

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650027

研究課題名(和文)高機能型新規バイオミネラル結合タンパク質の開発に関する研究

研究課題名(英文)Development of novel biomineral-binding protein with improved function

研究代表者

近藤 英昌 (KONDO, HIDEMASA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80357045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体中が作りだす結晶性物質であるバイオミネラルに特異的に結合するタンパク質の高機能化、および利用技術の開発を目的とする。そのために、バイオミネラル結合機構の解明と、結合能が向上したタンパク質の創出を目標とする。バイオミネラル結合タンパク質として、膵臓結石の主成分である炭酸カルシウム結晶(カルサイト)に結合するリソスタシンを用いた。断片化したリソスタシンおよび変異体リソスタシンのカルサイトに対する結合の強さを評価することで、カルサイト結合部位を同定した。また、この部位を他のタンパク質に導入することで、カルサイト結合機能が付加されたタンパク質の創出を試みた。

研究成果の概要(英文)：Biominerals are inorganic crystalline materials which are generated by living organisms. They are important components of the body including teeth, bones and shells. The abnormal biomineralization in internal organs causes stone diseases. Biomineral-binding proteins have been identified in from pathological biominerals. The present study focused on lithostathine (LIT) which is secreted from pancreas and binds to the surface of calcite crystal, a major component of pancreatic stone, to inhibit its further growth. In order to identify calcite-binding site and of binding mechanism of LIT, we characterize the binding affinity and intact LIT, fragments of LIT and mutant LITs. It was revealed that acidic residues clustering on the molecular surface are involved in the calcite binding. We also attempted to derive a bifunctional protein both with calcite binding and ice binding by introducing calcite-binding residues to fish antifreeze protein.

研究分野：構造生物学

キーワード：機能性タンパク質 バイオミネラリゼーション 生物物理

1. 研究開始当初の背景

バイオミネラルは生体が産出する無機物質であり、動物の外・内骨格を形成する主要な物質のひとつである。また、バイオミネラルはヒトの骨組織や歯などの他に、臓器内に析出することがある。これらは異常なバイオミネラルとして、膵臓結石(炭酸カルシウム)、尿路結石(シュウ酸カルシウム、尿酸アンモニウム、リン酸アンモニウムマグネシウム)、痛風(尿酸)などの様々な疾病に關与している。また、これらの結石からバイオミネラルに対して特異的に結合するタンパク質が見出されており、結石の成長の阻害や促進に關与していると考えられている。そのため、バイオミネラル結合タンパク質は、結石の成長阻害や検出のための薬剤として利用が可能である。さらに、結晶性のミネラルの基板にタンパク質分子を配列させることにより、これまでにない原理に基づいたナノ構造体の作成への利用が期待できる。しかしながら、バイオミネラルとタンパク質が結合した状態の立体構造を直接的に解析することや、相互作用を定量的に測定・評価することが困難であるため、機能メカニズムの詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではバイオミネラルの中で最も代表的な物質である炭酸カルシウムの結晶(カルサイト)に結合するタンパク質であるリソスタシン(Lithostathine:LIT)を対象として、カルサイトとの特異的な結合に關与する部位を同定し、その特徴を明らかにする。そのため、変異体を作成しそれらの結合能を評価する。得られた結果から分子モデリングによって結合のメカニズムを明らかにする。これらの知見を総括し新たなタンパク質-結晶間の相互作用機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) カルサイト結合領域の同定

リソスタシンは膵臓結石から見出された144残基からなるタンパク質であり、膵臓結石の主成分であるカルサイトに結合する性質を有している。これまでに、リソスタシンのカルサイト結合部位は分子から突き出たN末端の11残基の領域(LIT11)であるという見解と、それ以外の分子中央部(LIT133)に存在するという異なる見解があった。本研究では、それぞれのリソスタシン断片(LIT11、LIT133) および全長リソスタシン(LIT)を調製し、これらをカルサイトと混合し結合率を評価した。また、それぞれの試料の存在下で成長させたカルサイトの形状変化を観察し、カルサイトに対する結合能を比較した。

2) カルサイト結合部位の同定と残基の役割

次にカルサイト結合部位に關与する残基を特定するために、変異体実験を行った。LIT

は分子表面には酸性アミノ酸(アスパラギン酸・グルタミン酸)が偏在し、クラスターを形成している。これらの残基による負電荷と、カルサイトの表面のカルシウムイオンの正電荷の静電相互作用がカルサイトとの結合に關与していると思われた。クラスターには数残基の酸性アミノ酸がほぼ等間隔に並んでいる。このことから、これらの残基が重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、アスパラギン、グルタミン、およびアラニンを置換した変異体を作成し、カルサイトに対する結合能を評価した。

