残基を利用して 2 つの銅イオンを配位させた後、Cys 残基の酸化により Cys から近傍の His への転移でスーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンモデルのデザインができる可能性が考えられる。

今回、スーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンモデルは作成できなかったが、新しいデザイン指針を出すことができた。

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 0 件)

[学会発表](計 14 件)

龜井美里、志賀大悟、田中俊樹、De novo ブルー銅タンパク質を基にしたレッド銅タンパク質の構築。第 77 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2013 年 5 月 25 日、名古屋、名古屋大学

柘植大志、内山進、田中俊樹、システイン架橋を導入した 3 本鎖コイルドコイルタンパク質の構造と機能評価。第 77 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2013 年 5 月 25 日、名古屋、名古屋大学

安部雅人、志賀大悟、田中俊樹、ヘモシアニンモデルタンパク質の人工設計。第 77 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2013 年 5 月 25 日、名古屋、名古屋大学。

龜井美里、志賀大悟、田中俊樹、設計ブルー銅タンパク質における銅イオンの配位構造に与える疎水場のアミノ酸の影響。第 40 回生体分子科学討論会。2013 年 6 月 7 日、大阪、大阪大学

龜井美里、志賀大悟、田中俊樹、ヘリックスバンドル中に設計したブルー銅からレッド銅への配位構造の変換。第 13 日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 13 日、鳥取、とりぎん文化会館

柘植大志、田中俊樹、システイン架橋を導入した 3 本鎖コイルドコイルタンパク質の構造と機能評価。第 13 日本蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 13 日、鳥取、とりぎん文化会館

M. Kamei, D. Shiga, T. Tanaka, Construction of red copper protein that have unique coordinate. IGER International Symposium on cell surface structure. 2013 年 9 月 2 日、名古屋、名古屋大学

龜井美里、志賀大悟、田中俊樹、4 本鎖コイルドコイルタンパク質を用いたレッド銅蛋白質金属中心の構築。

第 7 回バイオ関連化学シンポジウム。2013 年 9 月 27 日、名古屋、名古屋大学
9 田中俊樹、金属結合蛋白質の設計と構築。大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の機能デザインに向けた実験と理論のインタ

ープレイ」2014年1月24日、大阪、大阪大学蛋白質研究所。招待講演。

10 柘植大志、田中俊樹、ルテニウムの配位を目指したシステイン架橋導入タンパク質の作成と評価。第94回日本化学会、2014年3月27日。名古屋、名古屋大学。

11 安倍雅人、志賀大吾、鷹野優、中村春木、田中俊樹、4-ヘリックスバンドルタンパク質中へ一時的な銅-Cys結合を利用したタイプ3銅イオンサイトのde novo設計。第24回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2014年6月14日。京都、京都薬科大学。
12 亀井美里、志賀大吾、田嶋邦彦、菊地晶裕、鷹野優、中村春木、田中俊樹、de novo設計したレッド銅タンパク質の構造解析。第14回日本蛋白質科学界年会、2014年6月25日、横浜。

13 柘植大志、田中俊樹、ルテニウム結合de novoタンパク質の作成と評価。第8回バイオ関連化学シンポジウム2014、2014年9月12日、岡山、岡山大学。

14 T. Tanaka, Creation of various copper configurations in the four helical bundle protein. Workshop on Artificial Photosynthesis : Engineering of light-harvesting processes based on Peptide and Protein Science. 2014年10月6日、名古屋、名古屋工業大学。招待講演。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

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 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :