

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25年 4月 15日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22550150

研究課題名（和文）複核金属タンパク質のデノボ設計

研究課題名（英文）De novo design of binuclear metalloproteins

研究代表者

田中 俊樹 (TANAKA TOSHIKI)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：70171775

研究成果の概要（和文）：チトクローム-C-オキシダーゼ(COX)はヒスチジンに結合した2つの銅イオンが2つのシステインを介して結合し Cu₂S₂ ダイヤモンドクラスターを形成している。この配位構造を4ヘリックスバンドル型のタンパク質中に設計した。作成したタンパク質の性質を円偏光二色性スペクトル、紫外・可視吸収スペクトル、電子スピン共鳴（ESR）スペクトルなどで調べたところ、天然のCOXと同じ性質であった。この結果はCOX中の銅イオンの設計に成功したことを示すものである。同じ構造の鋳型タンパク質に、スーパーオキシドジスムターゼ中に見られる亜鉛と銅イオンの設計を行った。タンパク質中にHis残基を6箇所入れ、二つの銅イオンの導入を調べたところ、銅イオンは一つしか入らなかった。そこで金属結合のモニターのためにCys残基を入れ金属結合を調べた。その結果銅イオンが二つ結合していると考えられる結果が得られた。また銅イオンと亜鉛イオンが配位していると考えられる結果も得られた。より詳細な解析が必要であるが設計方法の指針が得られた。

研究成果の概要（英文）：The CuA site in cytochrome C oxidase (COX) contains a binuclear copper center, which is composed of two bridging Cys residues forming a Cu₂S₂ diamond cluster. We designed this copper configuration in the de novo designed 4-helix bundled protein. The designed protein exhibited the same UV-vis and ESR spectra as those of COX, indicating that we successfully constructed the Cu₂S₂ diamond cluster in the 4-helix bundled protein. Next, we designed a metal configuration from Zn-Cu superoxide dismutase or hemocyanin. We placed six His residues in the designed protein. The designed protein bound one Cu ion. Then, we added Cys residue to monitor the metal binding. We obtained an evidence that shows this mutant protein might bind two Cu ions or Cu and Zn ions simultaneously. The Cys residue might determine the position of Cu ion in the protein. A new strategy to design the plural metal bindings can be proposed using one Cys residue. The detail analyses are required, we are able to construct the metal binding following the new design method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

プロテオームの約半数は金属タンパク質であると言われており、細胞内において重要な生物機能を担っている。これらタンパク質は特異的な分子認識や高活性な触媒能、迅速な電子伝達などの高機能性を持つ。そのため、多くの研究者らによってタンパク質の立体構造と機能との相関を探る研究がなされた。特に銅イオンは重要な金属イオンの一つであり type1 から type3 の種々の配位構造をとる。これらは電子伝達、酸素添加酵素、酸化酵素、還元酵素、物質輸送などの機能を有し、それらの機能は銅イオンの配位構造と関連しているが詳細はわかっていない。このような系を人工的に作りだすことができれば、機能メカニズムの解明や抗酸化作用、活性酸素の除去、電子伝達などへの応用へとつながる。一方で、これらの結果を直接的にテストする事は重要であり、その一番の手法としてタンパク質の構造及び機能を新規に造り出す事が挙げられる。このような観点から DeGrado、Dutton (ペンシルバニア大)、Pecoraro (ミシガン大)、Regan (エール大)、Hellings (デューク大) など多く国外の研究者が金属タンパク質の設計に精力的に取り組んできた。その結果、1 個の金属イオンの結合の設計については多くの報告が出されてきている。一方、複数個の金属イオンを結合したタンパク質の設計はほとんど行われていない。我々はこれまでに、タンパク質の一つの基本構造である α -ヘリカルコイルドコイル (以下コイルドコイルと略す) と呼ばれる構造を持つタンパク質を用いてデノボ設計を行なってきた。天然タンパク質においてそれぞれのアミノ酸残基に考えられる環境である疎水場、親水場、疎水場と親水場の界面をいずれもその構造の中に持っている事から、様々なタンパク質機能をデザインする上で真に適した鋳型構造であるといえる。

2. 研究の目的

金属イオンは天然タンパク質の活性中心ある場合が多く、配位構造と機能の相関に興味を持たれて金属配位の設計が盛んに行われてきた。しかし、複数個の金属イオンを持つタンパク質については未だに報告例はほとんどない。そこで本研究では、複核金属タンパク質、たとえば、生体に重要な機能を持つ複核金属タンパク質である、2つの銅イオンを持つチトクローム-C-オキシダーゼ(COX)、亜鉛と銅を持つスーパーオキシドジスムターゼ (Zn-Cu-SOD) などを取り上げ、金属配

