

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01947

研究課題名(和文) 金属酵素の機能制御機構における酵素分子全体の動的構造効果：モデル蛋白質による検証

研究課題名(英文) Experimental Investigation of structural protein dynamics for metalloenzyme functions

研究代表者

松尾 貴史 (Matsuo, Takashi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：50432521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、金属含有酵素の機能発現メカニズムに対する、活性部位である遷移金属イオン近傍を覆うタンパク質構造の動的な構造効果を、チオールサブチリシンをモデルタンパク質として検証した。その結果、チオールサブチリシンのシステイン残基に結合したCu(II)イオンの性質は、その近傍の構造的な要因だけでなく、その部位から遠く離れたカルシウムイオンの結合状態によって制御されることが実験的に証明できた。その遠く離れた部位の構造的摂動は、タンパク質全体の構造柔軟性効果によって説明することができ、タンパク質という自由度の大きい構造が、結合した金属イオンの性質を決める要因であることを実証することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、タンパク質という生体高分子の分子自由度が、遷移金属イオンの反応性を決める要因であり、金属酵素の理解には、金属配位部位近傍の構造的な要因のみだけでなく、タンパク質全体の構造効果を加味する必要性を実験的に証明したものである。分子量数万の金属含有酵素の機能は、「小さな」遷移金属イオン上で発揮される。したがって、本研究で得られた知見は、「小さな金属イオンの性質をコントロールするのに、なぜ、大きなタンパク質構造が必要か？」という構造生物学の根本的な疑問に1つの答えを与えるものであり、今後、タンパク質工学的に金属含有酵素の機能を制御する際の新しいアプローチを提案するものである。

研究成果の概要(英文)：This project focused on the correlation between the reactivities of a metal ion bound to a protein and the protein structural dynamics using thiol-subtilisin as a model protein. The reactivities of Cu(II) ion coordinated by Cys221 residues in the protein was found to be regulated by the calcium ion binding status far from the Cu(II) coordination site. The effect can be interpreted in term of the effect of structural flexibility of the host protein. It was proved that the increased molecular freedom of proteins is a determinant of the characteristics of metal ions bound to the proteins.

研究分野：生物無機化学

キーワード：金属酵素 構造柔軟性 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 金属含有酵素は、タンパク質内部に結合した金属イオンを活性部位にもち、この金属イオン上で触媒、電子伝達、小分子運搬といった様々な生体反応を担っている。従来、その金属活性部位の配位構造や化学反応機構を明らかにする方法の1つとして、活性部位近傍の構造を模倣した「低分子合成モデル化合物」が開発され多くの研究がなされてきた。しかし、金属含有酵素に限らず、生体内のタンパク質・酵素は分子量数万の巨大分子であり、様々な時間スケールの構造的な「揺らぎ」が存在する。このような「タンパク質機能に対する構造柔軟性・揺らぎの重要性」は、研究開始当初、関連する新学術領域が複数立ち上がっていたことにも見られるように、生体分子科学の研究におけるホットな関心事の1つであった。

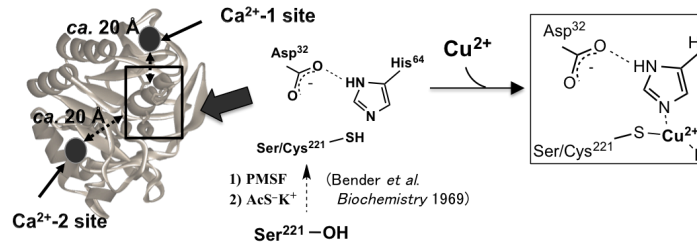
(2) さらに、近年、金属含有酵素の機能に対しては、活性部位の外側にあるアミノ酸残基の間接的な構造効果(第2配位圏効果)の重要性も指摘されていた。故に、金属含有酵素の機能発現機構をより詳細に明らかにする場合には、単に、活性部位近傍の構造的要因にのみを標的とした研究でなく、タンパク質部分の構造的役割を含めた詳細な実験的検証が必要であるという認識はなされていたものの、活性部位近傍だけを切り出した「低分子モデル化合物」を用いる従来の戦略では十分に金属含有酵素の機能発現に対する分子全体の構造効果を解明することは困難であるという問題点があった。

(3) 以上のような状況で、研究代表者は、タンパク質工学的研究の一環で、プロテアーゼの1つであるサブチリシンの活性部位 Ser221 残基を化学修飾法で Cys に置換した「チオールサブチリシン」を調製し(図1)、Cys 残基に Cu(II)が安定に配位することを見出していた。サブチリシンは、

