

博士論文

様々な配位構造を持つ銅タンパク質の新規設計

2013年

志賀 大悟

目次

序論 (2-5 p)

第 1 章 アミノ酸立体障害を利用した活性サイト歪みの制御 (6-13 p)

第 2 章 ブルー銅タンパク質の設計 (14-24 p)

第 3 章 軸配位子によるブルー銅構造制御 (25-32 p)

第 4 章 パープル銅タンパク質の設計 (33-42 p)

総括 (43-44 p)

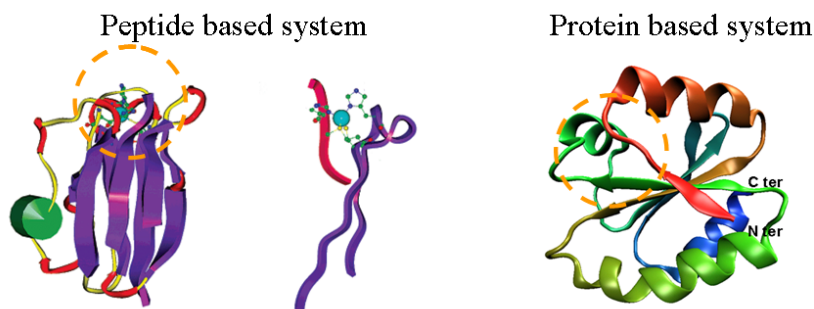
実験項 (45-54 p)

謝辞 (55 p)

序論

天然タンパク質の約 40%は金属タンパク質であるといわれており、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特異的かつ高活性な触媒能、迅速な電子伝達などの人工的な系では実現不可能なまでの高機能性を持つ。そのすべての機能は金属配位構造及び金属イオンを取り巻く環境に依存していると考えられている。一般に、溶媒中に存在するフリーな金属イオンに特筆すべき機能はないが、各官能基が配位することで特徴的な構造を持ち、それぞれの機能が発現される。さらに、その活性中心がタンパク質マトリックスに保持される事で、中心金属の持つ特異な構造形成を助長ないし高機能化（高活性・高選択性）が図られる。このことは、無機合成錯体系と金属タンパク質の持つ機能と比較すると明らかである。この高機能性に焦点をあて、医薬中間体合成・工業製品バイオプロセスの実用化、バイオデバイス・診断薬等への応用が期待されている。代表的な成功例としてはニトリルヒドラーゼを利用したアクリルアミドのバイオプロセスが挙げられる。この他にも非常に有用な機能を持ち、且つ実用化が期待されているものは数多く存在しているが、様々な障害（温度・衝撃に対するタンパク質の弱さ、溶解度が低い、固定化による失活など）があり、実用化されていないものが非常に多いのが実情である。

一方で、これら機能を持つ中心金属構造を新たなタンパク質土台（天然タンパク質、de novo 設計タンパク質）へ再現する試みが数多くなされている。このような試みは『意図した機能を持つタンパク質を自在に創り出す』というタンパク質工学研究領域の究極目標へ到達するための通過地点であり、将来的には実用的（機能、取り扱い etc）な設計タンパク質が創生される可能性を秘めている魅力的な学問領域の1つである。選定した任意の scaffold タンパク質に意図した機能を組み込む事が可能になると、上記実用化の弊害となる問題を解消する事も可能になると考えられる。加えて、生物無機化学分野において未だほとんど解明されていないタンパク質構造-機能の相関を検証する重要なツールとなりうる。しかしながら、機能中心の設計はもちろんの事、土台となるタンパク質構造ですら自在に予測設計することができないのが実情である。そこで、機能中心の設計には、ペプチド鎖を利用する場合と既存タンパク質へ機能中心再現が手法として利用されている[1,2]。



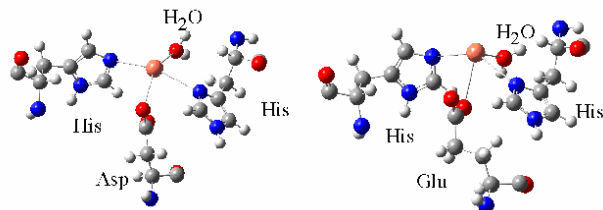
前者のペプチドベース系は、名前の通りにペプチドを基盤とした活性中心の構築（数残基～数十残基）である。この手法は天然金属タンパク質の金属結合配列を切り出したペプチドを利用する系であるが、殆どの取り組みが失敗に終わっている。通常、金属タンパク質の機能中心はタンパク質骨格により固定されているが故に、機能中心の構造を強制されていると考えられるが、ペプチドはランダム構造のため、中心金属に対して構造の強制力がないと思われる。したがって、金属イオンが好む構造をとり易く、特異な構造を形成する事ができていないと推定する。後者のタンパク質ベース系は天然タンパク質ないし新規設計タンパク質を scaffold(土台)として、機能中心を組み込む手法である。具体的な取り組みとしては、既存の天然金属タンパク質の金属結合ループを別の天然タンパク質へ挿入する手法や天然金属タンパク質既存金属結合サイトの再設計が挙げられる。これら取り組みにより、機能中心の構造を劇的に変えた事例等が数多く報告されている。一方で、金属結合サイトを持たないタンパク質を土台とした金属配位サイト導入による機能中心再現例は数少ない。

金属タンパク質の設計は scaffold となる全体構造の設計及び活性サイトの設計の 2 つの段階に分割する事が出来る。全体構造の新規設計は、特に α -ヘリカルバンドル、 α -ヘリカルコイルドコイル構造においてその設計手法が確立されつつある[3-15]。また、これらの構造を scaffold とした金属タンパク質設計例は数多く報告されている。加えて、天然の金属タンパク質の金属結合場は α -ヘリックスに囲まれた環境が多く、特に 4 ヘリカルドメインを基調とした二核金属タンパク質は数多く存在している。しかしながら、未だに完全に天然に見られる活性サイト構造を再現したものは少なく、天然と同等の機能を発揮した報告例はない。一方で、その他タンパク質構造についてほとんど設計手法が確立されていないのが実情である。このことはタンパク質構造の予測設計が非常に困難な事に起因する。したがって、本論文での設計事例には全て 4 本鎖コイルドコイルタンパク質を利用した。その理由は、1) タンパク質構造の予測設計が容易、2) 大きな変異に耐えうる高い熱安定性、3) 機能中心に加えて、基質結合サイトの設計も可能な点が挙げられる。

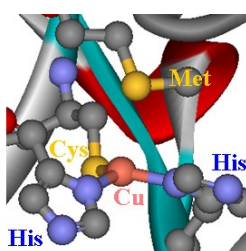
天然金属タンパク質の活性サイトは、その機能によって個々に特殊な構造を持つものが数多く存在する。中でも銅タンパク質活性中心は多様な構造・分光学的性質及び機能（電子伝達・酸化酵素・酸素添加酵素・還元酵素・物質輸送など）を持ち、これら相関に興味を持たれている。この特異な構造を持つ金属タンパク質の新規設計は、タンパク質設計手法の改良に繋がるに留まらず、生物無機化学分野における機能解明ツールとしての展開が期待される。また、銅タンパク質の中でも酸素の四電子還元サイトを持つマルチ銅オキシダーゼ、シトクロム c オキシダーゼは、バイオ燃料電池のカソード電極材料としても注目されている。そこで、本研究ではこれら金属酵素の活性サイトに存在するような以下に示した、銅タンパク質の持つ特異な構造を *de novo scaffold* に再現する事で機能解明ツールおよび新規設計材料の提供に試みた。最終的には得られた構造を

組み合わせることで、酸素添加バイオ触媒、バイオ燃料電池のカソード電極材料への展開が可能と考えられる。

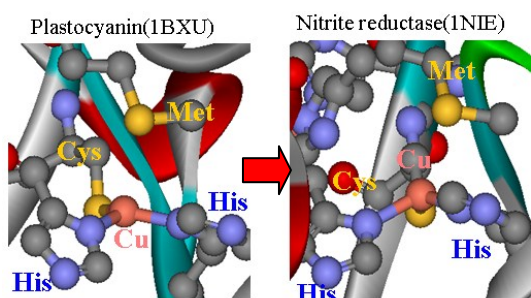
1) 歪んだ Type2 銅結合サイトの設計



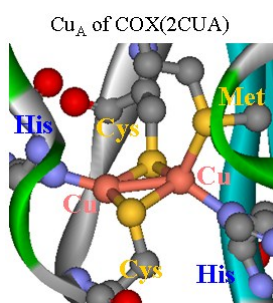
2) ブルー銅タンパク質の設計



3) ブルー銅タンパク質軸配位子による構造制御

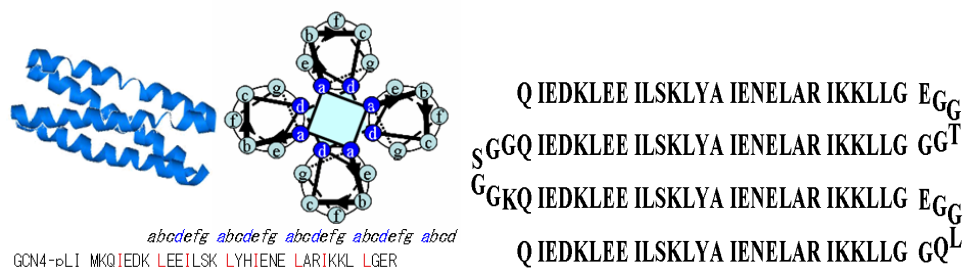


4) Cys 架橋を持つ二核パープル銅タンパク質の設計



土台とした 4 本鎖コイルドコイルタンパク質について以下で説明する。その設計土台として GCN4-pLI ペプチドを使用し、各 α -ヘリックス鎖を柔軟なリンカーにて繋いだ単量体とした[15]。4 本鎖コイルドコイルは下図に示したように a, b, c, d, e, f, g の 7 つの位置からなる α -ヘリックスが 4 つ束なった超螺旋構造を持つ。この会合状態は a, d 位置の疎水残基、e, g 位置の親水残基による塩橋にて制御されている。今回の設

計では a,d 位置のアミノ酸を変異することで、金属配位サイトの導入をおこなった。



■参考文献

- [1] Lu Y.; Yeung N.; Sieracki N.; Marshall N. M. *Nature* **2009**, 460, 855-862.
- [2] Lu, Y.; Berry S. M.; Pfister, T. D. *Chem Rev* 101, **2001**, 3047-3080.
- [3] Lau, S. Y. M.; Taneja, A. K.; Hodges, R. S. *J Biol Chem* **1984**,259, 13253–13261.
- [4] Hodges, R. S. *Biochem Cell Biol* **1996**, 74, 133–154.
- [5] O’neil, K. T.; Degrado, W. F. *Science* **1990**, 250, 646–651.
- [6] Betz, S.; Degrado, W. F. *Biochemistry* **1996**, 35, 6955–6962.
- [7] Harbury, P. B.; Zhang, T.; Kim, P. S.; Alber, T. *Science* **1993**, 262,1401–1407.
- [8] Suzuki, K.; Hiroaki, H.; Kohda, D.; Tanaka, T. *Protein Eng* **1998**,11, 1051–1055.
- [9] Suzuki, K.; Yamada, T.; Tanaka., T. *Biochemistry* **1999**, 38,1751–1756.
- [10] Kashiwada, A.; Hiroaki, H.; Kohda, D.; Nango, M.; Tanaka, T. *J Am Chem Soc* **2000**, 122, 212–215.
- [11] Liu, J.; Zheng, Q.; Deng, Y.; Cheng, C.-S.; Kallenbach, N. R.; Lu,M. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, 103, 15457–15462.
- [12] Liu, J.; Deng, Y.; Zheng, Q.; Cheng, C.-S.; Kallenbach, N. R.; Lu,M. *Biochemistry* **2006**, 46, 15224–15231.
- [13] Nautiyal, S.; Woolfson, D. N.; King, D. S.; Alber, T. *Biochemistry* **1995**, 34, 11645–11651.
- [14] Campbell, K. M.; Lumb, K. J. *Biochemistry* **2002**, 41, 7169–7175.
- [15] Harbury, P.; Kim, P. S.; Alber, T. *Nature* **1994**, 371, 80–83.

第1章 アミノ酸立体障害を利用した活性サイト歪みの制御

■ 諸言

金属イオンは生体内で触媒活性、電子伝達、タンパク質構造形成に利用されており、これら機能の人工的な発現を目的とした土台タンパク質への金属イオン導入例は多い[1-3]。特にコイルドコイルタンパク質を利用した例が多く、 Cu^+ 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 等の多くの遷移金属イオン導入例がある[4-14]。これら取り組みは金属イオン結合による構造誘起や天然タンパク質にみられる中心金属構造の模擬、単に金属イオンが結合したというものも含まれる。触媒活性や電子伝達機能を持つ天然金属タンパク質の中には、中心金属が好む配位構造から大きくかけ離れた構造（以後歪んだ構造）を持つものが多い。このように歪んだ構造は”entatic state”と呼ばれており、金属イオンの酸化・還元に伴う活性化エネルギー最小化を促し、その高機能化に重要であると考えられている[15]。しかしながら、これまでの金属タンパク質設計ではこの歪みに焦点をあてた設計例はない。

本章ではコイルドコイルタンパク質の疎水コアに Cu^{2+} 結合サイトを導入し、この構造の歪み度合を制御した例について述べる。

■ 実験結果および考察

・ 金属結合サイトの設計

天然の金属タンパク質には二価遷移金属イオンを結合するものが多く、その配位子として His, Asp, Glu, Tyr, Cys, Met が利用されている。本設計においては Carboxypeptidase A および naphthalene-2,3-dioxygenase の中心金属構造を見本とした。前者のタンパク質はペプチド結合を C 末端から分解する酵素であり、 Zn^{2+} が2つの His と1つの Glu に配位した正四面体構造を持つ。一方で後者のタンパク質はナフタレン酸化酵素であり、 Cu^{2+} が2つの His と1つの Asp に配位した構造を持つ。そこで2つの His 及び1つの酸性アミノ酸を持つ配位構造の設計を考えた。導入する酸性アミノ酸である Asp, Glu には側鎖の長さに違いがあるため、このことが中心金属配位構造の歪み度合に反映されることを期待した。

土台タンパク質には四量体コイルドコイル構造を形成する GCN4-pLI ペプチドを基盤とした設計タンパク質を採用した[16]。その配列を Figure1 に示す。

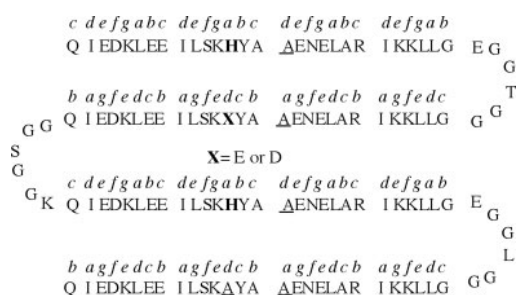


Figure 1. Amino acid sequences of AM2D and AM2E. Aminoacids in the metal binding sites are indicated by bold letters. Ala residues in the hydrophobic core are underlined.

各ペプチド鎖を 6 つのアミノ酸からなる柔軟なリンカーで結合することで単量体とした。また、元の GCN4-pLI はタンパク質外部に接する c 位置に His を有するが、金属イオンとの相互作用排除のため Ala へと変異した。金属結合サイト配置のため、疎水コアを形成する a,d 位置の Leu, Ile 計 8 つの内 2 つを His、1 つを Asp/Glu、残り 5 つは金属が配位するスペース確保のため Ala へと変異した。配位子として Asp を持つ変異体を AM2D、Glu を持つ変異体を AM2E とした。

• タンパク質構造評価

AM2D および AM2E のタンパク質二次構造を円偏光二色性 (CD) スペクトルにて評価した。Figure2 に AM2D の CD スペクトルを示す。タンパク質は 222nm 及び 208nm に極小値を持つ特徴的なスペクトルを呈した。一般的なコイルドコイル構造では、 $\theta_{222}/\theta_{208} > 1$ となり、 α ヘリカルバンドル構造では $\theta_{222}/\theta_{208} < 1$ となる。AM2D, AM2E では $\theta_{222}/\theta_{208} < 1$ であるが、全アミノ酸配列の約 18% がランダムコイル構造となる N,C 末端のアミノ酸配列や 3 つのリンカーにて構成されていることを考慮すると、コイルドコイル構造を持つと予想される[17]。また、 Cu^{2+} や Zn^{2+} イオンをタンパク質溶液に添加した状態にて CD スペクトルの測定を行ったが、顕著なスペクトル変化は確認されなかった。

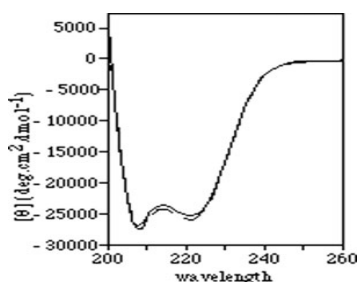


Figure 2. Circular dichroism spectra of AM2D (solid line) and AM2D in the presence of Cu^{2+} (dashed line). AM2E showed the spectra as same as AM2D.

タンパク質の会合状態を確認するため、超遠心分析を実施した。速度法及び平衡法での測定結果を Figure3 に示す。速度法から得られた沈降係数分布より、タンパク質は単量体で存在しており、沈降係数 $S=1.5$ であり、得られた分子量 15,600 Da は、アミノ酸配列より算出した理論値 15,057 Da に一致するものであった。加えて、

GCN4-pLI 結晶構造を基に算出した沈降係数 $S=1.62$ によく一致するものであった。しかしながら、タンパク質濃度を $150 \mu\text{M}$ にて同様の測定を行うと、約 30%の二量体を含んでいることが示された。沈降平衡法にて濃度依存的な会合状況を確認したところ、解離定数 $K_d=150 \mu\text{M}$ であった。以上より、低濃度においては単量体として存在しているが、高濃度領域ではタンパク質分子間の相互作用により二量体を形成しているものと推定される。

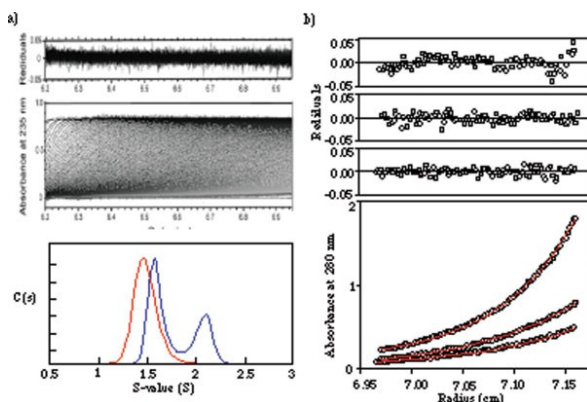


Figure 3. Analytical ultracentrifugation of AM2E. (a) Sedimentation velocity (SV) experiments. (Top and middle panels) SV run of $50 \mu\text{M}$ solution at 60,000 rpm, result of $c(s)$ distribution analysis, and the residual of the fit are shown. (Bottom) Sedimentation coefficient distribution of AM2E that were obtained from the analysis of SV experiments. Red line indicates distribution pattern of AM2E at $50 \mu\text{M}$ and blue line indicates distribution pattern of AM2E at $150 \mu\text{M}$. (b) Sedimentation equilibrium (SE) experiments. Equilibrium concentration gradient for AM2E (50 , 100 , and $150 \mu\text{M}$) in were indicated. Best fit curves of nonlinear fitting employing single species model and the residuals of the fit are shown. AM2D showed the spectra as same as AM2E.

