

## 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 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750156

研究課題名（和文） インターエレメント化学の要素を取り入れた金属タンパク質デザイン

研究課題名（英文） Design of Metalloproteins based on principal of inter-element chemistry

研究代表者

松尾 貴史（MATSUO TAKASHI）

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：50432521

研究成果の概要（和文）：「金属配位形式」「インターエレメント」（元素間の相互作用）およびタンパク質の構造的特徴に着目した人工金属タンパク質の構築を実施した。その結果、プロテアーゼ阻害機構に基づく有機金属(C-配位)タンパク質の創成、基質結合に伴うタンパク質構造変化に基づく金属錯体由来の発光挙動のスイッチングシステムの構築に成功した。さらに化学修飾サブチリシン活性部位におけるシステイン配位銅錯体の内圏電子移動に伴う自動還元反応を示唆するデータが得られた。

研究成果の概要（英文）： Some artificial metalloproteins were successfully constructed from the aspects of “fashions of metal coordination”, “inter-element principal (interactions between elements)” and “structural characteristics of proteins”. An organometallic artificial protein with a C-coordinated metal center was prepared through inhibition mechanism of serine proteases. Furthermore, we successfully develop a protein structure-based switching system of emission property of a metal complex attached onto the surface the protein. We also found autoreduction of a copper ion with S-coordination, which was constructed at the active site of a chemically modified subtilisin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：インターエレメント、タンパク質デザイン、白金錯体、触媒反応、有機金属

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 天然金属タンパク質の構造・機能・作用機構が明らかになるにつれて、コンパクトな構造で高度機能をもつ生体分子を得るために、「分子設計」の要素を取り入れた「タンパク質 de novo デザイン」がさかんに行われていた。従来行われていたタンパク質デザインの主な手法としては、(i)タンパク質中の金属イオンや補欠因子の置換によるタンパ

ク質再構成、(ii)遺伝子学的変異によりアミノ酸残基を適切に配置させることによる金属錯形成場の構築、(iii)システインやリシン残基を介したタンパク質表面の化学修飾であった。また、金属配位形式は、主に N, O, S 原子による配位がほとんどであり、必然的に「無機錯体」が研究対象となっていた。

(2) 一方、有機金属化学の分野では、C 配位の「有機金属錯体」、さらには第 2 周期以降

の重典型元素を配位子とする遷移金属—典型元素錯体が数多く合成され、N, O, S 原子配位では達成困難な特異的な性質や、炭素—炭素結合生成等、高度かつ利用価値のある反応性が報告されてきた。

(3) タンパク質中の反応、一般的な溶液反応双方とも、対象となる金属錯体の反応性は、中心金属と配位子原子との元素間相互作用(いわゆるインターエレメント)に大きく影響を受ける。また、多核錯体となると、金属—金属間の相互作用も重要となる。これらの要素を十分に考慮したうえで、タンパク質ならではの構造的特徴を加味した金属タンパク質デザインを行えば、新しい観点でのタンパク質デザイン法を提案できると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 以上の状況から、人工金属タンパク質デザインの新しいアプローチを提案すること目的として、ランダムなタンパク質表面の化学修飾や、単なる遺伝子操作による金属錯形成場の構築ではなく、「インターエレメント」(元素間の相互作用)とタンパク質の構造的特徴を活用するタンパク質デザインを行い、これらの要因に基づく人工金属タンパク質の機能発現をめざした。

(2) 具体的には、(i) 素材タンパク質の性質に基づく有機金属タンパク質の構築方法の確立、(ii) タンパク質構造変化に基づく、タンパク質表面に導入した金属錯体修飾分子の発光特性のスイッチングシステムの構築、(iii) 化学修飾天然酵素の活性部位における金属錯体の構築と配位子—中心金属の相互作用によるユニークな錯体化学反応の検討を実施したので、以下に研究内容を述べる。

