

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655153

研究課題名(和文) 酸化的自己修飾を利用した高機能タンパク質の創製

研究課題名(英文) Creation of Novel Functional Protein by Self-hydroxylation

研究代表者

藤枝 伸宇 (Nobutaka, Fujieda)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00452318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：単核や二核鉄タンパク質において近傍の芳香族アミノ酸残基が酸化され、特殊な酸化的自己修飾が報告されている。本研究では3つおよび4つのヒスチジンが配位した結合サイトを持つ、キュピン型金属結合タンパク質を用い、金属近傍のイソロイシン49やトリプトファン56にチロシンを導入したところ、吸収極大が800nm以上と、いった近赤外部に見られるような天然にはないクロモフォアが形成された。こうして、作製された特殊なアミノ酸残基はさらなる最適化により、電極との共役による新規バイオエレクトロニクスデバイスや多電子移動反応を触媒する人工金属酵素の創成など、様々な特性評価や利用方法の展開が可能になるものであった。

研究成果の概要(英文)：Recently, many self-hydroxylation reactions have reported, which occurred of aromatic amino acids lying close to mononuclear and dinuclear iron and copper binding site. In this study, we utilized cupin family protein bearing three or four histidine binding motif (3-His or 4-His motif) as metal binding scaffold. In the mutant introduced one tyrosine into the location of Ile49 or Trp56, non-natural occurring unusual spectral species around 800 nm have been found. Thus, the modification method presented in this study is very powerful to construct new functional protein for novel devices of bioelectronics and artificial metalloenzyme to be able to catalyze multielectron transfer reactions.

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：生物無機化学

キーワード：非ヘム鉄酵素 酸化的自己修飾 翻訳後化学修飾 ビルトイン補酵素

1. 研究開始当初の背景

近年、種々の酵素分子内でアミノ酸側鎖が翻訳後化学修飾を受けて生じた架橋構造や補欠分子が相次いで発見されてきた(*Chem. Biol.*, 7, R159 (2000))。アミン脱水素酵素のトリプトフィルキノン(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ン, LTQ)である。ごく最近では、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た。これらは C-C 及び C-O 結合形成が達成されていることから、いまだ見ぬ新規なカップリングケミストリーの存在が示唆されており、形成機構に注目が集まっていた(*Science*, 332, 929 (2011))。

2. 研究の目的

単核や二核鉄タンパク質において近傍の芳香族アミノ酸残基が酸化され、カテコールなどが発生する酸化的自己修飾が報告されている。また、天然の場合でも酸化的自己修飾によって巧みに特殊なアミノ酸残基を形成させている鉄および銅含有酸化還元酵素が存在している。このようなアミノ酸残基の形成において金属-活性酸素種がそれらの形成を誘起している可能性が示唆され始めている。本研究では、モデルタンパク質の活性中心で金属-活性酸素種による酸化的自己修飾の詳細な反応機構解明と、それに基づいた反応性の制御により、翻訳後化学修飾を誘起して新たなクロモフォア、フルオロフォア、そして酸化還元補酵素を持った人工タンパク質の創成を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では単核および二核の銅タンパク質を用いて、金属結合サイト近傍に距離を変化させて芳香族アミノ酸を導入した変異体を数十種類作製し、酸化的自己修飾を生じる変異体を簡便な方法でスクリーニングする。その後、スクリーニングポジティブな変異体について種々の分光法や結晶構造解析を用いて翻訳後化学修飾過程を詳細に検討する。また、これらの変異体をアポ体で調製後、銅イオンと反応させ、反応機構を解明する。この反応機構に基づきカップリング反応の起こりやすいアミノ酸残基対を決定した後、目標となる芳香族アミノ酸近傍に対となりうるアミノ酸残基を導入した変異体を作製する。これらの変異体を同様に特性評価し、新規な架橋構造を持つ芳香族アミノ酸残基をもった人工タンパク質の作製を試みる。変異体の調製とスクリーニングと特性評価を行い、酸化的自己修飾の詳細な反応機構を総括する。

その後、それに基づいた反応性の制御により、翻訳後化学修飾を誘起して新たなクロモフォア、フルオロフォア、そして酸化還元補酵素を持った人工タンパク質の創成を行う。ドーパやキノンの近傍に Cys, Lys, Tyr, His

などの求核性アミノ酸を導入した変異体を作製し、架橋構造形成の有無を確認する。この段階で形成が見られた場合、紫外可視吸収スペクトルやラマン分光法、フィンガーマスプリンティングなどで詳細な特性評価を行う。さらに結晶構造解析を用いてそれらの形成過程についての解明を目指す。

4. 研究成果

まず始めに金属結合 scaffold として好熱菌である *Thermotoga maritima* 由来の金属結合バレル状タンパク質 TM1459 の cDNA を合成し、pET30 ベクターの T7 プロモーター下流域に His-tag の cDNA と共に導入した発現コンストラクトを作製した。これらのプラスミドを BL21(DE3) に形質転換した後、2 mM のクエン酸鉄(III)、誘導物質として 0.2% のラクトースを含む培地中で大量培養を行った。発現誘導後の菌体を超音波により破菌し、Ni セファロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーで精製を行った。純度は SDS-PAGE で確認した。