・金属結合能評価

金属イオン添加により CD スペクトルに顕著な変化は確認されなかった事より、金属イオンが結合しているかどうか不明瞭であった。そこで、昇温測定によるタンパク質熱変性温度測定により金属イオン結合能を評価した。AM2D 及び AM2E は、金属イオン添加前に熱変性温度 $T_m=66^\circ\text{C}$ (AM2D)、 75°C (AM2E) を示した (Figure4)。各タンパク質はその疎水コアを大きく改変しているにも関わらず、高い安定性を保持していることが示された。疎水コアの大きな改変はタンパク質の構造安定性に致命的な影響を与えるが、今回の土台タンパク質はリンカーにて各 α ヘリックス鎖を結合しているために、大きな構造安定性を得ているものと考えられる。また、 Cu^{2+} 及び Zn^{2+} 存在下で、タンパク質の熱安定性は顕著に上昇し、 95°C においても変性が飽和する段階には至っていない。この顕著な構造安定性の向上は、 α ヘリックス鎖に導入した配位子が中心金属に結合することで α ヘリックス鎖が架橋補強された事によると考えられる。また、興

味深い事に AM2D と AM2E で各金属イオンに対する構造安定化の序列が異なっており、金属イオン親和性の差を反映しているものと推定される。

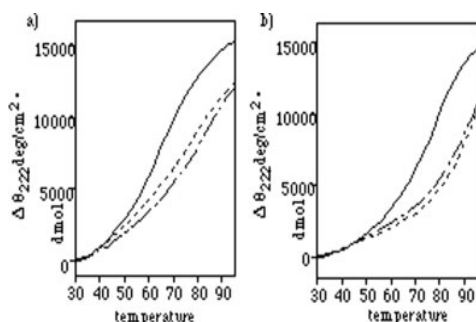


Figure 4. a) Thermal melting curves of AM2D (solid line) and AM2D in the presence of Zn^{2+} (dash-dotted line) or Cu^{2+} (broken line). (b) Thermal melting curves of AM2E (solid line) and AM2E in the presence of Zn^{2+} (dash-dotted line) or Cu^{2+} (broken line). Mean residue ellipticities at 222 nm are plotted as a function of temperature. The measurements were performed in 5 mM Tris-HCl containing 0.1 M NaCl (pH 7.5) at 298 °C. The total protein concentrations were 10 μ M.

以上より、設計した金属配位場 HHX(X=D or E)へ金属イオンが配位している事が示唆された。そこで、さらに等温滴定カロリーメトリー (ITC) により各金属イオンの結合能を評価した (Figure5)。いずれのタンパク質においても、 Zn^{2+} の結合によると思われる吸熱過程、 Cu^{2+} 結合によると思われる発熱過程が確認された。得られた解析結果より、タンパク質と各金属イオンは 1:1 で結合を確認できた。 Zn^{2+} について各タンパク質で親和性に顕著な差はないが、 Cu^{2+} のタンパク質に対する親和性は AM2E のほうが約 10 倍高く、配位構造に差が出ていることを予期させる結果であった。また、得られた解離定数の序列は前述昇温 CD スペクトルの結果と一致するものであった。

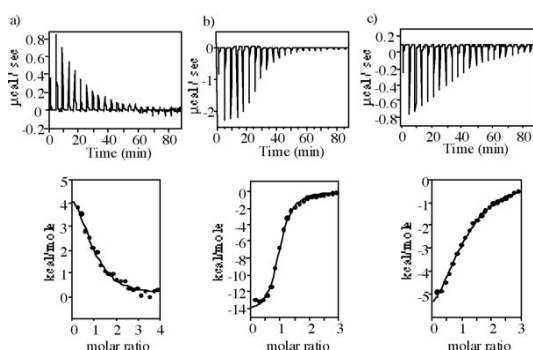


Figure 5. ITC analyzes of the binding of (a) Zn^{2+} to AM2D, (b) Cu^{2+} to AM2E, and (c) Cu^{2+} to AM2D. The raw data are shown in the upper panels, and the integrated area of each peak and the nonlinear, least-squares fit curve representing the heat released is shown in the lower panels. Each experiment was conducted with 1 mM metal injected into 28 μ M protein. The DH and the DS values were 5,650 cal mol⁻¹ and 42.4 cal mol⁻¹K⁻¹, for Zn^{2+} -AM2D. The values were -14,700 cal mol⁻¹ and -23.3 cal mol⁻¹K⁻¹ for Cu^{2+} -AM2E, and -7,690 cal mol⁻¹ and -3.76 cal mol⁻¹K⁻¹ for Cu^{2+} -AM2D, respectively.

- ESRによる金属イオン配位構造評価

AM2D および AM2E の配位原子は NNO と同様であるが、O 配位子の側鎖はメチレン鎖分の長さ差があり、AM2E の方がより長い側鎖を持つ。我々はこの側鎖のサイズ差が配位構造差に反映されることを期待した。そこで、AM2D-Cu²⁺複合体及び AM2E-Cu²⁺の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定した。(Figure6) AM2D-Cu²⁺ は g_{\perp} 領域に 5 つの hyperfine splitting が確認された事より、2 つの His 由来と思われる N 原子の配位を確認した。一方で、AM2E-Cu²⁺については g_{\perp} 領域における明確な hyperfine splitting は確認されなかった。各スペクトルから得られたパラメーターは次の通りであった。

AM2D-Cu²⁺ $A_{//} = 17.5 \text{ mT}$, $g_{//} = 2.25$, $g_{\perp} = 2.06$

AM2E-Cu²⁺ $A_{//} = 15.5 \text{ mT}$, $g_x = 2.07$, $g_y = 2.03$, $g_z = 2.30$

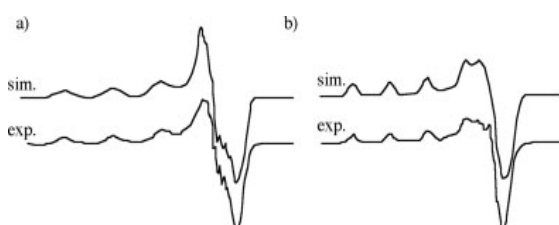


Figure 6. ESR spectra of (a) the AM2D-Cu²⁺ complex and (b) the AM2E-Cu²⁺ complex in 30 mM phosphate buffer containing 300 mM NaCl (pH 7.5). The upper lines represent the simulated spectra.

通常、Cu²⁺の平面四配位構造では $A_{//} = \sim 18 \text{ mT}$ 程度であり、ESR よりえられたパラメーターは構造を表す指標となる。 $A_{//}$ 値を比較すると、AM2D は概ね通常の平面四配位構造を持つと考えられる。一方で、AM2E-Cu²⁺は AM2D-Cu²⁺よりも小さな値を示しており、AM2E-Cu²⁺は Cu²⁺が好む平面から、四面体型に向かって歪んだ構造を持つと考えられる。

- 紫外-可視 (UV-vis) スペクトルによる金属イオン配位構造評価

AM2D-Cu²⁺ および AM2E-Cu²⁺ の UV-vis スペクトルを Figure7 に示した。AM2D-Cu²⁺ のスペクトルは 625 nm に小さな吸収帯 ($\epsilon = 80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を呈したのに対して、AM2E-Cu²⁺ のスペクトルはより長波長側の 674 nm により大きな吸収帯 ($\epsilon = 130 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を呈した。この AM2E-Cu²⁺ の吸収帯レッドシフトは、EPR スペクトルにて示した AM2E-Cu²⁺ の方がより歪んだ構造を持つという結果と一致するものであった。

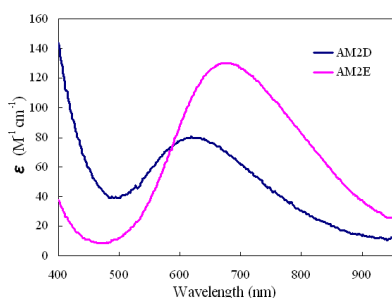


Figure 7. UV-vis spectra of AM2D-Cu²⁺ (blue) and AM2E-Cu²⁺ (pink). Each complex showed a band at 613 nm and 674 nm, respectively. The extinction coefficient were estimated to be, 80 M⁻¹ cm⁻¹ for AM2D-Cu²⁺, 130 M⁻¹ cm⁻¹ for AM2E-Cu²⁺, respectively. Experimental conditions; 30 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 500 mM NaCl, 298 K, [protein-metal complex] = 200 μM

• DFT 計算による金属配位構造の評価

各タンパク質の結晶が得られていないので、詳細な金属配位構造は不明確である。そこで、ロイシンジッパー結晶構造を基に、今回設計した 4 本鎖コイルドコイル構造を共役勾配法によるエネルギー最小化により得た (Figure 8) [18]。AM2D の金属配位場は 2 つの His、1 つの Asp、1 つの水分子が平面 4 配位構造を持つとした。AM2D のエネルギー最小化した構造は平面四配位構造からわずかに歪んだ構造を持ち、二面角は 8.2° であった。一方で、AM2E の配位構造は Asp を Glu へ置換したものであり、エネルギー最小化した構造は平面四配位から大きく歪み、二面角は 38.1° であった。この歪みは Glu 側鎖の立体障害によるものであった。各 αヘリックス鎖はタンパク質骨格にて固定されており、メチレン鎖の分だけ中心金属構造に反映されたものと考えられる。

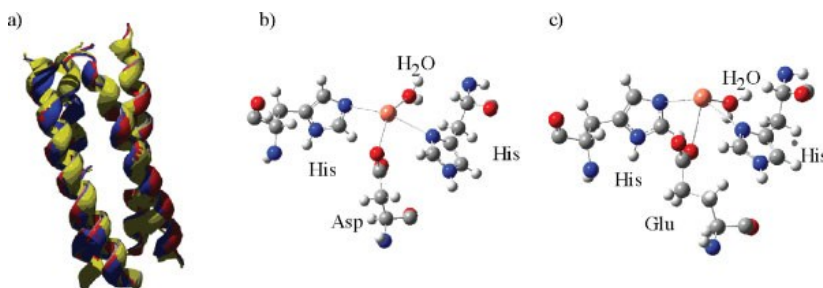


Figure 8. (a) Superposition of the minimized structures of the models of AM2D (Red) and AM2E (Blue) on the starting structure (Yellow). Active sites of the minimized structure of models of (b) AM2D and (c) AM2E. Bonds were formed between Cu²⁺ and the closest atoms of each residue.

■まとめ

新規設計によりタンパク質を作る事は、構造-機能相関の検討のみならず新たな構造及び機能設計に関する知見改良のため重要である。天然の酵素タンパク質は活性サイトに加えて基質結合サイトを合わせ持つが、コイルドコイル構造の疎水コアは両者を合わせ持つことに適した構造のため、人工酵素設計に最適と考える。基質結合サイトとして利用可能な疎水コアのサイズはコイルドコイル構造の会合状態にて制御可能である

[19]。例えば、三本鎖コイルドコイルではベンゼン、四本鎖コイルドコイルではより大きなエステル化合物やアダマンタン、6本鎖コイルドコイルとして知られる COMP はビタミン D₃ やレチナールのような大きな分子の結合も可能である[20-23]。

天然には大きく歪んだ構造を持つ金属タンパク質が数多く存在する。我々は配位子アミノ酸の側鎖立体障害を利用した構造歪度合の制御例について検討したが、その歪み度合はまだ小さいものであった。さらに歪んだ構造設計には、天然ブルー銅タンパク質のように、軸配位設計や配位子の種類についても検討が必要と考える。

■参考文献

- [1] Merkle, D. L.; Schmidt, M. H.; Berg, J. M. *J Am Chem Soc* **1991**, 113, 5450–5451.
- [2] Pessi, A.; Bianchi, E.; Cramer, A.; Venturini, S.; Tramontano, A.; Sollazzo, M. *Nature* **1993**, 367–369.
- [3] Klemba, M.; Gardner, K. H.; Marino, S.; Clarke, N. D.; Regan, L. *Nat Struct Biol* **1995**, 2, 368–373.
- [4] Schnepf, R.; Haehnel, W.; Wieghardt, K.; Hildebrandt, P. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 14389–14399.
- [5] Kharenko, O. A.; Kennedy, D. C.; Demeler, B.; Maroney, M.; Ogawa, M. Y. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 7678–7679.
- [6] Regan, L.; Clarke, N. D. *Biochemistry* **1990**, 29, 10878–10883.
- [7] Matzapetakis, V. L. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 18229–18233.
- [8] Lee, K.-H.; Matzapetakis, M.; Mitra, S.; Marsh, E. N. G.; Pecoraro, V. L. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 9178–9179.
- [9] Dieckmann, G. R.; McRorie, D.; Lear, J.; Sharp, K. A.; Degrado, W. F.; Pecoraro, V. L. *J Mol Biol* **1998**, 280, 897–912.
- [10] Geremia, S.; Costanzo, L. D.; Randaccio, L.; Engel, D. E.; Lombardi, A.; Natri, F.; Degrado, W. F. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 17226–17276.
- [11] Suzuki, K.; Hiroaki, H.; Kohda, D.; Nakamura, H.; Tanaka, T. *J Am Chem Soc* **1998**, 120, 13008–13015.
- [12] Kiyokawa, T.; Kanaori, K.; Tajima, K.; Koike, M.; Mizuno, T.; Oku, J.; Tanaka, T. *J Pept Res* **2004**, 63, 347–353.
- [13] Li, X.; Suzuki, K.; Kanaori, K.; Tajima, K.; Kashiwada, A.; Hiroaki, H.; Kohda, D.; Tanaka, T. *Protein Sci* **2000**, 9, 1327–1333.
- [14] Tanaka, T.; Mizuno, T.; Fukui, S.; Hiroaki, H.; Oku, J.; Kanaori, K.; Tajima, K.; Shirakawa, M. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 14023–14028.
- [15] B. L. Vallee, R. J. P. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1968**, 59, 498–505.
- [16] Harbury, P.; Kim, P. S.; Alber, T. *Nature* **1994**, 371, 80–83.

- [17] Sakurai, Y.; Mizuno, T.; Hiroaki, H.; Oku, J.; Tanaka, T. *J Pept Res* **2005**, 66, 387–394.
- [18] Mittl, P. R. E.; Deillon, C.; Sargent, D.; Liu, N.; Klauser, S.; Thomas, R. M.; Gutte, B.; Gru'tter, M. G. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**, 97, 2562–2566l.
- [19] Boice, J. A.; Dieckmann, G. R.; Degrado, W. F.; Fairman, R. *Biochemistry* **1996**, 35, 14480–14485.
- [20] Gonzalez, L. Jr.; Plecs, J. J.; Alber, T. *Nat Struct Biol* **1996**, 3, 510–514.
- [21] Johansson, J. S.; Gibney, B. R.; Rabanal, F.; Reddy, K. S.; Dutton, P. L. *Biochemistry* **1998**, 37, 1421–1429.
- [22] Pidikiti, R.; Zhang, T.; Mallela, K. M. G.; Shamin, M.; Reddy, K. S.; Johansson, J. S. *Biochemistry* **2005**, 44, 12128–12135.
- [23] Guo, Y.; Bozic, D.; Malashkevich, V. N.; Kammerer, R. A.; Schulthess, T.; Engel, J. *EMBO J* **1998**, 17, 5265–5272.

第2章 ブルー銅タンパク質の設計

■ 諸言

銅タンパク質は最も研究された金属タンパク質の1つであり、電子伝達、酸化酵素、酸素添加酵素、還元酵素、酸素輸送といった様々な機能を有するが、これら機能の違いはすべて中心金属配位構造の違いによるものである[1-8]。銅タンパク質の配位構造は type1 から type3 に大別され、特に特徴的なものが type1 サイトである[9,10]。Type1 サイトは一章にてふれた entatic state が顕著な例であり、電子伝達タンパク質やマルチ銅酵素に含まれている。Cu²⁺は His, His, Cys の3つの配位子からなる平面三配位構造に、1つの軸位相互作用を持つ trigonal pyramidal または、2つの軸位相互作用を持つ trigonal bipyramidal 構造を有する。Type1 銅サイトを持つタンパク質はその特徴的な構造に由来する濃い青色を呈することから、ブルー銅タンパク質と呼ばれている。この分光学的性質はチオレート-Cu²⁺間の LMCT に由来する 600nm 付近に存在する非常に大きな吸収帯 ($\epsilon = 2000\sim 8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) と 450nm 付近の小さな吸収帯によるものである[11]。これら吸収帯の比率 A_{450}/A_{600} には多様性があり、その構造を反映している。*Pseudomonas aeruginosa* azurin は 628 nm に $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の吸収帯と 450nm 付近に小さな吸収帯を持つスペクトルを示し、濃い青色を呈する[12]。また、*Alcaligenes xylosoxidans* 由来の nitrite reductase についても同様に青色であるが、*Achromobacter cycloclaster* 及び *Alcaligenes faecalis* 由来の nitrite reductase は 600nm 付近の吸収帯と 450nm 付近の吸収帯強度が同程度であり、濃い緑色を呈する事よりグリーン銅タンパク質とも呼ばれている[13]。このスペクトル差は軸位相互作用の強さの違いを表している。Figure1 に示したようにブルー銅サイトでは Cu²⁺が His, His, Cys の平面三配位と同一平面上に存在しており、軸位相互作用は非常に弱いという特徴がある。一方で、グリーン銅サイトでは軸位相互作用が強くなり、Cu²⁺が His, His, Cys の平面三配位から浮き上がった tetrahedral 様の構造を持つ事が特徴である。特に人工タンパク質においてグリーン銅サイトを持つ場合、Type1 と区別して Type1.5 と呼ばれることがある[14]。また、type2 である平面四配位構造においては濃い黄色を呈する。このように Cu²⁺-Cys 結合はその構造により特徴的な挙動を示すが、その内容を Figure1 にまとめた。

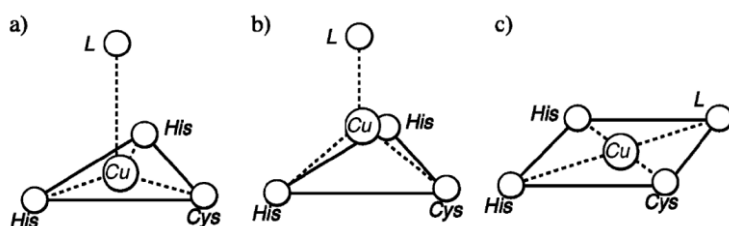


Figure 1. Structures of Cu^{2+} coordinated to His, His, Cys, and L (arbitrary). (a) Type 1: Cu^{2+} has a trigonal planar geometry and exhibits the blue color. (b) Type 1.5: Cu^{2+} has a somewhat tetrahedral geometry due to stronger axial bonding and exhibits a green color. (c) Type 2: Cu^{2+} has a square planar geometry. Type 3 consists of two copper ions linked by two oxygens and is therefore omitted in the figure. In the type 1 coordination, the Cu-S distance is short (about 2.1-2.3 Å), while the distance in type 2 is normal (2.3-2.5 Å). The Cu-N distances are normal (1.9-2.2 Å) for the both type 1 and type 2. The Cu^{2+} exists on the plane created from the His, His, Cys ligands in type 1. In type 1.5, the Cu^{2+} moves out of the plane.

このように特徴的な分光学的挙動及び構造を持つことから、type1 銅サイトは de novo 設計の魅力的な標的である。過去に実施されたモデル作成例として、アルコール加水分解酵素活性サイトの金属置換、チオレドキシシンへ、銅-亜鉛 SOD を利用した金属配位サイトの再設計例が挙げられる[14-17]。インシュリン六量体へ3つのHisを導入した例では、チオレート化合物の種類によって、ブルー銅・グリーン銅の両者を再現している[18]。このように多くの事例があるが、そのほとんどは type1.5 の挙動を示しており、完全に type1 型の再現をした例は非常に少なく、新規設計により再現した例はない。そこで、2章ではブルー銅サイトの設計結果について述べる。

■実験結果および考察

・金属結合サイトの設計

ブルー銅タンパク質は共通して His, His, Cys からなる平面三配位構造が保存されているが、残りの配位子の種類によって大きく構造が変わることが知られている。例えば、水分子が銅イオンに配位した場合、過去の設計例では例外なく type2 型の構造となっている[11,14]。水分子の結合は type2 型を安定化するといわれており、type1 型のブルー銅タンパク質設計で最も懸念すべき点である。したがって、中心金属を取り巻く環境からいかに溶媒を排除するかが重要である[19]。また、 Cu^{2+} のような酸化剤として機能する金属イオンを使用する場合、チオレートの酸化によるジスルフィド結合形成も問題となる。これら、溶媒排除及びジスルフィド結合阻止には、金属結合サイトの導入をタンパク質疎水コア内へ行う事が最も理にかなった手法であると考えられる。

一方で、我々は4本鎖コイルドコイルタンパク質の疎水コア内へ His, His, Asp/Glu 配位を持つ銅タンパク質の設計を行った[20]。大きな疎水コアの改変にも関わらず、土台タンパク質は安定に構造を保持していたことより、中心金属の環境は、タンパク質表面と比較して疎水的な環境、すなわち溶媒分子を排除した環境を持つと予想される。また、疎水コア内に導入した Cys 残基はタンパク質外表面とは遮断されるため、 Cu^{2+} 添加によるジスルフィド結合形成の懸念もないと考えた。Figure2 にブルー銅タンパク質を指向し、Cys を導入した AM2C の配列を Figure2 に示す。

N-term. Q IEDKLEE ILSKHYA AENELAR IKKLLG EG_G^T
 S_{GG} Q IEDKLEE ILSKCYA AENELAR IKKLLG GG^T
 G_{GK} Q IEDKLEE ILSKHYA AENELAR IKKLLG EG_G^L
 C-term. Q IEDKLEE ILSKAYA AENELAR IKKLLG GG_L^L

Figure 2. Amino acid sequence of AM2C. Amino acid residues in the metal binding site are indicated by underlined bold letters. Ala residues in the hydrophobic core are underlined.

• タンパク質構造評価

AM2C の CD スペクトル (Figure3) は 208nm 及び 222nm に同程度の強度で極小値を示した。典型的なコイルドコイル構造は $\theta_{222}/\theta_{208} > 1$ となるが、AM2C の場合も第 1 章と同様にコイルドコイル構造を保持しているものと考えられる[21]。Cu²⁺を添加してもスペクトルに顕著な変化はなく、Cu²⁺添加による構造変化は無視できる程度と考えられる。非還元 SDS-PAGE 測定の結果、単量体バンドのみが確認された事より、Cu²⁺添加によるジスルフィド結合は無視できるレベルと結論づけた。

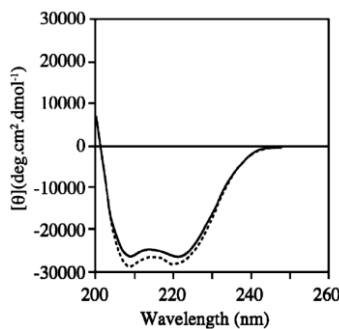


Figure 3. CD spectra of AM2C in the absence (solid line) and presence (dashed line) of Cu²⁺.

次に、会合状態を超遠心分析にて評価した(Figure4)。速度法により得られた沈降係数分布より、AM2C の沈降係数 S=1.70 であり、得られた分子量は 14,800Da は一次構造より算出した分子量 15,089Da と同程度であった。加えて、GCN4-pLI 結晶構造を基に算出した沈降係数 S=1.62 とよく一致するものであった[22]。しかしながら、少量ではあるが二量体の存在が確認された。測定を 10mM Tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride 存在下で行っても同様に二量体が確認されたが、非還元 SDS-PAGE にてダイマーが検出されていないことより、ジスルフィド結合ではなく分子間会合が生じていると予想される。

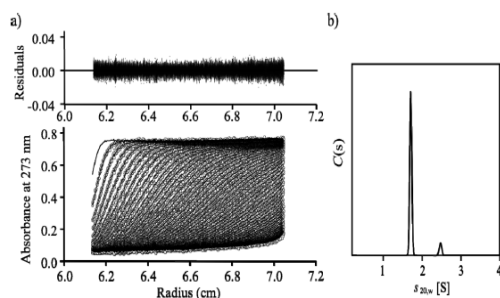


Figure 4. Analytical ultracentrifugation sedimentation data for AM-2C. (a) Sedimentation velocity (SV) experiments. The SV run of a 50 μM solution at 60 000 rpm, the results of the C(s) distribution analysis, and the residual of the fit are shown. (b) Sedimentation coefficient distribution of 100 μM AM2C from the analysis of the SV experiments.

• 吸収スペクトルによる構造評価

Cu^{2+} 添加により AM2C 水溶液は直ちに濃い青色を呈した事より、ブルー銅タンパク質に特徴的な構造を保持していることが予想された。PBS 中にて測定した結果を Figure5 に示す。AM2C- Cu^{2+} は $S(\pi)$ - Cu^{2+} 由来と思われる 616nm に大きな吸収帯と $S(\sigma)$ - Cu^{2+} 由来と思われる 474nm に小さな吸収帯 ($A_{474}/A_{616} = 0.30$) を呈した [23]。また d-d 遷移由来と思われる 969nm にさらに小さな吸収帯を確認した。

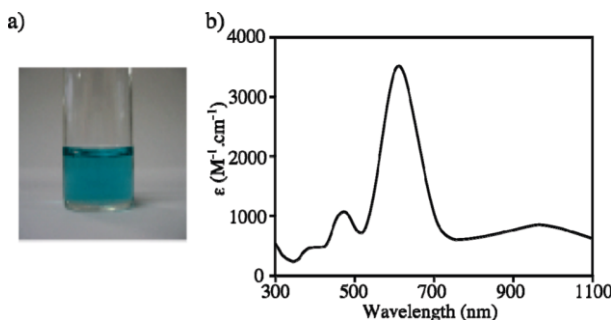


Figure 5. (a) Blue color of the solution of AM2C and Cu^{2+} in PBS. [AM2C]) 100 μM , [Cu^{2+}]) 100 μM . (b) UV-vis spectrum of AM2C- Cu^{2+} in PBS, pH 7.5. [AM2C] = 30 μM , [Cu^{2+}] = 25 μM .

金属イオン添加後のタンパク質水溶液は好気性条件下において徐々に退色がみられ、半減期は 1.2h 程度であった (Figure6)。一方で、嫌気性条件下において退色は見られなかった。この退色したタンパク質はエルマン試薬に反応しなかった事より、Cys 残基が酸化されていることが判明した。そこで、ESI-TOF-MS にてタンパク質分子量を測定することで酸化状態の確認を行った (Figure7)。 Cu^{2+} 添加前のタンパク質分子量は 15088.7Da であり、理論値 15089.29Da とよく一致するものであった。一方で、退色したサンプルの分子量は 15120.86Da であり、32 の分子量増加が確認された。したがって、退色の原因となった酸化はジスルフィド結合ではなく Cys の S 原子が SO_2 へ酸化されたことによると考える。

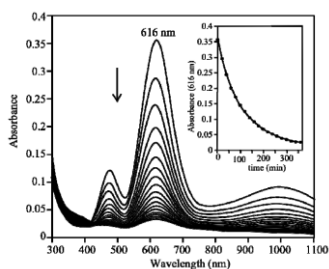


Figure 6. Time course of the UV-vis spectral change of the AM2C- Cu^{2+} complex. Initial concentrations of AM2C and Cu^{2+} were 100 μM in 50 mM PIPES-NaOH buffer at pH 7.5. Inset: Absorbance at 616 nm was plotted as a function of time.

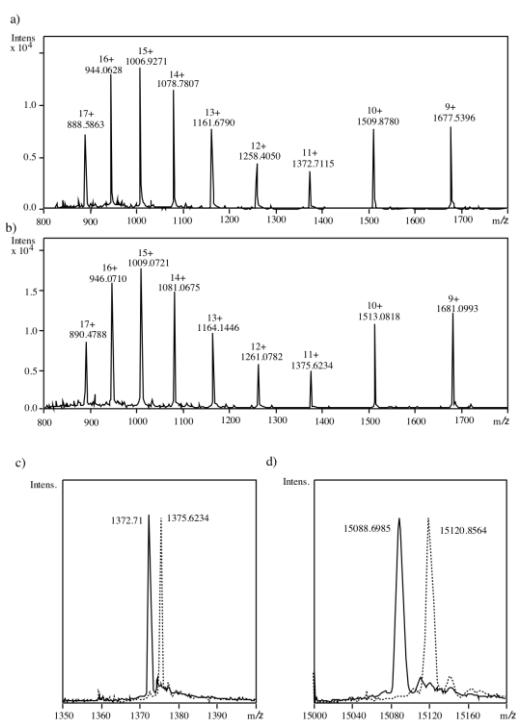


Figure 7. ESI-TOF MS spectra of colored (a) and color-faded AM2C (b). The assignment of series of charge states enabled the calculation of the masses. Each molecular mass corresponds to the value of highest peak with indicated ion charge state. (c) Enlarged signals of the 11+ charge state of colored (solid line) and color-faded (dotted line) AM2C. (d) Deconvoluted molecular masses for series of charge states for colored (15088.6985) (solid line) and color-faded AM2C (15120.8564) (dotted line).

• 外部配位子結合評価

今回の設計では、His, His, Cys の平面三配位構造のみを土台タンパク質疎水コアへ導入しており、残り 1 つの配位子が不明である。PEB 中には水分子、塩化物イオン、リン酸イオンが存在しており、これらが外部配位子として Cu^{2+} へ配位している可能性がある。そこで、塩化物イオン、リン酸イオンを排除した PIPES-NaOH 緩衝液中でスペクトル測定を行った (Figure 8)。

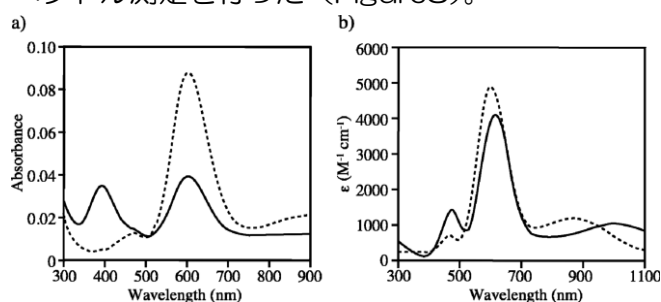


Figure 8. (a) UV-vis spectra of AM2C- Cu^{2+} in 50 mM PIPES-NaOH (solid line) and 500 mM PIPES-NaOH (dashed line). (b) UV-vis spectra of AM2C- Cu^{2+} in 20 mM PIPES-NaOH containing 500 mM NaCl (solid line) and in 500 mM KH_2PO_4 (dashed line), pH 7.5. [AM2C] = 150 μM , [Cu^{2+}] = 100 μM .

緩衝液中に塩がない状態ではタンパク質の溶解性が非常に低いためベースラインが上昇しているが、396nm 及び 602nm に特徴的な吸収帯が確認された。各々の吸収帯はそれぞれ type2 および type1 由来の吸収帯と考えられる。一方で、高濃度 PIPES

溶液中でスペクトルを測定すると、396nm 付近の吸収帯は消失し、602nm の吸収帯のみとなった。HHC サイトはしばしば水分子配位により type2 型に変わることが知られており、PIPES を高濃度とすることで水分子に代わって PIPES が配位したものと予想される[14]。

次に、低濃度 PIPES 溶液中に塩化物イオンやリン酸イオンを高濃度で存在させた状態にてスペクトル測定をおこなった。塩化物イオン存在下では 616nm に大きな吸収帯($\epsilon = 4100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)とともに 476nm に小さな吸収帯 ($A_{476}/A_{616} = 0.34$) を確認した。一方で、リン酸イオン存在下では 602nm に大きな吸収帯($\epsilon = 4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)とともに 468nm に小さな吸収帯($A_{468}/A_{602} = 0.14$)を確認した。いずれのケースにおいても、さらに小さな吸収帯がそれぞれ 992nm および 873nm に見られた。これらの結果は塩化物イオン及びリン酸イオンがブルー銅タンパク質の軸配位子として相互作用しており、かつ、その構造は軸配位の種類によって変わっていることを示している。また、PEB 中で測定したスペクトルは塩化物イオン結合体とよく似たものである事から、PBS 中では主に塩化物イオンが配位していることが予想される。このように、軸位からの塩化物イオンのようなアニオン種の配位した例は、AzurinH117G 変異体にて報告されている[24]。

・ 滴定実験

AM2C 及び Cu^{2+} の結合量論を決定するため、滴定実験をおこなった (Figure9)。塩化物イオン存在下では Cu^{2+} 添加に伴い 616nm の吸収強度は直線的に増加し、およそ 1 当量に到達した地点で変化が飽和した。一方で、リン酸イオン存在下では理論値まで吸収強度は到達せず、リン酸銅の沈殿が確認された。したがって、以後の評価ではリン酸配位体の評価は除外した。また ITC にて結合能を評価した。金属イオン溶解のため、各溶液には微量の Tris-HCl 緩衝液を添加した。滴定曲線の解析結果、AM2C と Cu^{2+} は 1:1 で結合していることが判明し、 $K_d = 2.1 \mu\text{M}$ 程度であった。また $\Delta H = -1985 \text{ cal mol}^{-1}$ 及び、 $T\Delta S = -5662 \text{ cal mol}^{-1}$ であり、エントロピー駆動の金属結合過程であった。金属結合過程がエントロピー駆動であるのは、主にキレート効果によるものと推定される[25]。

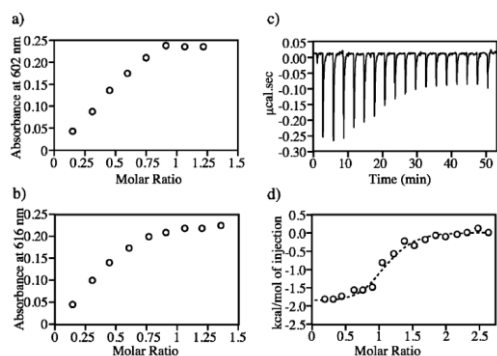


Figure 9. (Left) Titration experiment of AM2C in 50 mM PIPES containing (a) 500 mM NaCl buffer, pH 7.5 or (b) 500 mM K₂HPO₄, pH 7.5. The protein concentration was 65 μ M. (Right) ITC analyses of Cu²⁺ binding to AM2C. AM2C (50 μ M), in 50 mM PIPES containing 500 mM NaCl and 4 mM Tris, was added stepwise with 1.5 μ L of Cu²⁺ (1 mM) in the same buffer. The raw data are shown in panel c, and the integrated area of each peak and the nonlinear, least-squares fit curve representing the heat released are shown in panel d. Each parameter was obtained as follows: $n = 1.05 \pm 0.03$, $\Delta H = -1985 \pm 80 \text{ cal mol}^{-1}$, and $\Delta S = 19 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

• ESR による構造評価

AM2C-Cu²⁺-Cl 錯体の ESR スペクトルを測定した結果を Figure10 に示す。凍結したタンパク質水溶液は濃い青色を呈しており、凍結した状態でも構造を保持していることが示された。得られた ESR シグナルは $g_{//}$ 領域での hyperfine splitting が確認できなかった。しかしながら、得られたパラメーター、 $g_{//} = 2.255$, $g_{\perp} = 2.064$ は、タンパク質濃度に依存していないことより、双極子相互作用ないし交換相互作用の影響は無視できるレベルであると考えられる。リン酸配位型についても測定したところ、得られたパラメーター、 $g_{//} = 2.250$, $g_{\perp} = 2.065$ であり、塩化物イオン型とほぼ同等の結果であった。

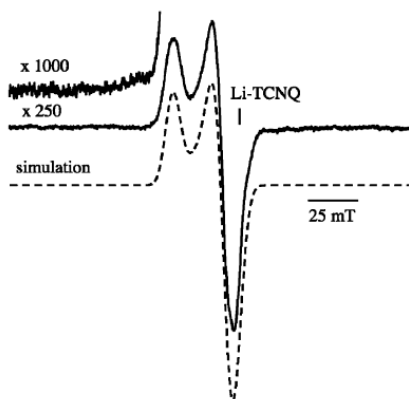


Figure 10. EPR spectrum observed for the frozen solution of the AM2C-Cu²⁺ complex at 77 K. The solution of the copper complex was prepared by the addition of Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.5) containing CuCl₂ (1.0 mM, 0.05 mL) to the AM2C solution (0.1 mM, 0.5 mL) in PIPES-NaOH buffer (50 mM, pH 7.5) containing NaCl (500 mM). The dotted line represents the simulated spectrum.

次に、40%グリセロール存在下でも EPR 測定を行ったが、 $g_{//}$ 領域のブロードなピークに変化は見られなかった。したがって、Figure8 に示したスペクトルが AM2C-Cu²⁺ の本来のスペクトルであると結論づけた。シミュレーションの結果、 $A_{//} = 15 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ であったが、このように異常なまでに小さな $A_{//}$ 値はその他 type1 銅についても確認されている。その例として *Pseudomonas aeruginosa* azurin の His117Gly 変異体における塩化物結合体 ($g_{\perp} = 2.042$, $g_{//} = 2.340$, $A_{//} = 17 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) とアジ化物結合体 ($g_{\perp} = 2.041$, $g_{//} = 2.317$, $A_{//} = 21 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) が挙げられる[24,26]。以上より ESR スペクトルの結果は type1 銅サイトに特徴的なスペクトルであると考えられる。

• EXAFS による構造評価

EXAFS 測定結果を Figure11 に示す。塩化物イオン結合型 AM2C-Cu²⁺ の EXAFS スペクトル形状は *Pseudomonas azurin* のものと似たものであった。配位子自体は異なるものの、この事は UV-vis スペクトル及び EPR スペクトルより得られた結果を考慮すると、EXAFS 結果についても type1 サイトに特徴的なものといえる。また、解析の結果として Table1 にまとめたパラメーターが得られた。Type1 銅サイトの Cu-S 距離は 2.1~2.3Å 程度、Cu-N 距離は 1.9~2.2Å 程度である。また、軸位相互作用は通常、2.5Å 以上である[27,28]。これら構造範囲に対してすべて一致するものであり、ブルー銅タンパク質に特徴的な構造を保持しているものと考えられる。

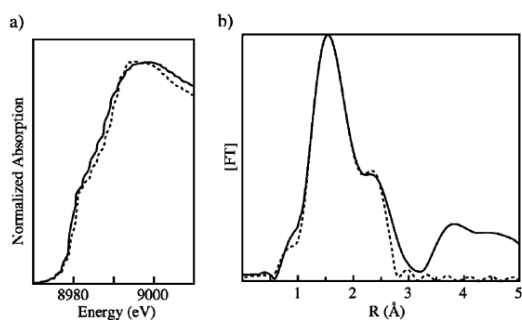


Figure 11. (a) Comparison of the normalized Cu K-edge XANES spectra of azurin (solid line) and the AM2C-Cu²⁺ complex with Cl⁻ as the axial ligand (dashed line). (b) FT of EXAFS of the AM2C-Cu²⁺ complex. The experimental and best-fitting curves are indicated by the solid and dashed lines, respectively.

