

研究課題別評価書

1. 研究課題名

光解離性修飾基を用いたタンパク質の構造と機能の新規研究法

2. 氏名

廣田 俊

3. 研究のねらい

タンパク質が生体内で機能するためには、特定の高次構造を持つ折れ畳んだ状態を形成することが必須であり、実験と理論の両面からタンパク質の構造形成に関する研究が盛んになされている。ストップフロー法により比較的遅い時間領域でのタンパク質形成反応の理解が深まったが、ストップフロー法の不感時間内(約 1 ms)での反応に関しては、いまだ不明な点も多い。このため、1 ms よりも早い初期段階での構造形成反応を追跡する良い手法の開発が必要であった。そこで本研究では、種々のタンパク質に広く応用できる方法として、化学修飾により光解離性修飾基をタンパク質の特定のアミノ酸残基に導入する手法の開発を行った。この手法では、不安定化した修飾タンパク質にパルス光を照射して、タンパク質から修飾基を瞬時に外すことにより、タンパク質のフォールディング反応を開始させ、その反応を追跡した。またこの手法の応用として、新規光応答性ペプチドを開発し、タンパク質-ペプチド相互作用の光制御を試みた。

4. 研究成果

本研究では、緑色植物などの葉緑体中に存在する可溶性の電子伝達銅タンパク質であるプラストシアニン(PC)から銅原子を取り除いたアポプラストシアニン(apoPC)を取りあげた。PC は β シートタンパク質に分類され、8本からなる2つの β シートと1回転の α ヘリックスを有し、タンパク質内の唯一のシステイン残基(Cys84)は銅原子に配位している。Cys84の硫黄原子は銅に配位しているため、PCから銅を外して得た apoPC の Cys の硫黄原子をオルトニトロベンジル基のジメチル誘導体(DMNB)で修飾した。

apoPC の修飾部位を特定するために、リシルエンドペプチダーゼにより未修飾および修飾タンパク質の酵素消化を行い、各タンパク質から得られたペプチド断片をHPLCで精製した(図1)。得られた各ペプチド断片のMALDI-TOFマスペクトルを測定し、分子量を決定した。未修飾 apoPC から得られたペプチド断片の溶出曲線で観測された分子量 1409.2 のペプチドに由来するピークは修飾 apoPC から得られたペプチド断片では観測されず、代わりに分子量 1604.4 のペプチドに由来する新しいピークが観測された。修飾により消失したペプチドおよび新しく生じたペプチドの分子量差は 294.8 で、修飾基の分子量に対応していた。また、新しく観測された分子量 1604.4 のペプチドは 355 nm に吸収帯を有していた。修飾タンパク質に特異的に観測されたこのペプチド断片のアミノ酸配列解析を行うとともに、エルマン試薬との反応性を未修飾と修飾タンパク質で比較したところ、apoPC の DMNB 修飾部位が Cys 84 であることが特定された。

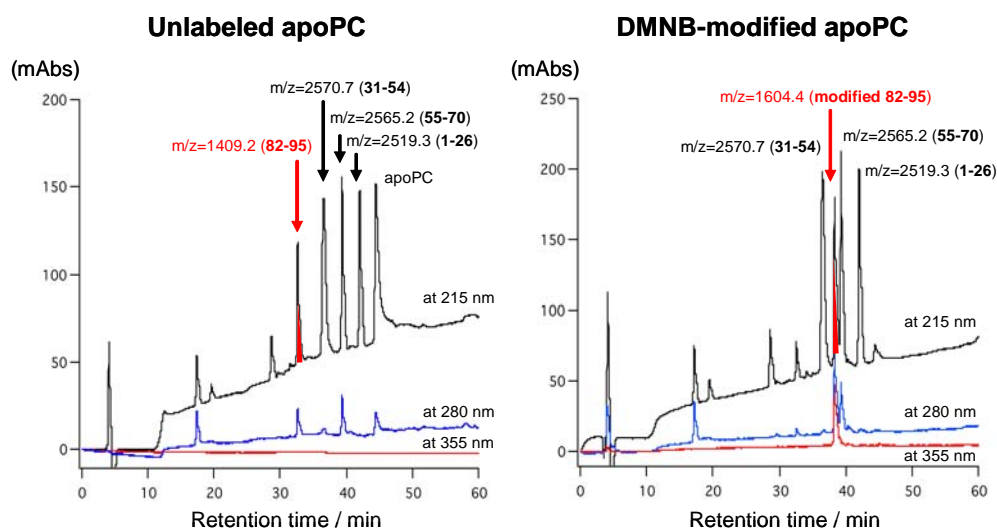


図 1. リジルエンドペプチダーゼを用いた未修飾および DMNB 修飾 apoPC の酵素消化により得られたペプチド断片の HPLC 溶出曲線。MALDI-TOF マススペクトルより得られた各ペプチドの分子量を記載した。