Ser/Cys221 部位から 20 Å 以上離れた位置での Ca²⁺イオンの結合の有無がタンパク質の熱安定性の決定要因

である。よって、Ca²⁺イオンの結合状態を人為的に制御することで、タンパク質全体の構造柔軟性さらに Cu(II)の性質との相関関係を実験的に検証できると予想した。

Cu(II)-チオールサブチリシン:『モデル蛋白質』



Ca²⁺結合状態 → 酵素の構造柔軟性 → Cu²⁺中心の性質

図1 チオールサブチリシンの構造

2. 研究の目的

以上の経緯から、本研究では、金属含有酵素における金属配位部位の反応性制御に対する「蛋白質全体の構造柔軟性・揺らぎ」という動的効果や、「活性部位外側の間接的な構造効果」の重要性を、チオールサブチリシンをモデルタンパク質として用いて実験的に証明することを目的とし、以下の2つの課題を設定した。

(1) チオールサブチリシンに結合する Ca²⁺の数が、蛋白質全体の構造柔軟性を変化させ、その効果が、Cu²⁺配位部位の反応性に伝搬していくことを実証する。

(2) チオールサブチリシン変異体を用いて、金属配位部位の外側に位置するアミノ酸残基の効果(第2配位圏効果)を検証し、金属配位部位に間接的に相互作用するアミノ酸残基の効果の重要性を実証する。

3. 研究の方法

(1) 図1に示すサブチリシンの構造において、Ca²⁺₁およびCa²⁺₂ siteのCa²⁺結合定数に差があることを利用して、タンパク質溶液の透析条件によって、Ca²⁺イオン2個結合型、1個結合型、0個結合型の3種類のチオールサブチリシンを調製し、これらのタンパク質の2次構造への影響、熱安定性の評価、アミド H/D 交換法による主鎖の構造柔軟性の評価を行ったのち、Cu²⁺配位位置から離れたところのCa²⁺結合状態を変化させて、Cys²²¹配位Cu²⁺錯体の構造および酸化状態変化を電子スピン共鳴スペクトル(EPR)で評価した。さらに、Cys221に対して2-bromomethylpyridineを用いた化学修飾を行い、安定な3座配位金属錯体が構築できるようにした。

(2) また、金属配位部位の外側に位置するアミノ酸残基の効果を検証するために、金属イオンの配位子となる His⁶⁴と水素結合を形成している Asp³²を Asn および Ala に置換した変異体を作成し、金属錯形成が可能であるかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1) Ca^{2+} 結合定数に注目した3種類のチオールサブチリシンの調製について、2個結合型タンパク質を Ca^{2+} イオンを含まない緩衝液中で透析を行うことで Ca^{2+} イオン1個結合型、さらに、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を含む緩衝液中で透析して Ca^{2+} イオン0個結合型を調製できることがわかった。これらのタンパク質の2次構造をCDスペクトルで評価したところ、 Ca^{2+} イオンの結合状態の違いに関わらず、一致するCDスペクトルが得られ、 Ca^{2+} イオンの結合状態は、タンパク質全体の構造には影響を及ぼしていないことが示された。しかし、塩酸グアニジン存在下でのCDスペクトル観測によるタンパク質変性実験においては、2個結合型タンパク質は6Mの変性剤存在下でも変性が見られなかったが、1個結合型、0個結合型では顕著な変性が見られ（図2）、2次構造の評価では反映されない構造的違いが示唆された。

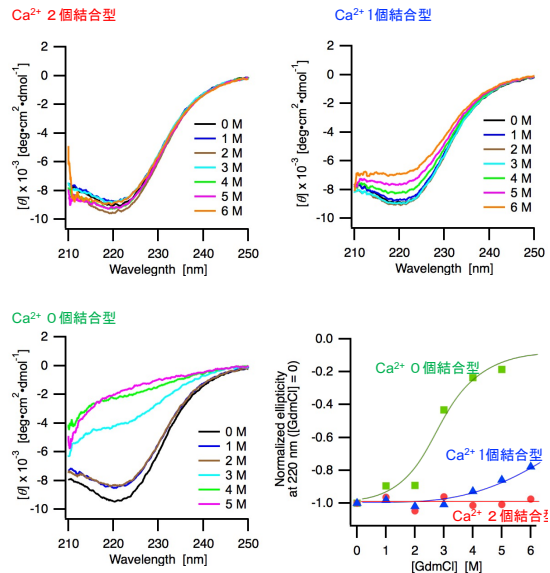


図2 塩酸グアニジン存在下でのチオールサブチリシンのCDスペクトル変化（10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 25 °C）

