タンパク質の精密設計と精密解析

旗野 昌弘

Masahiro Hatano 東北大学非水溶液化学研究所

1. はじめに

遺伝子組換え技術の確立により、タンパク質機能の構造論的説明は容易となった。個々の特定のアミノ酸残基とタンパク質機能との関連はこの遺伝子組換えによるアミノ酸置換によって明らかにされる。一方、X線結晶解析、NMR 構造解析と構造予測、コンホメーションのエネルギー計算、コンピュータ・グラフィックス解析、データ・ベース上のアミノ酸配列の相同性からの構造予測などを含む、いわゆるタンパク質工学の面からの研究も進展している。このようなタンパク質研究の新展開により、新しいタンパク質の創造も可能となった。タンパク質の精密設計と精密測定の現状と将来を展望したい。

2. タンパク質の精密設計

最近の *Science* 誌に四次元の nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) による interleukin-1 β (153 アミノ酸残基, 17,400 daltons) の各原子間距離の測定が報告された¹⁾。この方法は 25,000 daltons のタンパク質のコンホメーション解析にも適用できるという。機能的に重要なタンパク質は主旨数百のアミノ酸残基からなり、X線結晶解析データがタンパク質設計に必要である。分解能が問題で、4Å では側鎖の様子がわからない。3Å では Ala, Leu の側鎖の区別が可能となり、1Å 以下の分解能ではじめて各原子座標が決定される²⁾。

分解能を 1Å 程度にするには、タンパク質のよい結晶が必要である。

目標とするタンパク質の X線結晶解析がなされていると遺伝子組換えによるアミノ酸置換によって、ターゲットとしたアミノ酸の機能上の役割やタンパク質分子の構造変化に対する寄与が明らかとなる。ヘモグロビンについては野生種、変異種 (mutants) の X線

結晶解析がなされており^{3),4)}、予想どおりの構造変化が野生種、変異種の間で存在するかどうか、タンパク質機能とどのアミノ酸残基が関連するかなどについて明確なデータが得られる。野生種と変異種とは一般に結晶形、空間群が変化しないので、X線結晶解析で差フリーエ変換法が有効である³⁾。

数多くの研究例があるが、ここで二、三の研究例を示す。tyrosyl-tRNA synthetase は分子量 47,300 のサブユニット 2 個からなる。各サブユニットは 2 個のドメインをもち、Phe 164 Asp は会合しない (Phe 164 Asp は N 末端から 164 番目のフェニルアラニン残基をアスパラギン酸残基へ置換した変異種)。会合し、2 量体となつてはじめて酵素活性を示す。Phe 164 Asp は会合せず、酵素活性も示さないので、この Phe164 が酵素活性発現に必要なアミノ酸残基のひとつであることがわかる。活性部位はどこかは X線結晶解析ではわからなかった。モデル基質である tyrosyl-ATP と各変異種との結合定数が求められた。Cys 35, His 48, Thr 40, His 45 が tyrosyl-ATP との結合に必要であることがわかった。これらのアミノ酸残基は比較的高いドメイン (X線結晶解析によって得られる等方的温度因子 β が小さい) に存在する。一方、 β 値の大きい (比較的やわらかい) ドメインに存在する Lys 82, Arg 86, Lys 230, Lys 233 をそれぞれ Ala に置換すると、酵素活性は失なわれないが、野生種のたかだか 1/8,000 に低下する⁵⁾。Lys 82,

旗野昌弘 東北大学非水溶液化学研究所 (980 仙台市青葉区片平 2-1-1) 教授、工博
1959 年東工大大学院理工学研究科博士課程修了。1967 年東北大学非水研助教授、1969 年より教授。専門は生物物理化学、特にヘムタンパク質の分光学。＜趣味＞植物栽培、野菜栽培、読書 (特に歴史)、動物観察。