## 3. 研究の方法

(1) 【素材タンパク質の性質に基づく有機金属タンパク質の構築】セリンプロテアーゼの不可逆的阻害機構に着目した。 $\alpha$ -キモトリプシンなどのセリンプロテアーゼは、共通して、セリン、ヒスチジン、アスパラギン酸からなる Catalytic Triad と呼ばれる活性部位がドメイン間の割れ目部分に存在する。ここに TPCK(図 1)を作用させると、活性部位の His 残基が選択的にアルキル化され、プロテアーゼとしての機能を失う。この機構をタンパク質デザインの観点で見れば、内部にある His 残基を選択的に化学修飾できることになる。また、割れ目構造部分は、L-体アミノ酸からなるキラル環境である。したがって、この部分に触媒部位を位置させることで立体選択的合成への応用も開ける。以上のことから、図 1(b)に示すようなグラブス錯体部位を有するセリンプロテアーゼ阻害剤を設計し、合成法の確立および $\alpha$ -キモトリプシンへの導入を試みた。

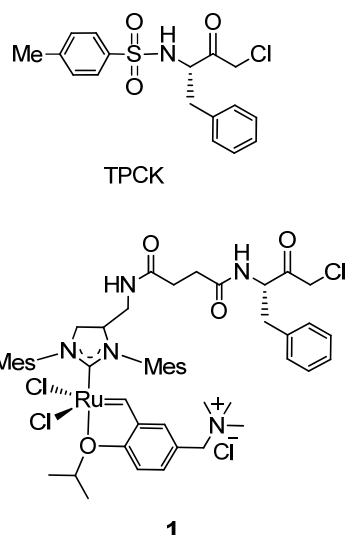


図1 TPCK および本研究で分子設計したグラブス錯体を有するセリンプロテアーゼ阻害剤 1 の構造

(2) 【タンパク質構造変化に伴う機能スイッチング】アデニル酸キナーゼ(Adk)や $\text{Ca}^{2+}$ 型のカルモジュリンなどでは、基質・有機小分子リガンドの結合に伴い、大きな構造変化を示し、ある部分でのアミノ酸配置が大きく変化する。このようび配置が大きく変化するアミノ酸残基に距離依存的に性質が変わる機能性分子を導入すれば、リガンド結合をトリガーとする機能スイッチングシステムが構築できる。そこで、本研究では、大腸菌由来のアデニル酸キナーゼのAla55とVal169をシステインに変換した変異体(図2)を作成し、システイン残基を介して白金錯体の導入を試みた。

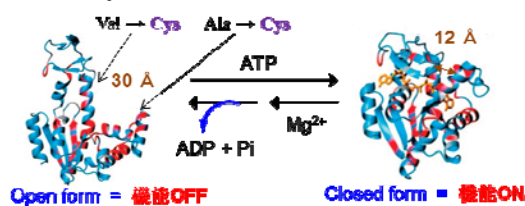


図2 大腸菌由来アデニル酸キナーゼの構造変化

(3) 【インターエレメント概念と酵素活性部位の構造的特徴を融合させた錯体化学反応】1本のポリペプチドからなるプロテアーゼであるサブチリシンの活性部位では、セリン残基とヒスチジン残基が金属錯形成場を形成するような位置に配置されている。このサイトを遷移金属錯体の構築場とすることを目的として、化学修飾によってセリン残基をシステイン残基に変換した「チオールサブ

チリシン」を調製し、銅イオンを添加することで、サブチリシン内で銅錯体を構築し、その反応性を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) グラブス錯体部位を有するプロテアーゼ阻害剤 **1** の合成は、阻害剤部位 **2** とグラブス錯体部位 **3** とをスクシニルリンカーで連結させる方策を採用した。ヒスチジン残基をアルキル化するためのクロロメチルケトン部位は、HIV-1 プロテアーゼ阻害剤合成を参考に下記のスキームに従って、L-フェニルアラニンから 4 ステップで合成した。本方法は、別法として知られるジアゾメタン誘導体を経由する方法よりも安全で大量合成に向いているため有利である。また、グラブス錯体部位は、Grubbs らによって報告されている方法に従って合成した。既報では、すべての操作を窒素下で実施する旨の指示が記載されているが、本研究において、ホペイダ配位子を導入したのは、空気下で精製を実施しても反応性の低下、錯体の分解は起こらないことが明らかとなった。また、最終段階においては、縮合剤、活性エステル法によるアミド結合生成は錯体の分解を起こし、低温における混合酸無水物法が最も有効であった。阻害剤 **1** の同定は、<sup>1</sup>H NMR、ESI-HR-MS により行った。

