

生命化学研究レター

(2009 年 10 月)

2. 巻頭言

2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium
(SJBCS2009)

University of Bern **Jean-Louis Reymond**

4. 研究紹介

4. 細菌の侵入を分子パターンで検知する生体防御システム ～細菌細胞表層成分の合成と自然免疫活性化機構の解析～

大阪大学大学院理学研究科 **藤本 ゆかり**

10. 刺激応答性設計蛋白質を利用した天然蛋白質 Off から On への制御

名古屋工業大学大学院工学研究科 **水野 稔久**

18. 外部刺激応答性機能をもつ分割型タンパク質の設計 に関する試み

東北大学多元物質科学研究所 **坂本 清志**

25. 論文紹介「気になった論文」

京都大学化学研究所 **森崎 達也**

東京大学大学院工学系研究科 **岩崎 一浩**

31. シンポジウム等会告

第 12 回生命化学研究会～化学者だからできる生命科学～

32. お知らせコーナー

受賞・会員異動のお知らせ

編集後記

卷頭言

2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS2009)

Jean-Louis Reymond

Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern

Swiss and Japanese chemical biologists have gotten to know each other recently. This started two years ago at the occasion of the 1st Japan-Switzerland Symposium on Chemical Biology held in Lausanne, Switzerland. This year, the Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium (SJBCS) was the 2nd event, taking place 11-12 September in Komaba, Tokyo. The meeting was organized by Hiroaki Suga (Organizing Chair, Univ. Tokyo) and Kouhei Tsumoto (Acting Organizer, Univ. Tokyo). The conference included 28 lectures and 52 posters, and around 100 participants.



As chemical biology goes these days, the idea was to provide a forum for the presentation and exchange of ideas and results that would accommodate a diversity of interests. There were four sessions, entitled “mechanisms and engineering of biomolecules”, “biological probes and therapeutic methods”, “natural product synthesis and engineering”, and “biological sensors and systems”. The exhaustive program including abstracts can be found at the meeting website (<http://www.cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp/FBC/SJBCS2009>). The lectures took place in a relaxed atmosphere, and allowed us to discover how broad and fascinating the forefront of chemical biology can be.

Although there were four sessions, I think it is fair to say that two research areas were dominant in this meeting. The first area concerns the problem of imaging biochemical processes in living cells and organisms. What chemical biologists do here is to devise new sensor systems using recombinant proteins or DNA and synthetic reporter groups, as shown by Kai Johnsson (EPFL) in

his lecture on glutamate sensors, Takeaki Ozawa (Univ. Tokyo) on the design of new fluorescent proteins, and many others. The second area deals with drug discovery, that is inventing new molecules that control pathological processes. Contributions included the reports by Junko Ohkanda (Osaka Univ.) on the design of prenyl transferase inhibitors, by Dario Neri (ETHZ) on innovative immunotherapies for cancer, by Teruhiko Matsubara (Keio Univ.) on oligosaccharide-binding peptides as antivirals, and many others. Science also extended into catalysis, synthesis, membrane chemistry and biology, systems biology and microscopy. Many of the more advanced and innovative experiments were reported by starting faculty members, a very good sign for the future of chemical biology.

Having known Hiroaki Suga for many years, going back to student times in Switzerland, I knew that he would take care not only of having excellent science, but also an excellent environment. Indeed, in the lecture hall, the discussions were lively. Outside, the coffee breaks and poster sessions were animated. And in the evening, the dinners and after-dinner parties were, yes, even much more than this. In all of this, Hiro took responsibility by participating directly, showing the way. Many of the swiss guests visited Japan for their first time, and our japanese hosts have made it such that this will not be the last. As I was having breakfast with three swiss colleagues in the Tokyo terminal on sunday morning, we all went for sushi, not really wanting to leave. Thank you Hiro for this wonderful event! Can we try to match this with swiss cheese fondue in two years time?



研究紹介

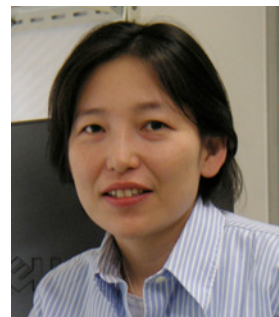
細菌の侵入を分子パターンで検知する
生体防御システム

～細菌細胞表層成分の合成と自然免疫活性化機構の解析～

大阪大学大学院理学研究科化学専攻

藤本 ゆかり

(yukarif@chem.sci.osaka-u.ac.jp)



1. はじめに

細菌菌体に免疫増強作用のあることは 20 世紀半ばより知られていたが、微生物由来成分の免疫活性化機構については、1996 年の受容体発見以来ここ 10 年ほどの間に大きく理解が進んだ。このような生体防御機構は、“自然免疫”と呼ばれ、生体防御に大きな役割を果たしていることが明らかになってきている。自然免疫は、感染防御の第一線を担っており、主として微生物特有の共通分子構造を受容体が認識する事によって活性化されるが、進化的に古い起源を持ち、植物、昆虫からヒトを含む哺乳類に至るまで広く多細胞生物において類似の機構を持つ事が明らかになっている。高等脊椎動物においては、リンパ球を主体とした抗体抗原反応等の遺伝子の再編成を伴う防御機構である“獲得免疫”の活性化・制御にも重要な役割を果たしている。

自然免疫の分子レベルでの理解において、化学領域の研究が大きな役割を果たしており、特に純粋な天然由来成分の単離が非常に難しい複合糖質分子については、有機化学的に合成された純粋な化合物が不可欠となっている。(天然由来の化合物を用いたために、夾雑物として含まれていた他の活性成分によって、非常に混乱した生物活性に関する結果が導き出されている例も多い。) 我々のグループでは、化学的な手法による免疫刺激細菌由来分子ライブラリの構築と、それを用いた種々の受容体タンパク質・認識タンパク質群の探索、認識部位の解析および認識タンパク質の機能の解析を行っており、有機合成化学を基盤として生体防御機構の解明を行っている。