Table 1. EXAFS Analysis of the AM2C-Cu²⁺ Complex^a

| | <i>N</i> ^b | <i>r</i> (Å) | σ^2 (Å ²) | ΔE_0 (eV) |
|-----------|-----------------------|--------------|------------------------------|-------------------|
| Cu-N(His) | 1 | 1.93 | 0.002 | 6.9 |
| Cu-N(His) | 1 | 1.98 | 0.002 | 6.9 |
| Cu-S(Cys) | 1 | 2.30 | 0.01 | 7.2 |
| Cu-Cl | 1 | 2.66 | 0.002 | 7.1 |

^a The coordination numbers (*N*), distances (*r*), Debye-Waller factors (σ^2), and energy shifts (ΔE_0) are shown. These parameters were obtained from the EXAFS data by the fitting procedure over the *r* range of 1.1-2.7 Å. The residual of the fit, which was defined as $\Sigma\{\varphi_{\text{exp}} - \varphi_{\text{theo}}\} / \Sigma\{\varphi_{\text{exp}}\} \times 100$, was 2.5%. ^b Fixed parameters for the curve-fitting procedure.

• 構造シミュレーション

EXAFS にて各結合距離の情報が得られた。そこで、この情報を基に 1 章と同様にタンパク質内での金属配位サイト構造のシミュレーションを行った(Figure12)。エネルギー最小化を行った構造は、His, His, Cys の平面 3 配位構造を基調としており、タンパク質軸方向に対して 38° 傾いていた。また、Cu²⁺ は平面三配位から少し浮いた部位に存在していた。この結果は吸収スペクトルの $A_{\sim 450} / A_{\sim 600}$ のレシオから想定された結果に一致しているものであった。また、金属配位サイトのために疎水コアアミノ酸の Lue, Ile を Ala へと変異した結果、金属配位サイト軸位相当部には大きな空間ができており、塩化物イオン配位に十分な空間が発生していた。

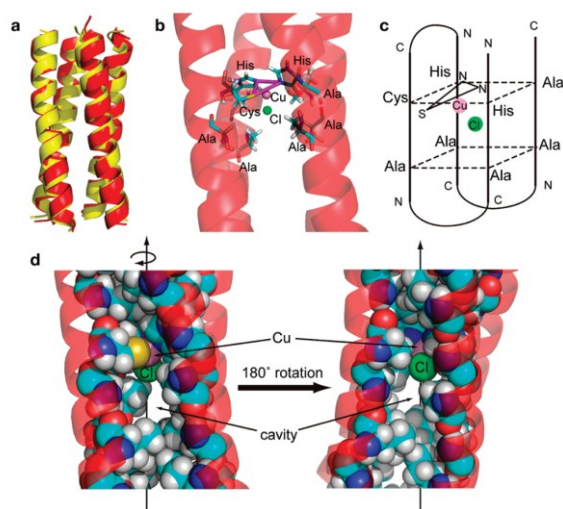


Figure 12. (a) Ribbon diagram showing the superposition of the minimized structure of the model of the AM2C-Cu²⁺ complex (red) and the starting structure (yellow). (b) Side view of the active site of the minimized structure of the model of the AM2C-Cu²⁺ complex. Pink and green spheres indicate the Cu²⁺ and Cl⁻ ions, respectively. The trigonal plane, formed by the S γ atom from the Cys residue and the N ϵ atoms from the His residues, is illustrated by magenta sticks. (c) Schematic view of the active site of the minimized structure of the model of the AM2C-Cu²⁺ complex. The fourth layer, composed of the C α atoms of the His, Cys, His, and Ala residues, and the fifth layer, formed by the C α atoms of the four Ala residues, are shown by the dotted lines, which are vertical against the α -helical axis. S and N indicate the S γ atom from the Cys residue and the N ϵ atoms from the His residues, respectively. The trigonal plane is tilted from the fourth equatorial layer by 38°. (d) Side view of the minimized model of the AM2C-Cu²⁺ complex, showing the inner packing. Internal amino acid residues are represented by spheres. The Cl⁻ ion exists in the cavity around the four Ala residues.

• まとめ

天然ブルー銅タンパク質はキュブレドキシソールドと呼ばれる共通の構造を持つが、我々はそれとはまったく異なる構造である4本鎖コイルドコイル構造へのtype1銅サイトの導入に成功した。金属配位サイトはタンパク質疎水コアにHis, His, Cysを配位子として持ち、軸位には外部配位子として塩化物イオンないしリン酸イオンを結合することでブルー銅サイトを形成した。また、その分光学的性質は軸配位子の種類によって異なり、その構造が軸配位子の種類によって変化していることを示唆するものであった。AM2Cの事例は、様々が外部配位子によりその構造、ひいては機能を自在に制御することが可能であることを予期させるものである。軸配位子の変更による構造制御は、ブルー銅タンパク質における構造-機能の相関を探る重要なツールになり得ると推定される。

• 参考文献

- [1] Canters, G. W.; Gilardi, G. *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 39–42.
- [2] Adman, E. T. *Adv. Protein Chem.* **1991**, *42*, 145–197.
- [3] Solomon, E. I.; Sundaram, U. M.; Machonkin, T. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563–2605.
- [4] Solomon, E. I.; Chen, P.; Metz, M.; Lee, S.-K.; Palmer, A. E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 4570–4590.
- [5] Stewart, L. C.; Klinman, J. P. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 551–592.
- [6] Prigge, S. T.; Mains, R. E.; Eipper, B. A.; Amzel, L. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1236–1259.
- [7] Zumft, W. G.; Dreusch, A.; Lochelt, S.; Cuypers, H.; Friedrich, B.; Schneider, B. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 31–40.
- [8] Magnus, K. A.; Ton-That, H.; Carpenter, J. E. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 727–735.
- [9] Solomon, E. I.; Baldwin, M. J.; Lowery, M. D. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 521–542.
- [10] Solomon, E. I.; Lowery, M. D.; LaCroix, L. B.; Root, D. E. *Methods Enzymol.* **1993**, *226*, 1–33.
- [11] Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulos, T.; Wieghardt, K., Eds. *Handbook of metalloproteins 2*; Wiley: New York, 2001; Chapter Type-1 copper proteins, Multicopper Enzymes.
- [12] Bonander, N.; Karlsson, B. G.; Vaˆnngard, T. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2429–2436.
- [13] Suzuki, S.; Kataoka, K.; Yamaguchi, K. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 728–735.
- [14] Hellinga, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10055–10066.
- [15] Maret, W.; Dietrich, H.; Ruf, H.-H.; Zeppezauer, M. *J. Inorg. Biochem.* **1980**, *12*, 241–252.
- [16] Lu, Y.; LaCroix, L. B.; Lowery, M. D.; Solomon, E. I.; Bender, C. J.; Peisach, J.; Roe, J. A.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5907–5918.
- [17] Schnepf, R.; Haehnel, W.; Wieghardt, K.; Hildebrandt, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14389–14399.
- [18] Brader, M. L.; Borchardt, D.; Dunn, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4480–4486.
- [19] Daugherty, R. G.; Wasowicz, T.; Gibney, B. R.; DeRose, V. J. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2623–2638.
- [20] Shiga, D.; Nakane, D.; Inomata, T.; Masuda, H.; Oda, M.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Fukui, K.; Takano, Y.; Nakamura, H.; Mizuno, T.; Tanaka, T. *Biopolymers* **2009**, *91*, 907–916.
- [21] Sakurai, Y.; Mizuno, T.; Hiroaki, H.; Oku, J.; Tanaka, T. *J. Peptide Res.* **2005**, *66*, 387–394.
- [22] Harbury, P. B.; Zhang, T.; Kim, P. S.; Alber, T. *Science* **1993**, *262*, 1401–1407.
- [23] Solomon, E. I.; Szilagyi, R. K.; George, S. D.; Basumallick, L. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 419–458.

- [24] den Blaauwen, T.; Canters, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1121–1129.
- [25] Vallet, V.; Wahlgren, U.; Grenthe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14941–14950.
- [26] den Blaauwen, T.; Hoitink, C. W. G.; Canters, G. W.; Han, J.; Loehr, T. M.; Sanders-Loehr, J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12455–12464.
- [27] Li, H.; Webb, S. P.; Ivanic, J.; Jensen, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8010–8019.
- [28] Koch, M.; Velarde, M.; Harrison, M. D.; Echt, S.; Fischer, M.; Messerschmidt, A.; Dennison, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 158–166.

第3章 軸配位子によるブルー銅構造制御

■諸言

ブルー銅タンパク質は濃い青色を呈する金属タンパク質であり、光合成、窒素固定、呼吸代謝、酸化反応に利用されている[1,2]。これらタンパク質は強い3つの相互作用として His, His, Cys の平面三配位構造を持ち、1つないし2つの弱い軸位相互作用を持つ[3,4]。この特異な構造のため、その分光学的性質は特徴的である。*Pseudomonas aeruginosa* azuri は 628nm に非常に大きな吸収帯と 450nm に小さな吸収帯を持ち、濃い青色を呈する[5]。一方で、*Achromobacter cycloclasters* nitrite reductase は 600nm 及び 450nm 付近に同程度の強度の吸収帯を持ち、濃い緑色を呈する[6]。これら色に依存して、各タンパク質はブルー銅・グリーン銅タンパク質と呼ばれている。この光学的性質は軸位相互作用の強さの違いによるものである[7]。ブルー銅サイトは通常、弱い軸位相互作用を持ち、 Cu^{2+} は His, His, Cys の平面三配位構造の三角形平面内に存在している。一方で、グリーン銅サイトは強い軸位相互作用をもち、平面三配位構造の三角形平面から Cu^{2+} が軸配位子に向かって浮き上がった tetrahedral 様の構造を持つ。このような構造制御を広範囲で実施することは、生物無機化学及びタンパク質工学の観点より、機能・構造相関の解明やタンパク質設計戦略改良に重要である。

2章にて述べたように、我々は4本鎖コイルドコイルタンパク質に対して type1 ブルー銅サイトの導入に成功した。設計したブルー銅タンパク質である AM2C は、His, His, Cys を配位子として持つが、軸配位に外部配位子である塩化物イオン、リン酸イオンを結合することでブルー銅サイトを形成していた[8]。また、その吸収スペクトルは軸配位子の種類により変化しており、外部配位子を適切に選定することでその構造を自在に制御できるように思われた。そこで、本章では様々な軸配位子を導入することでその構造を幅広く制御した事例について述べる。

■実験結果および考察

・吸収スペクトル

AM2C は塩化物イオンやリン酸イオンを軸位から結合することでブルー銅サイトを形成した。塩化物イオン結合体は 616nm に大きな吸収帯、476nm に小さな吸収帯 ($A_{476}/A_{616} = 0.34$) を持つ Stenocyanin に似たスペクトルを呈した[9]。一方で、リン酸結合型は 602nm に大きな吸収帯、468nm に小さな吸収帯 ($A_{468}/A_{602} = 0.14$) を持つ plastocyanin に似たスペクトルを呈した[10]。このレシオの違いは軸位相互作用の強さを表している。レシオが上がるにつれて、Cu-L(軸配位子)の結合距離が短くなり、Cu-S 結合は長くなる。その結果として、 Cu^{2+} は His, His, Cys の平面三配位から浮き出て、tetrahedral 様の構造にシフトする。事実、塩化物イオン結合体の構造シミュレーションの結果、 Cu^{2+} は His, His, Cys の平面三配位構造からわずかに浮き上が

っている構造が得られた。

AM2C の金属配位場軸位には空孔があり、小さな配位子であれば空孔内に導入可能である。そこで、様々な配位子を導入して構造評価を実施した。

```

N-term. 1c defgabc 10defgabc 20defgabc defgab
Q IEDKLEE ILSKHYA XENELAR IKKLLG E30G
60b agfedcb 50agfedcb 40agfedc
SGG Q IEDKLEE ILSKCYA AENELAR IKKLLG G70T
GGK 70c defgabc 80defgabc 90defgabc defgab
Q IEDKLEE ILSKHYA AENELAR IKKLLG E100G
130b agfedcb 120agfedcb 110agfedc
C-term. Q IEDKLEE ILSKAYA AENELAR IKKLLG G100L

```

Figure 1. The amino acid sequences of AM2C (X is A) and AM2C-E1 (X is E). The His, His, and Cys residues responsible for the type 1 copper binding in AM2C are indicated by bold letters. The proteins contain the extra G-S-A-M-A-K and R-S sequences in the N- and the C-termini, respectively, owing to the preparation of the proteins by genetic engineering in Escherichia coli. In the proteins the four α -helical portions form a α -helical coiled-coil structure and each heptad position (a-g) is indicated above the amino acids. The numbering of the amino acid sequence was used only in the core sequence. Two mutant protein used in this study, AM2C-F1 and AM2C-E5, have Phe (X is F) and Glu at position 115

硫酸イオン及び酢酸イオンを導入した AM2C-Cu²⁺ の UV-vis スペクトルを測定した。これらは 602nm に大きな吸収帯、468nm に小さな吸収帯を持つスペクトルを呈し、リン酸結合体のものとほぼ同等のものであった。このことより、硫酸イオン結合体、酢酸イオン結合体、リン酸イオン結合体は酷似した構造を持つと予想される。一方で、いずれのケースにおいても 400nm 付近に type2 由来と思われる小さな吸収帯が確認されたが、この事は各配位子の結合が飽和せずに、水分子結合型が残存していることを示しているものと推定される[8,11,12]。

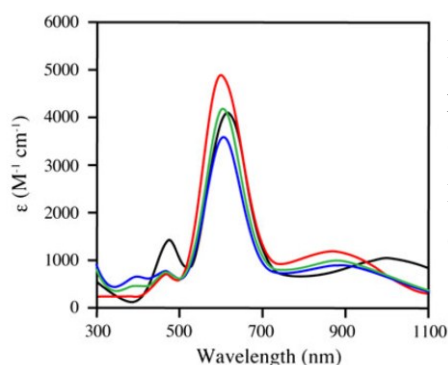


Figure 2. UV-vis spectra of AM2C-Cu²⁺ in 50 mM piperazine-N,N'- bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES)-NaOH (pH 7.5), containing 500 mM NaCl (black line), 500 mM KH₂PO₄ (red line), 500 mM Na₂SO₄ (green line), or 500 mM CH₃COONa (blue line)

アジド結合能評価のため、リン酸結合体に対してアジド滴定を行った。リン酸結合体由来の 602nm の吸収帯は、アジド添加に伴って 618nm にシフトしながら強度は低

下した。468nmに見られた弱い吸収帯は456nmにシフトしながら強度は増加した。この変化はアジド濃度が60mMに到達した時点で飽和が見られた。タンパク質溶液はアジド添加にて緑色寄りの青色に変化し、その吸収極大値レシオ $A_{456}/A_{618} = 0.49$ であった。この事は、アジドがより強い軸配位子として作用していることを示唆していると考えられる。

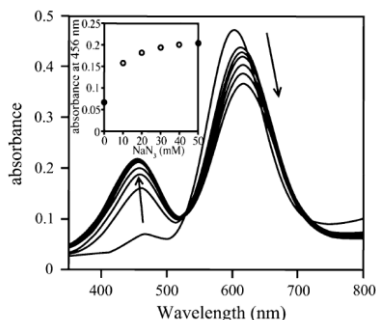


Figure 3. Azide titration to AM2C-Cu²⁺. Sodium azide concentrations of 10, 20, 30, 40, and 50 mM were added to 100 μM AM2C-Cu²⁺ in 50 mM PIPES buffer (pH 7.5) containing 500 mM KH₂PO₄. The absorbance at 456 nm was plotted as a function of the NaN₃ concentration (inset)

次にイミダゾール結合能の評価を行った。塩化物結合体にてイミダゾール滴定を実施したところ、その吸収スペクトルに変化が見られたが、過剰量のイミダゾール添加は退色に至った(data not shown)。この退色した溶液のEPRスペクトルを測定したところ、Cu-(imidazole)₄に典型的な g_{\perp} 領域に9つの hyperfine splitting を持つスペクトルが得られた。以上より、過剰添加したイミダゾールにより Cu²⁺が AM2C から剥離したと考えられた。AM2C-Cu²⁺へのイミダゾールの結合は、塩化物イオンの結合と競合するものと考えられる。したがって、イミダゾール結合と競合する外部配位子を排除した系を再現すれば、イミダゾール添加量を最小化することができ、金属イオンがタンパク質から剥離することを回避可能と考えられる。しかしながら、溶媒からいっさいの塩を排除することは、タンパク質溶解性を著しく低下させるため、金属配位場に外部配位子となりうるアニオン種の近接を排除する設計が必要と判断した。そこで、His, His, Cys 軸配位場近傍に負電荷を有する Glu を導入した AM2C-E1 を設計した(Figure1)。軸配位場周辺に負電荷を置くことで、緩衝液中に含まれる塩化物イオンやリン酸イオン等のアニオン種の軸配位阻害を期待した。CD スペクトル(Figure4)にて構造を評価したところ、負電荷を持つアミノ酸を空孔内に導入したにも関わらず、第1章にて紹介した AM2E 等と同様にコイルドコイル構造を保持していた[13]。また、Cu²⁺添加によるスペクトル変化がなかったことより、金属イオン共存による大きな構造変化はないと結論づけた。

AM2C-E1 水溶液は Cu²⁺添加により濃い黄色を呈した(Figure4)。吸収スペクトルは426nmに type2 サイトにおける thiolate-Cu²⁺ CT 遷移由来と思われる大きな吸収帯を呈した。また、滴定実験の結果、Cu²⁺と AM2C-E1 は 1:1 で結合していることが示された。EPR スペクトルを測定したところ、 $g_{//} = 2.24$, $g_{\perp} = 2.05$, $A_{//} = 12.0$ mT であり、N2SO 配位の type2 サイトの特徴的なスペクトルであった[14]。吸収スペク

トルは塩化物イオン濃度 0 M から 1 M まで変化がなく、塩化物イオンの代わりにリン酸イオンを添加した状態でもスペクトル形態に変化は見られなかった。以上の結果より、Glu 導入により塩化物イオン等のアニオン種の軸配位を阻害することができたと考えられる。4 つめの配位子としては水分子、導入した Glu が挙げられ、いずれが配位しているかについて明確な議論はできないが、本論から外れるため評価対象外とした。