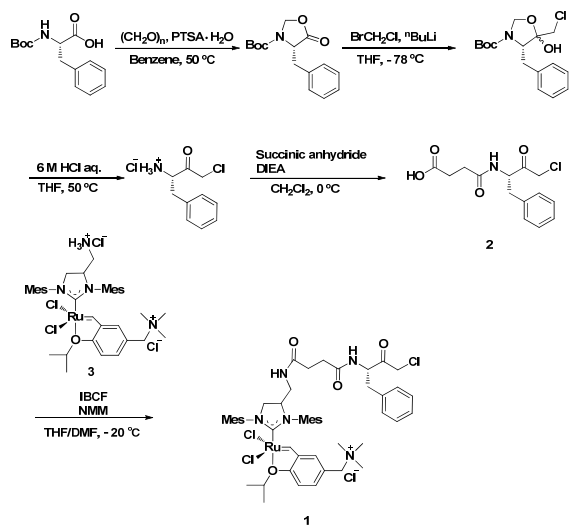


図3 確立したグラブス錯体部位を有するセリンプロテアーゼ阻害剤 **1** の合成経路

上記のルートで合成した阻害剤 **1** を  $\alpha$ -キモトリプシンに  $\text{pH} = 7.0$  の HEPES 緩衝溶液中で室温で作用させたところ、すみやかに加水分解活性の消失が観測され、目的通り活性部位への導入が確認された。CM 陽イオンカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、阻害剤 **1** を含む化学修飾キモトリプシンを単

品として得ることができた。ESI-MS および MALDI-MS により、阻害剤 **1** が 1 分子タンパク質に共有結合的に取り込まれていることが示された。また、化学修飾に有無に関わらず、カラムクロマトグラフィーにおいて同程度の塩濃度で溶出が起こったことと、ESI-MS において多価イオンピークパターンが類似していたことから、阻害剤 **1** を導入した後も、変性などのタンパク質の立体構造に大きな影響を与えていないことが示唆された。以上のことより、素材タンパク質本来の機能を応用した有機金属タンパク質の構築を行うことができた。

(2) 大腸菌由来のアデニル酸キナーゼにおいて、基質結合に伴い残基間の距離が大きく変わる 2 つの残基 (Ala55, V169) をピックアップし、この 2 つの残基を Cys とし、本来 Cys であった 77 番目残基を Ser に変更したトリプルミュータントを作成するために、Adk トリプルミュータント (Adk<sub>tm</sub>) をコードする pEAK 91 プラスミドにより HB101 大腸菌を形質転換した。この大腸菌からタンパク質を抽出し、疎水性アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE により目的タンパク質を同定した。ミュータントタンパク質のリン酸基転移反応触媒活性は、ヘキソキナーゼ-グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ共役反応により確認した。

次にターピリジン配位の白金錯体を合成し、さらにシステイン残基を介してコンジュゲートするために、ヨードアセトアミド基を導入した。

タンパク質表面への白金錯体の導入について、反応温度、時間、緩衝液・助溶媒の種類および濃度を検討したところ、10 mM リン酸緩衝液 ( $\text{pH} = 7.5$ ) 中、アセトニトリルで行うのが最適であることがわかった。得られた化学修飾タンパク質を Hi-Trap Q 強アニオン交換カラム (20 mM リン酸バッファー  $\text{pH} = 8.0 \rightarrow 20 \text{ mM}$  リン酸バッファー  $\text{pH} = 5.8 + 1 \text{ M NaCl}$ ) にかけると、2 つの吸着バンドが観測され、MALDI-MS スペクトルにより、後半のバンドに化学修飾タンパク質が含まれていることを確認した。しかし、このバンドには、白金錯体 **5** が 1 分子導入されたものと、2 分子導入されたものが混在していることが判明した。このことは、2 ヶ所のシステインチオールにおいて、近傍の酸性もしくは塩基性アミノ酸残基の存在により反応性の違いがあることを示唆している。