本稿では、現在我々のグループにおいて進めている種々の細菌由来の自然免疫活性化因子に関する研究の

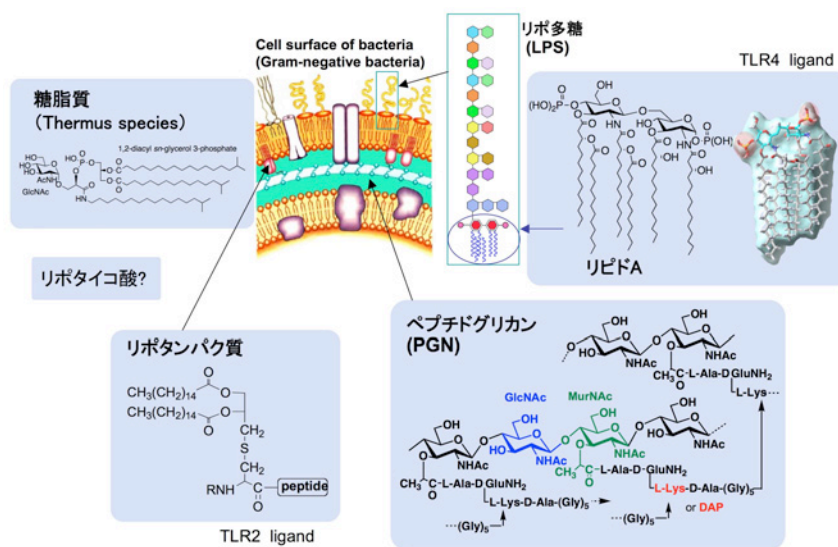


図 1 免疫を活性化する細菌細胞表層成分

うち、主として、細菌細胞壁ペプチドグリカン、細胞表層に存在するリポタンパク質の化学合成と機能解析についてご紹介する。

2. 細菌細胞壁ペプチドグリカンの化学合成と認識機構解析

～幾重にも張り巡らされた細菌細胞壁成分の認識システム～

細菌の細胞表層にある細胞壁は、ペプチドグリカン (PGN) と呼ばれる糖ペプチドが構成しており、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) が β 1-4 結合により交互に結合した糖鎖をペプチド鎖が架橋した網目状構造を持つ (図 1)。ペプチド鎖は菌種によって多少の差異はあるものの、ムラミン酸に結合したジペプチド部位はほとんどの細菌において構造が保存されている他、分岐部位のアミノ酸はグラム陽性菌では主としてリジン (Lys)、グラム陰性菌および一部のグラム陽性菌ではジアミノピメリン酸 (DAP) であるものが多く、広く類似の構造を持つことが知られている。

PGN が免疫増強活性を持つことは以前より知られており、その最小活性構造としてムラミルジペプチド (MDP) が知られていたが [5,6]、その認識機構は長年の研究においても明らかになっていなかった。1998 年、自然免疫受容体として Toll-like receptor の発見後、天然由来のペプチドグリカンを用いた実験結果から Toll-like receptor (TLR) 2 が受容体であるとされていたものの、生物活性を持つ夾雑物の混入の可能性が否定できず、大きな議論となっていた [7-9]。

そこで、まず、図 2 に示した種々のペプチドグリカン・フラグメントを化学合成したライブラリを構築した。合成した化合物を用い、受容体探索を行った。また、ライブラリ化合物を用いて、様々な認識タンパク質、特に PGRP (Peptidoglycan recognition protein) による認識、被認識リガンド構造、機能についても解析した (図 2)。その結果、図 2 の PGN 合成フラグメントは、いずれも TLR2 を活性

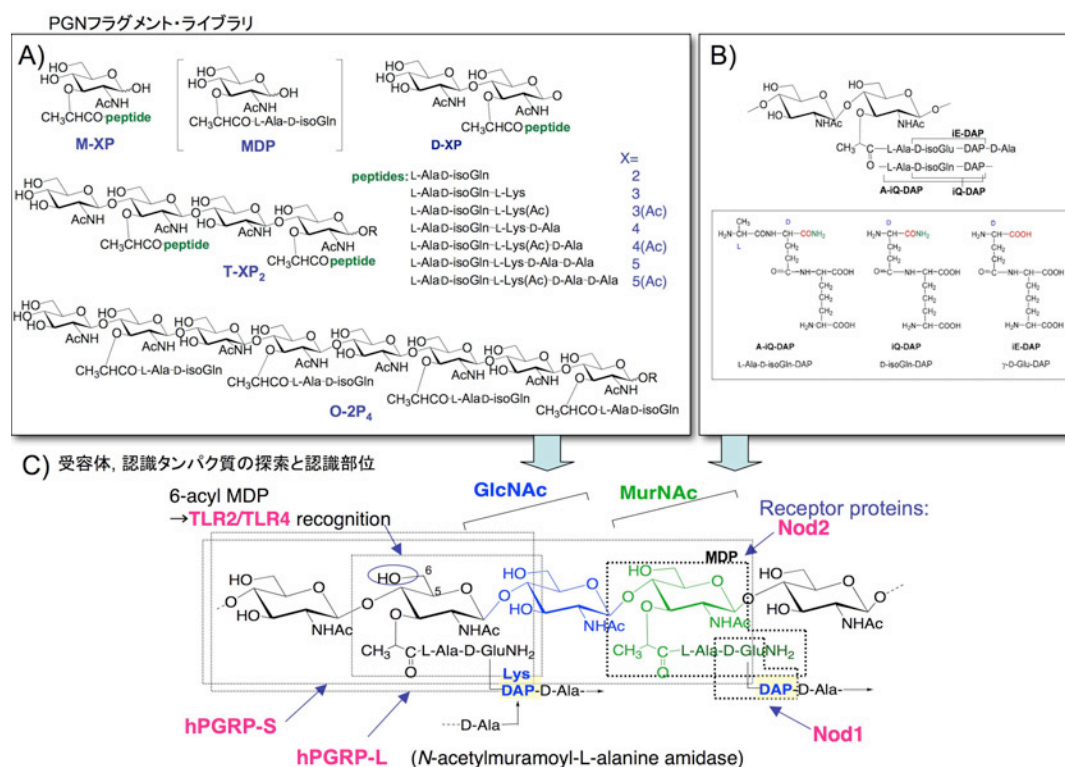


図 2 化学合成ペプチドグリカン・フラグメント・ライブラリ(A)Lys 型および(B)DAP を含むペプチド部位。(C) 合成化合物を用いて見出した受容体 (Nod1 [1], Nod2 [2]) および PGN 認識タンパク質 (hPGRP-S (PGLYRP-1) [3], hPGRP-L (PGLYRP-2) [4])。

