有機超分子によるヘム蛋白質の機能変換

九州大学工学部応用物質化学科 浜地 格

Site specific incorporation of unnatural molecules into native proteins are proven to be one of the most promising methodologies in protein molecules engineering. In this article, I describe successful examples of function regulation of hemoproteins by interactions with phenylboronic acid as a sugar recognition site and maleic acids as controlling sites of electrostatic repulsion. As another approach, molecular assemblies such as lipid bilayer membranes, are demonstrated to be potential one which enable the functional conversion of the bound-protein through noncovalent but domain-specific perturbations.

hemoprotein / unnatural molecules / molecular assembly / functional conversion /
specific interaction / protein engineering

1. はじめに

遺伝現象の分子レベルでの解明を契機に発展した遺伝子工学は生命のセントラルドグマに基づいてタンパク質工学という新しい学際領域を生み出した。それは部位特異的な変異の導入によるアミノ酸の入れ替えという新手法を武器に、天然酵素・タンパク質の構造と機能の関係をアミノ酸一個のレベルまで掘り下げて理解することを可能にしたと考えられている。確かに設計図となるDNAの変化が機能本体であるタンパク質の化学物質としての性質の変換を促すことは明らかとなった。しかしながら本当の意味での工学が成立しているとは言えないのが現状であろう。タンパク質をナノメートルサイズの分子機械と捉えてそれに対する分子レベルの工学を展望しようとするのがタンパク質工学の基本的な立場とすれば、設計図からタンパク質への筋道を明らかにする努力とともに、部品を天然に存在する20種類のアミノ酸以外へ拡張することが当然要求されよう。実際に生物が行っているタンパク質の翻訳後修飾は、機能の多様性を付与するために不可欠の営みであると思えることができる。最近アメリカのSchultzなどのグループによって生物型反応装置を用いたタンパク質への非天然アミノ酸の組み込み法が開発

され¹⁾、日本でも宍戸・横山らのグループによって展開が図られている²⁾。これまで知られていない非天然(すなわち進化の過程で生物が選択しなかったかあるいは出合わなかった)分子との相互作用の解析は、タンパク質の化学物質としての理解を深めるだけでなく、その構造・機能変換の有用な部品を提供し、タンパク質工学の幅を大きく広げることになるのではなかろうか。ここではそのような問題提起のもとに行われている研究の最近の動向について我々のグループの結果を中心に論じてみたい。

2. ミオグロビンへの人工的な分子認識サイトの組み込み

フェニルホウ酸は、糖類などのジオールと水中でも安定な結合を形成することのできるルイス酸として知られている。すなわち非イオン性の sp^2 軌道であるホウ酸が糖との錯化によって sp^3 のホウ酸エステル陰イオンに変化する。何の認識能も持たないタンパク質に糖類に対する分子認識機能を付与するために非天然分子としてこのフェニルホウ酸を導入したミオグロビン(フェニルホウ酸ペンダントミオグロビン)を合成した。この際補欠分子ヘムを予めフェニルホウ酸で化学修飾し、アポタンパク質と再構成させてミオグロビン

Function regulation of hemoproteins through their specific interaction with unnatural organic molecules or molecular assemblies

Itaru HAMACHI

Department of Chemical Science & Technology, Kyushu University

図1 化学修飾ヘムとアポミオグロビンとの再構成。再構成ミオグロビンとしてフェニルホウ酸ペンダントミオグロビンを代表例として示した。

に組み込んだ(図1)³⁾。この再構成法を用いるとかなり多くの非天然分子団をヘムタンパク質に導入できた。本論で述べる例以外にも光反応中心となるルテニウムピリジン錯体⁴⁾やアルキル長鎖⁵⁾を結合したハイブリッドタンパク質(それぞれ光誘起電子移動を介してヘム鉄の酸化還元状態がコントロールされたり、疎水性長鎖のアンカーによって最も単純な膜結合性のタンパク質となった)などが我々のグループでは得られている。また他にもこの方法論を基にして光還元酵素の半合成⁶⁾やフラビン酵素のバイオセンサーとしての人工機能化⁷⁾の例などが最近相次いで報告されている。