位の設計、構築を行い、複核金属タンパク質の設計方法の向上を目指す。

3. 研究の方法

本研究で用いた4-ヘリックスバンドルタンパク質は、平行四本鎖コイルドコイル構造を作る GCN4-pLI のアミノ酸配列を参考にし、短いリンカーでつなぐことにより設計した。このタンパク質の遺伝子を14本の合成オリゴヌクレオチドを用い PCR 反応により作成した。本遺伝子を大腸菌内で発現させ、チオレドキシンの融合タンパク質として得た。ニッケルカラムで精製、トロンビン処理で融合タンパク質部分を切り離し、最後に rpHPLC 又はイオン交換クロマトグラフィーで精製した。金属イオン結合部位は本タンパク質の疎水場に His と Cys 残基を設けることで設計した。金属イオンの結合、および、配位構造の確認は円偏光二色性 (CD) スペクトル、紫外・可視 (UV-vis) 吸収スペクトル、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル、等温滴定カロリメトリー (ITC) などの測定により行った。

4. 研究成果

1) チトクローム-C-オキシダーゼ(COX)に見られる CuA サイト (Cu₂S₂ ダイヤモンドクラスター) の設計
以前に四本鎖コイルドコイル構造の疎水場に金属イオンの結合のために、二つの His と一つの Cys を導入した AM2C を作成し、このタンパク質がブルー銅タンパク質となることを発表した (J. Am. Chem. Soc., 132, 18191-18198)。CuA サイトはブルー銅サイト二つが Cys 架橋を介して連なったような構造である。そこで本研究ではブルー銅サイトを二つ設けたタンパク質2種 (A, B) を設計した。これらのアミノ酸配列を以下に示す。

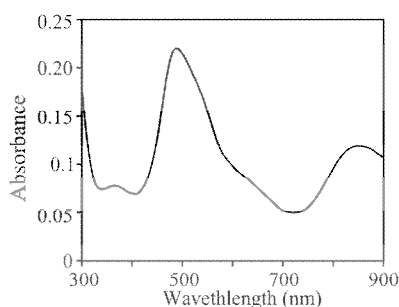
(A) bi-AM2C

```
N-term. Q IEDKLEE ILSKHYA HENELAR IKKLLG EGG
SGG Q IEDKLEE ILSKCYA CENELAR IKKLLG GGT
GGK Q IEDKLEE ILSKHYA HENELAR IKKLLG EGG
C-term. Q IEDKLEE ILSKAYA AENELAR IKKLLG GGL
```

(B)

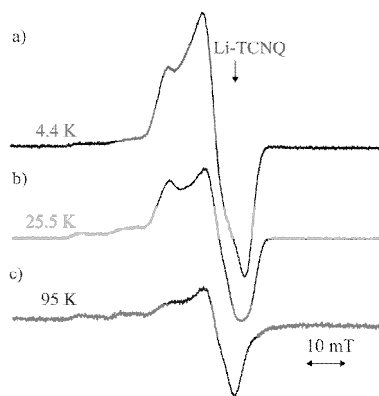
```
N-term. Q IEDKLEE ILSKHYA AENELAR IKKLLG EGG
SGG Q IEDKLEE ILSKCYA HENELAR IKKLLG GGT
GGK Q IEDKLEE ILSKHYA CENELAR IKKLLG EGG
C-term. Q IEDKLEE ILSKAYA HENELAR IKKLLG GGL
```

(A)、(B)両方のタンパク質に銅イオンを添加すると(A)のタンパク質はCuAサイトに特有の紫色を示したが、(B)は示さなかった。従って(A)について解析を進めた。また(A)の配列のタンパク質を bi-AM2C と名付けた。bi-AM2C は円偏光二色性(CD)スペクトル測定では 208 と 222 nm に極小値を持ち、 α -ヘリカルコイルドコイル構造を有し、超遠心分析の結果多くはモノマーで存在していた。次に UV-vis スペクトルを測定したところ、bi-AM2C -Cu²⁺は 488 nm と 530 nm(sh)に吸収があった。さらに 350 と 850 nm にも吸収が見られ、これらは CuA サイトに特徴的な吸収である。



Bi-AM2C に配位している銅イオンの数を Job's plott による分析をおこなったところ、二つの銅イオンが結合していることがわかった。

次に銅イオンの配位構造を調べるために ESR を測定した。ESR スペクトルに温度依存性が見られ、高温になるほどブロードになった。この現象からタンパク質に二つの銅イオンが配位していることが確認された。ESR シグナルの形状も天然あるいはアズリンに設計された CuA サイトに類似であった。これらの結果は bi-AM2C 中の銅イオンは CuA サイトを形成していることを示している。



