

解説

設計タンパク質をモジュールドメインとして利用した 外部刺激応答タンパク質の創製

水野稔久, 織田昌幸, 田中俊樹

(受取日: 2008年7月23日, 受理日: 2008年9月8日)

Construction of the Artificial Proteins Whose Functions Can Be Altered with the Specific External Inputs by Using the Engineered Protein Modules

Toshihisa Mizuno, Masayuki Oda, and Toshiki Tanaka

(Received July 23, 2008; Accepted September 8, 2008)

The artificial proteins, whose functions can be altered with the specific external inputs (pH, metal ions, ligands, *etc.*), would have large applications, for ligand-specific sensor-proteins, site-selective protein-drugs, tools to examine natural protein functions, and so on. Here we supply one of the methodologies to design such artificial proteins, especially from the protein engineering background. We designed the *de novo* coiled-coil proteins whose tertiary structures are altered from random coil to bundled structure by the specific external input. By insertion of the coiled-coil proteins into target natural proteins, we succeeded to construct the peptide-ligand-dependent RNA hydrolysis enzyme and metal-ion-dependent green fluorescent protein.

Keywords: De novo design; Coiled-coil; Circular permutation; Metal ion;
Green fluorescent protein (GFP)

1. はじめに

多様な細胞内タンパク質の機能解明に対するアプローチとして、染色体上で特定タンパク質遺伝子をノックアウト(機能を失わせる)する、いわゆるノックアウト生物(細菌、酵母、マウス等)を利用する方法¹⁾や、近年盛んなRNA干渉法を利用した、m-RNAレベルからの特定タンパク質の生産抑制^{2,3)}などが、分子生物学、細胞生物学の立場から広く知られている。一方で、化学の立場から特定タンパク質の機能活性を任意の外部刺激により調節する手法の開発も検

討されてきており、近年ケミカルジェネティクス^{4,5)}というタームが広く認知されてきている。これは、例えばまず特定のタンパク質に結合する有機小分子をライブラリーの中からセレクションし、更にその中から、タンパク質の機能活性を変化(Knock-Off, あるいはKnock-On)させるものを見つけ出す。そして、この小分子をターゲットとなるタンパク質を発現する細胞等の外部から振りかけ、細胞レベルのフェノタイプ、あるいは応答の変化を観察、検討を行うというものである。一方で、最近我々は化学的立場からの新たな研究手法として、特定の外部刺激に応答し大き

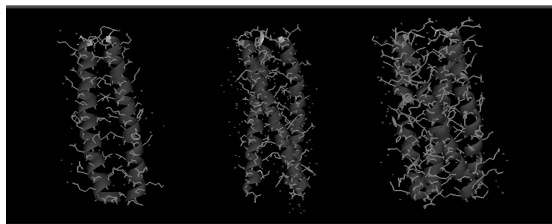


Fig.1 Crystal structures of GCN4-pIL (left), GCN4-pII (center), and GCN4-pLI (right).

く構造転移を起こす人工タンパク質モジュールを設計し、利用する手法を見出した。

2. モジュールドメインとしての コイルドコイルタンパク質の設計

α -ヘリカルコイルドコイル（以下コイルドコイルとのみ表記）構造は、天然タンパク質にも広く見られる構造モジュールの一つであり、両親媒性の α -ヘリックスが2本から5本寄り集まった超らせん構造を取る。元々はトロボミオン等の繊維状タンパク質^{6,7)}の中から見いだされてきたが、GCN4等の転写因子タンパク質^{8,9)} SNAREなどの膜融合タンパク質、Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)のような膜外マトリックスタンパク質¹⁰⁻¹²⁾等にも見つけられるようになり、現在では生体内で発現される全タンパク質の5%には、この構造ドメインが含まれると言われている。コイルドコイル構造は、3.6残基ごとに1ヘリックスをとる α -ヘリックスと若干異なり、3.5残基ごとに1ヘリックスを形成するため、7残基/2周回を繰り返し単位と考えることができる。従ってコイルドコイルを形成するアミノ酸配列には特徴的な7残基ごとの繰り返しが見られ、それぞれの位置は、a, b, c, d, e, f, gの7文字で表記される。特にa-位、d-位は、疎水性のアミノ酸 (Ile, Leu, Val等)で占められる割合が多く、これらは複数の α -ヘリックスが寄り集まり超らせん構造を形成する際の疎水コア部分を形成し、側鎖同士はタイトにパッキングをしている。なお構造未知のアミノ酸配列からコイルドコイル部位を推定する為のプログラムも存在する (COILS: http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)¹³⁾ 一方で、アミノ酸残基の配置（一次構造）から、三次構造における各残基の空間配置が予測可能であるために、コイルドコイルタンパク質は人工タンパク質設計のターゲットとして広く取り組まれてきた歴史を持つ¹⁴⁾ 例えば、T. Alberらにより報告された非常によく知られている例として、酵母転写因子GCN4の2本鎖コイルドコイルドメインをベースに設計された4本鎖コイルドコイル構造を選択的にとるGCN4-pLI, 3本鎖コイルドコイル構造を選択的にとる

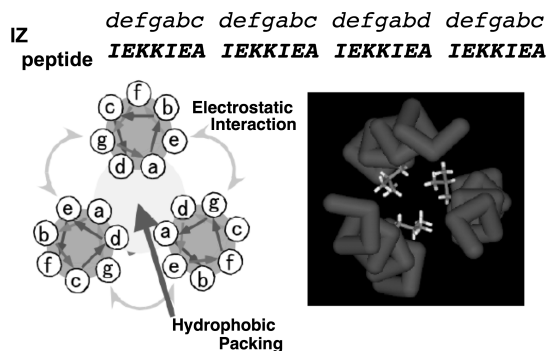


Fig.2 The amino acid sequence of IZ peptide and its trimeric structure.

