

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13743

研究課題名(和文) 新奇な補因子組込型人工ラジカル酵素の開発

研究課題名(英文) Development of novel radical enzymes bearing unusual protein-derived cofactor

研究代表者

藤枝 伸宇 (FUJIEDA, Nobutaka)

大阪大学・工学研究科 ・助教

研究者番号：00452318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、従来の翻訳後修飾とは全く異なる特殊な化学修飾が施されたアミノ酸側鎖の架橋構造や補因子(Cross-linked Protein-derived Cofactors (CPDC))が種々のタンパク質内で発見されてきた。本研究では、申請者が培ってきた金属-活性酸素種による酸化的自己修飾の手法を発展させ、小型タンパク質の内部で、自発的に形成される新奇なCPDCを持った機能性タンパク質の創製を行った。天然で安定なラジカル生じることが知られているCPDCを全く関係のないタンパク質中で生じさせることに成功し、これら得られた結果は広い展開を期待できるCPDC研究の端緒となるものであった。

研究成果の概要(英文)：Galactose oxidase and copper amine oxidase have the protein-derived redox-active organic cofactors generated by post-translational modification near the catalytic active center. There are several lines of evidences that the copper ion plays an important role in the formation of these cofactors. The copper-substituted variants of cupin proteins have been prepared by using an E. coli expression system with a copper-containing medium. Furthermore, we introduced Tyr and/or Cys residues into several site surrounding copper center and confirmed the formation of Tyr-Cys by spectroscopic method as well as X-ray crystal structural analysis.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：人工金属酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、種々の酵素やタンパク質分子内で、従来の翻訳後修飾(リン酸化等)の枠組みを超える化学的に高度な修飾を受けたアミノ酸側鎖が相次いで発見されてきた(*Chem. Biol.*, **7**, R159 (2000))。中でも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(Protein-derived cofactor (PDC))として機能中枢を司るものが多く、その機能は多岐にわたる。図1にはそれらの一部を示した。Tyr や Trp が単独で修飾された TOPA キノン(TPQ, 図 1A)やキヌレニン(図 1B)、そして、それらが他のアミノ酸によって架橋された Cross-linked PDC (CPDC)、ガラクトース酸化酵素の Tyr-Cys(図 1C)、アミン脱水素酵素のトリプトフィルキノ(図 1D)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、bis-LTQ)(図 1E)等である。

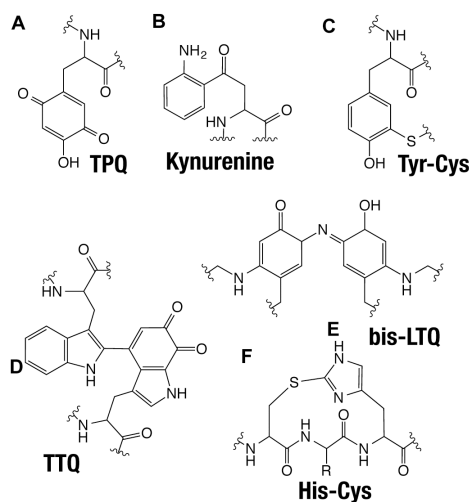


図1. 翻訳後化学修飾により形成された補欠分子・架橋構造

2. 研究の目的

これまでに申請者は金属中心の示す酸化能に着目し、近傍の芳香族アミノ酸を中心に化学修飾を誘起する手法を開発してきた。銅酵素活性中心近傍の His-Cys 架橋(図 1F)形成において銅-活性酸素種の関与を示した(*J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1180 (2011))。また、金属-活性酸素種の反応性を巧みに利用することにより、分子量 10kDa 程度の非常に小さなタンパク質内部でチロシン残基からカテコールや *o*-キノ、システイン残基からスルフィン酸の形成を確認している(*J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 5149 (2017))。本研究でも、この申請者らが培ってきた金属-活性酸素種による酸化的自己修飾の手法を発展させ、小型タンパク質の内部で、自発的に形成される新奇な CPDC を持った機能性タンパク質、特に人工ラジカル金属酵素の創製を行う。土台タンパク質として金属結合部位をもち、生理的役割の分かっていない好熱菌由来の安定な Cupin 型タン