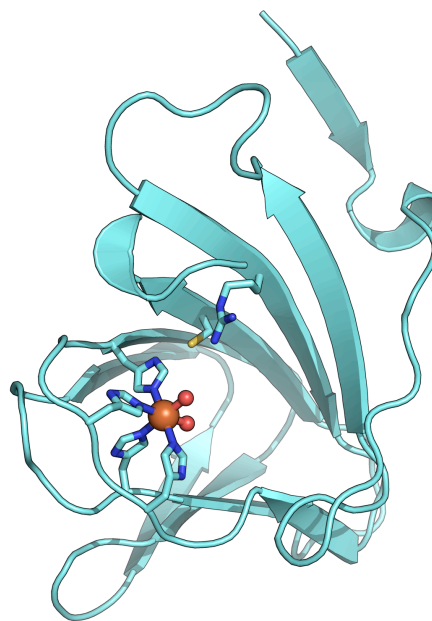


図1. 鉄置換型 Tm1459 の立体構造

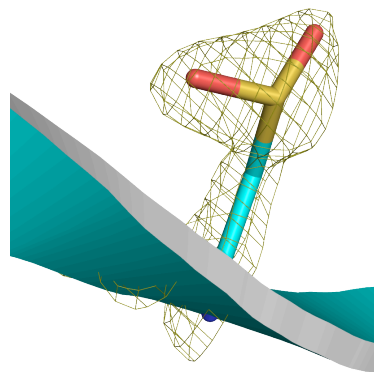


図1. 鉄置換型 Tm1459 における Cys106 の電子密度マップ

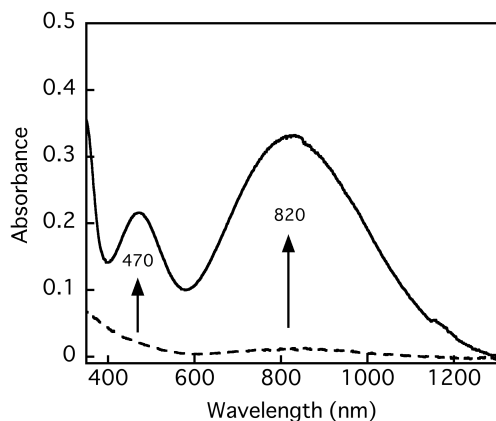


図2. 鉄置換型 Tm1459C106V 変異体の可視吸収スペクトル

精製後、ICP 分析を行ったところ、タンパク質に対しておおよそ一当量の鉄の結合が見られた。また、ESR スペクトルを測定したところ、鉄は三価の状態になっていることが分かった。MALDI-TOF/MS 分析を行ったところ、計算値に比べ 46 増加した質量が得られた。X 線結晶構造解析(分解能 1.1 Å)では、金属中心から 3.5Å 離れた位置に存在する Cys106 の窒素原子周辺に余分な電子密度が観測され、翻訳後修飾されていることが示唆された(図1)。すなわち、システインが酸化されスルフィン酸になっていることが示された。一方、この Cys106 を Val に変異させた C106V 変異体を野生型と同様に調整したところ、精製過程に置いて特徴的なスペクトルを示すアイソマーが得られた。このアイソマーでは計算値より 13 増加した質量が得られた。また、紫外可視吸光スペクトルを測定したところ TPA 鉄カテコラート錯体と似た吸収スペクトルを得た(図2)。X 線結晶構造解析では7番目のチロシン残基に余分な電子密度が観測され、修飾をうけていることが分かった。(図3)

さらに、金属結合部位近傍にチロシンを導入した I49Y 変異体および W56Y 変異体に対応する発現用プラスミドについても同様に作製した。I49Y, W56Y 変異体について鉄を含む培地にて発現させたところ、前者については鉄がほぼ一当量取り込まれたホロ型が得られた。そのため、この変異体についてさらに詳細な特性評価をおこなった。紫外可視吸収スペクトルを測定すると 350 nm, 640 nm 付近に吸収があり、さらに、過酸化水素を添加したところ吸収帯が 470, 810nm にシフトした。これら吸収帯は非ヘム鉄酵素であるヒト由来チロシン水酸化酵素にチラミン、ドーパミンが結合したもののスペクトルとそれぞれよく一致していた。そのため、前者の吸収帯はフェノレート、後者はカテコレートから Fe(III)への LMCT の吸収であることが示唆された。つまり、部位特異的変異により導入した Tyr49 が鉄に配位しており、近傍の鉄イオンと過酸化

