

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19094

研究課題名(和文) 高度に修飾された発色団組込型機能性タンパク質の創製

研究課題名(英文) Creation of functional proteins bearing highly modified unusual protein-derived cofactors

研究代表者

藤枝 伸宇 (Fujieda, Nobutaka)

大阪公立大学・大学院農学研究科 教授

研究者番号：00452318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、分析技術の発達により、タンパク質中でアミノ酸が翻訳後化学修飾を受けて形成された新規な補因子が発見されてきた。そのうちガラクトースオキシダーゼ(GAO)は、活性中心部位にヒスチジンとチロシンを2つずつ持つ酵素である。そこで本研究では、クビンタンパク質の金属中心近傍にチロシンとシステインを導入することによりGAOの酵素活性中心を模倣した銅含有金属タンパク質を調製し、これを用いて自発的なCys-Tyr架橋構造の形成を行なった。特に、Val37とArg39に対して飽和変異導入を行うことにより架橋形成が促進された変異体を特性評価およびスクリーニングした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

芳香族アミノ酸から生じる特殊な側鎖は配位子や補欠分子族として高度な機能を発揮するものがある。その機能は様々で他の有機補因子やカノニカルなアミノ酸残基にはない物理化学・触媒化学的に珍しい性質を示す。このように、今後、本研究結果を発展させ、様々な特殊なアミノ酸残基を形成させることができればタンパク質のさらなる機能化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the development of analytical techniques has led to the discovery of novel built-in coenzymes formed by post-translational chemical modification of amino acid residues in proteins, such as cysteinyl tyrosine in galactose oxidase (GAO). In our laboratory, we have studied the cupin protein from thermophilic bacteria, which has low molecular weight and a metal binding motif with four histidines. In this study, we prepared a copper-containing metalloprotein that mimics the environment of the active center of GAO by using this protein, and formed a Tyr-Cys cross-linked structure using this protein. Thus, by using saturated mutagenesis to two amino acid residues in the proximity of Tyr108, the crosslink formation of these mutant was further improved.

研究分野：生物無機化学

キーワード：補欠分子族 翻訳後化学修飾 キノプロテイン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾はリン酸化を始めとし、種々発見されている。タンパク質に機能を付与するものもあれば劣化に伴う自然の反応で生じるものも広い意味では修飾にはいると考えられる。そういったものをすべて含めるとタンパク質性のアミノ酸はカノニカルなものだけではなく、それらが化学的に反応したものも含め多種多様となっている。例を挙げるとガラクトース酸化酵素 (GAO) や銅アミン酸化酵素 (AO) は、活性中心にあるチロシン残基が酸化化学修飾を受けて生じたアミノ酸残基由来の補欠分子族を有している (図 1 AC)。GAO では翻訳後化学修飾によってチロシンとシステインの間で架橋が形成され Cys-Tyr 補因子を形成している (図 1 C)。この Cys-Tyr 補因子が近傍の銅イオンと電子移動したラジカル活性種が、アルコールの酸化反応に関与することがわかっている。さらに AO ではチロシン残基が水酸化に引き続く、水分子によるマイケル付加反応を受けてトールパキノン補因子を生じる。この TPQ は求電子的性質を保有するアミノ酸残基としてアミンの求核攻撃の受容体として働くほか、ラジカル分子を経由するその後のスムーズな電子移動を司っている。このように特殊な翻訳後化学修飾を受けたアミノ酸残基の一部は補因子として、タンパク質自身に触媒活性などの様々な機能を与えている。一方で、アミン脱水素酵素のトリプトフィルキノ (TTQ) や青色タンパク質 (Ranasmurfin) のクロモフォア (bis-リジルチロシルキノ, LTQ, 図 1 G) など複数のアミノ酸残基が架橋する補因子も発見されている。二核金属タンパク質の活性中心近傍に Tyr-Val 架橋や Phe-Val 架橋などの存在が確認されている。