(2) また、Cys 配位 Cu^{2+} 錯体の形成を試みたところ、 Ca^{2+} イオン0個結合型は、2次構造上は他2つと違いが見られないにも関わらず、ICP-MSによる金属イオン定量において、 Cu^{2+} の結合が起こっていないという結果が得られ、タンパク質全体の熱安定性が金属イオンの結合能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

そこで、タンパク質主鎖の構造柔軟性と Ca^{2+} イオン結合状態との相関関係を直接的に検証するために、アミドH/D交換に伴う質量変化をMALDI-TOF-MSによって評価した。その結果、 Ca^{2+} イオン2個結合型チオールサブチリシンの質量増加 ($\Delta m/z$) は、 $\Delta m/z = 70$ であったのに対し、 Ca^{2+} イオン1個結合型および0個結合型タンパク質は、 $\Delta m/z = 200$ 程度と大きな質量増加を示した。アミドH/D交換による質量増加が大きいほど、タンパク質主鎖の構造柔軟性が大きい。したがって、 Ca^{2+} イオンの結合状態は、タンパク質主鎖の構造柔軟性を自在に変化させることのできる「構造柔軟性パラメーター」として利用できることが明らかとなった。

(3) 以上の知見を基に、 Ca^{2+} イオン2個結合型および1個結合型チオールサブチリシンを用いて、Cys配位 Cu^{2+} 錯体について、これら2つのタンパク質における Cu^{2+} 錯体の性質を比較した。

これら2つのタンパク質それぞれに、 Cu^{2+} ソースとして $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ を1等量加えたところ、紫外可視吸収(UV-vis)スペクトルにおいて、 $\text{CysS} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ 電荷移動(LMCT)と帰属されるバンドが358 nm付近に出現し、 Cu^{2+} 配位が確認された（図3）。しかし、時間の経過とともに、この吸収バンドの強度は減少し、配位構造あるいは酸化状態の変化が示唆された。また、 Ca^{2+} イオン2個結合型、1個結合型タンパク質の間で、最終的に観測された吸収バンドの形状に違いがあり、前者では、吸収バンドがほぼ消失したのに対し、後者では、30%程度の強度を保ったまま、バンドが残存していた。

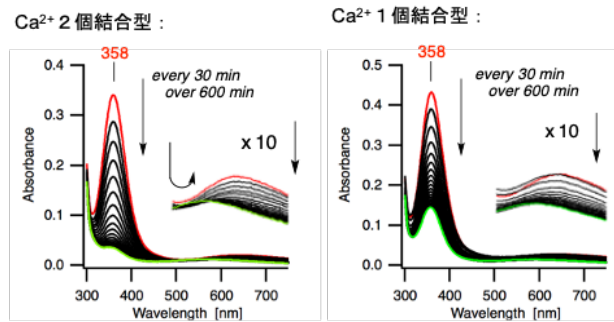


図3 チオールサブチリシンに $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ （1当量）加えた際のUV-visスペクトル変化（10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 25 °C）

これらのスペクトル変化をさらに詳細に検証するために、電子スピン共鳴(EPR)スペクトル変化を観測した（図4）。 Ca^{2+} イオン2個結合型および1個結合型チオールサブチリシン

ともに、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ を添加した直後は、type-II銅錯体に特徴的なスペクトルを示し、Cys残基近傍のアミノ酸残基の幾何学的配置から、Cys, Hisが配位子と機能し、水分子（あるいはヒドロキシ基）が残りの配位座を占める平面性(planar)の高い錯体構造であると考えられる。時間の経過とともに、 Ca^{2+} イオン2個結合型タンパク質は、シグナル形状の変化は見られたものの、二回積分によって求められるシグナル強度の変化はほぼ一定であった。このことは、微小な配位構造は起こるものの、 $\text{Cu}(\text{II})$ 酸化状態を保っていることを示している。一方で、 Ca^{2+} イオン1個結合型タンパク質は、シグナル形状の変化のみならず、シグナル強度が42%減少する現象が見られた。