修飾 apoPC に 355 nm のパルス光を照射すると、修飾基に由来する 355 nm の吸収帯が減少したことより、光照射により修飾基が apoPC から遊離したことが判明した (図 2A)。一方、未修飾と修飾 apoPC の酸変性状態の CD スペクトルを比較したところ、修飾 apoPC は変性状態であることが解った。また、修飾 apoPC への 355 nm の光照射により、変性状態を示していた CD スペクトルはネイティブ状態の CD スペクトルに戻った (図 2B)。さらに、光照射前後の修飾 apoPC の ^{15}N -HSQC NMR スペクトルを測定したところ、光照射前の修飾 apoPC のスペクトルは酸変性のスペクトルと類似したスペクトルになり、光照射によりスペクトルはネイティブ状態のスペクトルに変化した。これらの結果より、光照射によりタンパク質が変性状態からネイティブの β シート構造の状態に戻ることが確かめられた。

次に、過渡回折格子法を用いて修飾タンパク質に光を照射したときの反応を追跡した。修飾タンパク質への光照射により得られた回折シグナルは、まず、強度が急激に増大し、その後、ゆっくり増大す

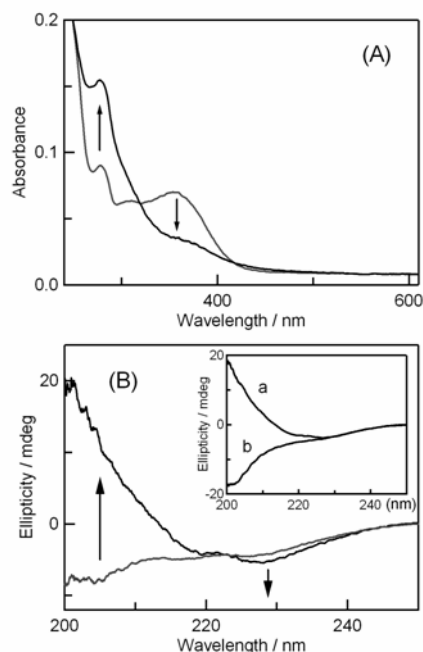


図 2. パルス光 (355 nm) 照射による DMNB 修飾 apoPC の (A) 吸収と (B) CD スペクトル変化。挿入図: apoPC の CD スペクトル、(a) pH 7 と (b) pH 2。

るようになり、マイクロ秒の時間領域で減少した。この減衰成分は、熱グレーティング成分であった。ゆっくり増大した成分のタイムスケールは 400 ns であり、この信号の形がグレーティングの波数を変えても変わらなかった。このことより、この成分は修飾基がタンパク質から解離するのに対応し、400 ns で修飾基がタンパク質から解離することが判明した(図 3)。光照射後、約 270 μ s でタンパク質の体積減少が観測され、この体積変化は変性状態から初期段階での疎水基凝集への変化に帰属できた。さらに、23 ms のタイムスケールで拡散定数が増大することが解り、この変化はタンパク質と水分子の分子間水素結合がタンパク質内の分子内水素結合へと変化したことに対応すると解釈した。

上記の手法の応用として、光応答性環状ペプチドを作製し、 β シート構造を有するホスファチジルイノシトールキナーゼの SH3 domain とその認識ペプチドとの相互作用の光制御を試みた。光解離性架橋修飾基でペプチドの2箇所を分子内で架橋させ、ペプチドを環状構造にした。得られた環状の修飾ペプチドに光を照射すると、ペプチドの環状結合が切れ、もとの天然構造のように揺らぎを有する構造を取ることが期待される。実際、タンパク質と修飾された認識ペプチドを共存させた場合、お互いに認識しなかったが、この混合溶液に光を照射すると、ペプチドと修飾基の結合が切れ、タンパク質とペプチドが相互作用を開始することが CD スペクトルより確かめられた。

本手法は多くのタンパク質へ応用可能であり、タンパク質の構造と機能の有効な研究手段になると期待される。特に、これらの手法がタンパク質のフォールディング反応の解明や分子認識の制御に寄与することが考えられる。