パク質を選択した。近傍に結合する金属イオンの反応性を利用し、側鎖の翻訳後化学修飾反応を誘起することによって、チロシン残基から誘導された新規な補因子を創製し、それらの化学的性質や反応性について検討した。

3. 研究の方法

Protein Database から小型(≈ 10 kDa)で金属結合部位があり、かつ基質結合場を備えたいくつかの土台タンパク質候補の中から、double stranded β -helix モチーフを持つキュピンファミリータンパク質を用いることとする。3つのヒスチジンからなる金属結合部位に鉄や銅を接合し、Tyr を結合部位から距離を変えて変異導入し、その形成を確認する。このように CPDC が確認された変異体についてはその都度、UV-vis スペクトルや ESR、共鳴ラマンスペクトル等の分光特性および質量分析、X線構造解析を行って特性を評価する。上記方法を遂行する際に困難が生じた場合は、同様のキュピンタンパク質のホモログに加え、小型(≈ 10 kDa)でかつ安定であるタンパク質モチーフ、(partly opened β -barrel モチーフの VOC タンパク質(PDB: 3rmu))を選択し順次、上記方法を試していく。

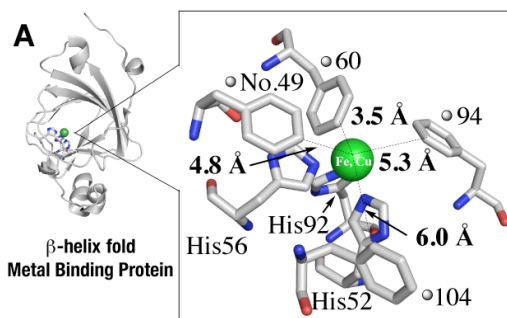


図2. モデルタンパク質と芳香族アミノ酸導入位置 (Phe 置換体を表示)

4. 研究成果

Tyr-Cys を持つガラクトース酸化酵素や TPQ を持つ銅含有アミン酸化酵素は、その活性中心にアミノ酸残基が翻訳後化学修飾を受けて形成された酸化還元補因子を有していることが知られている。その形成には近傍に存在する銅イオンが関与していることが示唆されているが、詳細な機構は明らかではない。また、天然のタンパク質中ではこれら補因子の化学的特性評価が困難であるため、モデル化合物を用いてその機能が検討されてきた。

まず、Tyr-Cys 結合の形成を目指し、金属中心からの距離を変えながら様々な位置にシステインとチロシンを導入した変異体を実験的に設計した(図 2, 導入例(残基番号:Ile49, Ile60, Phe94, Phe104))。そのうちの Ile49Tyr 変異体では DOPA や DOPA キノンに変換することに成功し、さらには Cys106 の近傍に Tyr を導

入した Ile60Tyr 変異体では **Tyr-Cys** 結合を形成させることに成功した。この CPDC は既知であるものの関連のないタンパク質中で人工的に生起させた初めての例であるため、以下、後者について更に解説する。

TM1459 野生型タンパク質をコードするオリゴ DNA 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、銅イオンに 52、54、58、92 番目の四つのヒスチジンが配位していることが確認された。この結晶構造に基づき、60 番目のイソロイシン残基にチロシン残基を変異導入することで銅イオン近傍に配置することが可能であり、106 番目のシステイン残基と隣り合うことが予想された。そこで、野生型と同様にして、H58A/I60Y 変異体の調製を行い、チロシン残基とシステイン残基の架橋形成について検討した。