化しなかった [2b]。現在も議論のあるところではあるが、TLR2 リガンドは主として細菌由来リポタンパク質／リポペプチドであると考えられており、他のリガンドと考えられている成分については、リポタンパク質／リポペプチドの混入が疑われる場合が多い。一方、ミシガン大学の Nuñez、猪原らと共同で、PGN の受容体タンパク質が Nod1、Nod2 であること、Nod1 がグラム陰性菌の PGN に特有のジアミノピメリン酸 (DAP) を含む γ -D-glutamyl-diaminopimelic acid (iE-DAP) を認識すること、Nod2 が muramyl dipeptide (MDP) を最小リガンドとして認識することを初めて明らかにしている [1,2]。Nod1、Nod2 の最小リガンドについては合成化合物を用いて決定したが、実際の環境中に存在するリガンドについては、種々の腸内細菌を含む常在菌、発酵菌の培養液および菌体について、Nod1、Nod2 の刺激活性が猪原らにより測定され、特に DAP 含有 PGN を持つ細菌の上清に強い Nod1 刺激活性を示すものが多いことが明らかになっている [10]。現在、培養液上清から天然リガンドの単離・解析を行っており、実際の環境中に存在し生物に直接作用しているリガンドを明らかにしつつある。

Nod1 については、その遺伝子変異が喘息等のアレルギー疾患発症と関連することが明らかになっていたものの [11]、実際の機能については不明な部分が多かった。一方、種々の Nod1 リガンドについては化学合成例が少なく、Nod1 が天然の PGN リガンド構造をどのように認識するかについても明らかでなかったため、PGN の繰り返し単位構造 **1**、気管上皮細胞毒素 (TCT; Tracheal cytotoxin) **5** およびそのフラグメント (図 3) について最初の合成を行った (スキーム 1) [12]。meso-DAP 部位の合成に関しては、セリンから誘導したアルデヒド **9** およびスルホン **10** を用い Julia-Kocienski 反応を用いて骨格形成を行った。得られた合成化合物 **1** ~ **8** についてヒト型 Nod1 刺激活性を観測したところ、単糖、二糖、あるいはアンヒドロ型であるなしにかかわらず、トリペプチド体 (**2**、**4**、**6** および **8**) が強い活性を示すのに対し、テトラペプチド体 (**1**、**3**、**5** および **7**) が iE-DAP より

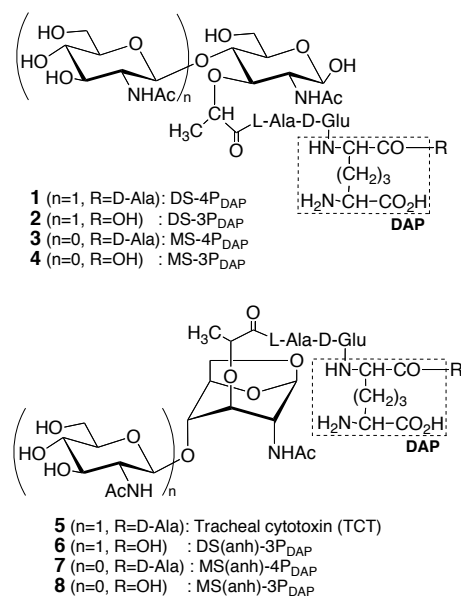
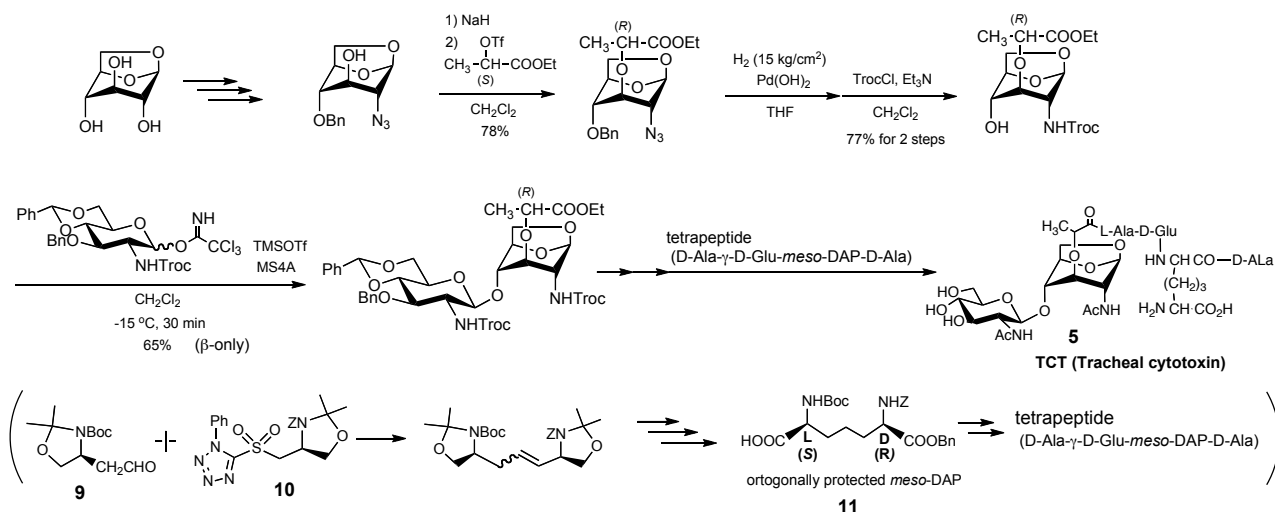


図3 DAP 型ペプチドグリカン繰り返し単位構造 **1**、気管上皮細胞毒素 (TCT) **5**、およびそのフラグメント



スキーム 1. 気管上皮細胞毒素 (TCT; Tracheal cytotoxin) の合成

も活性が弱いことが明らかとなり、DAP の C 末端側の構造がヒト型 Nod1 の認識に重要であることが示された [12]。

Nod1 の機能解明のため *in vivo* での解析を目指したが、当初我々の見出した最小構造のリガンド iE-DAP は活性が弱く *in vivo* での機能解析に用いることは困難であった。そこで、誘導体化による活性増強を試みた。すなわち、iE-DAP の N 末端に種々のアシル基を導入することにより主として膜透過性の向上を図り、強い活性をもつリガンドを得ることとした。図 4 に示した RCO-iE-DAP を固相法を用いて合成し活性を測定したところ、ミリスチイル基 (C14) を導入した場合 (KF1B) に、iE-DAP に比べ数百倍の Nod1 刺激活性を示すことを明らかにした [13]。こうして得られた KF1B を用い、マウス腹腔内投与による *in vivo* での Nod1 の機能解析を猪原らとともにに行った。その結果血清中で白血球遊走作用のあるケモカイン (CXCL1、CXCL2、CXCL8(IL-8)、CCL2 等) の誘導が観測され、炎症性のサイトカインはほとんど観測されなかった。この結果により Nod1 の *in vivo* での機能を初めて明らかにした [14]。