- (A) distal site
(B) proximal site

図1 種々のチトクロム P-450 の
アミノ酸配列の相同性

(A)	N D I F G A G F E T319 V T T A I F W	rat P-450 _d
	N D I F G A G F D T319 V T T A I T W	mouse P ₃ -450
	F D L F G A G F D T325 I T T A I S W	rat P-450 _c
	L D L F G A G F D T325 V T T A I S W	mouse P ₁ -450
	L S L F F A G T E T302 S S T T L R Y	rat P-450 _b
	L S L F F A G T E T302 G S T T L R Y	rat P-450 _e
	N D I F G A G F D T321 I T T A L S W	rabbit P-450 _{LM4}
	L S L F F A G T E T302 T S T T L R Y	rabbit P-450 _{LM2}
	W D V F S A G T D T301 T S N T L K F	rabbit P-450 _{LM3b}
	T E M L A G G V N T329 T S M T L Q W	bovine P-450 _{scc}
	G L L L V G G L D T252 V V N F L S F	<u>P.putida</u> P-450 _{cam}

Arg 86, Lys 230, Lys 233 は酵素でしばしば仮定されている induced-fitting と関連しているものと考えられる。同様の考察は barnase についてもなされている⁶⁾。

チトクロム *c* ペルオキシダーゼ (*ccp*) も X 線結晶解析により全原子座標が決定されている。ヘム近傍の Trp 191 を Phe に置換すると反応速度は野生種の 1/3,000 に低下する。ヘムに配位している His 175 のイミダゾールが Trp 191 のインドールと相互作用し、ヘムの電子状態がチトクロム *c* から *ccp* への電子の流入を容易にしているものと考えられる⁷⁾。同様の現象がヘムタンパク質について報告されており、各変異種のヘムの電子状態の解析が周辺のアミノ酸側鎖の位置と配向の関連から詳細に研究されている^{8),9)}。

精密設計にはタンパク質の全原子座標が決定されていることが必要であることを、もう一度ここで強調しておきたい。

3. 相同性を基礎としたタンパク質設計

X 線結晶構造解析によって全原子座標が決定されているタンパク質の数、種類は限られている。膜タンパク質については数例にすぎない。そこで、機能が類似しているタンパク質群について立体構造上の相同性を仮定してタンパク質設計を行う試みがある。加水分解酵素は X 線結晶構造解析がなされている数少ないグループのひとつである。キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼのアミノ酸配列上の相同性は高くはないが、機能にかかわるモジュールの立体構造は相互によく似ている¹⁰⁾。

ここで、チトクロム P-450 における相同性を基礎としたタンパク質設計の実例をのべて参考に供したい。

チトクロム P-450 (以下 P-450 と略す) は動植物組織、カビ、酵母のミクロソーム、動物組織のミトコンドリア中に存在する一群の一原子酸素添加酵素の総称である。約 100 種の P-450 分子のアミノ酸配列が決

(B)	F G L G K R R C456 I G E I	rat P-450 _d
	F G L G K R R C456 I G E I	mouse P ₃ -450
	F G L G K R K C461 I G E T	rat P-450 _c
	F G L G K R K C461 I G E T	mouse P ₁ -450
	F S T G K R I C436 L G E G	rat P-450 _b
	F S T G K R I C436 L G E G	rat P-450 _e
	F G L G K R R C458 I G E T	rabbit P-450 _{LM4}
	F S L G K R I C436 L G E G	rabbit P-450 _{LM2}
	F S A G K R A C435 V G E G	rabbit P-450 _{LM3b}
	F G W G V R Q C461 V G R R	bovine P-450 _{scc}
	F G H G S H L C357 L G Q H	<u>P.putida</u> P-450 _{cam}

定されている。X 線結晶構造解析がなされているのはカンファーを基質とする緑膿菌の P-450 (P-450_{cam}) のみである¹¹⁾。P-450_{cam} は水溶性で、他は膜結合性である。

Strobel ら¹²⁾ は 34 種の脊椎動物の P-450 について疎水部を推定する時に用いる ESG-Scale (Engelman-Steitz-Goldman Scale) 解析¹³⁾、Kyte-Doolittle プロットによる解析¹⁴⁾ を行い、これら 34 種の P-450 類のアミノ末端の 70 余のアミノ酸残基が共通して膜に貫入しているものと推定した。