3) カルサイト結合機能が付加されたタンパク質の創出

LITとアミノ酸配列および立体構造が類似したタンパク質として、魚類由来のII型不凍タンパク質(AFP2)が知られている。AFP2は氷結晶に特異的に結合する性質をもっている。LITとAFP2は共通の祖先から分子進化したと考えられているが、カルサイトや氷結晶に結合する部位は別の領域に存在している。そのため、LITのカルサイト結合部位の残基をAFP2に導入することによって、炭酸カルシウム結晶と氷の結晶の両方に結合し成長を抑制することができる新たな多機能タンパク質を創出することを試みた。

4. 研究成果

1) カルサイト結合領域の同定

全長LIT及びLIT133は90%程度の非常に高い結合効率を示したが、LIT11はほとんど結合しなかった(図1A)。また、通常カルサイトは菱面体の結晶に成長するが、全長LITの存在下では新たな結晶面が出現し、多面体の形状を呈する。これは、LITが特定のカルサイト結晶面に結合することで、その面の成長を抑制することによる。LIT133存在下で成長させたカルサイトは、全長LITと同様な顕著な形状変化を示したのに対し、LIT11は高濃度にしても形状変化が観察されなかった(図1B)。これらのことから、カルサイトに結合する部位はLIT133に存在する可能性が高いと考えられる。

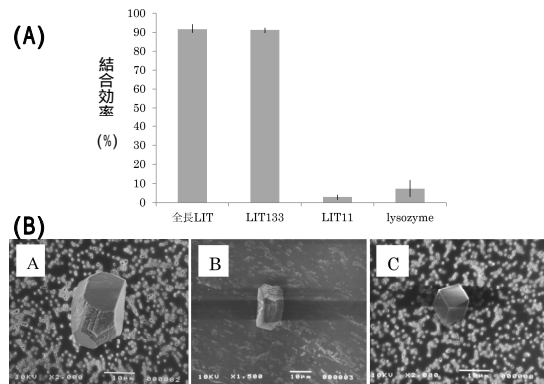


図 1

(A) : 各試料のカルサイトに対する結合効率
 (B) : (A)全長 LIT、(B)LIT133、(C)LIT11 によるカルサイトの形状修飾(電子顕微鏡写真)

2) カルサイト結合部位の同定と残基の役割

分子表面の酸性アミノ酸のクラスターのうち、Glu30、Asp31、Asp72は分子表面にほぼ等間隔に並んでいることから、この3つが重要な役割を果たしている可能性が高いと考え、Glu30、Asp31をAlaおよびGln・Asnに置換した変異体 (E30A/D31AとE30Q/D31N) を作成した。E30A/D31Aのカルサイトに対する結合効率は、野生型LITの半分程度まで減少した (図2)。さらにE30A/D31Aの存在下で成長したカルサイト結晶は、野生型LIT存在下に比べて形状変化の程度が低下していた。このことから、Glu30とAsp31を含む領域はカルサイトへの結合に参与していることがわかった。一方、E30Q/D31Nのカルサイトへの結合効率、カルサイトの形状変化の様子はともに、野生型LITとほとんど変わらなかった。

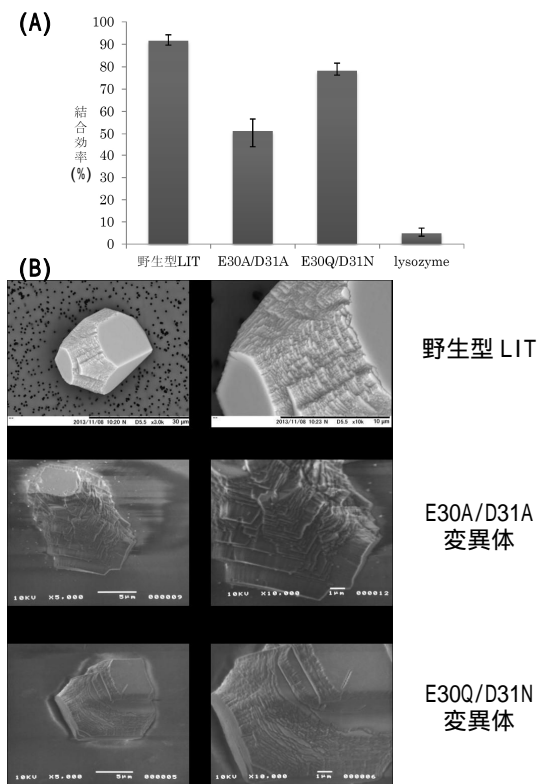


図 2

(A) : 各変異体のカルサイトに対する結合効率
(B) : 野生型 LIT、E30A/D31A 変異体、E30Q/D31N 変異体によるカルサイトの形状修飾 (電子顕微鏡写真)

E30A/D31Aでは側鎖の置換によって野生型LITよりもくぼんだ表面が形成されると予想される。一方、E30Q/D31Nでは分子の表面の形状は大きく変化しないと予想される (図3)。このことから、LITは静電相互作用だけでなく、分子表面の形状が結晶面とフィットすることによって、より強くカルサイトに結合しているということが示唆された。特にGlu30、Asp31、Glu72の側鎖の間隔がカルサイト表面のCa²⁺の間隔と良くマッチしており、アミノ酸の配置とカルサイトの構造の規則性が結合に参与していると思われる。