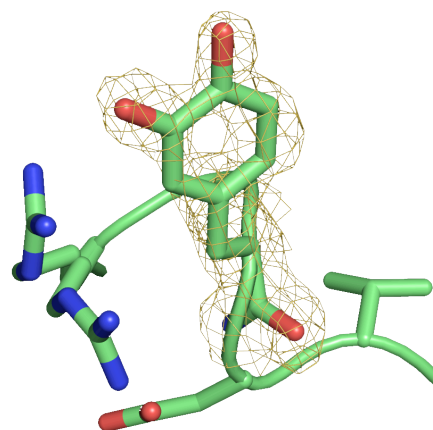


Fig.2 Electron density map of Tyr7 in C106V mutant

水素の作用によりカテコールとなったと考えた。さらに H52 を欠損させた変異体 H52A/I49Y の二重変異体について銅を取り込ませたとこ、銅が取り込まれた。ここへ、還元剤としてヒドロキシルアミンを添加しスペクトル変化を見たところ、400 nm 近傍にスペクトルが現れ、キノン様の化合物が形成されたことが示唆された。現在、フィンガーマスプリンティングなどによりその構造などの特性評価を行っている。

このように本研究では3つおよび4つのヒスチジンが配位した結合サイトを持つ、キューピン型金属結合タンパク質を用い、金属近傍のイソロイシン 49 やトリプトファン 56 にチロシンを導入したところ、鉄中心において吸収極大が 800nm 以上といった近赤外部に見られるような天然にはないクロモフォアが形成された。さらに反応過程を検討したところ、酸素および還元剤が必要であることが明らかとなり、その形成には鉄オキソ活性種の関連が示唆された。今後、この形成過程を結晶学的に検討することでその反応過程の詳細を明らかにできると期待される。また、天然のタンパク質には見られたことのないクロモフォアの形成が達成された。これらは、今後、形成過程を検討し、近傍に新たな変異を導入することでより、特殊な架橋構造や補欠分子属を生合成していくことが可能になると期待される結果である。さらに、こうして、作製された特殊なアミノ酸残基を用いて電極との共役による新規バイオエレクトロニクスデバイスや多電子移動反応を触媒する人工金属酵素の創成を目指し、様々な特性評価や利用方法の展開を行っていく予定である。

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. Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y., and Itoh, S., Activation Mechanism of MelB Tyrosinase from *Aspergillus oryzae* by acidic treatment. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 査読有、18, 2013, 19-26
2. Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G., and Itoh, S., Crystal Structures of Copper-depleted and Copper-bound Fungal Pro-tyrosinase: Insights into Endogenous Cysteine-dependent Copper Incorporation, *J. Biol. Chem.* 査読有、288, 2013, 22128-22140

[学会発表] (計 11 件)

1. Fujieda, N., Ishihama, K., Taniguchi, Y., and Itoh, S., An Artificial Metalloenzyme; Utilization of Mononuclear Metalloprotein Containing 4-His Metal Binding Motif., The First International Symposium on Biofunctional Chemistry, 2012/11/28-29, Tokyo, Japan
2. 石濱謙一・藤枝伸宇・伊東 忍、4つのヒスチジンが配位した単核鉄中心を有する人工金属酵素の創成、錯体化学会第 62 回討論会、2012/9/21、富山
3. 石濱謙一・藤枝伸宇・伊東 忍、4つのヒスチジンからなる単核鉄中心をもつタンパク質の分光学的特性および反応性の評価、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013/3/22、滋賀
4. 信重和紀・石濱謙一・藤枝伸宇・伊東 忍、バレル状タンパク質における金属結合サイト近傍の自己水酸化反応、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013/3/22、滋賀
5. 谷口勇希・藤枝伸宇・伊東 忍、4つのヒスチジンが配位した単核鉄含有タンパク質の特性評価、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013/3/22、滋賀
6. 谷口勇希・信重和紀・藤枝伸宇・伊東 忍、活性部位周辺の自己水酸化反応を活用した新規金属タンパク質の調製、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013/9/27、名古屋
7. 石濱謙一・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東 忍、4つのヒスチジンからなる単核非ヘム鉄中心を有する人工金属酵素の作製、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、2013/9/27、名古屋
8. 伊東 忍・信重和紀・藤枝伸宇、単核鉄含有人工金属酸化酵素の創製、第 112 回触媒討論会、2013/9/18、広島

9. 中野巧・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東 忍、超好熱菌由来タンパク質が持つ 4-Hisモチーフを利用した単核鉄及び銅中心の構築、日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014/3/27、名古屋
10. 谷口勇希・石濱謙一・藤枝伸宇・西河洋祐・栗栖源嗣・伊東 忍、4つのヒスチジンからなる金属結合部位をもつタンパク質の酸化的自己修飾反応、日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014/3/27、名古屋
11. 石濱謙一・谷口勇希・藤枝伸宇・伊東 忍、4つのヒスチジンが配位した単核鉄中心を有するタンパク質の酸化機能、日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014/3/27、名古屋

[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

http://www-bfc.mls.eng.osaka-u.ac.jp/BioFunctional_Chemistry/Home.html

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：