われわれはイソサフロールによってラット肝臓内で誘導される P-450_d の cDNA をシャトル・ベクターに組み込み、これを酵母を宿主として発現させた¹⁵⁾。

次に、遺伝子組換えによるアミノ酸置換を試みた。P-450_d の精密設計には P-450_d の X 線結晶構造解析による全原子座標が必要である。しかし、P-450_{cam} の全原子座標はあるが、他の P-450 のそれらはない。そこで相同性を仮定してタンパク質設計を行うこととした。

P-450_{cam} と P-450_d とではアミノ酸配列上の相同性は約 20% 以下と低い。しかし、図1で示す領域の相同性は高い。P-450_d の Cys 456 と P-450_{cam} の Cys 357 のそれぞれの S⁻ イオンがヘムに対して軸配位しているとみなした。

P-450_{cam} の原子座標をみるとたしかに Cys 357 の S⁻ イオンがヘムに軸配位している。したがって、すべての P-450 において相当する Cys を含む領域をヘムに近いという意味で proximal site とした (図 1 (B))。一方、P-450_d の Thr 319, P-450_{cam} の Thr 252 の近傍もアミノ酸配列上の相同性が高い。P-450_{cam} の Thr 252 の近くにヘムに結合した二原子酸素分子、基質カンファアが存在する。ヘムに隣接した部分という意味でこの領域を distal site (図 1 (A)) と名づけた。膜結合性の多くの P-450 と P-450_{cam} とにおいて、ヘム周辺の立体構造はほぼ同じであると仮定して、P-450 の精密設計を行った。保存されているアミノ酸残基については P-450_{cam} の原子座標を用い、コンピュータ上で最適化を行った。遺伝子組換えによって得られた変異種を用いた実験より、次のことが明らかとなった。

(1) Cys 456 His, Cys 456 Tyr の還元 CO 錯体は 450 nm に吸収を示さない¹⁶⁾。

(2) Arg 454 Leu の還元 CO 錯体は 450 nm に吸収を示すが、漸次この吸収は消失し、420 nm に新しい吸収を示す¹⁶⁾。

(3) 7-エトキシマリン、ベンツフェタミン、アセトアニリドの酸素化触媒活性は Thr 319 Ala, Lys 453 Glu では失われる^{17), 18)}。

(4) 11 種の distal site の変異種、9 種の proximal site の変異種、3 種の芳香族変異種はいずれも高スピン・ヘム単位をもつ¹⁹⁾。

(5) Thr 319 に隣接する Glu 318 を Asp へ変換すると、野生種ではヘムに直接配位できない 4-フェニルイミダゾールがヘムに直接配位できるようになる^{20), 21)}。

これらの研究結果から、(a)~(f) のことが推定される。

(a) Cys 456 の S⁻ がヘムに軸配位している。

(b) P-450_{cam} の His 355 に相当する P-450_d の Arg 454 のカチオン性側鎖は P-450_{cam} の His のイミダゾリウム・カチオンと同様にヘムのプロピオネート側鎖と相互作用し、ヘムとアポタンパク質との結合に関与している。

(c) P-450_d の Thr 319 は P-450_{cam} の Thr 252 と同様にヘムに配位した二原子酸素分子の近くに存在し、Thr の側鎖 OH 基がヘムに配位した二原子酸素分子の活性化に寄与している。

(d) P-450_{cam} では distal 位に配位子場の強い O 原子 (おそらく水素結合した水分子) が存在し、ヘムは低スピンであるが、P-450_d はこの O 原子が存在しない。

(e) Glu 318 はヘム面に近接して存在する。

(f) P-450 へ NADPH からの電子を供給する還元酵素と P-450 とはイオンの相互作用が結合している (同様の例はチトクロム *c* と *ccp*)。Lys 453, Arg 455, Lys 463 のカチオン性側鎖は還元酵素と P-450 との結合に関与している。しかし、よく保存されている (P-450 に共通して存在する) Lys 401 はこの結合に関与していない²²⁾。