3. 細菌細胞表層成分リポタンパク質

細菌由来のリポタンパク質は、強い免疫刺激活性・抗体産生誘導活性を持ち、自然免疫受容体 TLR2 の主要なリガンドとして考えられている。最近まで、マイコプラズマ、グラム陰性細菌のリポタンパク質の単離解析の例はあったが、グラム陽性菌の TLR2 リガンドについては、単離・解析が試みられていたものの議論が多く、明らかな構造が示されていなかった。そこで、我々は、まず、*Staphylococcus aureus* に存在するリポタンパク質について、その遺伝子配列より、リポタンパク質特有のコンセンサス

配列を持つタンパク質を抽出し DOLOP (Database of bacterial lipoproteins; <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>) [15] を用いて 56 個のリポタンパク質を予測した。これらの mRNA 発現効率を解析し、その中から、14 種のリポタンパク質を選び出し、N 末端側 10 残基のペプチドを含むリポペプチド 16 種を化学合成した (図 5)。これらのリポペプチドについて TLR2 刺激活性等の免疫活性化作用を測定したところ、すべてのリポペプチドが TLR2 を活性化し、そのアミノ酸配列により、TLR2 の活性化能が大きく異なることが明らかになった [16]。現在、配列依存的な選択的活性化の検討、および、受容体との結合についての構造生物学的観点での解析について研究を進めている。

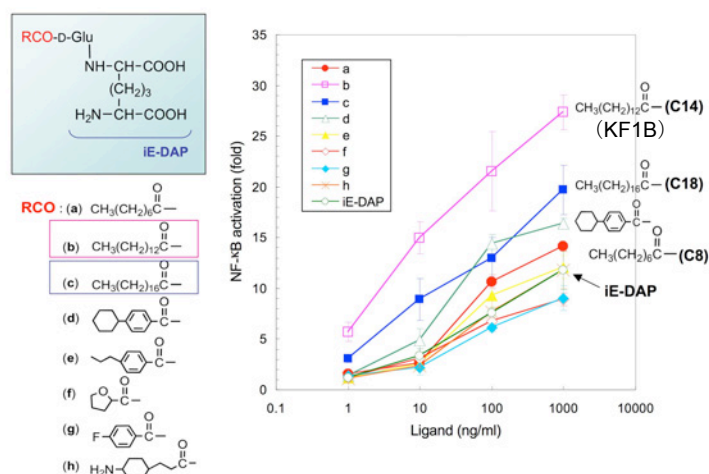


図4 アシル化iE-DAPのNod1刺激活性。Human Nod1を強制発現したHEK293Tを用い、各濃度のサンプルと培養後、ルシフェラーゼレポーターアッセイによるNF-κB 活性化測定。

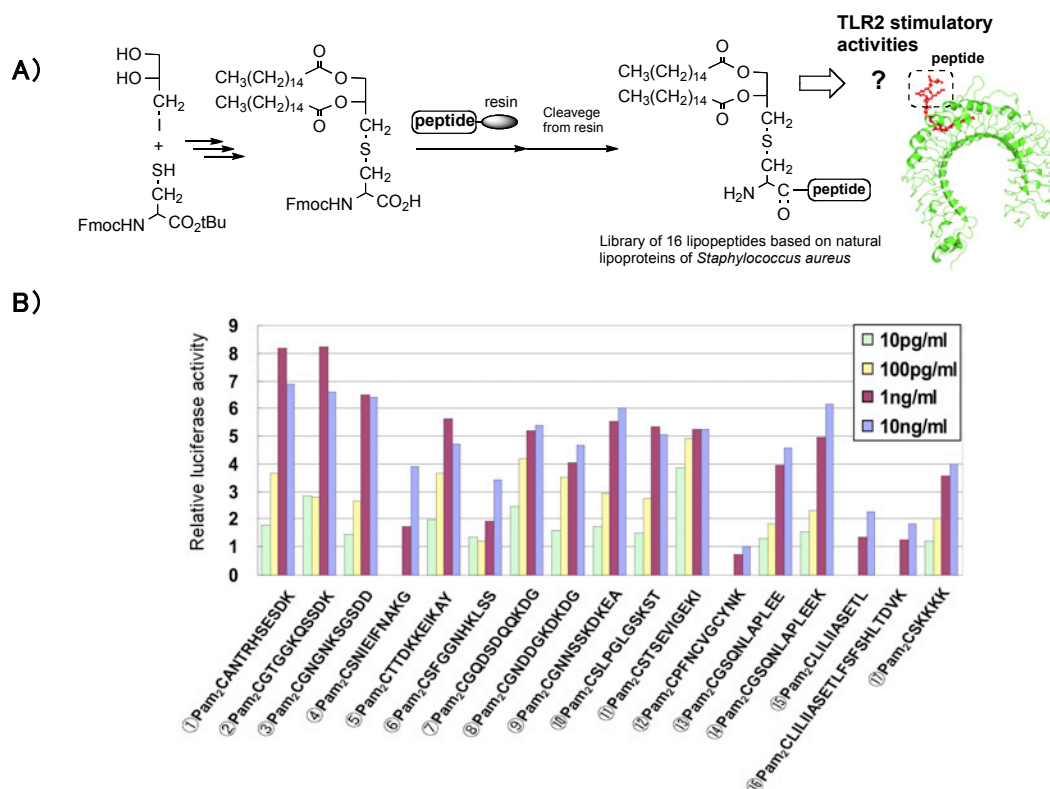


図5 A) リポペプチドの合成と TLR2 刺激活性解析。B) TLR2 刺激活性。Ba/F3 細胞に mouse TLR2 を過剰発現し、各濃度のサンプルと培養後、ルシフェラーゼレポーターアッセイによる NF-κB 活性化測定。