混合物の状態であるが、得られた化学修飾 Adk<sub>tm</sub> について、アデニル酸キナーゼ阻害剤 Ap<sub>5</sub>A の有無による分光学的特性を蛍光スペクトルにより評価した。Ap<sub>5</sub>A 存在下において、蛍光波長のシフトが見られた (図 4)。以上から、タンパク質構造変化に伴う、分光学的

特性の調節が可能であることが示された。

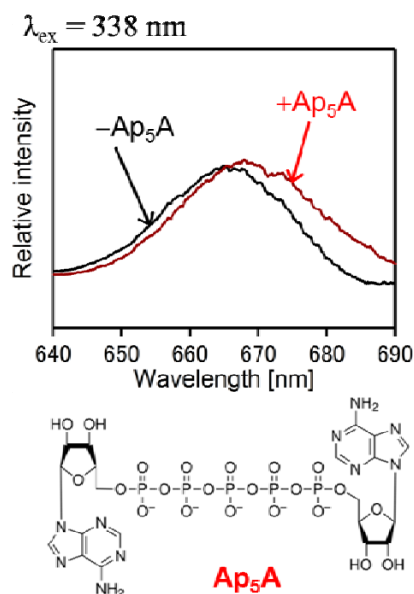


図4 白金錯体により化学修飾したアデニル酸キナーゼ変異体(Adk<sub>m</sub>)の発光特性変化

(3) 入手容易なサブチリシン(Subtilisin Carlsberg)に対して、PMSF(フェニルメチルスルホニルフロリド)を作用させ、さらにチオ酢酸塩で処理することにより、活性部位のセリン残基をシステインに変換したチオールサブチリシンを調製した。イオン交換クロマトグラフィーにより未修飾タンパク質との分離が容易にできることが確認された。また、DTNB法によるチオール基定量により、サブチリシンには複数のセリン残基が存在するが、上述の方法では、タンパク質1分子あたり1個のチオール基が導入されたことが分かった。PMSFは活性部位のセリン残基に特異的に結合することが知られているので、活性部位のセリン残基が選択的にシステインに変換されたと考えられる。また、ヨードアセトアミドを作用させたところ、ヨードアセトアミドが共有結合的に導入されたことがMALDI-MSにより確認された。したがって、空气中の酸素によるシステインの酸化やジスルフィド結合の生成は起こっておらず、フリーのチオール基の状態が存在していることが示された。

10 mM Tris 緩衝液(pH = 7.4)中で、チオールサブチリシンの溶液に Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を添加すると、吸収スペクトルにおいて、ただちに 360 nm 付近に特徴的なバンドが出現した。このようなバンドは、未修飾のサブチリシンでは見られないことから、Cu<sup>2+</sup>-S 結合の生成に伴う吸収バンドであると考えられる。この吸光度変化をもとに滴定実験をストップフローを用いて行い、タンパク質と銅イオンの化学量論は、1:1 であると求められた。

この吸収バンドは時間の経過とともに減少していき(図5)、その半減期約2時間であった。このことから、システインチオールから Cu<sup>2+</sup>への内圏電子移動により自動還元が起こっていることが示唆された。また、電子スピン共鳴(EPR)スペクトルにおいて、Cu<sup>2+</sup>の配位構造は、典型的な Type-2 銅錯体( $g_{\parallel} = 2.22$ ,  $A_{\parallel} = 16.3$  mT)であることがわかり、時間の変化とともに、EPR シグナルの強度が弱くなっていった。このことも、自動還元により EPR サイレントの Cu<sup>+</sup>種への変化したものであると帰属できる。