5. 自己評価

当初の目標は、タンパク質やペプチドに光解離性修飾基を導入し、修飾タンパク質やペプチドを光照射することにより、タンパク質の構造形成反応を追跡したり、機能を制御したりすることであった。本研究では、光解離性修飾基を導入したアポプラストシアニンの精製法を確立し、修飾部位を特定した。また、修飾によりタンパク質の立体構造が崩れ、修飾タンパク質への光照射によりタンパク質の立体構造が変性構造からネイティブ構造に戻ることを 15 N-HSQC NMR及びCDスペクトルにより確認した。以上のように、タンパク質の立体構造を一箇所のアミノ酸残基への化学修飾により変性させ、立体構造が崩れた修飾タンパク質への光照射によりネイティブ構造に戻る系を構築した。この系を用いてアポプラストシアニンの構造形成反応を時間分解測定し、フォールディング中間体を検出した。特に、これまで観測できなかった 270 μ s で起こる反応が観測され、各フォ

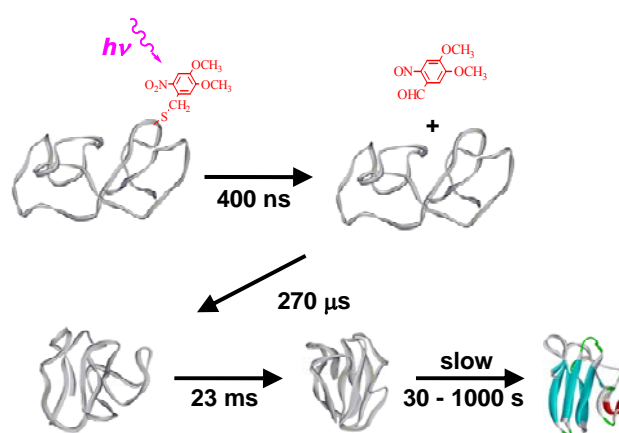


図 3. 修飾タンパク質への光照射 (355 nm) による apoPC の折れ畳み反応の模式図。

ールディング中間体の拡散定数が初めて求められたことは意義が大きい。また、本手法の応用として、SH3 ドメインタンパク質とそのペプチドリガンドとの複合体形成反応を光制御した。以上のようによ本研究では一定の成果は得られたが、問題点も残されている。例えば、本手法により構造形成反応を追跡できるタンパク質の種類は限定されている。また、タンパク質—ペプチド複合体形成制御による機能制御はこれからの課題である。今後、本研究で開発した手法が計測分析に広く利用されるためには、研究のさらなる展開が必要である。

6. 研究総括の見解

光解離性修飾基をタンパク質に導入し、光パルスでタンパク質の構造形成を開始させる全く新しい研究手法に挑戦した。この手法を用いて、タンパク質の構造形成反応を追跡し、構造形成のメカニズムの解明や光による反応制御を狙う。主たる成果は次の2点である。

①光感性修飾基を結合することにより変性させたタンパク質やペプチドに、光照射によって修飾基を解離させ構造変化を誘起し、リフォールディング過程を極初期から詳細に追跡することに成功した。

②修飾基脱離後にアポプラスチアニンが自然状態に戻る現象を、分子体積と拡散定数の変化などから解析して、フォールディング過程にタイムスケールの違う3段階があることを証明した。

特定タンパク質の構造形成反応を追跡することに成功しており、さらに、タンパク質—ペプチド複合体の形成の制御にも成功していることは高く評価できる。

研究成果は18篇の原著論文、7件の学会招待講演にまとめられている。この研究成果に基づく特許2件を出願している。また「平成17年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞」を受賞している。

タンパク質の構造形成反応に関して、初期段階での知見は少ない現状において、これを解明する手がかりを得たことは注目に値する。タンパク質の構造形成を研究するための新しい手法の提案であり、新しい視点であると考えられるが、本方法の適用範囲は限定されているので、タンパク質の立体構造を光制御する方法の開発へと発展することを期待したい。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Shun Hirota, Takumi Kawahara, Emanuela Lonardi, Ellen de Waal, Noriaki Funasaki and Gerard W. Canters, “Oxygen Binding to Tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* Studied by Laser Flash Photolysis”, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 17966–17967 (2005)
- ・ Shun Hirota, Yukari Fujimoto, Jungkwon Choi, Naoki Baden, Noriko Katagiri, Masako Akiyama, Rinske Hulsker, Marcellus Ubbink, Toshihide Okajima, Teruhiro Takabe, Noriaki Funasaki, Yoshihito Watanabe and Masahide Terazima, “Conformational Changes during Apoplastocyanin Folding Observed by Photocleavable Modification and Transient Grating”、