4. おわりに

我々は、上記の化合物を中心とした細菌由来の自然免疫刺激活性化合物ライブラリを構築し、活性分子群を用いた種々の解析を進めてきた。さらに現在は、もう一步踏み込んで、ライブラリ化合物を用いて免疫刺激および抑制の制御を可能とする複合分子の構築を試みている。研究を進めるにつれ、最近の免疫学における大きな変化と進歩を実感する反面、高等生物において微生物との共生と戦いの長い進化の歴史の中で構築されてきた幾重にも重なった生体防御システムの深淵を目の当たりにする毎日である。

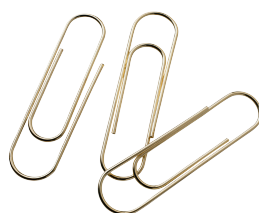
謝辞

本研究は、大阪大学大学院理学研究科（深瀬研究室）において行った研究であり、多くのサポートを頂いた深瀬浩一教授に感謝申し上げます。また、共同研究を行ってきたミシガン大学医学部の猪原直弘先生、長谷川瑞穂博士、鹿児島大学大学院理工学研究科の橋本雅仁先生、北海道大学大学院医学研究科の瀬谷司先生、また、多くのディスカッションと実験を進めてくれた共同研究者の学生さん達、そして本研究にご協力を賜った全ての方にお礼申し上げます。

参考文献

- [1] Chamailard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nuñez, G., Inohara, N., *Nat. Immunol.* **2003**, 4, 702.

- [2] a) Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foser, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., Nuñez, G., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5509. b) Inamura, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Shiokawa, Z., Woelk, E., Heine, H., Lindner, B., Inohara, N., Kusumoto, S., Fukase, K., *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 232.
- [3] Cho, J. H., Fraser, I. P., Fukase, K., Kusumoto, S., Fujimoto, Y., Stahl, G.L., and Ezekowitz, R. A. B., *Blood* **2005**, *106*, 2551.
- [4] Wang, Z-M., Li, X., Cocklin, R. R., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Gupta, D., Dziarski, R., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49044.
- [5] Kotani, S., Watanabe, Y., Kinoshita, F., Shiba, T., Kusumoto, S., Tarumi, Y., Ikenaka, K. et al. *Biken J.* **1975**, *18*, 105.
- [6] Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R., Lederer, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *59*, 1317.
- [7] Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Nahori, M. A., Werts, C., Boneca, I. G., et al. *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 1000 .
- [8] Dziarski, R., Gupta, D. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 5212.
- [9] Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., Alexander, C. *Immunobiology* **2008**, *213*, 205.
- [10] Hasegawa, M., Yang, K., Hashimoto, M., Park, J. H., Kim, Y. G., Fujimoto, Y., Nuñez, G., Fukase, K., Inohara, N. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29054.
- [11] P. Hysi, M. Kabesch, M. F. Moffatt, G. Nuñez, N. Inohara, W. O. Cookson, et al. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 935.
- [12] Kawasaki, A., Karasudani, Y., Otsuka, Y., Hasegawa, M., Inohara, N., Fujimoto, Y., Fukase, K. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10318.
- [13] Hasegawa, M., Kawasaki, A., Fujimoto, E., Nunez, G., Fukase, K., Inohara, N. et al. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 11757.
- [14] Masumoto, J., Yang, K., Varambally, S., Hasegawa, M., Tomlins, S. A., Qiu, S., Fujimoto, Y., Kawasaki, A., Foster, S. J., Horie, Y., Mak, T. W., Nunez, G., Chinnaiyan, A. M., Fukase, K., Inohara, N. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 203.
- [15] Madan Babu, M., Sankaran, K. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 641.
- [16] Fujimoto, Y., Hashimoto, M., Furuyashiki, M., Katsumoto, M., Seya, T., Suda, Y., Fukase, K. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2273.



研究紹介

刺激応答性設計蛋白質を利用した
天然蛋白質の Off から On への制御

名古屋工業大学大学院工学研究科

水野 稔久

(toshitcm@nitech.ac.jp)



1. はじめに

天然蛋白質を、様々な外部刺激(pH、イオン、光、リガンドとなる分子など)により、その機能を On-Off 制御可能な変異体へ改変する手法の開発は、特定対象に対するタンパク質ベースのセンサー分子の開発や、機能未知の天然蛋白質の細胞内ネットワークにおける機能解析などへの応用が期待され興味深い。これまでに、天然蛋白質の中から特定基質にのみ結合する基質結合ドメインを切り出して、蛍光蛋白質や酵素類の配列にハイブリッド化することにより、センサー特性を示す変異体の構築が種々の研究者により検討されており、例えば、カルモジュリンのカルシウム結合サイトを利用した、蛍光性カルシウムセンサーCameleon はよく知られている例のひとつである。

一方我々のグループでは、種々の外部刺激に応答して立体構造が構築される人工蛋白質のデザインという観点から、これまでに α -ヘリカルコイルドコイルモチーフ蛋白質に着目をして研究を展開してきており、pH の変化、光の照射、特定の金属イオン、ペプチドリガンド等の添加に応答し、ランダム構造から、コイルドコイル構造へと非常に大きな構造変化を起こす人工蛋白質の構築に成功してきている。これらの蛋白質は、天然蛋白質由来の基質結合ドメインとは異なる特性を持つため、これらを利用した刺激応答性蛋白質の構築は非常に興味深いと思われる。ここでは、ペプチドリガンド依存的に活性調節可能な加水分解酵素の構築、金属イオン依存的に発色する緑色蛍光蛋白質の構築、さらにはペプチドリガンド依存的に蛋白質-蛋白質間相互作用を調節することにより、蛋白質複合体の機能調節を行った例などについて紹介する。

2. 外部刺激依存的に構造変化を起こすコイルドコイル蛋白質の設計

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、天然蛋白質にも広く見られる構造モチーフの一つであり、両親媒性の α -ヘリックスが2から5本寄り集まった超らせん構造を取る。元々はトロポミオシン等の繊維状蛋白質^{1, 2)}の中から見いだされてきたが、GCN4 等の転写因子蛋白質^{3, 4)}、SNARE などの膜融合蛋白質、Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)のような膜外マトリックス蛋白質⁵⁻⁷⁾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蛋白質の5%には、この構造モチーフ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ヘリックスを繰り返し単位と考えることができ、それぞれの位置は、