以上のように、「膜結合性の多くの P-450 と P-450_{cam} とにおいて、ヘム周辺の立体構造はほぼ同じである」という仮定はほぼ正しいものと思われる。P-450 では多様な分子種があり、それぞれが基質特異性をもつ。P-450_{cam} では Tyr 96, Val 396, Val 295 が重要である。われわれは P-450_d の 200~220 番目のアミノ酸が基質特異性と関連するものと仮定し、多く変異種について触媒活性、基質選択性を測定している。このような推論、精密設計においてコンピュータ解析は有効である。

P-450_{cam} はプチグレドキシンから電子の供与を受ける。Poulos らはチトクロム *b₅* を P-450_{cam} とプチグレドキシンとの系に加えると P-450_{cam} への電子移動が競争的に阻害される。Poulos らはこのチトクロム *b₅* と P-450_{cam} との界面に存在するアミノ酸残基をコンピュータ上で吟味した²³⁾。例えば、Glu のカルボキシレート基と Lys のアミノ・カチオン基とが最も近接して存在し、またその組み合わせが最も多い相対的配置をコンピュータ上で求める。同様のことがチトクロム *c* と *ccp* との組み合わせでも吟味されている²⁴⁾。Marcus の理論と関連し⁸⁾、両タンパク質中のヘムとヘム、ヘムとフラビンの立体的位置関係、電子移動経路に存在する芳香族アミノ酸側鎖の寄与なども研究されている²⁵⁾。

相同性を基礎としたタンパク質設計では、論理にあまり残ることは否めない。2. でのべたタンパク質の精密設計は X 線結晶構造解析に基礎をおき、論理の展開も容易である。膜タンパク質も含め、タンパク質の X 線結晶構造解析の重要性をもう一度強調しておく。

4. タンパク質の精密解析

中性子線の小角散乱、非弾性散乱がタンパク質の形、会合の研究に有効である²⁶⁾。真核生物は D₂O 中で増殖しにくい、原核細胞 (例えば、*E. coli*) に遺伝子を導入し形質転換すれば、真核生物のタンパク質も重水素化でき、中性子線散乱用試料を作成できる。緩衝溶液中の D₂O の含量は 42% 程度にするとよい。バクテリオロドプシン²⁷⁾ を参考例としてあげておく。

X 線結晶構造解析の詳細は成書^{28),29)} をあげるに止める。解析をバック・アップするソフトウェアの重要性和データの refinement 実行のための演算速度の飛躍的向上の必要性を痛感している。生理的に重要なタンパク質では原子数が多いことがその理由である。

タンパク質の精密設計が容易となり、人工酵素の創造も夢ではない。精密設計には X 線結晶構造解析が重要であることをしばしばのべてきた。この人工酵素の創造には精密測定が不可欠である。変異種と野生種との機能の精密な評価とそれらの比較である。Fersht の総説⁶⁾、Tame の総説⁴⁾を読むことを勧める。また、分光学的重要性も強調しておきたい。transient Raman^{30),31)}、transient 吸収³²⁾、Redox 解析^{33),25)}、二次元、三次元、四次元 NMR^{35),36),1)} が重要である。最後に、タンパク質設計、タンパク質化学の最近の方法のまとめがなされていることをのべておく³⁴⁾。

5. む す び

タンパク質がどのような原理で自然界で立体構造を選択し、機能を発現するにいたっているかは不明である。重要なアミノ酸配列と重要ではないアミノ酸配列とがあるものと考えられる。人工酵素、その複合系としての超分子システムの創造は 21 世紀の研究課題であろう。

