

氏名	シガダイゴ 志賀 大悟
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博第857号
学位授与の日付	平成25年3月23日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当 課程博士
学位論文題目	様々な配位構造を持つ銅タンパク質の新規設計 (De novo design of metalloproteins with various copper configurations)
論文審査委員	主査 教授 田中俊樹 教授 青木純 准教授 出羽毅久 教授 伊東忍 (大阪大学)

論文内容の要旨

天然には多くのタンパク質が存在しているが、その約4割は金属タンパク質である。金属タンパク質は活性中心に様々な種類・構造の金属イオンを含有する事で、触媒機能、電子伝達機能、物質貯蔵・移送機能を発揮している。これら機能は通常の合成錯体では成し得ないほどの高機能を持ち、その機能が発揮されるメカニズム解明について多くの研究がなされている。これら知見は、新触媒開発の重要な手がかりになると考えられている。一方で、機能を持つタンパク質自体をそのまま利用する試みもなされており、中にはアクリルアミドのバイオプロセスのような成功例もある。しかしながら、多くのタンパク質は有用な機能を持つにも関わらず、溶解性・発現効率・安定性等の弊害により実用化できていないものが殆どである。一方で、タンパク質工学分野の究極目標は、タンパク質構造を自在に設計し、機能を自在に組み込む事である。この事は上記弊害を解消する事ができ、且つ、生物無機化学分野における金属タンパク質機能-構造の相関を検討する重要なツールと成り得る。しかしながら、実情は土台となるタンパク質構造の設計すら成功例は非常に少なく、活性中心を組み込んだ例についてはさらに少ない。この事は、タンパク質構造を一次構造から予測する事が非常に困難であり、アミノ酸配列から各アミノ酸側鎖配向を高度に予測する事ができない事に起因しているものと考えられる。

本研究では、その中での構造の予測設計方法が確立されているコイルドコイル構造を利用し、様々な機能中心の導入に取り組んだ。コイルドコイル構造は取り扱いが容易かつ、非常に安定な構造を持つため、アミノ酸側鎖配向の予測設計が行いやすいと考えた。天然の金属タンパク質には4つの α -ヘリックスに囲まれた環境に中心金属を保持している例が多いことより、4量体コイルドコイルを土台構造として採用した。また、設計対象には多岐にわたる構造・機能を持ち、その分光学的評価が容易な銅タンパク質とした。以下にその設計事例概略を述べる。

1) アミノ酸側鎖による配位構造歪みの設計

金属タンパク質活性中心の構造には、しばしばその中心金属が好む構造から大きく歪んだ構造を持つものが見られる。この歪んだ構造は entatic state と呼われ、中心金属の酸化還元過程における活性化エネルギーは大幅に下げられ、迅速な酸化還元を可能としている。このような歪んだ構造は、タンパク質構造によりアミノ酸側鎖配向が厳密に制御され、中心金属に対して歪んだ構造を強制する力があるためと考えられる。そこで、アミノ酸側鎖の長さを変えることで、配位構造歪みの設計に取り組み、その歪み度合いを制御する事に成功した。

2) ブルー銅タンパク質の設計

ブルー銅タンパク質は、1)にて紹介した entatic state が最も顕著に見られる例であり、迅速な電子伝達機能を有する。また、Cys-Cu CT 遷移由来の非常に濃い青色を呈する等の特異な分光学的性質が見られることより、過去より多くのモデル設計例が報告されている。しかしながらそれらの殆どは、溶媒分子の結合やジスルフィド結合形成等により、完全なブルー銅タンパク質を再現した例は殆どない。そこで、Cys 残基及び外部配位子を利用することで、ブルー銅タンパク質の設計に取り組み、再現に成功した。

3) ブルー銅タンパク質の構造制御

ブルー銅タンパク質のような HHC 配位は、その軸位相互作用の強さにより青色、緑色、赤色と様々な色を呈する。一方で、構造を制御することは機能を制御する事につながり、マルチ銅酵素を利用したバイオ燃料電池研究分野において取り組まれている。そこで、様々な配位子を利用することで、その構造を制御することに取り組み、青～緑色の領域で幅広く構造を制御することに成功した。