GCN4-pIIさらに天然と異なる配列であるが選択的に2本鎖コイルドコイル構造をとるGCN4-pILがある (Fig.1)¹⁵⁾ いずれも、疎水場 (a-, d-位)を占めるアミノ酸を, Ile, Leu残基の異なる組み合わせに変異することにより、寄り集まる際のペプチド鎖の会合数に選択性を持たせることに成功した例である。また最近では、a-, d-位だけでなく、たとえば疎水場と親水場の界面にあたるe-, g-位にも疎水性のアミノ酸残基を導入することにより、5本あるいは7本のヘリックスが寄り集まったコイルドコイル構造の設計についても報告されつつある^{16,17)}

我々はこれまでに、コイルドコイル構造を形成するデノボ設計タンパク質、主には3本鎖コイルドコイルに関して、詳細な設計に取り組んできている。Fig.2にはその一例として、IZペプチドのベースとなる設計配列を示す¹⁸⁾ ペプチド同士が寄り集まり形成される疎水コアを占めるa, d-位は、いずれもIleが占めており、一方で、疎水場-親水場界面にあたるe, g-位では、隣接ヘリックス間で静電相互作用を形成できるようにGlu, Lys残基を配している。¹H-NMRによる疎水コアIle残基の構造特異性、あるいは主鎖アミドプロトンのH-D交換反応速度の評価等からネイティブ様な構造を取っていることも明らかとなり、28残基からなるペプチド会合体でありながら、95℃においてもその会合構造が破壊されない、非常に安定な設計タンパク質の構築に成功した。またこの配列は、可溶性の高さ、配列の単純さなどから、様々な機能を持つ人工タンパク質設計のプラットフォームとして優れている。

2.1 金属イオン応答コイルドコイルタンパク質の設計

天然においては、様々な金属配位性タンパク質が知られている。酸化還元反応や加水分解反応に関与する金属酵素類^{19,20)} 細胞内での金属イオン検知部位としての金属イオン応答転写因子タンパク質群²¹⁻²³⁾ Znフィンガータンパク

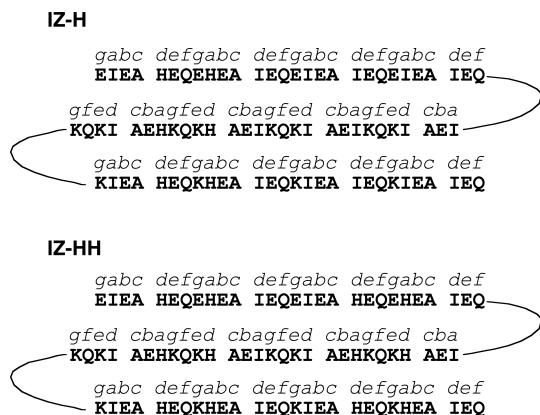


Fig.3 Metal-binding IZ peptide mutants, IZ-H, and IZ-HH.

質^{24,25})など、金属イオンは、その特異な配位構造を基に様々なタンパク質機能に参与している。これらの中で特に我々は、金属イオンの配位に伴うタンパク質の構造安定化への寄与に着目し、金属イオンの配位に伴いタンパク質の安定性が大きく変化するタンパク質、さらには劇的に高次構造が変化する設計タンパク質の構築を目指した。

以前我々は、金属イオンに配位するIZペプチド変異体に関して報告した。²⁶⁻²⁸ IZペプチドの疎水場に存在するIle残基を一つあるいは二つをHis残基に変異することにより、金属イオン非存在下においては、各々のペプチドがバラバラに存在するが、Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺などの金属イオンとの結合により、自己3量体化、すなわちホモ3本鎖コイルドコイル構造を形成するものであった。これはコイルドコイル構造形成に重要な疎水場パッキングが、IleからHisに変化することにより崩され、自己3量体化が阻害されていたものが、金属の架橋配位により新たな安定化エネルギーを獲得し、改めて自己3量体化を起こせるようになると考えられる。そこでこのコンセプトを活かし、金属イオンの配位に伴い大きく構造変化する一つのペプチド鎖からなる3本鎖コイルドコイルタンパク質の設計を目指した (Fig.3)。²⁹

隣接するヘリックス間で近接する位置に存在するa, d-位の6, あるいは12個のIle残基を、金属配位性のHis残基に置き換えた。6個置き換えたものをIZ-H、12個置き換えたものをIZ-HHと名付けた。IZ-Hに関しては一つの金属イオンとの結合を、IZ-HHに関しては二つの金属イオンとの結合を想定した。円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により、実際に金属イオンとの結合に伴う構造変化の評価を行った。その結果、IZ-Hに関しては、金属イオンを添加する前よりすでにコイルドコイル構造の形成が見られたが、IZ-HHに

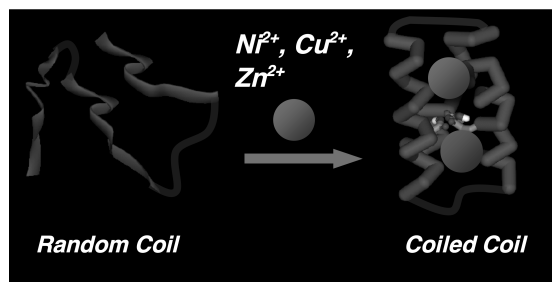


Fig.4 Structural transition of IZ-HH by the metal binding.

Table 1 Analyses of the thermodynamic parameters of IZ-H and IZ-HH in binding with various metal ions by the ITC measurements.