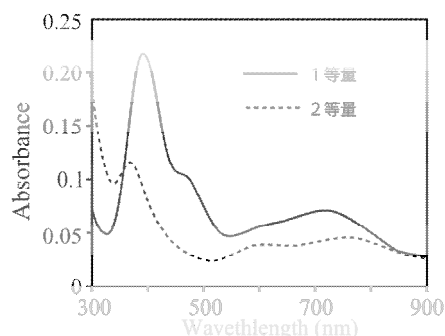
CuA サイトの二つの銅イオンは Cu(1.5)-Cu(1.5)となった電荷で分布していることが知られており、Cu K-edge XANES

で解析した。対照サンプルとして Cu²⁺-Cu²⁺化合物と比べたところ、bi-AM2C 中の銅イオンはより還元状態にあることがわかった。Cu⁺は無色であることを考えると Cu(1.5)-Cu(1.5)となっていることが考えられる。EXAFS のデータから銅イオンと原子間の距離を見積もったところ、Cu-S が 2.21 Å、Cu-N が 1.90 Å、Cu-Cu が 2.51 Å となった。これらの距離は天然の CuA サイトに近い。

以上、我々が作成したタンパク質は天然のパープル銅タンパク質と同じ性質を持っていることがわかり、このような例は初めてである。

2) スーパーオキシドジスムターゼ中に見られる亜鉛と銅イオンの設計

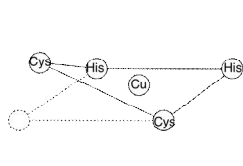
スーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンは銅と亜鉛イオンまたは二つの銅イオンが主に His 残基に配位している。bi-AM2C には二つの銅イオンが結合できたため、まず bi-AM2C の Cys 残基を His 残基にしたタンパク質を作成し銅イオンの結合を調べた。銅イオンの結合は ITC を用いて調べた。その結果、銅イオンは一つしか結合できないことがわかった。bi-AM2C では二つの銅イオンが結合したのに対し、今回は一つしか結合できなかった理由は明らかでないが、Cys 残基の S との配位が銅イオンの配置を決めているのではないかと推測している。そこで CuA サイトの設計で紫色を示さなかったアミノ酸配列 (B) を用いて銅イオンの配位を検討した。銅イオンをタンパク質に対し 1 等量、2 等量を加え UV-vis スペクトルを測定した。1 等量での UV-vis スペクトルは 400, 480(sh), 710 nm に吸収があったのに対し、2 等量では 390, 600, 780 nm に変化した。この事はタンパク質に 2 等量の銅イオンが結合したことを示している。



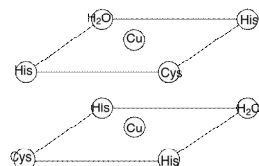
ESR スペクトル測定においても 1 等量と 2 等量でスペクトルが変化した。即ち 1 等量では A パラレルが 12.8 mT、g パラレルが 2.17 であったのに対し、2 等量ではそれぞ

れ 15.2 mT、2.28 となった。UV-vis スペクトルと ESR スペクトルの結果を合わせて考えると 1 等量では銅イオンは二つの His と二つの Cys 残基に配位し歪んだ平面構造となり、2 等量では銅イオンはそれぞれ二つの His と一つの Cys と H₂O に配位し平面構造となっていることが推測される。二つの銅イオンが架橋無しで接近して配置できた初めての例となる。

銅イオン 1 等量の場合



銅イオン 2 等量の場合



スーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンには Cys 残基は存在しない。そこで B のアミノ酸配列中の二つの Cys 残基を His 残基に変えたタンパク質を作成した。このタンパク質中に 6 つの His 残基が存在する。ESR 測定では 1 等量の銅イオンでは、A パラレルが 18.7 mT、g パラレルが 2.24 で平面四配位構造であった。2 等量の銅イオンを添加すると単一のシグナルとはならずまたスペクトルは若干変化しただけであった。ITC 測定からは 1 等量の銅イオンしか結合しない結果が得られた。

次に、B のアミノ酸配列で 1 つの Cys 残基のみ残し他を His 残基に置換したタンパク質 2 種を作成した。このタンパク質に 1 等量の銅イオンを加えると 400 nm 付近に UV-vis 吸収があり、銅イオンは Cys 残基と結合し平面四配位構造をとっている。2 等量の銅イオンを加えてもスペクトルに変化はなかった。この場合、銅イオンは 2 番目と 3 番目のヘリックスに存在する 3 つの His 残基と 1 つの Cys 残基に配位したため、残っている His 残基は距離的に遠くなり次の銅イオンが結合できなくなったと考えられる。