4) パープル銅タンパク質の設計

パープル銅タンパク質は2つの Cys にて架橋された二核銅サイトであり、呼吸代謝系における電子伝達機能を担っている。その電子伝達速度はブルー銅サイト以上といわれている。その機能に加えて、Cys-Cu CT 遷移由来の濃い紫色を呈する等の特異な分光学的性質を持つことから、設計ターゲットとして魅力的である。そこで、天然パープル銅タンパク質における Cys-Cys 距離に着目し、その再現に成功した。

論文審査結果の要旨

天然には多くのタンパク質が存在しているが、その約4割は金属タンパク質である。金属タンパク質は活性中心に様々な種類・構造の金属イオンを含有する事で、触媒機能、電子伝達機能、物質貯蔵・移送機能を発揮する。これら機能は通常の合成錯体では成し得ないほどの高機能を持ち、その機能が発揮されるメカニズム解明について多くの研究がなされてきている。一方、タンパク質工学分野の究極目標は、タンパク質構造を自在に設計し、機能を自在に組み込む事である。しかし、実情は土台となるタンパク質構造の設計すら成功例は非常に少なく、活性中心を組み込んだ例はほとんどない。申請者は、構造の予測設計方法が確立されていること、また4つの α -ヘリックス中に金属を保持している例が多いことに注目し、4量体 α -ヘリカルコイルドコイルを金属イオンの配位設計の土台構造として研究を行った。また設計する金属タンパク質として多岐にわたる構造・機能を持ち、その分光学的評価が容易な銅タンパク質とし、様々な銅イオンの配位構造の作成を行った。

第1章でアミノ酸側鎖による歪んだ配位構造を持つ銅イオンの設計を行った。金属タンパク質活性中心には、しばしばその中心金属が好む構造から大きく歪んだ構造を持っているものが多い。この歪んだ構造は entatic state と言われ、中心金属の酸化還元過程における活性化エネルギーは大幅に下げられ、迅速な酸化還元を可能としている。このような歪んだ構造の設計は、これまでに報告例がない。申請者はアミノ酸側鎖配向が厳密に制御され、中心金属に対して歪んだ構造を強制する力があるためと考え、銅イオンに配意するアミノ酸側鎖の長さを変えることで、銅イオンの配位構造歪みの設計に取り組み、その歪み度合いを制御する事に成功した。

第2章では上記の entatic state が最も顕著に見られるブルー銅タンパク質の設計を行った。ブルー銅タンパク質は迅速な電子伝達機能を有すること、また Cys-Cu CT 遷移由来の非常に濃い青色を呈する等の特異な分光学的性質が見られることより、過去より多くのモデル設計例が報告されている。しかしながらそれらの殆どは、溶媒分子の結合やジスルフィド結合形成等により、完全なブルー銅タンパク質を再現した例は殆どない。そこで、Cys 残基及び外部配位子を利用することで、ブルー銅タンパク質の設計に取り組み、その再現に成功した。

第3章では、ブルー銅タンパク質の構造制御を行った。ブルー銅タンパク質のような HHC 配位は、その軸位相互作用の強さにより青色、緑色、赤色と様々な色を呈する。この構造制御は機能制御と強く関係し、マルチ銅酵素を利用したバイオ燃料電池研究分野においても取り込まれてきている。そこで、申請者は様々な配位子を利用することで、銅イオンの配位構造を制御することに組み、青～緑色の領域で幅広く構造を制御することに成功した。

第4章では、2つの Cys にて架橋された二核銅サイトを持つパープル銅タンパク質の設計を行った。パープル銅タンパク質は、呼吸代謝系における電子伝達機能を担い、その電子伝達速度はブルー銅サイト以上といわれている。その機能に加えて、Cys-Cu CT 遷移由来の濃い紫色を呈する。申請者は、天然パープル銅タンパク質における Cys-Cys 距離に着目し、アミノ酸設計を行い、土台構造中にパープル銅タンパク質の銅配位構造の再現に成功した。

このように、天然とは異なるタンパク質構造に意図した様々な金属配位構造の設計は、新規な機能の創出に有用な知見を与え、今後のタンパク質工学研究において広汎な応用展開が期待される。以上、本論文の結果は学術雑誌4報に掲載されており、学術的に高い価値を持つと判断される。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分な価値があると認められる。