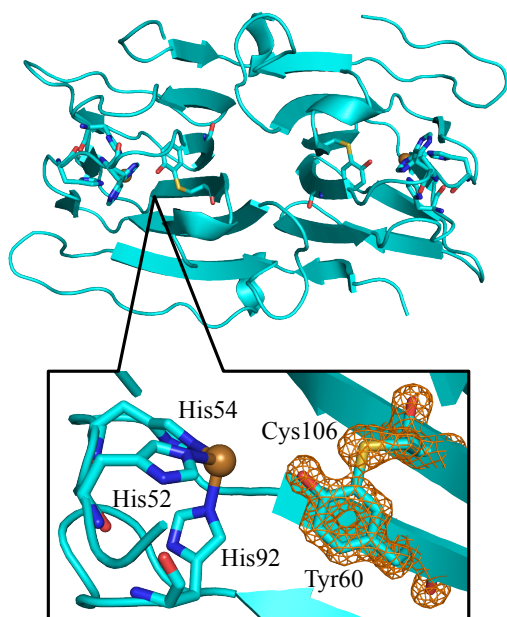


図3. H58A/I60Y 変異体
—銅結合型の結晶構造

まず、H58A/I60Y 変異体のアポ体の調製を行った。精製後、SDS-PAGE 上で単一の目的タンパク質を確認し結晶化を検討した。アポ体の X 線結晶構造解析を行い 1.4 Å の高分解能で結晶構造を決定することが出来た。得られた結晶構造より、60 番目に変異導入したチロシン残基の ϵ 炭素原子と 106 番目のシステイン残基の硫黄原子間の距離が 3.4 Å 以上離れており架橋形成は見られなかった。チロシン残基とシステイン残基間の架橋形成反応を行うため、アポ体に、1 当量の硫酸銅と 10 当量のヒドロキシルアミンを加え、好気条件下、20°C で 16 時間ほど静置し SDS-PAGE 上で比較した結果、バンドシフトが観測された。またホロ体の H58A/I60Y 変異体の結晶構造

を得るため、アポ体の結晶に対して硫酸銅およびヒドロキシルアミンを含んだ溶液に浸漬し、X 線結晶構造解析を行った結果、1.6 Å の高分解能で結晶構造を決定することができた。チロシン残基とシステイン残基の炭素-硫黄原子間距離が 1.9 Å であり、結晶中におけるチロシン残基とシステイン残基間の架橋形成が確認された (図 3 下)。この結果より、チロシン残基とシステイン残基間の架橋形成は近傍に存在する銅イオンと分子状態素によって起こることが明らかとなった。

チロシン残基とシステイン残基が架橋した H58A/I60Y 変異体を中性条件下 (pH 6.8) で可視近赤外スペクトルを測定したところ、銅イオンに由来する *d-d* 吸収帯のみが観測された (図 4)。このタンパク質溶液を塩基性条件下 (pH 11.0) で同様に可視近赤外スペクトルを測定したところ、493 nm に特徴的な吸収帯が観測された (図 4)。また、架橋の効果を確認するため、106 番目のシステイン残基をアラニン残基に変異させた、H58A/I60Y/C106A 変異体を用いて同条件下で可視近赤外スペクトルを測定した結果、463 nm に特徴的な吸収帯が観測された (図 4)。従って、492 nm の吸収帯は、形成された Tyr-Cys のチロシン残基から銅(II)への LMCT と考えられ、チロシンが銅に配位していることが示唆された。また、H58A/I60Y 変異体の ESR スペクトルを測定したところ、タイプ 2 銅タンパク質に特徴的なシグナルが観測され、塩基性条件下では、 A_{\parallel} の値が 40 G シフトし、pH に依存して金属中心の配位構造が変化したことが示唆された。このように、本研究では人工的に設計したタンパク質中で Tyr-Cys の架橋構造を生成させることに成功するとともに、その高分解能結晶構造を決定し、形成機構やスペクトル特性について新たな知見を与えることに成功した。