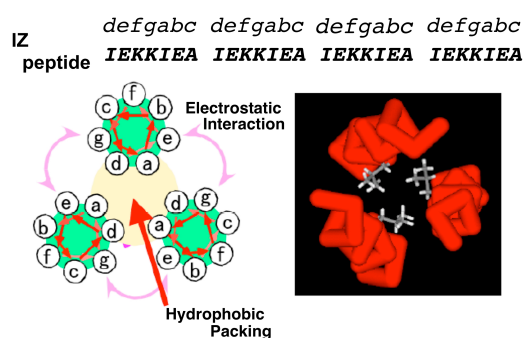


Fig. 1 The amino acid sequence of IZ peptide and its trimeric structure

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を形成し、側鎖同士はタイトにパッキングをしている。また、整数で割り切れる繰り返し単位を持つことから、アミノ酸残基の配列 (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となるため、コイルドコイル蛋白質はデノボ蛋白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っている。⁸⁾

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蛋白質、主には3本鎖コイルドコイルに関して取り組んできている。Fig. 1 には、我々のグループでオリジナルに設計された IZ ペプチドの配列を示す。⁹⁾ 3本のペプチド同士が平行に寄り集まることにより3本鎖コイルドコイル構造が形成され、疎水コアを占める a、d-位は、いずれも Ile が占める一方で、疎水場-親水場界面にあたる e、g-位は、隣接ヘリックス間で静電相互作用が働くように Glu、Lys が占める。¹H-NMR による Ile 側鎖の構造特異性、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°Cにおいてもその会合構造が破壊されない、非常に安定な設計蛋白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、これをベースに様々な外部刺激応答性を付与した変異体を構築する上でのプラットフォームとして優れていた。

2-1 金属イオン応答コイルドコイル蛋白質の設計

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ている。¹⁰⁻¹²⁾ IZ ペプチドの疎水コアを形成する Ile 残基の1つあるいは2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、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 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。ここでは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1つのペプチド鎖からなる3本鎖コイルドコイル蛋白質の設計を行った (Fig. 2)。¹³⁾

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1つの金属イオンとの結合を、IZ-HH に関しては2つの金属イオンとの結合を想定した。また、3本の α -ヘリックスを形成するペプチドは、柔軟なリンカー配列でつないだ。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 に関してはほとんどランダムな構造であった。一方で Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等の遷移金属イオンの添加により、IZ-HH はコイルドコイル構造形成の回復が見られた。IZ-HH と各種金属イオン

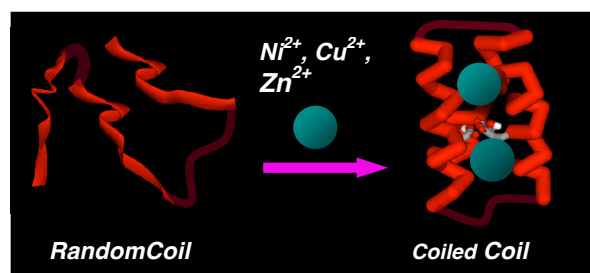


Fig.2 Structural transition of IZ-HH by the metal binding

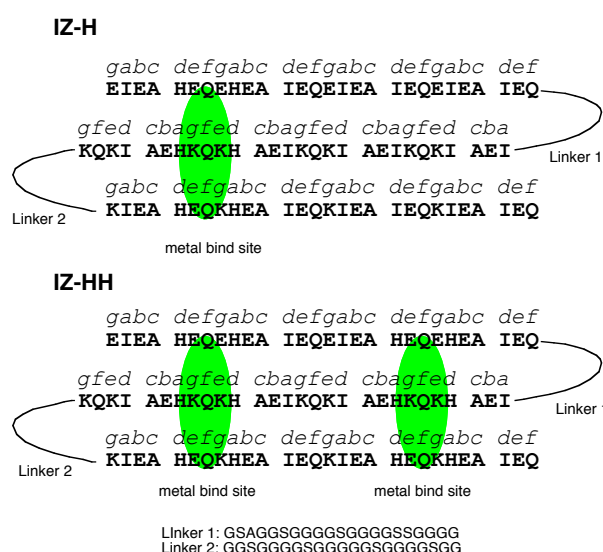


Fig. 3 Metal-binding mutants, IZ-H, and IZ-HH

ン間の解離定数を等温滴定熱量測定により評価をしたところ、特に Cu^{2+} に対して高いアフィニティーが見られ、その値は 60 nM に達した。また、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 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。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。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蛋白質 IZ-HH の構築に成功した。

2-2 ペプチドリガンドにตอบสนองしコイルドコイル構造形成が起こる変異体の構築

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は、疎水場におけるアミノ酸側鎖間の相互作用である。典型的な例として、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モチーフをベースに設計された、2 本鎖、3 本鎖、4 本鎖コイルドコイル変異体がある。ここでは、疎水場を占める a、d-位への変異により側鎖の形や大きさを変化させることで、何本のペプチドが寄り集まることにより、安定な疎水コアを形成できるか制御し、会合数の選択性を生み出した。¹⁴⁾ そこでこれに習い、まずは疎水場における側鎖のパッキングに着目したヘテロなペプチド間相互作用の創出を試みた。具体的には、IZ ペプチドが 3 量体構造を形成する際に本来 3 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 2 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 1 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、CD スペクトルによる滴定実験から非常に選択性高く AAB 型 (Ala を持つ方が A 型、Trp が B 型) のヘテロ 3 量体を形成できることが分かってきた。¹⁵⁻¹⁷⁾ また、これらのペプチドは単独ではランダム構造で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寄り集まってコイルドコイル構造を形成した。これは見方を変え、2 つの A 型ペプチドに対して、1 つの B 型ペプチドをリガンドとして添加することにより、A 型ペプチドに対してコイルドコイル構造の形成誘起を行ったとも見なせる。