J. Am. Chem. Soc., 128, 7551–7558 (2006)

(2)特許出願

発 明 者: 廣田 俊、濱崎 勇二

発明の名称: 光制御ペプチド及び光制御ペプチドを用いたペプチド-金属複合体形成の制御方法

出 願 人: 株式会社島津製作所

出 願 日: 2006.8.14

出 願 番 号: PCT/JP2006/316278

発 明 者: 廣田 俊、ハラン・プラカシュ

発明の名称: アゾペプチド複合体

出 願 人: 奈良先端科学技術大学院大学

出 願 日: 2007.7.9

出 願 番 号: 特願 2007-179592

(3)受賞

・ 平成 18 年 2 月 平成17年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞

(4)著書

・ 廣田 俊、“光解離性修飾基を用いたタンパク質のフォールディング反応の追跡”、生物物理, 45, 207-210 (2005)

(5)学会発表

口頭発表(国内)

・ 黒岩繁樹、矢島辰雄、置塩信行、舟崎紀昭、廣田俊、“光感受性修飾ペプチドを用いた SH3ドメインの分子認識の制御”、日本化学会第 86 春季年会、2006 年 3 月

・ 黒岩繁樹、矢島辰雄、置塩信行、舟崎紀昭、廣田 俊、“新規光応答性環状ペプチドを用いた SH3ドメインの分子認識の制御”、第 21 回生体機能関連化学部会・第 9 回バイオテクノロジー部会・第 9 回生命化学研究会 合同シンポジウム、2006 年 9 月

ポスター発表(国際)

・ Shun Hirota, Yukari Fujimoto, Jungkwon Choi, Naoki Baden, Noriko Katagiri, Masako Akiyama, Rinske Hulsker, Marcellus Ubbink, Toshihide Okajima, Teruhiro Takabe, Noriaki Funasaki, Yoshihito Watanabe, and Masahide Terazima、“Conformational Changes during Apoplastocyanin Folding Observed by Photocleavable Modification and Transient Grating”、The Second International Symposium on Biomolecular Chemistry (ISBC2006)、2006 年 8 月

・ Shun Hirota, Yukari Fujimoto, Jungkwon Choi, Naoki Baden, Noriko Katagiri, Masako

Akiyama, Rinske Hulsker, Marcellus Ubbink, Toshihide Okajima, Teruhiro Takabe, Noriaki Funasaki, Yoshihito Watanabe, and Masahide Terazima “Conformational changes during apoplastocyanin folding observed by photocleavable modification and transient grating”、Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS&BSJ 2006)、2006 年 11 月

・ H. Prakash, A. Shodai, H. Yasui, H. Sakurai, S. Hirota、“Photoconversion of Copper Ion Coordination in a Chemically Modified Peptide”、13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2007 年 7 月

(6) 招待講演

招待講演(国際)

・ Shun Hirota、“Photo-triggering ligand binding, folding, and molecular interaction of proteins”、International Workshop on Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy、2006 年 8 月

・ Shun Hirota, Takumi Kawahara, Mariano Beltramini, Paolo Di Muro, Noriaki Funasaki, Luigi Bubacco、“Oxygen Binding Properties of *Carcinus aestuarii* Hemocyanin Revealed by Laser Flash Photolysis”、13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2007 年 7 月

・ Shun Hirota、“Control of Folding and Molecular Interaction of Proteins and Peptides by Photocleavable Modification”、2nd European Conference on Chemistry for Life Sciences、2007 年 9 月

招待講演(国内)

・ 廣田俊、“タンパク質構造変化の新規測定法と制御法の開発”、第 7 回創薬ビジョンシンポジウム、2006 年 2 月

・ 廣田 俊、“光トリガーを利用したタンパク質の構造形成制御”、日本薬学会第 127 年会、2006 年 3 月

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・ Atsuhiko Taniguchi, Youhei Sohma, Maiko Kimura, Takuma Okada, Keisuke Ikeda, Yoshio Hayashi, Tooru Kimura, Shun Hirota, Katsumi Matsuzaki, and Yoshiaki Kiso、“Click Peptide” Based on the “*O*-Acyl Isopeptide Method”: Control of A β 1–42 Production from a Photo-Triggered A β 1–42 Analogue”、J. Am. Chem. Soc., 128, 696–697 (2006)”

・ Mariusz Skwarczynski, Mayo Noguchi, Shun Hirota, Youhei Sohma, Tooru Kimura, Yoshio Hayashi, and Yoshiaki Kiso、“Development of first photoresponsive prodrug of paclitaxel”、Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 4492–4496 (2006)

- ・ N. Baden, S. Hirota, T. Takabe, N. Funasaki and M. Terazima, “Thermodynamical Properties of Reaction Intermediates during Apoplastocyanin Folding in Time-Domain”、J. Chem. Phys., 127, 175103 (2007)

(2)特許出願 なし