Metal ion	Ratio	ΔH (J mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	K_d (nM)
IZ-H				
Ni ²⁺	0.9	-49900	-15.9	17.6
Cu ²⁺	0.8	-62900	-92.2	800
IZ-HH				
Ni ²⁺	1.7	-35200	15.5	130
Cu ²⁺	1.9	-59900	-58.9	60.0
Zn ²⁺	1.7	-13800	71.2	570

関しては金属イオン非存在下においてはほとんどランダムな構造であった。これはペプチド配列をリンカーでつなぐことにより相互作用が強められた為に、IZ-Hのように6個のHis残基の導入による不安定化のみでは不十分であったが、IZ-HHのように12個のHis残基の導入により十分な構造不安定化が得られたと考えられる。さらに、IZ-HHでは、Ni²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺等の金属イオンの添加によりコイルドコイル構造形成の回復も見られた (Fig.4)。それぞれのペプチドと各種金属イオン間の結合定数を等温滴定熱量測定により評価をしたところ (Microcal社, MCS-ITCを使用)、IZ-HHに関しては、特にCu²⁺に対して高いアフィニティーが見られ、その解離定数の値は60 nMに達した (Table 1)。また、Ni²⁺、Zn²⁺に対しても130 nM、570 nMと、いずれも1 μM以下の高いアフィニティーであった (Fig.5)。 ΔH は結合の強さとほぼ相関しており、金属イオンの配位結合やコイルドコイル構造形成に伴う熱量変化を反映しているものと考えられる。化学量論比に関しても、いずれもほぼ2という値が得られ、デザインした2ヶ所の結合サイトへの結合が示唆された。一方でIZ-Hに関しては、化学量論比がいずれもほぼ1と得られ、こちらも設計した1ヶ所の結合サイトへの結合が示唆され、それらの結合親和性は、いずれ

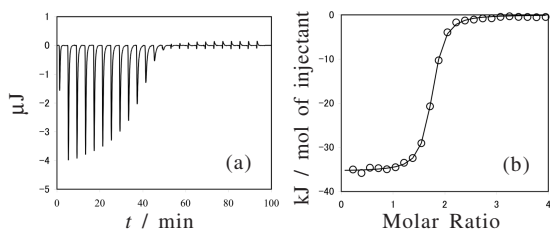


Fig.5 A typical ITC profile of the interaction between **IZ-HH** and NiCl_2 . (a) A 660 μM NiCl_2 solution injected 24 times in 5- μl increments into 15 μM **IZ-HH**. Data were obtained at 30 °C.

も 1 μM 以下であった。以上より、金属イオンとの結合に伴い、ランダム構造から3本鎖コイルドコイル構造へと、非常に大きな立体構造の変化が起こる人工タンパク質 **IZ-HH** の創製に成功した。

2.2 ヘテロコイルドコイルペプチドの設計

コイルドコイル構造の形成において、最も重要な相互作用因子は、疎水場におけるアミノ酸残基間相互作用である。もっとも典型的な例が、T. Alber らにより報告されている酵母転写因子 **GCN4** の2本鎖コイルドコイルドメインをベースに設計された、2本鎖、3本鎖、4本鎖の構造をとるコイルドコイルタンパク質であるが、これらは、疎水場を占めるアミノ酸側鎖の大きさの違いが、疎水場パッキングを起こす際の疎水コアサイズに対応し、選択性を生み出している。そこで、この疎水場におけるパッキングに着目したペプチド間のヘテロな相互作用を生み出すことを試みた。**IZ** ペプチドが3量体構造を形成する際に本来三つの **Ile** 残基により占められる疎水場空間を、側鎖の小さい **Ala** 残基二つと、それよりも大きなインドール環を側鎖に持つ **Trp** 残基一つにより置き換えた組み合わせの検討を行った。その結果、非常に選択性高く **AAB** 型のヘテロ3量体を形成できることが分かった。またその後の検討により、**Phe-Ala-Ala** の組み合わせにすることにより、より安定な **AAB** 型ヘテロ3量体のデザインが可能であることも示された (**Fig.6**)³⁰⁻³² また、これらのペプチドは単独ではランダム構造をとりバラバラに存在するが、**A** 型、**B** 型が2:1 で存在するときのみ選択的にコイルドコイル構造を形成する。すなわち、ペプチド間の選択的な相互作用により、大きな構造転移を生み出すことにも成功したといえる。

3. 設計コイルドコイルモジュールと

天然タンパク質との融合によるスイッチ機能の付与

前項までに、金属イオンあるいはペプチド間の相互作用をもとに、大きな構造変化を起こすコイルドコイルモジュ

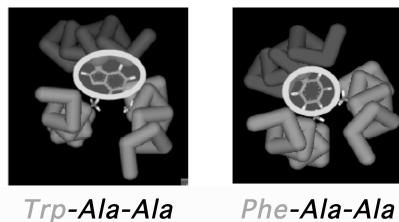
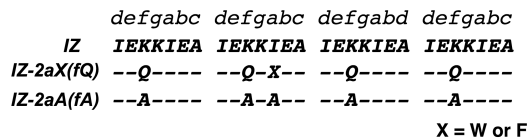


Fig.6 The **AAB**-type heterotrimeric coiled coil structure of **IZ** peptide mutants.

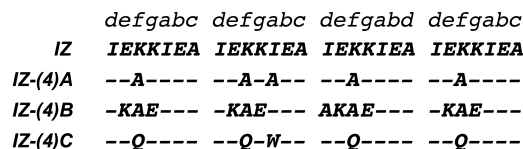


Fig.7 **IZ** peptide mutants forming the **ABC**-type heterotrimeric coiled coil structure.