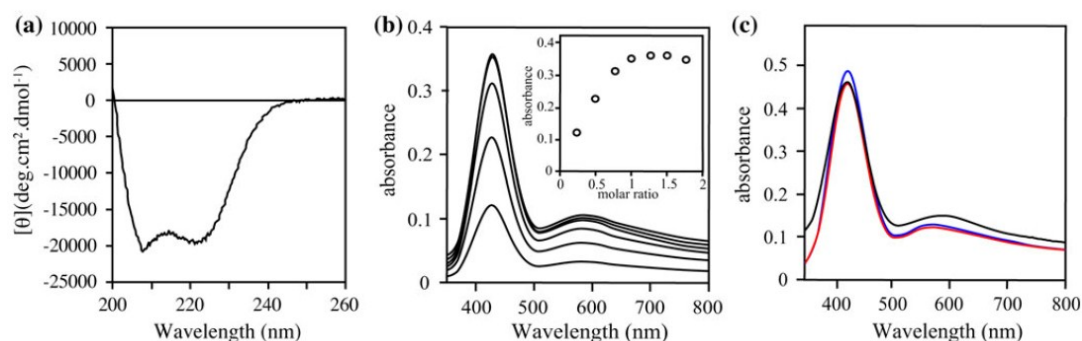


Figure 4. a) Circular dichroism spectrum of AM2C-E1 in the absence of Cu^{2+} . b) Titration of Cu^{2+} to AM2C-E1. Cu^{2+} at concentrations of 25, 50, 75, 100, 125, 150, and 175 mM was added to AM2C-E1 (100 μM) in 50 mM PIPES-NaOH (pH 7.5) and 500 mM NaCl. The absorbance at 426 nm was plotted as a function of the molar ratio of Cu^{2+} to AM2C-E1 (inset). c) UV-vis spectra of the AM2C-E1- Cu^{2+} complex. AM2C-E1 and Cu^{2+} were dissolved in 50 mM PIPES-NaOH (pH 7.5) with NaCl at 0 M (black line), 300 mM (blue line), and 1 M (red line). AM2C-E1 concentration 15 mM and Cu^{2+} concentration 10 mM for 0 M NaCl, owing to the low solubility of the protein. AM2C-E1 concentration 140 mM and Cu^{2+} Concentration 100 mM for 300 mM and 1 M NaCl. The scale of the absorbance was enlarged ten times in the case of 0 M NaCl. The UV-vis spectra of AM2C-E1 containing KH_2PO_4 were same as those of AM2C-E1 containing NaCl

次に、Glu の位置重要性の検証のため、Glu 導入位置を変えた AM2C-E5、負電荷の重要性を検証のため Phe を導入した AM2C-F1 を新たに設計し、UV-vis スペクトル測定を行った (Figure 1, 5)。AM2C-F1 は Cu^{2+} 添加により濃い青緑色を呈し、600nm 及び 450nm に大きな吸収帯を呈するブルー銅に特徴的なものであった。また、AM2C-E5 についても Cu^{2+} 添加により濃い青色を呈し、600nm 付近に大きな吸収帯と 400nm 付近に小さな吸収帯を確認した。Type2 由来と思われる 400nm 付近の吸収帯が確認された事より、ある程度のアニオン種配位の阻害は行っているものの、完全に阻害できていないことが予想される。以上より、塩化物イオン等のアニオン種の配位は、立体障害ではなく静電的反発によるものであると結論づけた。

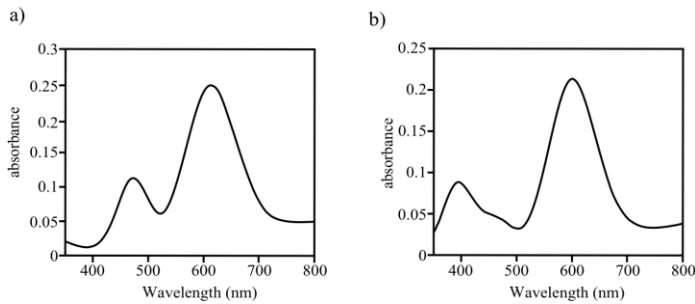


Figure 5. a) The UV-Vis spectrum of AM2C-F1-Cu²⁺ complex containing NaCl. AM2C-F1 (160 μM) and Cu²⁺ (100 μM) were dissolved in 50 mM PIPES-NaOH containing 500 mM NaCl. b) The UV-Vis spectrum of AM2C-E5-Cu²⁺ complex containing KH₂PO₄. AM2C-E5 (150 μM) and Cu²⁺ (100 μM) were dissolved in 50 mM PIPES-NaOH containing 100 mM KH₂PO₄.

AM2C-E1-Cu²⁺水溶液に対してイミダゾールを添加したところ、溶液は黄色から緑色へ変色した。UV-vis スペクトルは 426nm の吸収帯は強度を下げながら 438nm へシフト、550nm 付近の吸収帯は 600nm 付近へシフトしながら強度が上昇した (Figure6)。このスペクトル変化はイミダゾール濃度 25mM 程度にて飽和が見られ、 $A_{438}/A_{600} = 1.58$ と、アジド結合型よりさらに大きな値を得た。しかしながら、さらなる過剰量のイミダゾール添加は退色がみられた事より、金属イオンが剥離したと推定する。以上結果より、イミダゾールはアジドより強く Cu²⁺と結合しており、その構造は tetrahedral 様であると予想される。ここまでで得られた各軸配位子結合体の水溶液色を Figure7 にまとめた。

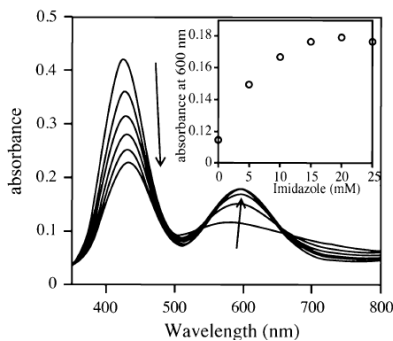


Figure 6. Imidazole titration to 100 μM AM2C-E1-Cu²⁺ in PIPES-NaOH (pH 7.5) containing 500 mM NaCl. The imidazole concentrations were 0, 5, 10, 15, 20, and 25 mM. The absorbance at 600 nm was plotted as a function of the imidazole concentration (inset)



Figure 7. Color of the protein solutions. 1 phosphate-bound type, 2 chloride-bound type, 3 azide-bound type, 4 imidazole-bound type, and 5 AM2C-E1

ブルー銅、グリーン銅ともにその軸位相互作用には Met が利用されることが多い。X

線結晶構造解析結果によると、その構造の違いは Cu-S(Met) 及び Cu-S(Cys) 結合距離に反映されている。通常、ブルー銅では Cu-S(Met) 結合距離は 2.8~2.9 Å、Cu-S(Cys) 結合距離は 2.1 Å 程度である。一方で、グリーン銅の Cu-S(Met) 結合距離は 2.45 Å と短い。そのため、Cu²⁺ は軸方向に引き寄せられ、Cu-S(Cys) 結合距離は 2.21 Å とブルー銅のものより伸びた形となる[15,16]。Met に荷電がないことを考慮すると、その結合距離は主に Met 側鎖と Cu(II) 距離のみにより制御されているように見受けられる。一方で AM2C の系においては、Cu-軸位相互作用の結合距離に関して距離制限はないため、配位子-金属イオン相互作用の強さのみにより制御されていると考えられる。したがって、AM2C において第二配位圏の設計、すなわち空孔内の疎水環境や立体的環境を適切に設計することで精密な構造制御が可能になると推定する。

・共鳴ラマン

ブルー銅タンパク質のラマンスペクトルは Cu-S(Cys) 結合に関して重要な情報を与えてくれる[17-19]。振動モードは 300~500 cm⁻¹ の領域にて type1: 430 ~ 405 cm⁻¹, type 1.5 380 ~ 430 cm⁻¹, type2 < 365 cm⁻¹ に大別される[20]。リン酸、塩化物、アジド結合型は 647.1 nm にて、イミダゾール、水結合型は 441.6 nm にて励起し、測定した結果を Figure 8 に示す。ブルー銅タンパク質のラマンスペクトルでは複数のバンドが確認されるため、強度平均振動数 $\langle \nu \rangle = \frac{\sum_i (I_i \nu_i^2)}{\sum_i (I_i \nu_i)}$ が結合強度比較によく利用されている[21]。リン酸イオン結合型と塩化物イオン結合型の $\langle \nu \rangle$ はそれぞれ 398 cm⁻¹, 382 cm⁻¹ であり、A₄₅₀/A₆₀₀ の序列と一致するものであった。一方で天然の laccase は $\langle \nu \rangle = 414$ cm⁻¹, plastocyanin は $\langle \nu \rangle = 413$ cm⁻¹ であり、大きく異なるものであった。また、塩化物結合型と似たスペクトルを呈する stellacyanin や nitrite reductase はそれぞれ 386 cm⁻¹, 383 cm⁻¹ であり、塩化物のそれとよく一致するものであった[22]。一方で、アジド結合型においては $\langle \nu \rangle = 387$ cm⁻¹ であり、塩化物結合型よりも結合が弱いというものであった。

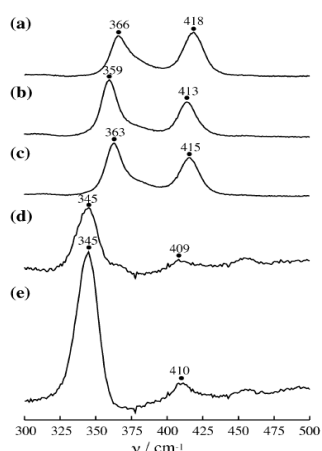


Figure 8. Resonance Raman spectra of phosphate-bound (a), chloride-bound (b), and azide-bound (c) types of AM2C and imidazole-bound (d) and water-bound (e) types of AM2C-E1. The phosphate-, chloride-, and azide-bound types of AM2C were measured with excitation at 647.1 nm, and the imidazole- and water-bound types of AM2C-E1 were measured with excitation at 441.6 nm. The protein concentration was 350 μM in 50 mM PIPES-NaOH (pH 7.5). The additional compositions were 500 mM KH₂PO₄ (a), 500 mM NaCl (b, e), 500 mM KH₂PO₄ and 60 mM NaN₃ (c), and 500 mM NaCl and 20 mM imidazole (d)

この理由については定かではないが、結合距離意外にも分光学的性質に何等かの影響を与える因子が存在していると推定する。イミダゾール結合型では $\langle\nu\rangle=354\text{cm}^{-1}$ であり、グリーン銅として知られる azurinM121E ($\langle\nu\rangle=348\text{cm}^{-1}$) とほぼ同程度の結果であるといえる。一方で水結合型では $\langle\nu\rangle=353\text{cm}^{-1}$ とグリーン銅と同程度の結合強度との結果であり、type2 であった azurinH117G($\langle\nu\rangle=298\text{cm}^{-1}$) とかけ離れた値を示した。それぞれの ESR 測定結果を見ると、azurin 変異体は $A_{\parallel}=18\text{mT}$ とほぼ平面型であるのに対して、水結合型は $A_{\parallel}=12\text{mT}$ と大きく平面から歪んだ構造を持つことが推定される。したがって、共鳴ラマンの結果はこの構造の差異を反映しているものと推定する。

・まとめ

軸位相互作用は type1 サイトにおける Cu^{2+} の構造及び機能を制御しているものと考えられる。この軸位相互作用を変える事は構造及び機能相関を検証する有用な手法であると思われる。我々が設計したブルー銅タンパク質は様々な外部配位子を軸配位することが可能であり、この配位子を選ぶことで広範囲での金属配位構造の制御ができた。今回の例は配位子を変更しただけにすぎず、空孔内の環境の変更、例えば親水的、疎水的、立体的な要因を自在に制御することでさらに精密な制御が可能と予想する。これら知見は今後、type1 サイトの構造設計や機能設計に非常に重要な知見を与えるものと考えられる。

・文献

- [1] Solomon, E.I.; Szilagy, R.K.; DeBee, G.S.; Basumallick, L *Chem Rev* **2004**, 104, 419–459.
- [2] Dennison, C *Chem Rev* **2005**, 249, 3025–3054.
- [3] Garrett, T.P.; Clingeleffer, D.J.; Guss, J.M.; Rogers, S.J.; Freeman, H.C. *J Biol Chem* **1984**, 10, 2822–2825.
- [4] Nar, H; Messerschmidt, A; Huber, R; van der Kamp, M; Canters, G.W. *J Mol Biol* **1991**, 221, 765–772.
- [5] Bonander, N; Karlsson, B.G.; Vannngard, T *Biochemistry* **1996**, 35, 2429–2436.
- [6] Suzuki, S; Kataoka, K; Yamaguchi, K *Acc Chem Res* **2000**, 33, 728–735.
- [7] Basumallick, L.; Szilagy, R.K.; Zhao, Y.; Sphapleigh, J.P.; Scholes, C.P.; Solomon, E.I. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 14784–14792.
- [8] Shiga, D.; Nakane, D.; Inomata, T.; Funahashi, Y.; Masuda, H.; Kikuchi, A.; Oda, M.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Fukui, K.; Kanaori, K.; Tajima, K.; Takano, Y.; Nakamura, H.; Tanaka, T *J Am Chem Soc* **2010**, 132, 18191–18198.
- [9] Malmstrom, B.G.; Reinhammar, B.; Vannngard, T. *Biochim Biophys Acta* **1979**, 205, 48–57.
- [10] Solomon, E.I.; Szilagy, R.K.; George, S.D.; Basumallick, L.; *Chem Rev* **2004**, 104, 419–458.

- [11] Hellinga, H.W. *J Am Chem Soc* **1998**, 120, 10055–10066.
- [12] Daugherty, R.G.; Wasowicz, T.; Gibney, B.R.; DeRose, V *J Inorg Chem* **2002**, 41, 2623–2632.
- [13] Shiga, D.; Nakane, D.; Inomata, T.; Masuda, H.; Oda, M.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Fukui, K.; Takano, Y.; Nakamura, H.; Mizuno, T.; Tanaka, T. *Biopolymers* **2009**, 91, 907–916.
- [14] Peisach, J.; Blumberg, W.E. *Arch Biochem Biophys* **1974** 165, 691–708.
- [15] Ghosh, S.; Xie, X.; Dey, A.; Sun, Y.; Scholes, C.P.; Solomon, E.I.; *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**, 106, 4969–4974.
- [16] LaCroix, L.B.; Shadle, S.E.; Wang, Y.; Averill, B.A.; Hedman, B.; Hodgson, K.O.; Solomon, E.I. *J Am Chem Soc* **1996**, 118, 7755–7768.
- [17] Blair, D.F.; Campbell, G.W.; Schnoover, J.R.; Chan, S.I.; Gray, H.B.; Malmström, B.G.; Pecht, I.; Swanson, B.I.; Woodruff, W.H.; Cho, W.K. *J Am Chem Soc* **1985**, 107, 5755–5766.
- [18] Han, J.; Adman, E.T.; Beppu, T.; Codd, R.; Freeman, H.C.; Huq, L.; Loehr, T.M.; Sanders-Loehr, J. *Biochemistry* **1991**, 30, 10904–10913.
- [19] Basumallick, L.; Sarangi, R.; George, S.D.; Elmore, B.; Hooper, A.B.; Hedman, B.; Hodgson, K.O.; Solomon, E.I. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 3531–3544.
- [20] Andrew, C.R.; Yeom, H.; Valentine, J.S.; Karlsson, B.G.; van Pouderoyen, G.; Canters, G.W.; Loehr, T.M.; Bonander, J.S.N. *J Am Chem Soc* **1994**, 116, 11489–11498.
- [21] Blair, D.F.; Campbell, G.W.; Schnoover, J.R.; Chan, S.I.; Gray, H.B.; Malmström, B.G.; Pecht, I.; Swanson, B.I.; Woodruff, W.H.; Cho, W.K. *J Am Chem Soc* **1985**, 107, 5755–5766.
- [22] George, S.D.; Basumallick, L.; Szilagyi, R.; Randall, D.W.; Hill, M.G.; Nersissian, A.M.; Valentine, J.S.; Hedman, B.; Hodgson, K.O.; Solomon, E.I. *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 11314–11328.

第4章 パープル銅タンパク質の設計

■ 諸言

シトクロムcオキシダーゼやN₂O還元酵素は濃い紫色を呈するCuAサイトを持つ。CuAサイトはシトクロムcより電子を受け取った後、各酵素サイトへ電子を移送する役割があり、その中心金属構造は2つのCysにて架橋されたCu₂S₂コアに対して、平面方向から2つのHisが結合した構造を持つ[1-3]。また、中心金属の電荷は高度に非局在化されており、Cu(1.5)-Cu(1.5)のmixed valenceな電荷状態を持つことが各分光学的解析結果より明らかになっている[4-9]。CuAサイトはCys-Cu CT遷移に由来する480nm及び520nm近傍に大きな吸収帯を有し、濃い紫色を呈する[10-12]。この色のため、CuAサイトを持つタンパク質はパープル銅タンパク質とも呼ばれている。これらCys由来のCT遷移に加えて、350nm付近及びNIR近傍にも小さな吸収帯が見られる[10,13]。この特徴的な構造・分光学的性質のため、CuAサイトは新規設計の魅力的な標的であるといえる。その設計手法としてCuAサイトの保存されたCXXXCループ配列に焦点をあてたloop-directed変異例が報告されているが、完全な新規設計の例は報告されていない[14-16]。そこで、本章ではタンパク質再設計によりCuAサイトをコイルドコイルタンパク質内に設計した例について述べる。

■ 実験結果および考察

・ 金属結合サイトの設計

CuAサイトは2つのCysにより架橋されたCu₂S₂コアに対して、平面方向から2つのHisが配位した構造を持つ[1-3]。この基本骨格はCuAサイトに共通して保存されている一方で、軸位相互作用については配位子及び距離ともに多様性がある。この事は、構造形成にはCys及びHisの位置が重要である一方で、軸位相互作用についてはある程度の柔軟性を許容すると考えられる。Cys-Cys距離に着目すると、その距離は約3.6Åであり、この距離が架橋配位構造形成に重要と考えられる[2]。この距離はαヘリックスにおけるi,i+3の位置関係に相当するため、2つのCys位置は同一αヘリックス上のi,i+3とした。また、そのCys周辺をHisリッチな環境とすることで、構造形成に重要なHis配位を期待した。そのアミノ酸配列をFigure1に示す。

```
N-term. 1 c defgabc 10 defgabc 20 defgabc defgab
          Q IEDKLEE ILSKHYA XENELAR IKKLLGEG30
          b 60 agfedcb 50 agfedcb 40 agfedc
          SGG Q IEDKLEE ILSKCYA YENELAR IKKLLGGT
          SGK c 70 defgabc 80 defgabc 90 defgab defgab
          GGK Q IEDKLEE ILSKHYA XENELAR IKKLLGEG
          130 b agfedcb 120 agfedcb 110 agfedc
C-term. Q IEDKLEE ILSKAYA AENELAR IKKLLGGL100
```

Figure 1. Amino acid sequences of AM2C (X, Y= A) for the blue copper protein and bi-AM2C (X= H, Y= C) for the purple copper protein. The proteins were prepared by genetic engineering in *E. coli*, and hence contain the extra G-S-A-M-A-K and R-S sequence at the N- and C-termini, respectively. The amino acid numbering is only for the core sequence. The protein has four α -helical portions forming the α -helical coiled-coil structure, and each heptad position (*a* to *g*) is indicated above the amino acids.