また、もう一つのバリエーションとして、疎水場における静電相互作用を利用したヘテロなペプチド間相互作用の検討を行った。一般に蛋白質疎水場における親水性相互作用は、構造安定性、特異性など蛋白質全体の構造に大きな影響を与えることが知られており、異なるペプチド間での選択的な相互作用の発現が期待された。設計した配列は、Fig.5 に示す 2 つであり、 α -ヘリックスを形成する 2 つのペプチドを柔軟なリンカー配列でつないだ IZ-DS 側には、a-位、d-位に Asp、Ser 残基を、1 本の α -ヘリックスを形成するペプチドからなる IZ-3K には、Lys 残基を d-位に導入した。互いに 1:1 で相互作用が起った場合には、Asp のマイナス電荷と Lys のプラス電荷がキャンセルされることにより、それらが疎水場に留まることが可能となることを期待した。同様に CD スペクトルによる滴定実験から評価を行った結果、各々単独ではランダム構造をとるが、1:1 で存在するときのみ選択的に寄り集まってコイルドコイル構造を形成できることが分かった。¹⁸⁾ IZ-3K 側にリンカー配列を介してビオチン基を導入し、ピアコア測定により IZ-DS との解離定数の評価を行った結果、244 nM であった。

この場合においても、IZ-3K をリガンドとして見立てた場合に、IZ-DS という蛋白質の構造がリガンド依存的に、ランダム構造からコイルドコイル構造へと構造転移が誘起されたとみなせる。また、IZ-DS は 1 本のペプチド鎖であるため

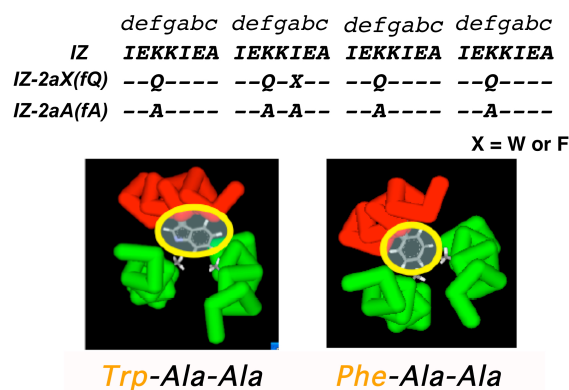


Fig. 4 The AAB-type heterotrimeric coiled coil structure of IZ peptide mutants

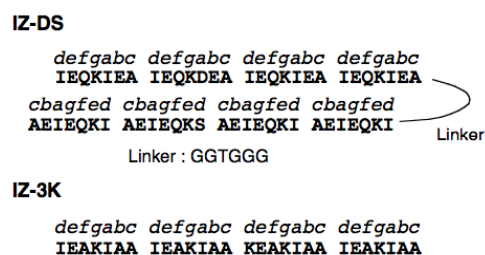


Fig.5 A pair of peptides to form the hetero coiled-coil protein in a 1:1 manner.

に、様々な天然蛋白質への導入は容易である。

3 設計コイルドコイルモジュールと天然蛋白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リガンドとの相互作用を契機に、大きな構造変化を起こす人工蛋白質の設計に関して述べたが、次にこれらを利用した天然蛋白質への機能スイッチ付与に関して述べたい。その為の1つの方法論として、我々は以下の手法を提案している。①円順列変異をターゲットとなる蛋白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。②円順列変異をかけることにより新たに生成した N-末端、C-末端に、種々の外部刺激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蛋白質の配列をそれぞれ導入する。これにより、③外部刺激に伴う、コイルドコイル部位のランダムからコイルドコイル構造への構造転移に伴い、円順列変異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蛋白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、天然蛋白質に対して、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¹⁹⁾

そこではじめに、ターゲット蛋白質に核酸加水分解酵素として知られる RNaseT1 を選び、上記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蛋白質を利用した (Fig. 6)。これらも互いに1:1:1で存在するときのみ、コイルドコイル構造を形成する。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。²⁰⁾ また、Cys2とCys10、Cys6とCys103の間に2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。²¹⁾

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蛋白質として、この蛋白質に対して円順列変異を施した。円順列変異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残基のリンカー (Gly-Pro-Ala-Gly) で繋いだ (Fig. 7)。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。次に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蛋白質のうちの 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蛋白質のうちの 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スペクトルによる滴定実験より明らかとなった。最後に、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 を使い、ホスホジエ

	defgabc	defgabc	defgabdc	defgabc
IZ	IEKKIEA	IEKKIEA	IEKKIEA	IEKKIEA
IZ-(4)A	--A----	--A----	--A----	--A----
IZ-(4)B	--KAE---	--KAE---	AKAE---	--KAE---
IZ-(4)C	--Q----	--QW---	--Q----	--Q----

Fig. 6 Three IZ mutants forming the ABC-type hetero-trimeric coiled coil structure

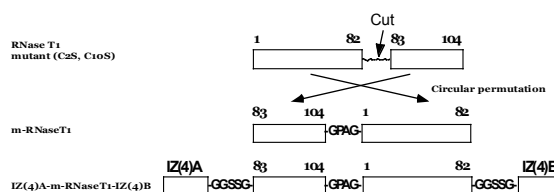


Fig. 7 Construction of the RNaseT1 mutants fused with IZ(4)A and IZ(4)B

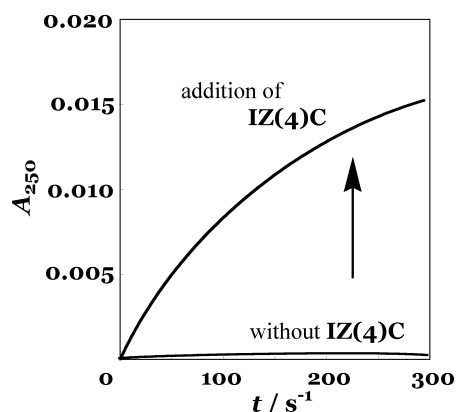


Fig. 8 Recovery of RNase T1 enzymatic activity by the interaction with IZ(4)C: [IZ(4)A-m-RNaseT1-IZ(4)B] = 250 nM, [IZ(4)C] = 25 μ M, [GpC] = 50 μ M, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 30 $^{\circ}$ C

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か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. 8)。具体的に、Lineweaver-Burk plot を用い、 k_{cat} 、 K_m などのパラメーターを算出したところ、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 RNaseT1^{22, 23)}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蛋白質変異体の構築¹³⁾

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を蛍光蛋白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蛋白質変異体の構築を行った。緑色蛍光蛋白質は238残基からなる蛋白質であり、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。²⁴⁻²⁷⁾ 従ってこの蛍光蛋白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、同様に、①円順列変異を緑色蛍光蛋白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を導入する。③金属イオンとコイルドコイル部位の結合、構造転移に伴い、円順列変異前には元々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蛋白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. 9)。そのためには、まず円順列変異により蛍光発光機能を失うが、新たにN-末端、C-末端となる部位にヘリックスバンドル構造をとったコイルドコイ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。