ールの設計に関して述べたが、次にこれらを利用した天然タンパク質への機能スイッチ付与に関して述べたい。昨今、**RNAi**、ケミカルジェネティクス等の手法による特定タンパク質機能の失活 (**On** から **Off**) を通したタンパク質機能解析が、特に細胞生物学において有効な手法として利用されている。しかしながら、例えば特定タンパク質の *in vivo* における機能解析への応用を考えると、機能を **Off** から **On** へ変化させる有効な手法があれば、本来そちらに利点が多いことは想像に難くない。これに対する細胞生物学における手段は、強制発現位しかないことから、新たな、かつ出来れば一般性を持った特定タンパク質の機能を **Off** から **On** へ変化させる手法の開発が望まれる。

その為の方法論として、我々は下記の手法を提案している。① サーキュラーパーミューテーション (円順列変異) をターゲットとなるタンパク質に施すことにより立体構造を不安定化し、機能をいったん失活させる。ここでサーキュラーパーミューテーションとは、もともとのタンパク質の **N**-末端、**C**-末端を適当な長さのアミノ酸数~数十残基で結び、代わりにもともと繋がっていたペプチド結合の任意の位置を切開する変異体の作成手法の事をいう。② サーキュラーパーミューテーションをかけることにより、新たに生成した **N**-末端、**C**-末端に種々の外部因子依存的にコイルドコイル構造を形成するコイルドコイルモジュールをそれぞれ導入する。これにより、③ 外部因子との相互作用に伴

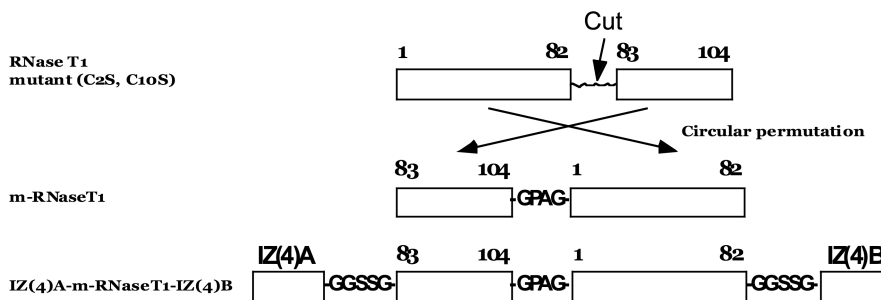


Fig.8 Construction of the RNaseT1 mutants fused with IZ(4)A and IZ(4)B.

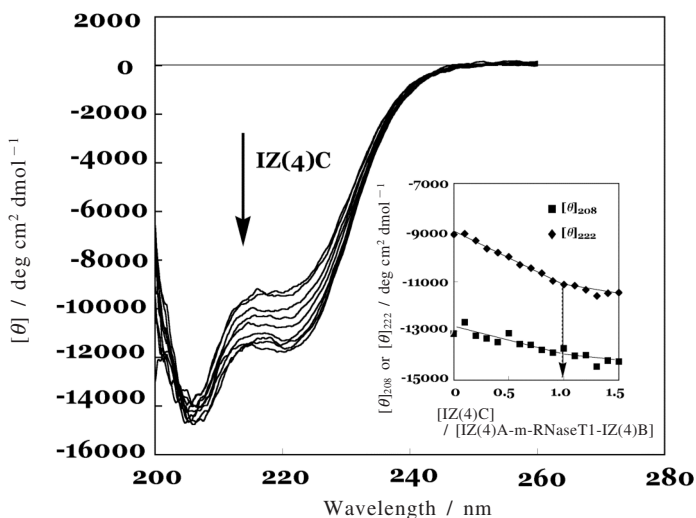


Fig.9 CD spectral changes of IZ(4)A-m-RNaseT1-IZ(4)B in addition with IZ(4)C: [IZ(4)A-m-RNaseT1-IZ(4)B] = 5 μ M, [IZ(4)C] = 0 ~ 7.5 μ M, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 $^{\circ}$ C.

う、コイルドコイルモジュールのランダムコイルからコイルドコイル構造への構造転移に伴い、サーキュラーパーミューテーションにより引き離されていたアミノ酸残基同士が近接化される。それによりターゲットタンパク質のリフォールディングと構造安定化が促され、機能回復を誘起するというものである。この方法により、天然タンパク質に対して、本来持たなかった外部因子応答性を付与することが可能になると考えた。

3.1 核酸加水分解酵素活性のペプチドリガンド依存性の付与³³⁾

そこではじめに、ターゲットタンパク質に核酸加水分解酵素として知られるRNaseT1を選び、上記の方法論の検証を行った。なおここでは、前項で述べたABB型ヘテロコイ

ルドコイルの配列を参考に設計したABC型のヘテロコイルドコイルタンパク質を利用した (Fig.7)。RNaseT1は104残基からなる加水分解酵素であり、その酵素活性には、His40とHis92が大きく関与することが知られている。³⁴⁾ また、Cys2とCys10、Cys6とCys103の間に二つのS-S結合を持っていることも知られているが、Cys2とCys10の間のS-S結合に関しては、両残基をSerに変異しても活性にほとんど影響がないことも知られている。³⁵⁾

そこで、Cys2とCys10を共にSerに変異したRNaseT1変異体をオリジナルのタンパク質として、このタンパク質に対してサーキュラーパーミューテーションを施した。サーキュラーパーミューテーションをかける為に切開する位置には、 β 5と β 6の間の β ターンの部分 (Glu82とAsn83の間) を選択し、もともとのN-末端、C-末端は4残基のり

ンカー (Gly-Pro-Ala-Gly) で繋いだ (Fig.8)。CD スペクトル測定より、この変異体 (m-RNaseT1) の二次構造評価を行った結果、このような変異を施すことにより、立体構造の大きな不安定化が観測された。一方でこの新たに生成したN-末端、C-末端に、ABC型のヘテロコイルドコイルタンパク質のうちのA型、B型ペプチド (IZ(4)AとIZ(4)B) を導入した変異体 (IZ(4)A-m-RNaseT1 -IZ(4)B) を作製し、この二次構造の評価を行ったところ、若干の安定化が見られたが、依然構造不安定化が観測された。一方で、この変異体に対してABC型のヘテロコイルドコイルタンパク質のうちのC型ペプチド (IZ(4)C) を添加したところ、1:1で飽和が見られる結合挙動が、CDスペクトル測定を用いた滴定実験より明らかとなった (Fig.9)。