この EPR シグナル強度は、Cys チオールから Cu(II)への内圏電子移動の結果、Cu(I)への自動還元を意味している。一般的に、平面性の高い Cu(II) 錯体が Cu(I)への変化する際は、tetrahedral 構造への大きな配位構造変化を伴う。主鎖の構造柔軟性の高い Ca²⁺イオン 1 個結合型チオールサブチリシンは、この配位構造変化に追従することが可能であり、その変化をアシストしていると考えられる。一方、主鎖の構造柔軟性の剛直な Ca²⁺イオン 2 個結合型タンパク質は、この配位構造変化をアシストできないため、自動還元反応が抑制され、Cu(II)酸化状態を保ったまま、微小な配位構造変化に留まっていると結論づけることができる。

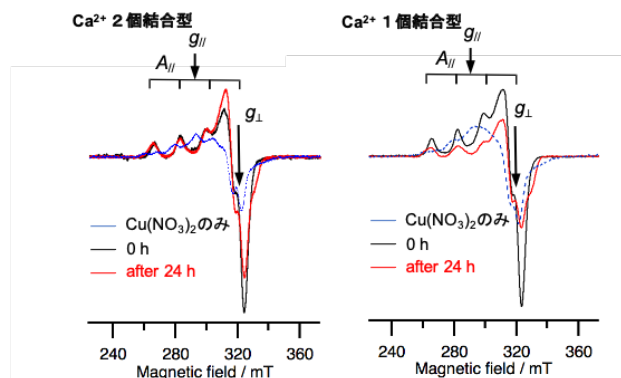


図4 チオールサブチリシンに Cu(NO₃)₂ (1 当量) 加えた際の EPR スペクトル変化 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 77 K)

(4) Cys221 を 2-bromomethylpyridine を用いた化学修飾は、MALDI-TOF-MS によって、Cys221 がメチルピリジル化され、Co³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺が配位することを ICP-MS によって確認できた。これらの金属イオンの脱離は見られず、安定な三座配位錯体を構築することに成功した。

(5) 金属配位部位の外側に位置するアミノ酸残基を検証するために必要な変異体チオールサブチリシンの大腸菌発現系の構築を行った。由来は異なるが相同性の高いサブチリシンカールスバークとサブチリシン E について、プロドメインを有する「プロチオールサブチリシン」をコードする pCold I 系プラスミドを構築し、JM109 大腸菌へ形質転換した。両タンパク質ともに、発現の確認は行うことができたが、自己消化による成熟化は非常に遅いため、別途、市販の成熟型サブチリシンを加えて、プロドメインの脱離をさせることが必要であった。また、Asp32Asn および Asp32Ala 変異体の発現も確認でき、CD スペクトル評価によるタンパク質二次構造には大きな影響は出なかったが、Cu(NO₃)₂ の添加後出現する LMCT バンドの強度は変異導入前よりも小さく (50%)、また、添加後 10 分で吸収バンドの著しい現象が見られ、Cu(II)錯体の安定性が、変異導入前より大きく低下する現象が見られた。タンパク質二次構造評価から示されるタンパク質の全体構造の大きな変化はないことから、Asp32-His64 の水素結合への有無が間接的に錯体の安定性を制御しているものと考えられる。

(6) 以上のことから、タンパク質に結合した遷移金属イオンの反応性は、金属配位部位から遠く離れた構造的摂動が、タンパク質の主鎖の柔軟性という効果を通じて制御されることが実験的に証明された。このことは、「アミノ酸ポリマー」であるタンパク質という生体高分子の分子自由度が、遷移金属イオンの反応性を決める要因であり、金属酵素の反応性を十分に理解するには、金属配位部位近傍の構造的要因のみだけでなく、タンパク質全体のグローバルな構造効果を加味することを意味している。