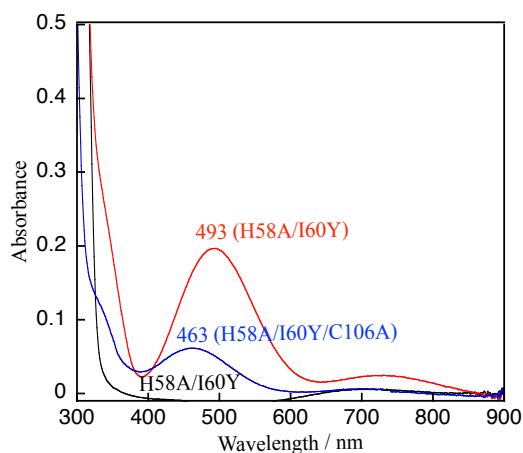


図4. H58A/I60Y 変異体
の UV-vis スペクトル

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 2 件)

1. Nobutaka Fujieda*, Jonas Schätti, Edward Stuttfeld, Kei Ohkubo, Timm Maier, and Thomas R. Ward*, Enzyme Repurposing of a Hydrolase as an Emergent Peroxidase upon Metal Binding, *Chem. Sci.*, 査読有, 6 (34), 4060 (2015)
2. Nobutaka Fujieda*, Takumi Nakano, Yuki Taniguchi, Haruna Ichihashi, Hideki Sugimoto, Yuma Morimoto, Yosuke Nishikawa, Genji Kurisu, and Shinobu Itoh*, A Well-Defined Osmium-Cupin Complex: Hyperstable Artificial Osmium Peroxygenase, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 139 (14), 5149–5155 (2017).

[学会発表] (計 9 件)

1. 藤枝伸宇、配位子としてのタンパク質-人工金属酵素創製に向けて-(招待講演)、第 52 回錯体化学若手の会・近畿支部勉強会、大阪大学吹田キャンパス (大阪府吹田市) 平成 27 年 5 月 16 日
2. 藤枝伸宇、配位子としてのタンパク質：金属錯体の一步先 (招待講演)、生物機能化学シンポジウム、京都大学宇治キャンパス (京都府宇治市) 平成 27 年 11 月 21 日
3. 藤枝伸宇、配位子としてのタンパク質：機能性アミノ酸架橋の創製 (招待講演)、ミニワークショップ「生体機能関連化学の最先端」、東京工業大学すずかけ台キャンパス (神奈川県神奈川市) 平成 28 年 6 月 25 日
4. 藤枝伸宇・谷口勇希・伊東 忍、Tyr-Cys を含有した人工タンパク質の創製 (口頭)、第 42 回生体分子科学討論会 2015、高崎シティーギャラリー、2015 年 6 月 12 日～13 日
5. 山脇沙耶香・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東忍、翻訳後化学修飾による Tyr-Cys 架橋形成を可能とするタンパク質の分子設計 (口頭 A)、日本化学会第 96 回春季年会、同志社大学、2016 年 3 月 24 日～27 日
6. 藤枝伸宇・谷口勇希・山脇沙耶香・伊東忍、Creation of Artificial Metalloprotein Bearing the Tyr-Cys Covalent Linkage (Oral)、第 26 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(SRM2016)、北海道大学 (北海道札幌市) 2016 年 6 月 17 日～18 日
7. 藤枝伸宇・谷口勇希・山脇沙耶香・伊東忍、人工金属酵素活性中心における翻訳後 Tyr-Cys 結合形成とその機能解明 (口頭)、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂 (石川県金沢市) 2016 年 9 月 7 日～9 日

8. 山脇沙耶香・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東忍、活性部位にチロシン-システイン架橋構造を有する人工金属タンパク質の調製と性質(ポスター)、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂 (石川県金沢市) 2016 年 9 月 7 日～9 日

9. 山脇沙耶香・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東忍、Tyr-Cys 架橋を有する銅含有タンパク質の調製と酸化活性(口頭 A)、日本化学会第 97 回春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)、2017 年 3 月 16 日～19 日

[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
藤枝 伸宇 (FUJIEDA, Nobutaka)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：00452318

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()