そこで実際に、この変異体のIZ(4)C添加前後での酵素活性の比較を行った。基質にはGpCを用い、ホスホジエステル結合の加水分解の伴う淡色効果 (A_{250} の値の上昇) を利用した。その結果、IZ(4)C添加前にはほとんど見られな

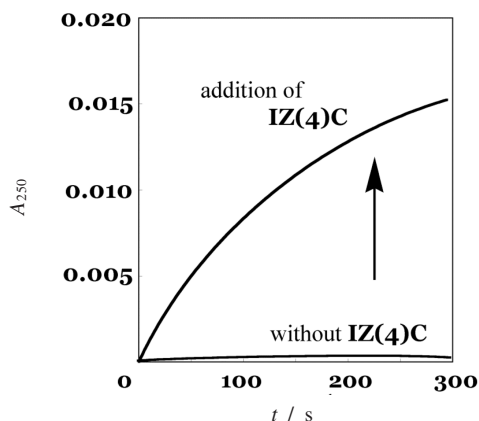


Fig.10 Recovery of RNase T1 enzymatic activity by the interaction with IZ(4)C: [IZ(4)A-m-RNaseT1-IZ(4)B] = 250 nM, [IZ(4)C] = 25 μM, [GpC] = 50 μM, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 °C.

った加水分解活性が、IZ(4)Cの添加により、明らかな上昇が観測された (Fig.10)。具体的に、Lineweaver-Burk plotを用いた解析から算出した、 k_{cat} 、 K_m などのパラメーターをTable 2に示した。残念ながら、IZ(4)Cの添加により回復する k_{cat}/K_m の値は、天然のRNaseT1²¹⁾に比べて2%程度ではあったが、機能活性の調節という意味では、非常に有為な知見が得られた。

3.2 金属イオン応答性緑色蛍光タンパク質変異体の構築²⁹⁾

前項では、ABC型コイルドコイルペプチド間の選択的な相互作用を利用した酵素機能のスイッチに関する検討を述べた。一方ここでは、金属イオンに応答し構造が大きく変化するコイルドコイルモジュールを蛍光タンパク質と組み合わせることで、金属イオンセンサーとなる蛍光タンパク質変異体の構築の検討結果を述べる。これはすなわち、金属イオンの存在によりターゲットとなるタンパク質機能をOnにする手法の開発例とも言える。

緑色蛍光タンパク質は238残基からなるタンパク質であり、11本のβ-ストランドと、1本のα-ヘリックスからなる。細胞内において発現、翻訳された後にβ-バレル構造が形成され、それとともにSer65, Tyr66, Gly67の連続した3残基が自発的な酸化縮合反応を起こし蛍光発色団が形成され、蛍光発光特性を持つ。³⁸⁻⁴¹⁾ 従ってこの蛍光タンパク質のフォールディングを金属イオンによって調節することが、蛍光センサーの構築に繋がると考えた。設計の方法は、前章記載のように、① サーキュラーパーミューテーションを緑色蛍光タンパク質の配列に施すことにより立体構造を不安定化し、機能をいったん失活させる。② 新たに生成した、N-末端、C-末端に金属イオン依存的にコイルドコイル構造を形成するコイルドコイルモジュールを導入する。③ 金属イオンとコイルドコイルドメインの結合、構造転移に伴い、本来繋がっていたアミノ酸残基同士が近接化され、それにより緑色蛍光タンパク質部位のフォールディングが促され、蛍光発光が誘起される (Fig.11)。そのためには、まずサーキュラーパーミューテーションにより、蛍光発光機能を失うが、新たにN-末端、C-末端となる部位にコイル

Table 2 k_{cat} and K_m values for various RNase T1 mutants at 25 °C.

	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (M)	k_{cat} / K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
wild type RNaseT1*	210	6.8×10^{-5}	3.1×10^7
RNaseT1 mutant (C2S, C10N)*	258	1.5×10^{-4}	1.7×10^6
m-RNaseT1	n.d.	n.d.	n.d.
IZ(4)A-m-RNaseT1-IZ(4)B	n.d.	n.d.	n.d.
IZ(4)A-m-RNaseT1-IZ(4)B + IZ(4)C	4.0**	9.4×10^{-6} **	4.3×10^5 **

* These data were cited from ref 36, 37. The enzymatic reaction is performed at 30 °C.

ドコイルモジュールを導入することにより、蛍光発光機能を回復できる切開位置を見つけ出す必要がある。なおここでは、クロンテック社のGFPuvをベースの蛍光タンパク質配列として用いた。

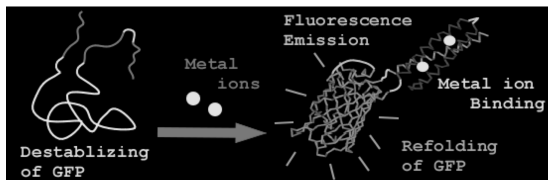


Fig.11 Trigger of the folding of Green Fluorescent Protein (GFP) by metal ions.