フラクトースなどの糖類を添加すると糖類の結合によってフェニルホウ酸ペンダントミオグロビンの構造変化が起こった。円偏光二色性分光(CD)から α ヘリックス含量が糖類によって増え、それに伴ってヘム領域の誘起CDの強度も大きくなることが示された。ヘム領域の構造をNMRで眺めると、ヘムポケットの出入口付近のヘムおよびタンパク質側鎖のプロトンの化学シフトが最も敏感に変化していることが分かった(図2)。同時に活性中心のヘム鉄に配位している水の pK_a が0.5ほど塩基性側にシフトすることが観察された。これらの結果から糖とフェニルホウ酸の錯化はヘムクレバス近傍のペプチド領域の α ヘリックスの巻き戻りを引き起こし、これがヘム補欠分子とアポタンパク質との相互作用を微妙に調整していると解釈される。

糖類に応答したヘム・アポタンパク質相互作用の変化は、ミオグロビンの活性にも影響を与えた。酸素錯体の自動酸化速度から酸素貯蔵能を評価すると、そのままではあまり安定ではなかった酸素錯体(自動酸化速度 $k = 0.11/h$)が糖の添加によって天然ミオグロビ

図2 糖添加によるフェニルホウ酸ペンダントミオグロビンの糖添加によるNMRスペクトル変化。上は糖なし、下は糖添加。実線と破線の矢印はそれぞれ化学シフト変化が認められたシグナルとそうでないシグナルを示す。ヘムポケットの出口付近のヘム5,8位のメチル基やHis-F8, Phe-CD1などが選択的にシフトしている。

ンに匹敵する安定性($k = 0.03/h$)を獲得した。この安定化効果は添加する糖の構造によって大きく異なり、単糖と二糖では単糖の方が効果的でありまた単糖の中ではフラクトースが最も有効であった。糖類の結合によって新たに発生するホウ酸原子上の負電荷とともに、糖の水酸基のペプチド側鎖部分との水素結合(あるいは立体障害、疎水的相互作用)などが寄与している様である。このような変化は当然ほかの修飾ミオグロビンでは見られない。またランダムにタンパク質表面のリジン残基をフェニルホウ酸で修飾したミオグロビンを用いた参照タンパク質もまったく何の糖応答性を示さなかった。このことはエフェクター分子(この場合は糖類)の結合によるタンパク質機能のスイッチングには、単に分子結合サイトの導入だけでなく、なによりも活性中心への効率よい情報伝達が重要であることを明瞭に示している。さらに酸素錯体の長寿命化はこのミオグロビンの酸化酵素としての活性増幅にもつながった。電子伝達系とカップリングさせてアニリン水酸化を行うと、フラクトース添加によって5倍以上の反応性の上昇が見られ、速度論的解析からこれはアニリンに対する触媒効率(k_{cat})の増大に起因することが分かった。このように分子認識部位を新しく導入したミオグロビンは本来の酸素貯蔵タンパク質としての活性だけでなく内在する触媒活性も糖の刺激に応答してダイナミックに制御されることが明らかとなった。

3. マレイル化チトクロムcの動的揺らぎとその機能⁸⁾

ペプチド主鎖レベルでのもっと大きな構造変化は正

電荷のリジン残基を無水マレイン酸で修飾して電荷を反転させたマレイル化チトクロムcにおいて見られる。面白いことにこの修飾チトクロムcは中性pH条件でアルカリ金属イオンを添加していくと(CDや吸収スペクトルから明らかなように)二次構造がランダムな変性状態から α -ヘリックスに富んだ疑似天然状態へと変化する。これは天然チトクロムcの酸変性状態にアニオンを添加して生じるモルテングロビュール状態ときわめて類似した挙動である⁹⁾。すなわちリジンカチオン間の静電反発がアニオンによって抑制されたように、マレイル化チトクロムcでは金属カチオンとマレイン酸末端のカルボキシレートとの相互作用によりタンパク質表面での静電反発が大きく緩和されモルテングロビュール状態となったと考えられる。実際にマグネシウムなどの二価アルカリ土類金属イオンはカルボキシレート間の架橋が可能なために一価アルカリ金属イオンに比べて100倍ほど低濃度から巻き戻し効果が現れた。