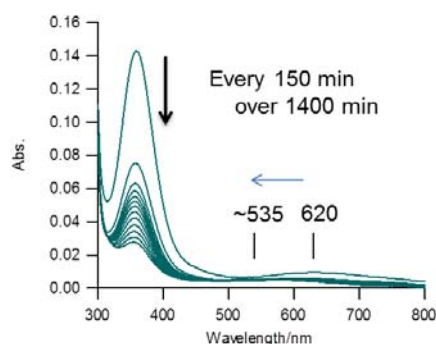


図5 チオールサブチリシン(50 μM)に 1.1 等量の Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を加えたのちの吸収スペクトル変化 (10 mM Tris 緩衝液、pH = 7.4, 25 °C)

(4) 以上の結果から、当初の目的通り、元素間の相互作用とタンパク質の構造的特徴に主眼を置いた新規金属タンパク質構築法を示し、今後、認識すべき金属タンパク質デザインのコンセプトを提案できたものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Tomokazu Shibata, Satoshi Nagao, Masashi Fukaya, Hulin Tai, Shigenori Nagatomo, Kenji Morihashi, Takashi Matsuo, Shun Hirota, Akihiro Suzuki, Kiyohiro Imai, Yasuhiko Yamamoto, Effect of Heme Modification on Oxygen Affinity of Myoglobin and Equilibrium of the Acid-Alkaline Transition in Metmyoglobin, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 6091-6098, 2011, 査読有
- ② Takashi Matsuo, Kazuki Fukumoto, Takuro Watanabe, Takashi Hayashi, Precise Design of Artificial Cofactors for Enhancing Peroxidase Activity of Myoglobin: Myoglobin Mutant H64D Reconstituted with a Single-winged Cofactor is Equivalent to Native Horseradish Peroxidase in Oxidation Activity, *Chem. Asian. J.*, 6, 2491-2499, 2011, 査読有

- ③ Zhonghua, Wang, Takashi Matsuo, Satoshi Nagao, Shun Hirota, Peroxidase Activity Enhancement of Horse Cytochrome *c* by Dimerization, *Org. Biomol. Chem.*, 9, 4766-4769, 2011, 査読有
- ④ Anangamohan Panja, Takashi Matsuo, Satoshi Nagao, Shun Hirota, DNA Cleavage by Photo-Controlled Cooperation of Zn(II) Centers in Azobenzene-Linked Dizinc Complex, *Inorg. Chem.*, 50, 11437-11445, 2011, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Takashi Matsuo, Chie Imai, Takefumi Yoshida, Akira Fujii, Takashi Saito, Takashi Hayashi, Shun Hirota, Creation of Artificial Organometallic Enzyme by Using Intrinsic Mechanism of Parent Protein, 5th Asian Bioinorganic Chemistry Conference (AsBIC-V), 2010.11.4, Kaohsiung, Taiwan
- ② 藤井亮, 松尾貴史, 廣田俊, タンパク質の構造変化に基づくスイッチング機能を有する生体分子の創成、日本化学会第 91 春季年会、2011.3.26、横浜
- ③ 吉田武史, 松尾貴史, 今井千絵、廣田俊、プロテアーゼの機能メカニズムに基づく有機金属錯体含有タンパク質の創成、日本化学会第 91 春季年会、2011.3.26、横浜
- ④ 藤井亮, 松尾貴史, 廣田俊、タンパク質構造変化を利用したスイッチング機能を有する機能性生体分子の創成、第5回バイオ関連化学シオンポジウム、2011.9.13、つくば
- ⑤ 吉田武史, 松尾貴史, 廣田俊、水溶性グラブスホベイダ錯体の構造および触媒活性に対する pH・塩濃度効果、第61回錯体化学討論会、2011.9.18、岡山
- ⑥ 権田勝也, 松尾貴史, 廣田俊、サブチリシン活性部位の化学修飾に基づくシステイン配位銅錯体の構築、日本化学会第92春季年会、2012.3.27、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

[http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo\\_jpn.html](http://mswebs.naist.jp/LABs/hirota/tmatsuo/matsuo_jpn.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 貴史(MATSUO TAKASHI)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：50432521