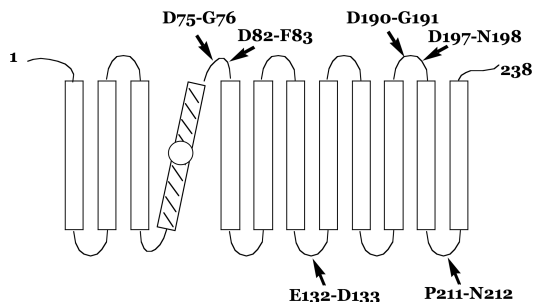


Fig.12 Structure of GFP. Open and striped rectangles indicate the 11 β -strands and the 1 α -helix, respectively. The circle indicates the position of the Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ triad, which forms the fluorescent chromophore. The positions cleaved for the circular permutation are indicated by arrowheads.

そこでFig.12に示すように、 β -シート間を繋ぐリンカー部位にあたる Asp75-Gly76, Asp82-Phe83, Glu132-Asp133, Asp190-Gly191, Asp197-Asn198, Pro211-Asn212, それぞれの間で切開したサーキュラーパーミュータントの検討を行った。もともとの蛍光タンパク質のN-末端, C-末端は、柔軟なリンカーである Gly-Gly-Ser-Gly-Gly で繋いだ。一方で予め3量体構造をとるコイルドコイルモジュールとしては、ABC型のコイルドコイルモジュールを利用し、A型とB型をリンカーでつないだものとC型を、それぞれサーキュラーパーミューテーションにより新たに生じたN-末端, C-末端に導入した (Fig.12, "cpGFP"ⁿ⁻¹-IZ-cc1 (n = 76, 83, 133, 191, 198, 212))。

その結果, Fig.11に示すいずれの位置で切開したサーキュラーパーミュータントに関しても、蛍光発光機能の消失が見られた。一方で、Asp190-Gly191の間で切開したサーキュラーパーミュータントのみ、ABC型のコイルドコイルモジュールを導入することにより蛍光回復が観測された。そこでこの変異体を¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰と名付けた。次に、¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰のN-末端, C-末端それぞれに導入するコイルドコイルモジュールとの間のリンカーの長さに関して最適化を行った。Fig.13に示すように、4残基, 6残基のリンカーを4通り組み合わせさせた変異体 (¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-cc1 ~ cc4) を作製し比較したところ、N-末端側4残基, C-末端側が6残基の長さのリンカーを用いた変異体 (¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-cc4) に関して、もっとも高い蛍光発光強度 (天然型の蛍光タンパク質の蛍光強度の約6割程度) が観測された (Table 3)。また、¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-cc1 ~ cc4での蛍光スペクトルを比較した結果、いずれも同様のスペクトル形状を取っていたことから、この蛍光強度の違いは蛍光発色団の形成に至ったタンパク質の割合の違いによると推測された。なお、これ以降用いる金属イオン応答コイルドコイル

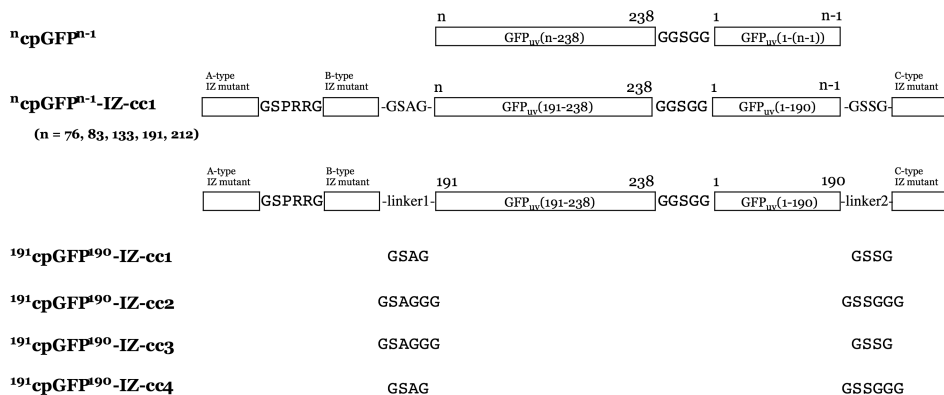


Fig.13 Structure of "cpGFP"ⁿ⁻¹ (n = 76, 83, 133, 191, 212) mutants fused with ABC-type coiled-coil peptides.

Table 3 Comparison of the linker length with the fluorescence intensities.

GFP variants	Fluorescence intensity
GFPuv	100
¹⁹¹ cpGFP ¹⁹⁰	< 2
¹⁹¹ cpGFP ¹⁹⁰ -cc1	4
¹⁹¹ cpGFP ¹⁹⁰ -cc2	23
¹⁹¹ cpGFP ¹⁹⁰ -cc3	7
¹⁹¹ cpGFP ¹⁹⁰ -cc4	55

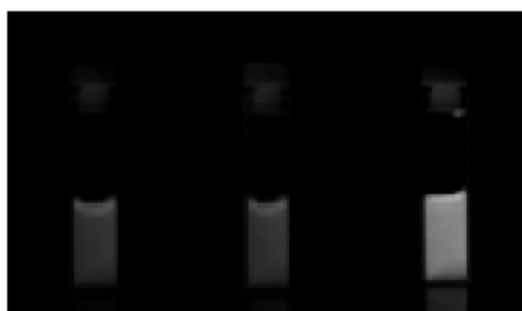


Fig.14 Fluorescence emissions of suspended *E. coli* cells, harboring the ¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-HH gene. The protein expressions were induced by the addition of IPTG (1 μM) in the LB medium (3 ml) without metal ion (left), with 500 μM Ni²⁺ (middle), and with 500 μM Cu²⁺ (right).