我々はこのような状態のマレイル化チトクロムcのintrinsicな反応性に興味を持った。幸いこの系ではモルテングロビュール状態を中性のpHで得ることができるので、ヘムタンパク質特有のいくつかの反応を試みた。電子伝達タンパク質としての特性はビタミンcによる還元反応から、またペルオキシダーゼ反応は過酸化水素を酸化剤としたグアヤコール酸化反応を用いて評価した。図3に示すように低塩濃度では大きなペルオキシダーゼ活性が見られるが電子伝達活性はまったくなく、ナトリウムイオンを加えていくと電子伝達活性が徐々に回復し、逆にペルオキシダーゼ活性は低塩濃度の時の1/10程度(しかし天然チトクロムcに比べて10倍以上)まで抑制された。そして問題のモル

図3 マレイル化チトクロムcの金属イオン添加による活性変化。縦軸はペルオキシダーゼ反応初速度(右)とビタミンcによる還元初速度を表す。

テングロビュール状態(0.6M以上のNaCl濃度条件)ではマレイル化チトクロムcは両方の活性とも合わせ持つ中間的な機能のヘムタンパク質であることが分かった。これまでモルテングロビュール状態はタンパク質折り畳みの中間状態と推定され、構造論的な側面の研究が多く行われてきたが、生理的な活性はその極端な生成条件のために無視されてきた傾向が強い。しかしながらタンパク質を化学物質として考えるとき、ここで示されたようなモルテングロビュール状態での動的構造とともに反応活性(機能)の中間性には本質的に重要な側面があるのではなかろうか。このことの分子論的理解はde novo設計による人工タンパク質合成が直面している問題点の克服などにきわめて重要な示唆を与えうると考えられる¹⁰⁾。

4. 脂質膜・タンパク質相互作用による機能変換

生体における超分子システムは、タンパク質・タンパク質相互作用や脂質二分子膜とタンパク質・ペプチドとの相互作用などほとんどの場合非共有結合的相互作用によって形成されており、その重要性は広く認識されている。共有結合による非天然分子の導入のほか、このような非共有結合的な相互作用もタンパク質工学のもう一つの重要な武器となりえるかもしれない。非共有結合の場合タンパク質との結合を安定に保つために多点での相互作用が必要となるので、分子集合体

図4 脂質膜結合チトクロムcのN脱メチル化酵素活性の速度論解析。反応初速度の過酸化水素濃度に対する二重逆数プロットを示した。

図5 脂質膜添加チトクロムc凍結溶液のESR. それぞれ脂質膜添加・無添加条件でのスペクトル. リン酸型脂質においてのみ強い高スピン型のスペクトルとなった.

図6 固定化脂質膜中でのチトクロムcのESR角度依存性. 磁場中で特定の配置に脂質膜フィルムにおいて測定を行うと、リン酸膜の場合のみその角度に依存してスペクトルが大きく変化した.

や高分子が非天然分子として選択されるのが妥当であろう. 典型的な表在タンパク質であるチトクロムcと(合成)脂質二分子膜との相互作用をチトクロムcの機能をプローブとして調べていくと面白い現象が見つかった¹¹⁾.

いくつもの合成脂質(アンモニウム, フォスファチジルコリン, リン酸, スルホン酸型など)とチトクロムcとの親和性をゲル濾過や限外濾過アッセイで評価すると, リン酸親水部をもつ脂質膜類と強く結合することが示された. この脂質膜結合チトクロムcの過酸化水素を酸化剤としたN脱メチル化反応活性を検討すると天然型に比べて10~30倍もの速度増幅が見られた. その他の脂質膜については何の効果も見られなかった. 詳細に速度論的な解析を行うと, 反応は基質ジメチルアニリン濃度には依存せず, 過酸化水素と膜結合チトクロムcとの反応(高酸化活性種が生じる)過程が律速段階であった. ミカエリス・メンテン型の速

度式を仮定して, 初速度と過酸化水素濃度との相関をとると, その両逆数プロットは良好な直線関係を与えた(図4). 得られた速度パラメーターから脂質膜の作用は主としてチトクロムcの過酸化水素との親和性(すなわち $1/K_m$)を10倍も向上させることで加速をもたらすことが分かった. またより大きな速度上昇を示すリン酸型脂質膜では $1/K_m$ の増加だけではなく, 同時に触媒効率(k_{cat})の10倍近い増幅も観測された. 複数のリン酸膜について反応速度を比較すると相転移温度との間にゆるやかな依存性がみられ, 脂質膜の流動性が増すほど脱メチル化反応が加速された. 混合膜での実験から相分離によるリン酸膜ドメイン形成も脱メチル化酵素活性の誘導に大きな役割を果たすことが明かとなった.