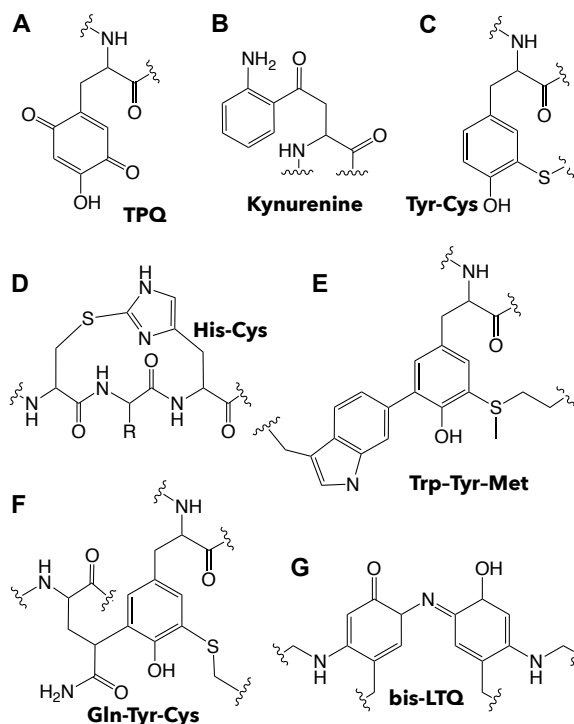


Figure 1. Protein-derived organic cofactors

2. 研究の目的

1 で書いたように、銅含有酸化還元酵素では金属中心酸化的反応性によって、特殊なアミノ酸残基を形成させることができている。このようなアミノ酸残基の形成においては活性中心金属-活性酸素種がそれらの形成を誘起していると考えられている。一方で、鉄タンパク質においても銅と同様の酸化反応性を有するため、近傍の芳香族アミノ酸残基が酸化され、カテコールが発生し、鉄と配位することにより、強い呈色を示す酸化的自己修飾が数多く報告されてきた。これらより、金属中心が持つ酸化的反応性の制御と金属イオンからの距離や配置を微調整することにより、特殊な翻訳後化学修飾を人為的に引き起こせると考えた。そこで、本研究では、このようなアミノ酸残基の銅や鉄中心による酸化的な翻訳後化学修飾を利用した特異な有機補因子の創出と、その特性評価、および触媒反応への応用をめざして検討を行った。さらに、モデルタンパク質としたクピンタンパク質における金属-活性酸素種の詳細な反応機構解明を目的とした。

3. 研究の方法

図 1 C の Cys-Tyr 補因子は近傍の銅イオンの作用により自発的に形成されるため、土台タンパク質として様々な金属と結合する安定な超好熱菌由来クピンタンパク質を用いて、この補因子の生成を試みた。狙いとしては酸化されやすいシステインとチロシンに焦点を絞り、クピンタンパク質が持たない Cys-Tyr をこのタンパク質の金属結合部位近傍に形成させることにあつた。すでに本プロジェクト開始までに Tyr-Cys 近傍のアミノ酸残基に部位飽和と変異誘発を利用してより修飾効率の良い変異体を獲得し、構造などの評価により、立体制御による形成メカニズムを検討してきた。すでに、58 番目のヒスチジンをシステイン、108 番目のイソロイシンをチロシン

に変異させた変異体に存在する 37 番目のバリンに部位飽和変異導入を行っていた。SDS-PAGE 上で架橋構造が生じた場合に泳動度が変化することを利用して、スレオニンやセリン、アスパラギン酸への変異で効率が向上することが分かっていた。そのため、これら変異体の X 線結晶構造解析から開始し、スレオニンやセリンになった変異体に対して、さらにチロシンとの相互作用が考えられる 39 番目のアルギニンにもターゲットを絞り、部位飽和変異誘発を利用してより修飾効率の良い変異体を獲得し、構造な解析を行った。

4. 研究成果

58 番目のヒスチジンをシステイン、108 番目のイソロイシンをチロシンに変異させた変異体をコードする DNA 配列を pET30 ベクターに組み込んだプラスミドを、大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換し、硫酸銅を含む培地中で発現誘導を行った。アフィニティクロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、結晶構造解析を行った。その結果、SDS-PAGE 上では Cys-Tyr の架橋形成が観測されていたものの、ほとんど結晶構造中では観測されなかった。そこで、37 番目のバリンをスレオニンやセリンに変異させた変異体でも同様に観測したところ、ダイマー中の片方においてははっきりと架橋構造がの形成が観測された (図 2)。

実際に精製タンパク質に銅イオンを添加して架橋構造の形成率を定量したところ、6 割まで向上したことがわかった。そこで、さらにこの効率を向上させるため、この結晶構造中でチロシン残基の最も近傍に存在していた 39 番目のアルギニンに飽和変異導入を行い、SDS-PAGE でのスクリーニングを行った。その結果、ヒスチジンやトリプトファンへの変異が効率を向上させる可能性が示唆された。そこで、それらを精製したが、精製に利用する Strep タグの切断効率が非常に低下する現象に見舞われてしまった。現状ではトロンビンで切断していたため、トロンビン量を増加させるなど行ったが向上は見られず、今後の結晶化に悪影響が予想された。そこで、プロテアーゼ切断部位をトロンビンから HRV3C2 変更することとした。発現コンストラクトを調製し直し、HRV3C での切断を試みたところ、ほぼ 100%の切断が観測できた。そこで、ヒスチジンやトリプトファンへの変異体を精製し、銅イオンを添加して架橋構造の形成率を定量したところ、トリプトファンへと変異させたものではさらに向上することがわかった。今後、この変異体を特性評価しさらなる環境制御を行うことで効率の良い特殊なアミノ酸残基の誘起方法が得られると期待される。

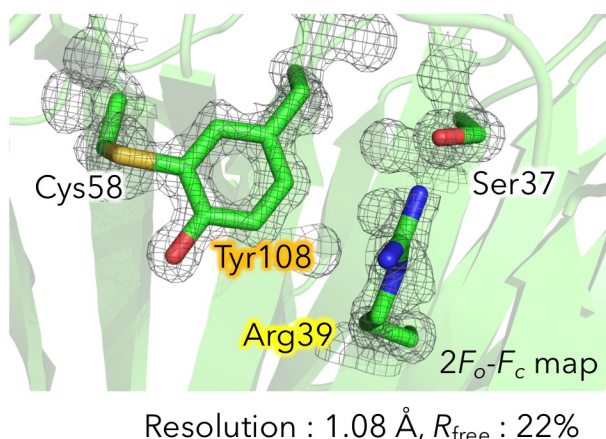


Figure 2. Electron density map around the Tyr-Cys residues in serine mutant.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤枝伸宇
2. 発表標題 タンパク質金属配位子を使った反応開発
3. 学会等名 第90回白鷺セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本紘依・松本 沙耶香・藤枝伸宇
2. 発表標題 クピンタンパク質の銅中心が誘起するシステインとチロシンの架橋形成
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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