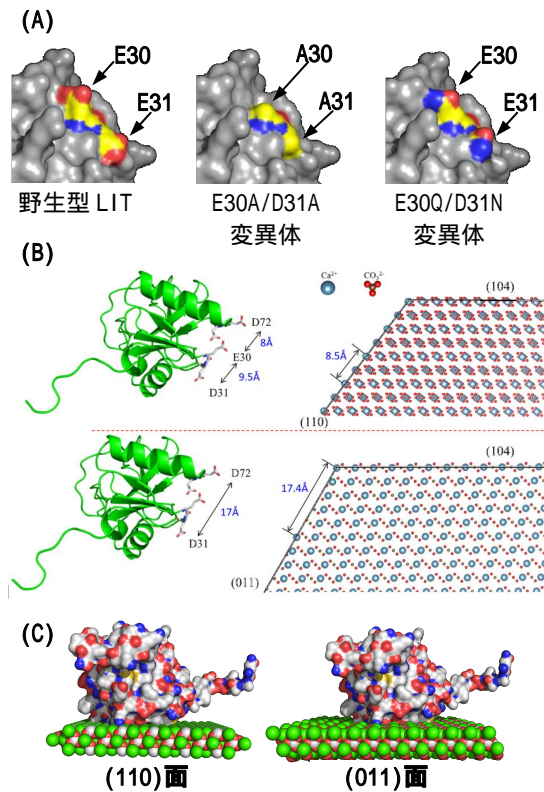


図 3

(A) : 野生型LITと各変異体の分子表面モデル
(B) : 酸性アミノ酸の側鎖の配置とカルサイト結晶面
(C) : LITとカルサイトのドッキングモデル

3) カルサイト結合機能が付加されたタンパク質の創出

AFP2としてシチロウウオ不凍タンパク質を対象として、LITのカルサイト結合部位に対応する6残基のうち2残基を置換し、カルサイトと氷結晶に結合するタンパク質の作成を試みた。得られた変異不凍タンパク質 (LIT-AFP) のカルサイト結合能および不凍活性を評価した。

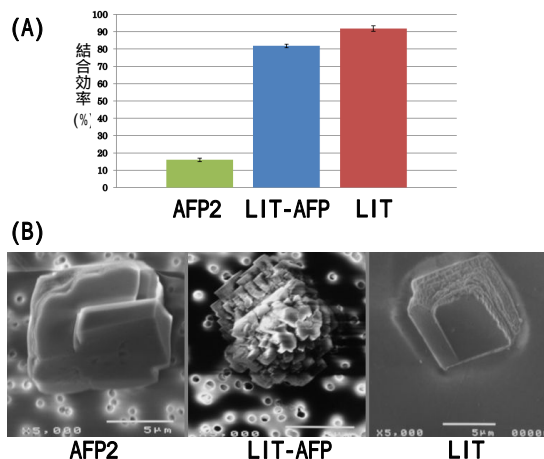


図 4

(A) : 各試料のカルサイトに対する結合効率
(B) : カルサイトの形状

LIT-AFPはLITと同程度の結合効率を示した。また、AFP2存在下で成長したカルサイトは菱面体に近い形状のまま成長しているが、LIT-AFP変異体存在下では不規則な形状の結晶面があらわれた(図4)。AFP2存在下と比べると大きく形状が変化しているが、LITと異なる形状を示した。このことから、LIT-AFPはカルサイトへの結合機能を有しているが、LITと比べて結晶面に不規則に結合しているのではないかと考えられる。

また、不凍タンパクが存在する水溶液で成長する氷結晶は、ピラミッド型などに形状が変化する(図5左)。LIT-AFPの不凍活性は大きく低下していた(図5中)。これは、変異導入による立体構造の変化が顕著であったためであると考えられる。今後は、立体構造に対する影響を考慮し、リソスタシンの機能と不凍活性の両方を有したタンパク質の創出を目指す。

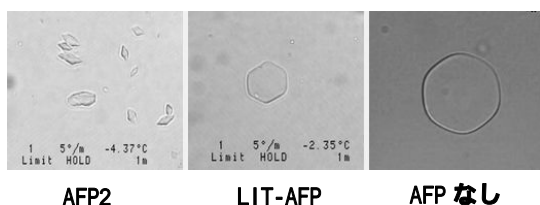


図5

氷結晶の形状変化による不凍活性の評価

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)

[学会発表](計2件)

奈良真帆、花田祐一、津田栄、近藤英昌、Functional analysis of calcite-binding site of lithostathine、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

富樫征也、花田祐一、奈良真帆、津田栄、近藤英昌、Identification of calcite-binding site of lithostathine、第51回日本生物物理学会年会、2013年10月28日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 英昌(KONDO HIDEMASA)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80357045