3) 結論

4-ヘリックスバンドル型的设计タンパク質中に複核金属タンパク質の例として COX 中の CuA サイトとスーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンの金属イオンサイトを設計した。CuA サイトに関しては天然タンパク質とほぼ同じ物理化学的性質を持つタンパク質を構築することができた。結晶化を試みており、今後は詳細な複合体の構造解析が必要である。

スーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンは、主に His 残基に銅と亜鉛イオンまたは二つの銅イオンが配位している。今回の結果から、His 残基だけでは 2 つの銅イ

オンを配位させることはできなかったが、Cys 残基を加えると 2 つの銅イオンの配位させることができた。2 つの銅イオンの配位させる戦略として 2 つのことが考えられる。1) His 残基の場所を固定するため、立体障害の大きいアミノ酸残基を銅イオンの近傍に配置する。2) Cys 残基は銅イオンが配位場所を固定することが考えられた。そこで 1 つの Cys 残基を使って銅イオンの配位を固定し、空いた場所に二つ目の銅イオンを配位させる。このようにして二つ目の銅イオンを配位させることができる。このことが可能になれば、前述のように Cys 残基を利用して 2 つの銅イオンを配位させた後、Cys 残基の酸化により Cys から近傍の His への転移でスーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンモデルのデザインができる可能性が考えられる。

今回、スーパーオキシドジスムターゼやヘモシアニンモデルは作成できなかったが、新しいデザイン指針を出すことができた。

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)

①D. Shiga, Y. Hamano, M. Kamei, Y. Funahashi, H. Masuda, M. Sakaguchi, T. Ogura, T. Tanaka, Tuning the geometries of a *de novo* blue copper protein by axial interactions. J. Biol. Inorg. Chem., 査読有, vol. 17, 2012, 1025-1031.

②D. Shiga, Y. Funahashi, H. Masuda, A. Kikuchi, M. Noda, S. Uchiyama, K. Fukui, K. Kanaori, K. Tajima, Y. Takano, H. Nakamura, M. Kamei, T. Tanaka, Creation of a binuclear purple copper site within a *de novo* coiled-coil protein. Biochemistry, 査読有, vol. 51, 2012, 7901-7907.

〔学会発表〕(計 8 件)

①志賀大悟、濱野裕輔、北川達也、猪俣智彦、外山智章、船橋靖博、増田秀樹、田中俊樹、設計ブルー銅タンパク質の外部配位子の解析第 11 日本蛋白質科学会年会、2011 年 6 月 7 日、大阪、ホテル阪急エキスポパーク

②亀井美里、志賀大悟、船橋靖博、増田秀樹、野田勝紀、内山進、福井希一、田嶋邦彦、菊池晶裕、鷹野優、中村春木、田中俊樹、四本鎖コイルドコイルタンパク質におけるパープル銅サイトの構築第 76 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2012 年 5 月 26 日、岡崎、自然科学研究機構コンファレンスセンター。

③安部雅人、志賀大悟、鷹野優、中村春木、田中俊樹

ヘモシアニンモデルタンパク質の設計を目指した試み第76回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2012年5月26日、岡崎、自然科学研究機構コンファレンスセンター。

④M. Kamei, D. Shiga, Y. Funahashi, H. Uchiyama, K. Fukui, K. Kanaori, K. Tajima, Y. Takano, H. Nakamura, T. Tanaka

Creation of binuclear purple copper site within the *de novo* coiled-coil protein
第21回金属の関与する生体関連反応シンポジウム2012年5月31日、金沢、金沢大学宝ホール

⑤安部雅人、志賀大悟、鷹野優、中村春木、田中俊樹、新規設計コイルドコイルタンパク質にヘモシアニン銅サイトを構築する試み第12日本蛋白質科学会年会2012年6月20-22日 名古屋、国際会議場

⑥龜井美里、志賀大悟、舩橋靖博、増田秀樹、野田勝紀、内山進、福井希一、田嶋邦彦、菊池晶裕、鷹野優、中村春木、田中俊樹、パープル銅タンパク質の *de novo* 設計
第12日本蛋白質科学会年会2012年6月20-22日、名古屋、国際会議場

⑦龜井美里、志賀大悟、舩橋靖博、増田秀樹、金折賢二、田嶋邦彦、菊池晶裕、鷹野優、中村春木、田中俊樹、*De novo* 4本鎖コイルドコイルタンパク質におけるパープル銅サイトの構築第6回バイオ関連化学合同シンポジウム2012、2012年9月6-8日、札幌、北海道大学

⑧安部雅人、志賀大悟、田中俊樹、ヘモシアニンモデル蛋白質の人工的設計
第43回中部化学関係学協会支部連合秋期大会2012年11月11日、名古屋、名古屋工業大学

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中俊樹 (TANAKA TOSHIKI)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：70171775

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：