生体内に存在する金属含有酵素は、分子量数万の巨大分子であるものの、これらの酵素の機能は、「小さな」遷移金属イオン上で発揮される。したがって、本研究で得られた知見は、「小さな金属イオンの性質をコントロールするのに、なぜ、大きなタンパク質構造が必要か？」という構造生物学の根本的な疑問に 1 つの答えを与えるものである。また、今後、タンパク質工学的見地から、金属含有酵素の機能を調節・改良したい場合、反応部位近傍の構造最適化でなく、「タンパク質全体の構造ゆらぎへの摂動による機能調節」という新しいアプローチを提案するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Takashi Matsuo, Teruyuki, Miyake, Shun Hirota	4. 巻 60
2. 論文標題 Recent Developmetns on Creation of Artificial Metalloenzymes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 151226(1-8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2019.151226	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 Rini Majumder, Snigdha Roy, Kentaro Okamoto, Satoshi Nagao, Takashi Matsuo, Partha Pratim Parui	4. 巻 36
2. 論文標題 Porphyrin-based Probe for Simultaneous Detection of Interface Acidity and Polarity during Lipid Phase Transition of Vesicles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 426-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b02781	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 Teruyuki Miyake, Ryosei Tamaki, Moeko Asanuma, Yoji Fukada, Shun Hirota, Takashi Matsuo	4. 巻 31
2. 論文標題 Regioselective Chemical Modification of Cysteine Residues on Protein Surfaces Focusing on Local Environment around the Conjugation Sites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chem.	6. 最初と最後の頁 794-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.9b00869	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 Matsuo Takashi, Kono Takamasa, Shobu Isamu, Ishida Masaya, Gonda Katsuya, Hirota Shun	4. 巻 24
2. 論文標題 Global Structural Flexibility of Metalloproteins Regulates Reactivity of Transition Metal Ion in the Protein Core: An Experimental Study Using Thiol-subtilisin as a Model Protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 2767 ~ 2775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201705920	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12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Teruyuki Miyake, Yoji Fukada, Shun Hirota, Takashi Matsuo
2. 発表標題 Sequential Conjugation of Different Molecules onto Protein Surface and Comparison of Reactivities of Cysteine Residues
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田達郎、百武篤也、山本泰彦、松尾貴史、廣田俊、鈴木秋弘、根矢三郎、莊司長三、渡辺芳人
2. 発表標題 ヘム鉄の軸配位子としてイミダゾールをもつミオグロビンの研究
3. 学会等名 第46回生体分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾貴史、三宅輝幸、廣田俊
2. 発表標題 システイン残基周辺の局所的環境の違いを利用したタンパク質化学修飾の反応制御
3. 学会等名 第19回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉置椋星、三宅輝幸、浅沼萌子、松尾貴史、廣田俊
2. 発表標題 アデニル酸キナーゼ三変異体(A55C/C77S/V169C)の表面システイン残基の反応性に対する局所的構造要因の検証
3. 学会等名 日本化学会第100春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾貴史、菖蒲勇、河野尊匡、権田勝也、廣田俊
2. 発表標題 チオールサブチリシンに結合したカルシウムイオンの結合状態が及ぼす主鎖の構造柔軟性およびシステインの反応性評価
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 Takashi Matsuo, Takefumi Yoshida, Chie Imai, Shun Hirota, Kazumo Wakabayashi, Catur Jatmika
2. 発表標題 Combination of metathesis catalyst complexes and protein: From the development of metathesis-catalyzing artificial enzymes to application as a biorthogonal tool
3. 学会等名 43rd International Conference on Coordination Chemistry 2018 (ICCC-2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Teruyuki Miyake, Yoji Fukada, Shun Hirota, Takashi Matsuo
2. 発表標題 Sequential conjugation of different synthetic molecules onto protein surface with two cysteine residues based on the reactivities of cysteine thiols
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾貴史、菖蒲勇、石田昌也、河野尊匡、廣田俊
2. 発表標題 タンパク質内部の遷移金属イオンの性質とタンパク質構造柔軟性：チオールサブチリシンをモデルタンパク質とした相関関係の実験的検討
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾貴史
2. 発表標題 タンパク質の動的構造効果による機能制御
3. 学会等名 第30回生物無機化学夏季セミナー(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三宅輝幸、松尾貴史、廣田俊
2. 発表標題 金属錯体-金属錯体相互作用のスイッチングを目指したCoサレン錯体修飾アデニル酸キナーゼの物性評価
3. 学会等名 錯体化学会第67回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松尾貴史、三宅輝幸、藤井亮、菖蒲勇、河野尊匡、廣田俊
2. 発表標題 タンパク質の構造的二面性に立脚した反応場の機能制御
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Matsuo, Takefumi Yoshida, Chie Imai, Shun Hirota, Kazumo Wakabayashi,
2. 発表標題 Construction of "metathesase" with protein scaffold and potential application of olefin metathesis as a biochemical tool
3. 学会等名 International Congress of Pure and Applied Chemistry-2018(ICPAC-2018)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Daniel F. Sauer, Takashi Matsuo, Akira Onoda, Jun Okuda, Takashi Hayashi	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 472
3. 書名 Advances in Bioorganometallic Chemistry	

〔産業財産権〕

〔その他〕

松尾貴史ホームページ http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo_jpn.html

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
---------	---------