モジュールと間のリンカーの長さに関しても、その組み合わせを利用することとした。

次に、金属イオン応答コイルドコイルモジュールと¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰の融合タンパク質の検討を行った。前項で述べたIZ-HHの二つめのリンカー部位に、¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰の遺伝子を導入したDNA配列を含むプラスミドベクターを調製し、これを大腸菌に形質転換した。この大腸菌に発現誘導をかける際、培地に各種金属イオン (Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺) を添加し、大腸菌内での¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-HHの蛍光発色の比較を行った。IZ-HH単独では、Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺すべての金属イオンに対する配位と、それに伴うヘリックスバンドル構造の形成が見られたことから全ての金属イオンによる蛍光発色が予想されたが、興味深いことに、Cu²⁺に関してのみ非常に高い蛍光発色が観測された (Fig.14)。Zn²⁺は、Cu²⁺と比較して弱いながらも蛍光発色が見られたが、解離定数としてはCu²⁺により近い値を持つ筈のNi²⁺に関して

は、全く蛍光発色が見られなかった。次にCu²⁺に関して、培地への添加濃度と蛍光強度の比較を行った。その結果、添加濃度の上昇に伴い、明らかな蛍光強度の上昇が見られたが、一方で500 μMの添加においても、その値の飽和は見られなかった。この蛍光発色応答の各イオンの違いに関する理由の一つとしては、今回検討を行った金属イオン間での、膜透過性やイオン濃度調節機構の厳密さ等が考えられる。一般にCu²⁺イオンも含めた遷移金属イオンは、フリーの状態で存在するものは、1細胞辺り一つあるかどうかであると言われている。⁴²⁾ 一方で、一過的に細胞外での濃度上昇の起こった際の細胞膜透過性の比較を行った場合、今回検討を行ったイオンの中で、Cu²⁺は比較的膜透過性が高いと言われている。⁴³⁾ 今回の結果は、以前に言われていた現象がある程度反映したものではないかと思われる。すなわち、金属イオンに応答する構造モジュールを組み合わせることにより、タンパク質ベースの新たなセンサー分子の開発を可能にし、さらに生命現象解明におけるツールの提供も成されたと言えよう。

4. まとめ

以上より、外部刺激に応答しランダム構造からヘリカルバンドル構造へと大きな構造変化を起こすデノボ設計モジュールドメインを利用し、サーキュラーパーミューテーションと組み合わせることにより、天然タンパク質に対して種々の外部刺激応答性を付与することに成功した。コイルドコイルモジュールを導入する位置に関して、一つのターゲットタンパク質に対してある程度ランダムに検討をしていく作業はあるものの、比較的一般性を持った設計手法を提供できたのではないかと我々は考えている。一方で今回検証した手法には、まだいくつかの問題点が存在する。その一つが、サーキュラーパーミューテーションの要請として、ターゲットとする天然タンパク質のN-末端、C-末端が近い位置にある場合でないと適用できないということがある。しかしながら、これは更なるモジュールドメインの設計により解決できると期待される。すなわち、大きな構造転移を起こすモジュールドメインを外来リンカーとして、直接天然タンパク質構造の中に導入する手法である。同手法は、既に我々のグループでも検証しはじめており、すでにいくつかの初期データを得ている。また別の問題点として、外部刺激応答性を持つモジュールを、一種の異物として天然タンパク質の骨格内に導入するため、機能をOnにした場合に、天然タンパク質の元々持つ機能活性までその機能を回復させることが難しいという点がある。特定基質に対するセンサータンパク質として利用する場合であれば、必ずしもそこまで回復できなくても良いのであろうが、外部刺激により機能調節可能な新規タンパク質を設計すると