化学は新しい物質系の創造の学問である。その一分野である高分子化学が人工酵素、その超分子システムの創造に最も大きな貢献をしようものと期待している。

文 献

- 1) L.E. Kay, G.M. Clore, Ab Bax, A.M. Gronenborn: *Science*, **249**, 411 (1990)
- 2) T.A. Jones *et al.*: *Nature (London)*, **343**, 687 (1990)
- 3) 高分子学会 バイオ・高分子研究会編: バイオ・高分子研究法 1 “遺伝子組換えを駆使した蛋白質デザイン”, 学会出版センター, 東京 (1987)
- 4) J. Tame: Protein Structural Analysis, Folding and Design, M. Hatano *Ed.*, p.167~p.183, Japan Scientific Societies Press, Tokyo and Elsevier, Amsterdam (1990)
- 5) A.R. Fersht *et al.*: *Biochem.*, **28**, 9201~9209 (1989); *ibid.*, **29**, 1643~1648 (1990)
- 6) A.R. Fersht *et al.*: *Nature (London)*, **346**, 440~445 (1990)
- 7) J. Kraut *et al.*: *Biochem.*, **27**, 6243~6256 (1988)
- 8) 旗野昌弘: タンパク質工学, 小野修一郎編, p.83~p.106, 丸善 (1989)
- 9) T.G. Spiro *et al.*: *Biochem.*, **27**, 5477~5485 (1988); *ibid.*, **27**, 5486~5492 (1988)
- 10) J.S. Richardson *et al.*: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, G. D. Fasman *Ed.*, p.1~p.98, Plenum Press, N.Y. and London (1989)
- 11) T.L. Poulos *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **260**, 16122~16130 (1985); *Biochem.*, **25**, 5314~5322 (1986); *ibid.*, **26**, 8165~8174 (1987); *ibid.*, **28**, 917~922 (1989); *ibid.*, **28**, 8201~8205 (1989)
- 12) H.W. Strobel *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **263**, 6038~6050 (1988)
- 13) D.M. Engelman *et al.*: *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 321~353 (1986)
- 14) J. Kyte, R.F. Doolittle: *J. Mol. Biol.*, **157**, 105~132 (1982)
- 15) T. Shimizu *et al.*: *FEBS Lett.*, **207**, 217~221 (1986)
- 16) T. Shimizu *et al.*: *Biochem.*, **27**, 4138~4141 (1988)
- 17) H. Furuya *et al.*: *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **160**, 669~676 (1989)
- 18) H. Furuya *et al.*: *Biochem.*, **28**, 6848~6857 (1989)
- 19) H. Sotokawa *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1037**, 122~128 (1990)
- 20) T. Shimizu *et al.*: *Biochem.*, 投稿中
- 21) T. Shimizu *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **995**, 116~121 (1989)
- 22) T. Tateishi *et al.*: *Biochem.*, 投稿準備中
- 23) S.G. Sliger *et al.*: *Biochem.*, **28**, 8201~8205 (1989)
- 24) T.L. Poulos *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **259**, 13027~13036 (1984)
- 25) M.K. Johnson *et al. Eds.*: Electron Transfer in Biology and Solid State, Advances in Chemistry Series Vol. 226, American Chemical Society, Washington, DC (1990)
- 26) V. Ramakrishnan: Protein Structure and Engineering, O. Jardetzky *Ed.*, p.49~p.60, Plenum Press, N. Y. and London (1990)
- 27) M.P. Heyn *et al.*: *Biochem.*, **29**, 4904~4913 (1990)
- 28) G.L. Gilliland: Biological Macromolecule Crystals, Vol. 1 Methodology, Vol. 2 Crystallization Conditions and Procedures, CRC Press, Cleveland, Ohio (1990)
- 29) H. Michel *Ed.*: Crystallizing Membrane Proteins in Two and Three Dimensions, CRC Press, Cleveland, Ohio (1990)
- 30) J.M. Friedman: Biological Applications of Raman Spectroscopy, T.G. Spiro *Ed.*, p.133~p.216, John Wiley & Sons, N.Y. (1988)
- 31) T.G. Spiro *et al.*: *Biochem.*, **29**, 4497~4508 (1990)
- 32) J. Kraut *et al.*: *Biochem.*, **29**, 1777~1791 (1990)
- 33) S.W. Englander *et al.*: *Biochem.*, **29**, 3494~3504 (1990)
- 34) 大内宗城, 他: 有機合成化学協会誌, **48**, 577~586 (1990)
- 35) K. Wüthrich: 文献 (26), p.69~p.78
- 36) J.J. Villafrance: Current Research in Protein Chemistry, Academic Press, Inc., San Diego (1990)

カット写真 = *Biochemistry*, **28** [17] 1989 6853 Catalytic Activities of P-450_a Mutants より (M. Hatano 他)