・タンパク質構造評価

bi-AM2C の CD スペクトル測定結果を Figure2 に示す。そのスペクトルは 208nm 及び 222nm に特徴的な極小値を持つものであった。1,2 章と同様に $\theta_{222}/\theta_{208} < 1$ ではあるが、リンカー配列等を考慮するとコイルドコイル構造に特徴的なスペクトルと考えられる[17]。

次に、超遠心分析による会合状態確認結果を Figure3 に示す。沈降速度実験の結果より、bi-AM2C は主に単量体として存在しているが、少量の二量体が確認された。この二量体は還元剤存在下においても解消されなかった事より、分子間会合によるものと推定される。得られた沈降係数 $S = 1.30$ は、GCN4-pLI 結晶構造より算出した沈降係数 $S=1.62$ に近いものであった。また、実験結果より算出したタンパク質分子量 13,000Da は、アミノ酸配列から求めた理論値 15,250Da と同等のものであった。

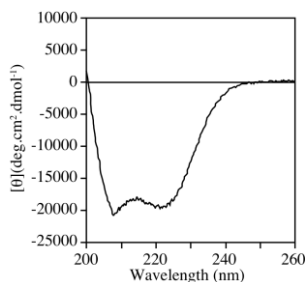


Figure 2. Circular dichroism spectrum of bi-AM2C. The measurement was performed in PBS, pH 7.5, with a 10 μ M protein concentration.

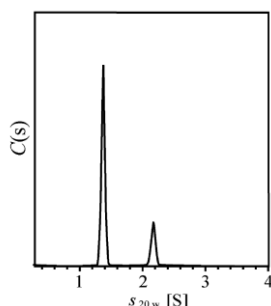


Figure 3. Analytical ultracentrifugation of bi-AM2C. The sedimentation coefficient distribution of 50 μ M bi-AM2C from the SV experimental analysis is indicated.

・吸収スペクトル

タンパク質水溶液に対して過剰量の Cu^{2+} を添加したところ、直ちに濃い紫色を呈し

た。そこで bi-AM2C の吸収スペクトルを測定した(Figure4)。Cys-Cu CT 遷移由来と思われる大きな吸収帯が 488nm 及び 530nm 付近に確認され、加えて 350nm に His-Cu CT 遷移由来、850nm に $\text{Cu}\psi\text{-Cu}\psi^*$ 遷移由来と思われる各吸収帯についても確認できた[13]。これら得られた各吸収帯のモル吸光係数 $\epsilon_{488} = 1350$, $\epsilon_{530} = 1085$, $\epsilon_{849} = 695$, $\epsilon_{350} = 420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ は Azurin の loop-directed 変異 CuA サイトのものと酷似するものであった[15]。したがって、bi-AM2C は 2 つの Cu イオンを結合し、CuA サイトに近い構造を持つと考えられる。

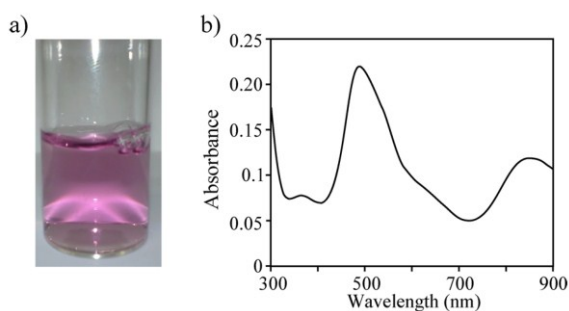


Figure 4. a) Purple color of the solution of bi-AM2C and Cu^{2+} in 50 mM PIPES-NaOH, pH 7.5, containing 500 mM NaCl. $[\text{bi-AM2C}] = 200 \mu\text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 400 \mu\text{M}$. b) UV-vis spectrum of bi-AM2C and Cu^{2+} in the same buffer. $[\text{bi-AM2C}] = 160 \mu\text{M}$, $[\text{Cu}^{2+}] = 320 \mu\text{M}$.

2章で紹介した新規設計ブルー銅は空気中にて Cys 残基 S 原子が SO_2 へ酸化することで溶液が退色する現象が確認された。同じように、今回設計した bi-AM2C についても溶液の退色が確認されたため、退色後のサンプルの酸化状態の確認を行った。始めにエルマン試薬による Cys 定量を実施したが、試薬に対して反応がない事より Cys が酸化していることが確認できた。そこでさらに ESI-TOF-MS にて分子量測定を実施した。

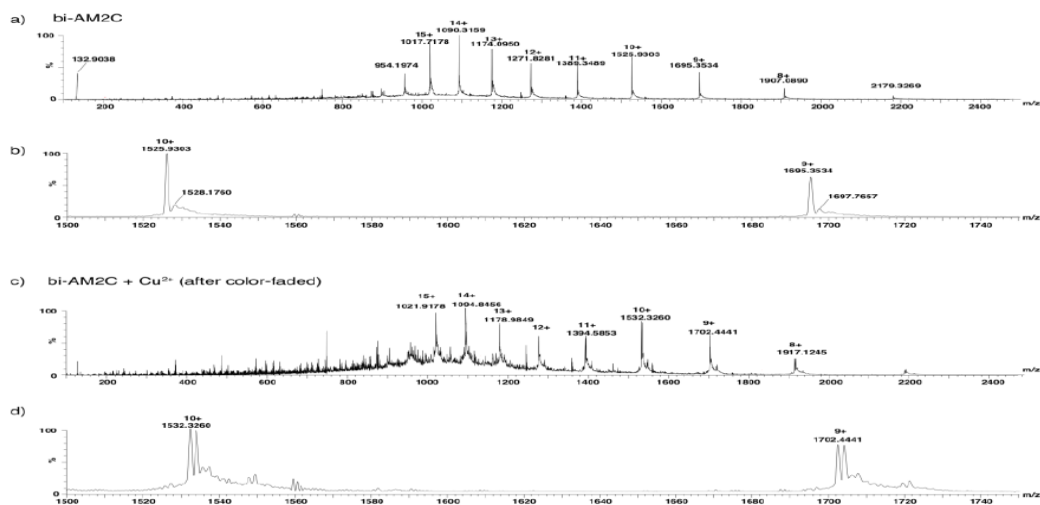


Figure 5. ESI TOF MS spectra of bi-AM2C (a) and the color-faded protein (c). Each sample was prepared by adding a small amount of formic acid and analyzed by using microTOF-Q (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Each molecular mass corresponds to the value of highest peak with indicated ion charge state. (b) and (d) correspond to the 10+ and 9+ charge states of (a) and (c), respectively. Deconvoluted molecular masses for series of charge states for bi-AM2C(15,250) and the color-faded bi-AM2C(15,313 and 15,329).

Figure5 に示したように、退色後のタンパク質ではほぼ同程度の比率で分子量 15313 と 15329 のピークが確認できた。これらは bi-AM2C の分子量 15250 から 63, 79 の分子量増加が見られる。このことは前者においては各 S 原子が SO_2 まで酸化、後者においては各 S 原子が SO_2 及び SO_3 まで酸化されたことによると推定される。

次にタンパク質への金属結合数を決定するため、様々なモル比にて UV-vis スペクトル測定を行った(Figure6)。bi-AM2C : Cu^{2+} = 1 : 1 の混合比率においては 488nm 及び 530nm の大きな吸収帯に加えて、600nm 近傍に小さなショルダーが確認された。一方で、bi-AM2C : Cu^{2+} = 1 : 2 の比率で混合した場合には 600nm のショルダーは消失し、488nm 及び 530nm の吸収強度が増加した。bi-AM2C には AM2C と同じ単核のブルー銅サイトを形成しうる金属配位場を合わせ持つ事より、600nm の吸収帯は type1 ブルー銅サイト由来と思われる[18]。Job's plot の結果、吸収強度が最大となった地点は biAM2C : Cu^{2+} = 1 : 2 付近であった事より、bi-AM2C には 2 つの金属イオンが結合していることが示された。biAM2C : Cu^{2+} = 1 : 1 混合時に確認された 600nm の吸収帯由来の検証のため、AM2C 及び bi-AM2C のスペクトル合成を行った。その結果、biAM2C : Cu^{2+} = 1 : 1 混合状態において、単核サイト : 複核サイトの存在比は 1 : 20 であることが判明した。したがって、銅イオン 1 当量添加の時点で 9 割以上が複核として存在しており、単核種と比較して複核種はより親和性が高いと予想される(Figure7)。

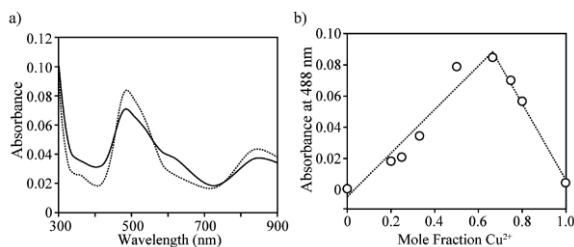


Figure 6. a) The UV-vis spectra of mixtures of bi-AM2C and Cu^{2+} at 1:1 (solid line) and 1:2 (dotted line) molar ratios. b) Job's plot analysis. The total concentration ($[\text{bi-AM2C}] + [\text{Cu}^{2+}]$) was fixed at 200 μM .

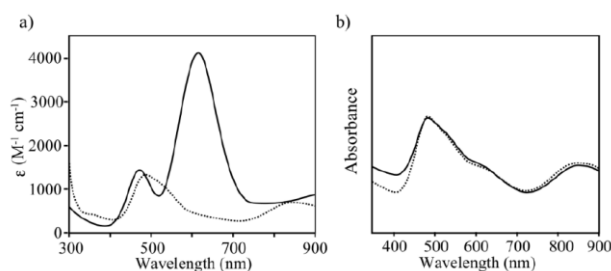


Figure 7. a) UV-vis spectra of the chloride-bound AM2C-Cu²⁺ complex (solid line), and the bi-AM2C-(Cu)₂ complex (dotted line). b) The measured UV-vis spectrum of bi-AM2C and Cu²⁺ at the 1:1 ratio (solid line). The calculated UV-vis spectrum from the AM2C-Cu²⁺ complex and the bi-AM2C-(Cu)₂ complex at the ratio of 1:20 (dotted line).

CuA サイト Cu₂S₂ コアの平面位には 2 つの His が配位しているが、bi-AM2C において 4 つの His の中で、どの His が平面位からの配位をしているかが不明瞭である。そこで、変異実験によりどの His が構造形成に重要であるかを検証した (Figure 8)。H16A 及び H84A 変異体は bi-AM2C の吸収スペクトルと大きな変化がないことより、これら His は CuA サイト構造形成には必須ではないと考えられる。一方で、H13A 及び H81A については金属イオン添加により、タンパク質が沈殿した。金属結合サイトを設計前の AM2 (GCN4-pLI をベースに設計した 4 本鎖コイルドコイルタンパク質) は、同じように金属イオン添加によりタンパク質の沈殿が発生する。一方で、金属イオンを結合する変異体 (1~3 章紹介) は、金属イオンを添加してもタンパク質の沈殿は発生しない。タンパク質沈殿は、変異により金属イオン親和性が著しく低下し、溶液中に存在する金属イオンにより分子間凝集が発生したものと推定される。以上より、H13 及び H81 が Cu₂S₂ コア平面方向より配位しているものと予想される。

次に、H16, H84 を同時に変異した H16, H84A 変異体についても評価を行ったところ、600nm 付近にブルー銅由来と思われるショルダーが確認された。この事は H16 及び H84 はブルー銅サイト形成に必要な軸配位を立体的な要因で排除を行い、二核サイトの安定化に重要な役割を持つものと推定される。

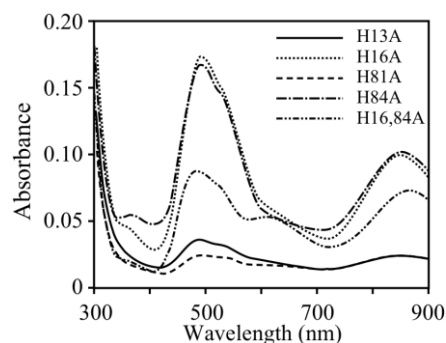


Figure 8. UV-vis spectra of the His mutant proteins. The measurements were performed in 50 mM PIPES-NaOH, pH 7.5, containing 500 mM NaCl at protein and Cu²⁺ concentrations of 130 and 260 μM, respectively. For H13A and H81A mutants, the addition of Cu²⁺ caused precipitation. The UV-vis spectra were measured using the supernatants.

• ESR スペクトル

bi-AM2C-Cu₂ の ESR 測定結果を Figure9 に示す。凍結した溶液は濃い紫色を保持していたことより、凍結状態においてもその構造を保持していると考えられる。得られたパラメータは $g_1=2.19$, $g_2=2.04$, $g_3=1.98$ であり、 g_1 領域における明確な hyperfine splitting は確認されなかった。パープル銅タンパク質の ESR スペクトルは $g_{//}$ 領域において 7 つの hyperfine splitting を示す例と、COX の CuA サイトのように明確な hyperfine splitting が確認されないものが存在する[10,12,19]。この $g_{//}$ 領域における hyperfine splitting の差は、UV-vis スペクトルにおける A_{480}/A_{530} 値との相関が指摘されている[15]。この $A_{480}/A_{530} > 1$ の場合、明確な hyperfine splitting は確認されず、 $A_{480}/A_{530} < 1$ の場合には 7 つの hyperfine splitting が確認されている。bi-AM2C-Cu₂ においては $A_{480}/A_{530} = 1.23$ であり、測定結果と一致する挙動であった。既存の CuA サイトの各 ESR パラメータは $g_{//}=2.18$, $g_{\perp} = 2.00\sim 2.03$ (COX), $g_{//} = 2.18$, $g_{\perp} = 2.06$ (Azurin CuA) であり、今回得られた bi-AM2C-Cu₂ のパラメータとほぼ同等の結果であると考えられる[15,20]。また、二核銅サイトは各銅イオン間でのスピン交換相互作用により非常に短い緩和時間を示すが、その影響は特に 77K を上回ると顕著である。95K においては二核由来と思われる強度は顕著に低下し、フリーの銅由来と思われるピークが確認された。一方で、温度を下げるにつれて二核の強度のみが顕著に増加し、フリーの銅由来のスペクトルはほとんど確認できないレベルとなっている。この温度依存性は二核サイトを持つことを裏付けるものである。

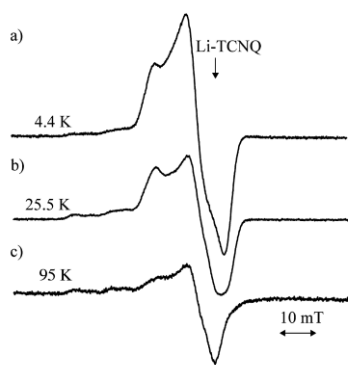


Figure 9. EPR spectra recorded for the frozen solutions of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex at a) 4.4 K, b) 25.5 K, and c) 95 K. The final concentrations of bi-AM2C and Cu²⁺ were 1 mM and 2 mM, respectively, in 50 mM PIPES-NaOH, pH 7.5, containing 500 mM NaCl and 200 μM DTT. The lithium salt of tetracyanoquinodimethane, Li-TCQN, was used as an external standard ($g = 2.0025$).

• EXAFS

CuA サイトは Cu₂S₂ コアを形成し、その中心金属は Cu(1.5)-Cu(1.5) の mixed-valence な状態であり、Cu(2)-Cu(2) の電荷状態は報告例がない[21]。そこで、bi-AM2C と Cu(2)-Cu(2) 電荷状態を持つ酸素原子架橋型の Cu₂(CH₃COO)₄[Cu-Cu 距離 2.64 Å] 及び硫黄原子架橋型の [Cu₂(S₂)(Bn₃TACH)](SbF₆)[Cu-Cu 距離 3.92] 錯体との XANES スペクトルの比較を行った[22]。

bi-AM2C-Cu₂ のスペクトルはこれら二核金属錯体と比較して低エネルギー領域に確認された事より、bi-AM2C はより還元された電荷状態を持つことが示された。Cu(1)-Cu(1)サイトの場合には LMCT 遷移はなく無色である。したがって、Cu²⁺を添加したにも関わらず bi-AM2C は Cu(1.5)-Cu(1.5)サイトを有するものと考えられる。Azurin のループ配列置換により設計された Azurin-CuA は Cu²⁺を添加するとブルー銅サイトを形成するが、長時間のインキュベーションによりパープル銅サイトへ変貌したという報告例がある[23]。我々の場合にはこの現象が瞬時に発生したものと予想されるが、その原因は定かではない。

CuA サイトを形成する Cu₂S₂ コアの Cu-S 結合距離は 2.2~2.3 Å、Cu-Cu 結合距離は 2.4~2.6 Å である[3]。これら結合距離はパープル銅サイトの構造に特徴的なものである。bi-AM2C-Cu₂ の EXAFS 測定により得られた構造情報 Cu-N 1.90 Å、Cu-S 2.21 Å、Cu-Cu 2.51 Å は CuA サイトのそれとよく一致するものであった。

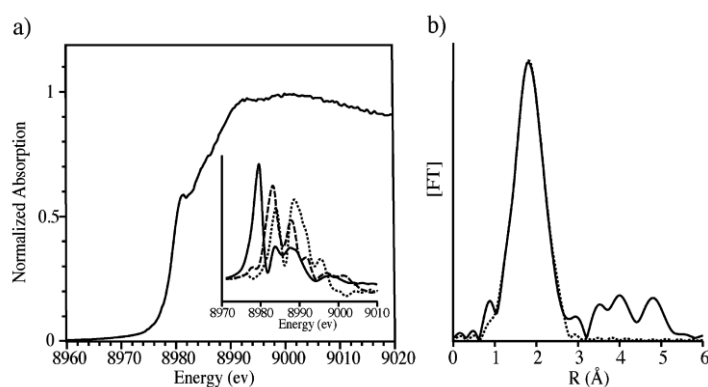


Figure 9. a) The normalized Cu K-edge XANES spectra of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex. Inset: The first derivatives of Cu K-edge absorption spectra of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex (solid line), Cu₂(OAc)₄ (dotted line), and [Cu₂(S₂)BnTACH]⁺ (broken line). b) FT of EXAFS of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex. The experimental and best-fitting curves are indicated by the black and dotted lines, respectively.

| Table 1. EXAFS analysis of the bi-AM2C-(Cu) ₂ complex | | | | |
|--|------------|--------------|---|----------------------------|
| | <i>N</i> * | <i>r</i> (Å) | <i>σ</i> ² (Å ²) | <i>ΔE₀</i> (eV) |
| Cu-N(His) | 1 | 1.90 | 0.0021 | 7.8 |
| Cu-S(Cys) | 2 | 2.21 | 0.0035 | 9.2 |
| Cu-Cu | 1 | 2.51 | 0.0039 | 0.2 |

* Fixed parameters for the curve-fitting procedure. The coordination numbers (*N*), distances (*r*), Debye-Waller factors (*σ*²), and energy shifts (*ΔE₀*) are shown. The residuals of the fit for the first peak, which was defined as $\Sigma\{\varphi_{\text{exp}} - \varphi_{\text{theo}}\} / \Sigma\{\varphi_{\text{exp}}\} \times 100$, were 4.3.