いう立場からは、さらなる検討が必要な部分ではあろう。しかしながら、昨今のタンパク質工学における、“効率の良い新規機能を持つタンパク質デザイン（いわゆるデノボ設計）手法”として一般に認識されてきているのは、ラショナルな設計とコンビナトリアルなランダム変異手法の組み合わせである。すなわち、根幹のところの基盤構造はラショナルに設計し、細部となる微妙な立体構造調節、機能活性向上では、ランダムな手法を適応するのである。今回紹介した二つの系は、いずれも最後のランダム変異による最適化までは検討を行っていないが、さらなる検討により機能活性回復の問題もある程度は解消できると期待される。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金若手研究(B)、文部科学省特定領域研究、及び稲森財団研究助成の支援を得ることにより成された研究成果であり、この場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) M. R. Capecchi, *Trends Genet.* **5**, 70 (1989).
- 2) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello, *Nature* **391**, 806 (1998).
- 3) D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliansky, and D. W. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2**, 711 (2006).
- 4) S. L. Schreiber, *Chem. Eng. News* **81**, 51 (2003).
- 5) 半田宏編, ケミカルバイオロジー・ケミカルゲノミクス, シュプリンガーフェアラーク東京 (2005).
- 6) C. Cohen and K. C. Holmes, *J. Mol. Biol.* **6**, 423-432 (1963).
- 7) J. Sodek, R. S. Hodges, L. B. Smillie, and L. Jurasek, *Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.* **69**, 3800 (1972).
- 8) W. H. Landschultz, P. F. Johnson, and S. L. Mcknight, *Science* **240**, 1759 (1998).
- 9) P. Mitchell and R. Tjian, *Science* **245**, 371 (1989).
- 10) M. A. Poirier, W. Xiao, J. C. Macosko, C. Chan, Y. K. Shin, and M. K. Bennett, *Nat. Struct. Biol.* **5**, 765 (1998).
- 11) W. Xiao, M. A. Poirier, M. K. Bennett, and Y. K. Shin, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 308 (2001).
- 12) V. N. Malashkevich, R. A. Kammerer, V. P. Efimov, T. Schulthess, and J. Engel, *Science* **274**, 761 (1996).
- 13) A. Lupas, M. V. Dyke, and J. Stock, *Science* **252**, 1162 (1991).
- 14) L. Regan and W. F. DeGrado, *Science* **241**, 976 (1988).
- 15) P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, and T. Alber, *Science* **262**, 1401 (1993).
- 16) J. Liu, W. Yong, Y. Deng, N. R. Kallenbach, and M. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 16156 (2006).
- 17) J. Liu, Q. Zheng, Y. Deng, C. S. Cheng, N. R. Kallenbach, and M. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 15457 (2006).
- 18) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, and T. Tanaka, *Protein. Eng.* **11**, 1051 (1998).
- 19) K. D. Pina, V. Desjardin, M. A. M.- Berthelot, G. Giordano, and L. F. Wu, *J. Bacteriol.* **181**, 670 (1999).
- 20) M. A. Pennella and D. P. Giedroc, *Biometals* **18**, 413 (2005).
- 21) J. P. Klinman, *Chem. Rev.* **96**, 2541 (1996).
- 22) E. I. Solomon, U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **96**, 2563 (1996).
- 23) B. L. Vallee and D. S. Auld, *Acc. Chem. Res.* **26**, 543 (1993).
- 24) J. Miller, A. D. McLachlan, and A. Klug, *EMBO J.* **4**, 1609 (1985).
- 25) M. S. Lee, G. L. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case, and P. E. Wright, *Science* **245**, 635 (1989).
- 26) T. Kiyokawa, K. Kanaori, K. Tajima, M. Koike, T. Mizuno, J. Oku, and T. Tanaka., *J. Pept. Res.* **63**, 347 (2004).
- 27) T. Kiyokawa, K. Kanaori, K. Tajima, and T. Tanaka, *Biopolymer* **55**, 407 (2000).
- 28) T. Tanaka, T. Mizuno, S. Fukui, H. Hiroaki, J. Oku, K. Kanaori, K. Tajima, and M. Shirakawa, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14023 (2004).
- 29) T. Mizuno, K. Murao, Y. Tanabe, M. Oda, and T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11378 (2007).
- 30) A. Kashiwada, H. Hiroaki, D. Kohda, M. Nango, and T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 212 (2000).
- 31) T. Kiyokawa, K. Kanaori, K. Tajima, K. Kawaguchi, T. Mizuno, J. Oku, and T. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **10**, 3548 (2004).
- 32) Y. Sakurai, T. Mizuno, H. Hiroaki, J. Oku, and T. Tanaka, *J. Pep. Res.* **66**, 387 (2005).
- 33) S. Yuzawa, T. Mizuno, and T. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **12**, 7345 (2006).
- 34) C. N. Pace, U. Heinenmann, U. Hahn, and W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343 (1991).
- 35) L. M. Mayr, D. Willbond, O. Lamdt, and F. X. Schmid, *Protein Sci.* **3**, 227 (1994).
- 36) J. R. Brandts and K. J. Kaplan, *Biochemistry* **12**, 2011 (1973).
- 37) G. Marutake, W. Shalongo, and E. Stellwagen, *Biochemistry* **30**, 4245 (1991).

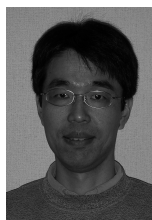
- 38) O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga, *J. Cell Comp. Physiol.* **59**, 223 (1962).
- 39) M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington, *Science* **273**, 1392 (1996).
- 40) D. P. Barondeau, C. D. Putnam, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, and E. D. Getzoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 12111 (2003).
- 41) D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, and E. D. Getzoff, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4685 (2006).
- 42) T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, and T. V. O'Halloran, *Science* **284**, 805 (1999).
- 43) S. M. Herd, J. Camakaris, R. Christofferson, P. Wookey, and D. M. Danks, *Biochem. J.* **247**, 341 (1987).

要 旨

種々の外部刺激（イオンや有機分子等のリガンド）に
 応答し機能活性の変化する人工タンパク質を自在に設計でき
 れば、特定リガンドに対するセンサータンパク質の構築や、
 部位特異的に働くタンパク質医薬の創製、あるいは機能未
 知な天然タンパク質機能の解明に対するツールの提供等、
 その工学的応用は計り知れない。ここでは、特にタンパク
 質工学的な立場からこの問題を解決する方法論の一つとし
 て、比較的手の加え易い設計タンパク質モジュールと、タ
 ーゲットとなる天然タンパク質との組み合わせを考えた。
 すなわち、天然にも広く見られる構造ドメインの一つであ
 る α -ヘリカルコイルドコイルをベースに、種々の外部刺激
 に応答し、ランダム構造からバンドル構造へと大きく構造
 変化を起こす外部刺激応答モジュールを新たに設計し、こ
 れを天然タンパク質中に遺伝子工学的に組み込む事により、
 その機能活性に大きな摂動を起こす事を期待した。実際に、
 加水分解酵素、蛍光タンパク質等にこのモジュールを適応
 する事により、特定ペプチド、イオン等による機能調節に
 成功している。



水野稔久 Toshihisa Mizuno
 名古屋工業大学大学院工学研究科,
 Graduate School of Engineering, Nagoya
 Institute of Technology, TEL.&FAX.
 052-735-5237, e-mail: toshitcm@nitech.
 ac.jp
 研究テーマ：タンパク質設計, 超分子化
 学
 趣味：ドライブ



織田昌幸 Masayuki Oda
 京都府立大学大学院生命環境科学研究科,
 Graduate School of Life and
 Environmental Sciences, Kyoto
 Prefectural Univ., TEL.&FAX. 075-703-
 5673, e-mail: oda@kpu.ac.jp
 研究テーマ：タンパク質科学
 趣味：スポーツ観戦, 旅行



田中俊樹 Toshiaki Tanaka
 名古屋工業大学大学院工学研究科,
 Graduate School of Engineering, Nagoya
 Institute of Technology, TEL.&FAX.
 052-735-5210, e-mail: ttanaka@nitech.
 ac.jp
 研究テーマ：ペプチド工学, タンパク質
 工学
 趣味：植物栽培, 食物一般