リン酸膜結合チトクロムcの構造は光吸収スペクトルや電子スピン共鳴(ESR)によって検討された. リン酸膜添加後の光吸収スペクトルは酸化型も還元型も

明らかにミオグロビンのそれと酷似したものに变化した。また酸化型では六配位目のメチオニン80とヘム鉄とのLMCT（配位子—金属電荷移動）吸収帯の消失が確認された。ESRからは明らかにリン酸膜の場合だけ低スピンから高スピンへとスピン状態が変化していることが示された（図5）。CDスペクトルは天然チトクロムcのほとんどの α ヘリックスが保持されていることを示し、ここで見られた構造・機能変換は単なる変性とはまったく別のものであることを意味している。さらに興味深いことに固定化二分子膜を調製してその中でのチトクロムcの分子配向をEPRの角度依存性から見積ると、リン酸膜中でチトクロムcはヘム面を膜面に対してほぼ平行に揃えた特定の配向で固定化されていることが分かった（図6）。この知見を溶液系に拡張できるとすればチトクロムcとリン酸脂質膜との結合は、タンパク質表面の特異的なドメインと二分子膜二次元平面との異方的相互作用と考えてよいであろう。このように分子集合体によるタンパク質の機能変換は共有結合ほどの厳密性は現在のところないものの、これまでの方法論とは異なる新しい方向性を示すものと期待される。この他にも表在タンパク質のひとつであるDNA複製開始タンパク質（DnaA）の活性が脂質膜によって制御されることがごく最近関水らによって報告されており¹²⁾、我々がここで示したような現象はかなり一般性のあるものかもしれない。

5. むすび

ここで示したような非天然（機能性）分子のタンパク質への取り込みは、従来のタンパク質工学的手法と比べるといささか精緻さに欠ける乱暴なものとなることが多い。しかしながら、KaiserやSchultzの先駆的な成功例からも明らかのように20種類に限られる構成要素を大きく拡張できることはきわめて魅力的な戦略に思われる¹³⁾。さらに有効性が立証された非天然分子を基に非天然アミノ酸が設計・合成されれば遺伝子工学との併用によるペプチド骨格への導入も可能となってくるであろう。また当然そのようにして拡大された分子系を用いれば、これまで見えなかった化学物質としてのタンパク質の新しい側面に光をあてること

にもなると期待される。

文 献

- 1) Cornish, V. W., Mendel, D. and Schultz, P. G. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 621-633.
- 2) Hohsaka, T., Sato, K., Sisido, M., Takai, K. and Yokoyama, S. (1994) *FEBS Lett.* **344**, 171-174.
- 3) Hamachi, I., Tajiri, Y., Murakami, H. and Shinkai, S. (1994) *Chem. Lett.*, 575-578; Hamachi, I., Tajiri, Y. and Shinkai, S. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7347-7348.
- 4) Hamachi, I., Tanaka, S. and Shinkai, S. (1993) *Chem. Lett.*, 1417-1420; Hamachi, I., Tanaka, S. and Shinkai, S. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10458-10459.
- 5) Hamachi, I., Nakamura, K., Fujita, A. and Kunitake, T. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4966-4970; Hamachi, I., Higuchi, S., Fujimura, H., Nakamura, K. and Kunitake, T. (1993) *Chem. Lett.* 1175-1178.
- 6) Willner, I., Zahavy, E. and Heleg-Shabtai, V. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 542-543.
- 7) Riklin, A., Katz, E., Willner, I., Stocker, A. and Buckmann, A. F. (1995) *Nature (London)* **376**, 672-675.
- 8) Fujita, A., Hamachi, I. and Kunitake, T. (1995) *J. Inorg. Biochem.* **53**, 505.
- 9) Goto, Y. and Nishikiori, S. (1991) *J. Mol. Biol.* **222**, 679-686.
- 10) DeGrado, W. F. (1993) *Nature (London)* **365**, 488.
- 11) Hamachi, I., Fujita, A. and Kunitake, T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8811-8812; Fujita, A., Senzu, H., Kunitake, T. and Hamachi, I. (1994) *Chem. Lett.*, 1219-1222.
- 12) Sekimizu, K. and Kornberg, A. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 7131-7135; Sekimizu, K. (1994) *Chem. Phys. Lipids* **73**, 223-230.
- 13) Kaiser, E. T. and Lawrence, D. S. (1984) *Science* **226**, 505-511.