・モデリング

4 本鎖コイルドコイルタンパク質全体構造を踏まえた中心金属構造のシミュレーションを実施した。得られた Cu_2S_2 コア構造における二面角は 163.2° であり、この角度は *Paracoccus denitrificans* N_2O reductase における二面角 $164.0\text{--}165.9^\circ$ とほぼ同等のものであった。また、2つの His (His13, His81) は Cu_2S_2 コアの平面位に存在しており、変異実験結果と一致するものであった。軸位相当位置で 2.7\AA の距離において Glu46、Cys47 カルボニルや、残りの His16, His84 についても各々 4.1\AA 、 2.7\AA の距離関係にあり、これらが軸位相互作用の候補として挙げられる。しかしながら、これらの決定には結晶構造解析が必須である。

これまで報告されている CuA サイトにおいては2つの His, 2つの Cys, 1つの Met が保存されているが、軸位相互作用はその構造に対して顕著な影響を与えないといわれている[24]。我々の例では Met は導入しておらず、軸位相互作用はその構造に顕著な影響を与えないため、ある程度の柔軟性を許容するという結論を支持するものであると考えられる。

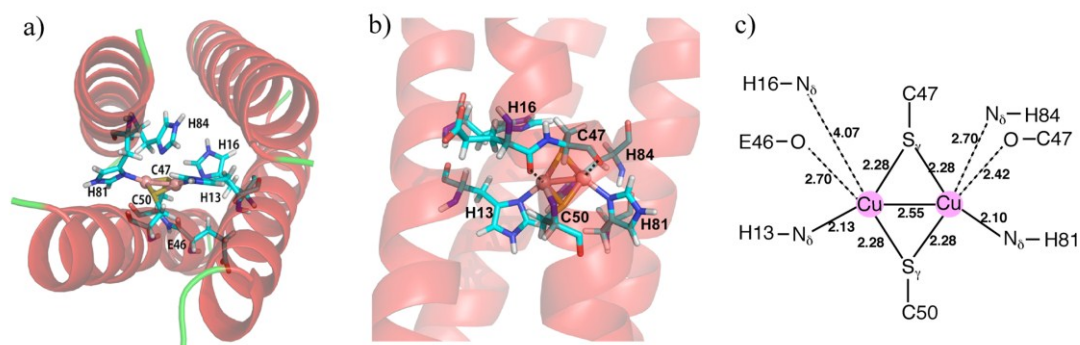


Figure 10. (a) Bottom view of the minimized model structure of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex. The pink sphere indicates the copper ion. (b) Side view of the active site of the minimized model structure of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex. (c) Schematic view of the active site of the minimized model structure of the bi-AM2C-(Cu)₂ complex. The putative axial interactions are indicated by the dotted lines. Bond lengths are shown in angstroms.

・まとめ

この章では CuA サイトにおける Cys-Cys 距離に着目して、4 本鎖コイルドコイルタンパク質への CuA サイト導入を試みた。これまでに単核金属結合サイトの設計例は数多く報告されているが、複核金属サイトの設計例はほとんどない。今回の設計例は、 α ヘリックスにおける $i, i+3$ の位置関係が金属イオンの架橋構造形成に重要な位置関係にあることを証明した。

bi-AM2C は軸位等の様々な変異実験により、構造形成に重要な因子の検証、さらに

は機能-構造相関についても重要な情報を得るツールとなることが期待される。COX では CuA サイトは電子を受け取り、酸素の四電子還元を行うヘム Fe-CuB 異種二核サイトへ電子が移送されている。一方で四本鎖コイルドコイルタンパク質の疎水コアに対するヘム鉄の導入例が報告されている[25,26]。したがって、将来的にはこのような酸素四電子還元サイトを含む COX の最小モデルの設計への展開が可能と考えられる。

・文献

- [1] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomigaki, T.; Yamaguchi, H.; Sinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, *269*, 1069-1074.
- [2] Wilmanns, M.; Lappalaomem, P.; Kelly, M.; Sauer-Eriksson E.; Saraste, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, *92*, 11955-11959.
- [3] Robinson, H.; Ang, M. C.; Gao, Y-G.; Hay, M. T.; Lu, Y.; Wang, A. H-J. *Biochemistry* **1999**, *38*, 5677-5683.
- [4] Neese, F.; Zumft, W. G.; Antoholine, W. E.; Kroneck, P. M. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8692-8699.
- [5] Fee, J. A.; Sanders, D.; Slutter, C. E.; Doan, P. E.; Aasa, R.; Karpefors, M.; Vanngard, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 77-83.
- [6] Farrar, J. A.; Neese, F.; Lappalainen, P.; Kroneck, P. M. H.; Saraste, M.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11501-11514.
- [7] Blackburn, N. J.; Barr, M. E.; Woodfuff, W. H.; van der Oost, J.; de Vries, S. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10401-10407.
- [8] Williams, K. R.; Gamelin, D. R.; LaCroix, L. B.; Houser, R. P.; Tolman, W. B.; Mulder, T. C.; de Vries, S.; Hedman, B.; Hodgson, K.; Solomon, E.I. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 613-614.
- [9] Blackburn, N. J.; de Vries, S.; Barr, M. E.; Houser, R. P.; Tolman, W. B.; Sanders, D.; Fee, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6135-6143.
- [10] Slutter, C. E.; Sanders, D.; Wittung, P.; Malmström, B. G.; Aasa, R.; Richards, J. H.; Gray, H. B.; Fee, J. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3387-3395.
- [11] Farrar, J. A.; Lappalainen, P.; Zumft, W. G.; Saraste, M.; homson, A. J. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *232*, 294-303.
- [12] Riester, J.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *178*, 751-762.
- [13] Gamelin, D. R.; Randall, D. W.; Hay, M. T.; Houser, R. P.; Mulder, T. C.; Canters, G. W.; de Vries, S.; Tolman, W. B.; Lu, Y.; Solomon, E.I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5246-5263.
- [14] van der Oost, J.; Lappalainen, P.; Musacchio, A.; Warne, A.; Lemieux, L.; Rumbley, J.; Gennis, R. B.; Aasa, R.; Pascher, T.; Malmström, B. G. *The EMBO Journal* **1992**, *11*,

3209-3217.

- [15] Hay, M.; Richards, J. H.; Lu, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1996**, *93*, 461-464.
- [16] Dennison, C.; Vijgenboom, E.; de Vries, S.; van der Oost, J.; Canters, G. W. *FEBS Lett.* **1995**, *365*, 92-94.
- [17] Sakurai, Y.; Mizuno, T.; Hiroaki, H.; Oku, J.; Tanaka, T. *J. Peptide Res.* **2005**, *66*, 387-394.
- [18] Shiga, D.; Nakane, D.; Inomata, T.; Funahashi, Y.; Masuda, H.; Kikuchi, A.; Oda, M.; Noda, M.; Uchiyama, S.; Fukui, K.; Kanaori, K.; Tajima, K.; Takano, Y.; Nakamura, H.; and Tanaka, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18191-18198.
- [19] Malmström, B. G.; Aasa, R. *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 49-52.
- [20] Antholine, W. E.; Kastrau, D. H. K.; Steffens, G. C. M.; Buse, G.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 875-881.
- [21] Savelieff, M. G.; Lu, Y. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 461-483.
- [22] Kajita, Y.; Matasumoto J.; Takahashi, I.; Hirota, S.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Masuda, H. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3977-3986.
- [23] Savelieff, M. G.; Wilson, T. D.; Elias, Y.; Nilges, M.; Garner, D. K.; Lu, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2008**, *105*, 7919-7924.
- [24] Hwang, H. J.; Berry, S. M.; Nilges, M. J.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7274-7275.
- [25] Rabanal, F.; DeGrado, W. F.; Dutton, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 473-474.
- [26] Cochran, F.V.; Wu, S. P.; Wang, W.; Nanda, V.; Saven, J. G.; Therien, M. J.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1346-1347.

総括

本研究の取り組みでは金属タンパク質機能中心における構造特異性に焦点をあて、その構造を新規設計タンパク質内への再現、制御に取り組んだ。土台タンパク質として利用した 4 本鎖コイルドコイルタンパク質は 1) 熱安定性が高く、疎水コアの大きな改変に耐えうる、2) 予測設計が容易、3) 天然タンパク質のもつ疎水環境・疎水/親水界面・親水環境をあわせ持つといった特徴があり、天然金属タンパク質に見られる機能中心の導入に有用な構造と考えられた。

1 章では中心金属構造をアミノ酸側鎖の立体障害を利用することで、構造の歪みを作り出すことに成功した。側鎖のサイズが構造の歪みとして反映された事実は、天然タンパク質における特異な構造形成にはその構造を強制する因子として、タンパク質の構造による配位子配向制御が重要であることを示した好例と考えられる。この仮説は、ペプチドベースで特異な構造を再現できていない事実とも一致する。また、最近になって Cys を使用せずに四面体型にまで歪んだ type0 と命名された金属配位サイトの設計例まででている。我々の例では天然アミノ酸のみを利用しているが、さらに歪みを作り出すにはさらに側鎖を延ばしたプロピオン酸のような側鎖をもつ非天然アミノ酸導入により実現可能と考えられる。

2、3章では最も *entatic state* が顕著な機能中心をもつブルー銅タンパク質の設計を行った。設計したタンパク質は様々な外部配位子を軸配位することで、ブルー銅サイトを再現することができた。一方で、多くの研究者によりブルー銅サイトの設計を行った事例が報告されているが、その多くは Cys 残基が Cu^{2+} による酸化や、溶媒分子の配位子により失敗に終わっている。他研究グループの指摘もあるように、これらを回避するためにはタンパク質疎水コアへの設計が重要であるという結果を支持するものであった。一方で、完全な type1 銅サイトを構築した例は殆どなく、この結果は数少ない成功例である。加えて、軸配位に様々な外部配位子を利用することで、その構造を広範囲にわたって制御する事に成功した。最終的には外部配位子の種類に加えて、第二配位圏を調整することでさらなる精密な構造制御、すなわち機能制御が可能になると予想された。

4 章ではタンパク質構造の α ヘリックス $i, i+3$ 位置に Cys を導入することでパーブル銅サイトの再現例を報告した。このサイトについてもブルー銅サイトと同様に多くの研究者による再現が試みられているが、成功例は数少なく、新規設計タンパク質へ再現した初めての例と考える。また、この結果は α ヘリックスにおける $i, i+3$ 位置が架橋配位を作製することに適した位置関係であることを示した好例であり、この事はその他構造においても適応可能と考える。今後、この位置関係を利用することでさらなる二核金属サイトの設計が可能と推定される。

以上、本論分では銅タンパク質を中心とし単純な構造の再設計により、より複雑な構

造を精密に制御することを可能とした。また、コイルドコイル構造への機能中心再現はヘムのような錯体の導入例や、より複雑な金属クラスター形成例まで報告されており、今後はより複雑な中心金属構造の形成が期待される。これら取り組みは、タンパク質工学分野を大きく発展する原動力となり、将来的には工業・医学分野等で有用な機能を持つ人工タンパク質の創出例が期待できる。

実験項

遺伝子作製

遺伝子作製は段階的 PCR 法により遺伝子の延長により作製し、場合に応じて点変異により各遺伝子の作製を行った。以下には主要な遺伝子（AM2D, AM2E, AM2C, bi-AM2C）の作製方法を記載した。その他変異体は bi-AM2C 作成時とほぼ同様の点変異にて作製のため、省略した。

■ AM2D, AM2E の遺伝子

```
tctggccatatgcaccatcatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctgcc
S G H M H H H H H H S S G L V P R G S A
                His-tag                Thrombin cleavage site
atggcNco ItaacaaattgaagacaaattggaggagatKpn Itttgagtaagcattatgctgccgaa
M A K Q I E D K L E E I L S K H Y A A E
aacgagttagctagaattaaaaattgctcggggaggagggtaccggaggaggattgttKpn Ig
N E L A R I K K L L G E G G T G G G L L
aaaaaattagagcactcgaaaatgaggcagcttatgaxaaaagtttgattgaggagttg
K K I R A L E N E A A Y x=t, x=DX K S L I E E L
aaagacgagatacaaggtBamH Iggatccggaggaaagcagatcx=a, X=Egaggataagctggaagaaata
K D E I Q G G S G G K Q I E D K L E E I
ctttcaaagcactacgctgctgagaatgaacttgcacgaatcaaaaagctacttggcgaa
L S K H Y A A E N E L A R I K K L L G E
ggcggcctPst Igcagggcggccttcttaagaagatccgagcattagagaacgaagccgcttac
G G L Q G G L L K K I R A L E N E A A Y
gctaagtcacttatcgaagaacttaaatgaaatccagagatccttagtaaaaagcttgcg
A K S L I E E L K D E I Q R S * *
                Hind III
```

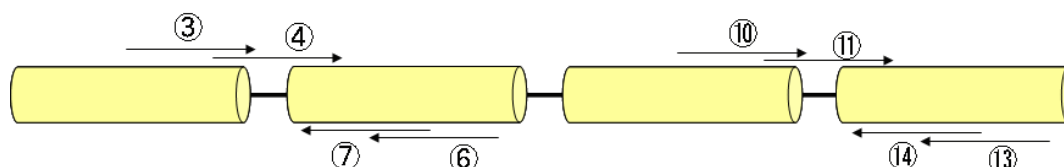
それぞれの遺伝子は 14 本のプライマーを用いた 3 段階の PCR により作製した。その過程を以下に示す。

AM2D 及び AM2E の遺伝子作製に利用した全プライマーの配列を以下に記す。

- ① 4 1-1 forward ggcgaattcgccatggcctaacaaattgaagacaaattggaggagat^{ttt}
- ② AM2-4A-H 1-2 forward gacaaattggaggagat^{ttt}tgagtaagcattatgctgccgaaaacgagt
- ③ AM2-4A 1-3 forward tatgctgccgaaaacgagttagctagaattaaaaattgctcggggagg
- ④ 4 1-4 forward aaaaaattgctcggggaggagggtaccggaggaggattgttgaaaaaat
- ⑤ 4 1-1 reverse tcctccggtaccactt^{gt}atctcgtctttcaactcctcaatcaaacttt
- ⑥ AM2-4A-D 1-2 reverse caactcctcaatcaaact^{ttt}tatcataagctgcctcattttcgagt^{gct}
- AM2-4A-E 1-2 reverse caactcctcaatcaaact^{ttt}ttc^{ataag}ctgcctcattttcgagt^{gct}
- ⑦ 4AA2 1-3 reverse tgcctcattttcgagt^{gct}t^{ct}aat^{ttt}tttcaacaatcctcctccgta
- ⑧ 4 2-1 forward aggtggatccggaggaaagcagatc^{gag}gataagctggaagaaatactttcaa

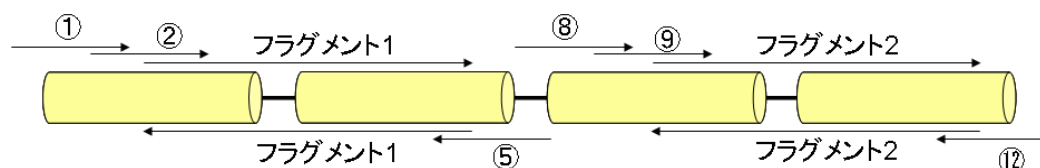
- ⑨ AM2-4A-H 2-2 forward ctggaagaaatactttcaaagcactacgctgctgagaatgaacttgcaac
 ⑩ 4AA2 2-3 forward gctgagaatgaacttgcaacgaatcaaaaagctacttggcgaaggcgccc
 ⑪ 4 2-4 forward ctacttggcgaaggcgccctgcagggcgcccttcttaagaagatccgagc
 ⑫ 4 2-1 reverse gccaaagctttactaagatctctggatttcattcttaagttcttcgata
 ⑬ AM2-4A 2-2 reverse atctttaagttcttcgataagtgacttagcgttaagcggttcgttctct
 ⑭ AM2-4A 2-3 reverse gtaagcggttcgttctctaatgctcggatcttcttaagaaggccgcc

• 1 段階目



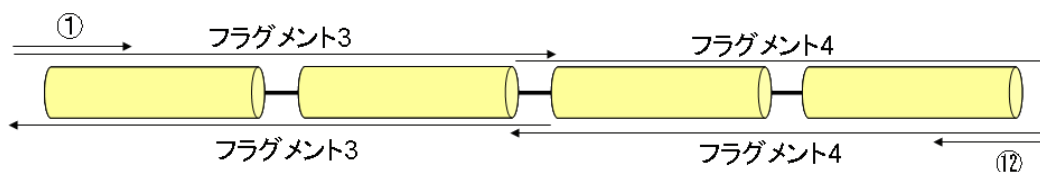
③、④、⑦、⑥のプライマーを含む PCR 溶液と⑩、⑪、⑭、⑬のプライマーを含む PCR 溶液を反応させた。それぞれの反応で得られた約 120bp のバンドをそれぞれ 1% アガロースゲル電気泳動により単離し、フラグメント 1 及びフラグメント 2 とした。

• 2 段階目



①、②、⑤のプライマー及びフラグメント 1 を含む PCR 溶液と⑧、⑨、⑫及びフラグメント 2 を含む PCR 溶液を反応させた。それぞれの反応で得られた約 230bp のバンドを 1%アガロースゲル電気泳動により単離し、フラグメント 3 及びフラグメント 4 とした。

• 3 段階目



①、⑫のプライマー及びフラグメント 3、フラグメント 4 を含む PCR 溶液を反応させた。反応で得られた約 430bp のバンドを 1%アガロースゲル電気泳動により単離した。得られたフラグメントを制限酵素 *Nco*I 及び *Hind*III で処理、アルカリフォスファターゼ処理を経て、T4 DNA リガーゼにより pET32-S(-)ベクターへ挿入した。

■AM2C の遺伝子

```

tctggccatatgcaccatcatcatcattcttctgggtctgggtgccacgcggttctgcc
S G H M H H H H H H S S G L V P R G S A
                His-tag                Thrombin cleavage site
atggcctaacaattgaagacaaattggaggagatTTTgagtaagcattatgctgccgaa
Nco I
M A K Q I E D K L E E I L S K H Y A A E
aacgagttagctagaattaaaaattgctcggggaggagggtaccggaggaggattgttg
                Kpn I
N E L A R I K K L L G E G G T G G G L L
aaaaaattagagcactcgaataatgaggcagcttattgcaaaagtttgattgaggagttg
K K I R A L E N E A A Y C K S L I E E L
aaagacgagatacaaggtggatccggaggaaagcagatcgaggataagctggaagaata
                BamH I
K D E I Q G G S G G K Q I E D K L E E I
ctttcaaagcactacgctgctgagaatgaacttgcacgaatcaaaaagctacttggcgaa
L S K H Y A A E N E L A R I K K L L G E
ggcggcctgcaggggccttcttaagaagatccgagcattagagaacgaagccgcttac
                Pst I
G G L Q G G L L K K I R A L E N E A A Y
gctaagtcaacttatcgaagaacttaagatgaaatccagagatcttagtaaaagcttgcg
                Hind III
A K S L I E E L K D E I Q R S * *

```

遺伝子は 14 本のプライマーを用いた 3 段階の PCR により作製した。AM2C の遺伝子作製に利用した全プライマーの配列を以下に記す。

- ① 4 1-1 forward ggcgaattcgccatggcctaacaattgaagacaaattggaggagatTTT
- ② AM2-4A-H 1-2 forward gacaaattggaggagatTTTgagtaagcattatgctgccgaaaacgagt
- ③ AM2-4A 1-3 forward tatgctgccgaaaacgagttagctagaattaaaaattgctcggggagg
- ④ 4 1-4 forward aaaaaattgctcggggaggagggtaccggaggaggattgttgaaaaaat
- ⑤ 4 1-1 reverse tctcctcgatccaccttgatctctgtctttcaactcctcaatcaacttt
- ⑥ AM2-4A-C 1-2 reverse caactcctcaatcaaaacttttgcaataagctgcctcattttcgagtgt
- ⑦ 4AA2 1-3 reverse tgctcattttcgagtgtcttaattttttcaacaatcctcctccggtta
- ⑧ 4 2-1 forward aggtggatccggaggaaagcagatcgaggataagctggaagaataactttcaa
- ⑨ AM2-4A-H 2-2 forward ctggaagaataactttcaagcactacgctgctgagaatgaacttgcac
- ⑩ 4AA2 2-3 forward gctgagaatgaacttgcacgaatcaaaaagctacttggcgaaggcggcc
- ⑪ 4 2-4 forward ctacttggcgaaggcggccttgcaggcggccttcttaagaagatccgagc
- ⑫ 4 2-1 reverse gccaagcttttactaagatctcttgatttcatctttaagttcttcgata
- ⑬ AM2-4A 2-2 reverse atctttaagttcttcgataagtgacttagcgtaagcggttcgttctct
- ⑭ AM2-4A 2-3 reverse gtaagcggcttctgttcttaagctcggatcttcttaagaaggccgccc

これらプライマーを用いて AM2D 及び AM2E の際と同様の過程で作製した。

■ bi-AM2C

bi-AM2C は以下配列(bi-AM2H)の遺伝子の点変異によって作製したため、bi-AM2Hの作製方法についても述べる。

```

tctggccatgatgcaccatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctgcc
S G H M H H H H H H S S G L V P R G S A
                His-tag                Thrombin cleavage site
atggctaaacaaattgaagacaaattggaggagatTTTgagtaagcattatgctcacgaa
Nco I
M A K Q I E D K L E E I L S K H Y A H E
aacgagtttagctagaattaaaaaattgctcggggaggaggtaccggaggaggattgttg
Kpn I
N E L A R I K K L L G E G G T G G G L L
aaaaaattagagcactcgaaaatgagcatgcttatcataaaagtttgattgaggagttg
K K I R A L E N E H A Y H K S L I E E L
aaagacgagatacaaggtggatccggaggaaagcagatcgaggataagctggaagaaata
BamH I
K D E I Q G G S G G K Q I E D K L E E I
ctttcaaagcactacgctcatgagaatgaacttgacgaatcaaaaagctacttggcgaa
L S K H Y A H E N E L A R I K K L L G E
ggcggcctgcagggcggccttcttaagaagatccgagcattagagaacgaagccgcttac
Pst I
G G L Q G G L L K K I R A L E N E A A Y
gctaagtcaacttatcgaagaacttaagatgaaatccagagatcttagtaaaagcttgcg
Hind III
A K S L I E E L K D E I Q R S * *

```

それぞれの遺伝子はそれぞれ、以下のプライマーを用いた3段階PCRまたは鋳型プラスミドを用いた点変異PCRによって得た。

・ bi-AM2H

- | | |
|----------------------|---|
| ① 4 1-1 forward | ggcgaattcgccatggctaaacaaattgaagacaaattggaggagatTTT |
| ② AM2H ②forward | gacaaattggaggagatTTTgagtaagcattatgctcacgaaaacgagt |
| ③ AM2H ③forward | tatgctcacgaaaacgagtttagctagaattaaaaaattgctcggggagg |
| ④ 4 1-4 forward | aaaaaattgctcggggaggaggtaccggaggaggattgttgaaaaaaat |
| ⑤ 4 1-1 reverse | tcctcggatccacctgtatctcgtctttcaactcctcaatcaaacTTT |
| ⑥ AM2H ⑥reverse | caactcctcaatcaaacTTTTatgataagcatgctcattttcgagtgct |
| ⑦ AM2H ⑦reverse | atgctcattttcgagtgctcTaatTTTTTcaacaatcctcctccggtA |
| ⑧ 4 2-1 forward | agtggtaccggaggaaagcagatcgaggataagctggaagaaatactttcaaa |
| ⑨ AM2H ⑨forward | ctggaagaaatactttcaagcactacgctcatgagaatgaacttgcac |
| ⑩ AM2H ⑩forward | catgagaatgaacttgacgaatcaaaaagctacttggcgaaggcggcc |
| ⑪ 4 2-4 forward | ctacttggcgaaggcggcctgcagggcggccttcttaagaagatccgagc |
| ⑫ 4 2-1 reverse | gccaaagcttttactaagatctcttgatttcatctttaagttcttcgata |
| ⑬ AM2-4A 2-2 reverse | atctttaagttcttcgataagtgacttagcgtgaagcggtctcgttctct |

⑭ AM2-4A 2-3 reverse gtaagcggcttcgttctctaattgctcggatcttcttaagaaggccgcc

• bi-AM2C 遺伝子配列

```
tctggccatgatgcaccatcatcatcattcttctggtctggtgccacgcggttctgcc
S G H M H H H H H S S G L V P R G S A
His-tag Thrombin cleavage site
atggctaacaattgaagacaaattggaggagatcttgagtaagcattatgctcagaa
Mco I
M A K Q I E D K L E E I L S K H Y A H E
aacgagttagctagaattaaaaattgctcggggaggagggtaccggaggaggattgtg
Kpn I
N E L A R I K K L L G E G G T G G G L L
aaaaaattagagcactcgaaaatgagtgcgcttattgcaaaagttgattgaggagttg
K K I R A L E N E C A Y C K S L I E E L
aaagacgagatacaaggtggatccggaggaaagcagatcgaggataagctggaagaaata
BamH I
K D E I Q G G S G G K Q I E D K L E E I
ctttcaagcactacgctcatgagaatgaactgcacgaatcaaaaagctacttggcgaa
L S K H Y A H E N E L A R I K K L L G E
ggcggcctgcagggcggccttcttaagaagatccgagcattagagaacgaagccgcttac
Pst I
G G L Q G G L L K K I R A L E N E A A Y
gctaagtcacttatcgaagaacttaagatgaaatccagagatcttagtaaaagcttgcg
Hind III
A K S L I E E L K D E I Q R S * *
```

• 鋳型プラスミド: bi-AM2H

• 用いたプライマー

4 1-1 forward ggccaattcgccatggctaacaattgaagacaaattggaggagatctt

AM2C dinuclear reverse aacttttgcaataagcgcactcattttcgagtgc

その他変異体についても以後、同様の点変異にて作製したため省略する。

タンパク質発現

各タンパク質配列をコードしたプラスミドを Escherichia coli BL21 (DE3)へ形質転換し、LB 培地中にて 37°Cで培養した。その後、1mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside(IPTG)にて発現誘導し、3 時間培養した。遠心分離により大腸菌と培地を分離した後、大腸菌ペレットを 50 mM Tris-HCl (pH 7.5*), 500 mM NaCl 緩衝液適量で懸濁した後、0°Cにおいて超音波破碎器により細胞を破碎した。十分に破碎した後、遠心分離により不溶成分を取り除いた。* bi-AM2C については等電点沈殿の影響を考え、pH 8.5 の緩衝液を用いた。

Ni affinity カラム精製

融合タンパク質中に His-tag 配列が含まれているため、Ni affinity カラムによる精製が可能である。精製プロセスは通常のプロトコルを改良しているため、精製プロセスチャートを以下に示す。1 ℓ 培養当り 3 ml の樹脂を用いた。

樹脂/ 20%エタノール懸濁液をカラムにアプライした。

↓

樹脂に対して 3 倍量のイオン交換水をアプライし、カラム内をイオン交換水で置換した。

↓

樹脂に対して 3 倍量の 1×charge buffer をアプライし、Ni イオンを樹脂に吸着させた。

↓

樹脂に対して 5 倍量の 1×binding buffer をアプライし、カラム内に残る 1×charge buffer を洗い流した。

↓

超音波破碎後の上清を 3 回アプライし、目的タンパク質を樹脂に十分に吸着させた。

↓

樹脂に対して 10 倍量の 1×binding buffer をアプライし、非特異吸着成分を洗い流した。

↓

樹脂に対して 3 倍量の thrombin buffer をアプライし、カラム内緩衝液を交換した。

↓

トロンビン溶液(0.5 mg/ ml^{*})をカラムに対して 1 ml 添加し系内を均一にした後、4℃で一晩処理した。*プロテアーゼ濃度は処理量に応じて適宜変えた。

↓

樹脂に対して 2 倍量の 1×binding buffer をアプライし、目的タンパク質を溶出した。

↓

20 ml の 1×elute buffer にて全成分を溶出した。

なお、以後の樹脂再生操作についてはプロトコルと同様の手順で行っている。

緩衝液組成

| | |
|------------------|---|
| 1×charge buffer | 50 mM NiSO ₄ ・6H ₂ O |
| 1×binding buffer | 5 mM imidazole, 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH |

7.9

1 × elute buffer 1 M imidazole, 500 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 7.9

thrombin buffer 20 mM Tris HCl, pH 8.4, containing 500 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂

RF-HPLC による精製

Ni affinity カラムによる精製を行っているため、系内には多くの金属イオンが含まれる。RF-HPLC は酸性環境下かつ変性状態にて精製するため、タンパク質に結合している金属イオンについても除去する事が出来る。したがって、精製の最終段階に RF-HPLC を用いた。

溶出液を遠心分離後*、RF-HPLC にアプライした。タンパク質は 0.1% TFA 存在下におけるアセトニトリルの線形的濃度勾配により溶出した。タンパク質を含むフラクションを集めて適度に減圧濃縮した後、凍結乾燥した。

* Cys 残基を含むタンパク質は、プロテアーゼ処理後の溶出液に対して終濃度 10 mM で DTT を添加した。

タンパク質の溶解

• AM2D、AM2E、AM2C の場合

適量の凍結乾燥品にそれぞれの緩衝液を添加し、超音波によって溶解した。遠心分離により不溶成分を分離した。

* 塩強度が低い緩衝液 (i. e. 100 mM NaCl) にタンパク質は高濃度では溶けない。一方で塩強度が高い緩衝液 (i. e. 500 mM NaCl) には高濃度で溶解する。また、GCN4 基盤の設計タンパク質においては、タンパク質高濃度下において金属イオンを添加すると、金属イオンを介した分子間でのアグリゲーションにより沈殿する事が多い。この現象を回避するため、予め塩強度が高い緩衝液に溶解すると良い。

• bi-AM2C の場合

pH 7.5 の緩衝液への溶解度は低いが、pH 8.5 程度の緩衝液には直接溶解する。しかしながら、ジスルフィド結合を最小限に抑えるために pH 7.5 の緩衝液に溶解する事が好ましい。これらタンパク質は 200 μM の DTT を含む緩衝液に 0.7 mg/ml で溶解後、遠心分離により不溶成分を分離した。上清をアミコンウルトラ 4, 3000 MWCO (8000 rpm, 4°C) もしくはアミコンウルトラ 15, 3000 MWCO (7500 rpm, 4°C) にて限外ろ過により 1 mM まで濃縮した。測定直前に DTT を含まない緩衝液にて目的濃度まで希釈して測定に用いた。

濃度定量

一連のタンパク質は4つのTyr残基を持つ。Tyr残基1つ当りのモル吸光係数は $\epsilon_{280} = 1300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を採用した。タンパク質の紫外吸収スペクトルは6 M グアニジン塩酸による変性条件下にて行い、ランベルト・ベールの式に従ってストック溶液の濃度を決定した。測定には1 mm 石英セル(サンプル総量: 200 μl)及びU-2800 spectrometer (HITACHI)を用いた。

CD スペクトル

測定には2 mm 石英セル(サンプル総量: 400 μl)及び円二色性分散計 (J-820, 日本分光)を用いた。また熱変性実験はすべて昇温速度を $2^\circ\text{C}/\text{min}$ で統一した。

超遠心分析

沈降速度分析には Proteomelab XL-I Analytical Ultracentrifuge (Beckman-Coulter, Fullerton, CA)を使用した。測定は60,000rpm、 20°C にて行い、12mm Aluminum double-sector centerpiece および four-hole An60Ti analytical roter を使用した。遠心により発生した濃度勾配は、吸光度が0.8~1.2となるように235nmまたは280nmで測定した。半径方向の増加は0.003cmであり、少なくとも200回のスキャンを6.0~7.25cmの区間でおこなった。全ての速度データはSEDFIT11.71のプログラムにある連続C(s)分布モデルにて分析した。メニスカス位置及び f/f_0 はフィッティングパラメーター変数として設定し、時間不変ノイズおよびラジアン不変ノイズは除去した。また、解析に必要なパラメーターである体積 $0.7485 \text{ cm}^3/\text{g}$ 、密度 $1.02009 \text{ g}/\text{cm}^3$ 、粘度 1.0638 cPs はSEDNTEZRP ver1.09にて計算した。3D構造を基にした $S_w,20$ 計算にはULTRASCAN II, ver9.86のSOMOを使用した。

UV-vis スペクトル

測定には幅3 mmの石英セル(サンプル総量: 600 μl)及びU-2800 spectrometer (HITACHI)を用いた。それぞれの金属イオン濃度は添加量に見合った濃度に調製し(1 mM~10 mM程度)、添加量は全サンプル量の5%程度(30 μl)を上限とした。金属イオンはそれぞれ100 mM Tris-HCl*緩衝液に溶解した。

*pHはタンパク質によって使い分けた。また、それぞれのモル吸光係数は滴定実験結果を最小二乗法により解析し、3回行った平均値を採用した。

マススペクトル

測定はmicrOTOF-Q(Bruker Dalton, Bremen, Germany)にて行った。金コーティングキャピラリーより溶液2 μL をイオンスプレーした。変性したタンパク質は少量の

ギ酸を添加して調製した。すべての測定は ES Tunign MIX(Agilent Technologies, Santa Clara) を使用して測定し、Compass(Bruker Daltonics)にて処理した。

ESR スペクトル

- AM2D, AM2E

ESR スペクトルは X-band (9.5 GHz) JEOL JES-RE1X によって、液体窒素温度 77K にて測定した。ESR パラメーターは JEOL ES-IPRIT 異方性シミュレーションプログラム ver 1.20 にて算出した。

- AM2C、bi-AM2C

ESR スペクトル測定には X-band ESR spectrometer(TE-300, JEOL)にて変調幅 100kHz として測定し、IPRIT 解析ソフト (JEOL) を利用した。磁場強度は MgO にドーブされた Mn²⁺の超微細結合定数 (8.69 mT) を元に修正した。また、Li-TCNQ (lithium salt of tetracyanoquinodimethane, $g=2.0025$) を g 値の指標とした。各 g 値は 3 回測定結果の平均値を採用した。AM2C は液体窒素温度 77K にて、bi-AM2C はクライオスタット (JANIS, ST-170) にて凍結サンプルの温度を 4.2~100K の間で制御した。

ITC

ITC 測定は Microcal MCS calorimeter 及び Microcal iTC200 calorimeter (MicroCal) にて 20°C で測定した。測定条件はそれぞれの機器によって異なるので以下に示した。ITC 測定においてはシリンジ側の溶液 (金属イオン溶液) にもセル側と同様の緩衝液を用いる必要がある。一方で緩衝液に対して Cu²⁺は不要であるため、錯形成能を持つ化合物を少量添加する必要がある*。そこで、それぞれの緩衝液に Cu²⁺を溶解するために必要最小限である 4 mM Tris を添加した。

*AM2D において大量に錯形成能がある Tris を含む系 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) にて測定すると Tris との錯形成競争により、明確な解析が出来なかった。

Microcal MCS calorimeter・・・AM2D, AM2E 使用

金属溶液はそれぞれ 1 mM 程度でセル溶液と同様の緩衝液に溶解し、5 μ l のシリンジ溶液を 4 分間隔で 1.36 ml のセル溶液に添加した。

Microcal iTC200 calorimeter (MicroCal)・・・AM2C 使用

金属溶液はそれぞれ 1 mM 程度でセル溶液と同様の緩衝液に溶解し、1.5 μ l のシリンジ溶液を 3 分間隔で 200 μ l のセル溶液に添加した。

EXAFS

Cu K-edge XAS データは Spring8 ビームライン(BL01B1, 8GeV, ca. 100mA) を利用した(Proposal No. 2011B1238 for bi-AM2C, 2009A1988 for AM2C)。タンパク質凍結乾燥品をペレットに成型し、ペレットを 30K(bi-AM2C)または 10K(AM2C)に保って測定を行った。また、比較サンプルである二核銅錯体は和光から入手ないし、過去の報告例に沿って準備した。測定は 19 エLEMENT 固体用検出器を使用した蛍光モード及び 2 結晶分光器を利用した透過モードにて測定した。また、エネルギー調整には銅箔を利用した。タンパク質のスペクトルは 20 回測定の平均値を採用した。XAS データは WinXAS ソフト(Ver 3.1)にて標準的な手法により処理し、 $2 < k < 12 \text{ \AA}^{-1}$ (bi-AM2C)または $2 < k < 10 \text{ \AA}^{-1}$ の範囲上でフーリエ変換した。EXAFS のため、COX の CuA サイト(PDB 2ZXW)の結合距離を基にモデリングをおこなった。CuA サイトにおける軸位相互作用が EXAFS データへ及ぼす影響は微小のため、今回のモデルから軸位相互作用は排除した。ブルー銅のモデルには nitrite reductase (PDBID 1C94) 利用し、Met を塩化物イオンに変更した。EXAFS の理論計算には FEFF 8.4 コードを利用した。カーブフィッティングに利用したパラメータは以下の通りである。

R : Cu からの距離

σ^2 : Debye-Waller factor

ΔE_0 : 光電子エネルギーシフト

モデリング

モデル作成は Swiss-Pdb Viewer にて行った。タンパク質構造モデリングには並行四本鎖コイルドコイル GCN4-pLI(PDBID:1GCL)の結晶構造を基に実施した。しかしながら実際には逆並行ストランドを持つため、逆並行である GCN4 ロイシンジッパー (PDBID: 1C94) の結晶構造を元に、2,4 本目のストランドを逆並行に変更した。側鎖は SCWRL を使用して配列通りに変更した。水素原子は myPresto を使用して加え、アミノ酸電荷は AMBER96 データベースより得て、銅イオンを配置した。初期構造は半径 35 \AA 水球体で溶媒和させた状態とした。球外に移動した水分子に $100 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ の調和ポテンシャルを適応した。また、配位子アミノ酸には AMBER96 force field parameter を使用した。初期構造における共役配向最小化は myPresto の cosgene を使用して実施した。 12 \AA 以上の長距離の非結合性相互作用は排除した。非共有結合成相互作用は 10 ステップ毎にアップデートした。エネルギー最小化の終了基準二乗平均平方根は $0.01 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-32}$ とした。EXAFS 測定実施があるモデルについては、EXAFS データより 0.1 \AA 以内の変更を制限した。

謝辞

本研究は以下に示したように非常に多くの先生方に支えられた結果、成し遂げる事が出来たものであり深く感謝致します。

| | |
|--------------------|------------------------|
| 京都府立大学大学院生命環境化学研究科 | 織田昌幸先生 |
| 大阪大学大学院蛋白質研究所 | 中村春木先生、鷹野優先生 |
| 大阪大学大学院工学研究科 | 福井希一先生、内山進先生、 野田勝則氏 |
| 大阪大学大学院工学研究科 | 船橋靖博先生 |
| 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 | 田嶋邦彦先生 |
| Spring-8 | 菊地晶裕先生 |
| 兵庫県立大学大学院生命理学研究科 | 小倉尚志先生、坂口美幸氏 |
| 名古屋工業大学大学院工学研究科 | 増田秀樹先生、中根大輔氏 |

特に、終始並々ならぬご指導ならびにご助言を賜りました田中俊樹教授に深く感謝申し上げます。