そこで 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円順列変異体の検討を行った。もともとの蛍光蛋白質の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として、ABC型のコイルドコイル (Fig. 6)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、それぞれ円順列変異により新たに生じたN-末端、C-末端に導入した (Fig. 10、**ⁿcpGFPⁿ⁻¹-IZ-cc1** ($n=76, 83, 133, 191, 198, 212$))。その結果、いずれの位置で切開した円順列変異体に関しても、蛍光発光機能の消失が見られた一方で、Asp190-Gly191の間で切開した円順列変異体のみ、ABC型のコイルドコイ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、以下の実験に用いた。

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蛋白質の配列と間のリンカーの長さに関して最適化を行った。Fig. 10に示すように、4残基、6残基のリンカーを4通り組み合わせた変異体 (**¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-cc1-cc4**)を作製し比較したところ **¹⁹¹cpGFP¹⁹⁰-IZ-cc4** に関して、もっとも高い蛍光発光強度 (天然型の蛍光蛋白質の約6割程度)が観測された。そこで以下の実験では、このリンカーの組み合わせを利用することとした。

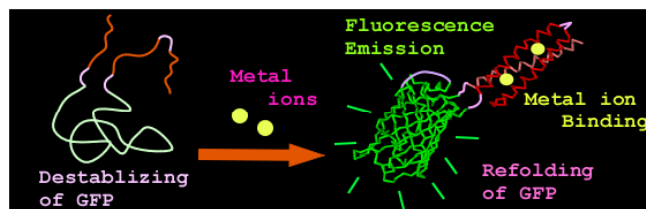


Fig. 9 Trigger of the folding of Green Fluorescent Protein (GFP) by metal ions

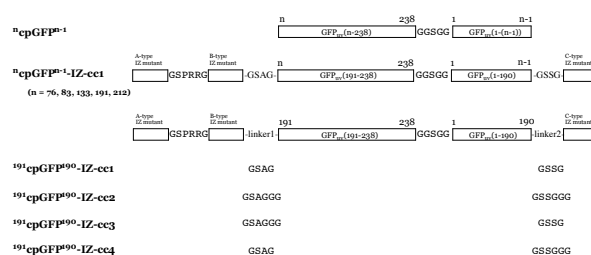


Fig. 10 Structure of **ⁿcpGFPⁿ⁻¹** ($n = 76, 83, 133, 191, 212$) mutants fused with ABC-type coiled-coil peptides.

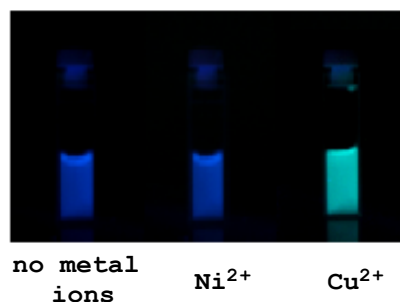


Fig. 11 Fluorescence emissions of suspended *E. coli* cells, harboring the $^{191}\text{cpGFP}^{190}$ -IZ-HH gene. The protein expressions were induced by the addition of IPTG (1 μM) in the LB medium (3 ml) without metal ion (left), with 500 mM Ni^{2+} (middle), and with 500 mM Cu^{2+} (right).

金属イオン応答コイルドコイルと $^{191}\text{cpGFP}^{190}$ の融合蛋白質の検討を行った。前項で述べた IZ-HH の2つめのリンカー部位に、 $^{191}\text{cpGFP}^{190}$ の配列を導入した変異体 ($^{191}\text{cpGFP}^{190}$ -IZ-HH) の遺伝子を導入した発現ベクターを調製し、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 (Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+}) を添加し、大腸菌内での $^{191}\text{cpGFP}^{190}$ -IZ-HH の蛍光発色の比較を行った。IZ-HH 単独では、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 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対する蛍光発色が予想されたが、興味深いことに、 Cu^{2+} に関してのみ非常に高い蛍光発色が観測された (Fig. 11)。 Zn^{2+} は、 Cu^{2+} 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 Cu^{2+} により近い値を持つ筈の Ni^{2+} に関しては、全く蛍光発色が見られなかった。次に Cu^{2+} 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1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 Cu^{2+} 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細胞あたり1つあるかどうかであると言われている。²⁸⁾ 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、 Cu^{2+} は比較的膜透過性が高いと言われている。²⁹⁾ 今回の結果は、以前に言われていたこれらの現象をある程度反映したものではないかと思われる。

3-3. ペプチドリガンドを用いた蛋白質間相互作用の調節¹⁸⁾

ここでは、ペプチドリガンド依存的に蛋白質間相互作用を Off から On へと制御を試みた例に関して述べる。細胞内では、個々の蛋白質が単独で機能を果たしている訳ではなく、それぞれの蛋白質どうしが相互作用を介して、互いに干渉し合いながら調節を図っている。その際に、特定の蛋白質から始まる相互作用のみを外部刺激依存的に On-Off できれば、細胞内でのターゲットとなる蛋白質の機能解明において、有用なツールを提供できるであろう。また一方で、例えば大腸菌内の RNA polymerase (RNAP) のような巨大蛋白質複合体の機能調節を、任意のリガンドにより On-Off 制御できた例はあまりなく、複合体内部での蛋白質間相互作用の調節で複合体全体の機能の On-Off 調節が可能となれば、こちらも興味深いところであろう。これらのことを踏まえ、ここでは、T7 RNA polymerase (T7 RNAP) とその阻害剤である T7 lysozyme の蛋白質複合体をターゲットにして、ペプチドリガンド依存的な、蛋白質間相互作用の Off から On への制御を試みた。

また前の2項では円順列変異法と組み合わせた手法の検討を行っていたが、ここでは、ペプチドリガンド IZ-3K 依存的に構造転移を起こす IZ-DS を天然蛋白質内に、構造変化を起こすリンカー配列として導入し、この部位の大きな構造変化により、ターゲットの蛋白質の機能調節を図る手法の検討を行った。これまでに結晶構造解析がなされている天然蛋白質の約半分は、N-末端とC-末端が 20 Å 以内にないことが知られており、³⁰⁾ 円順列変異を用いた手法には適応限界がある。円順列変

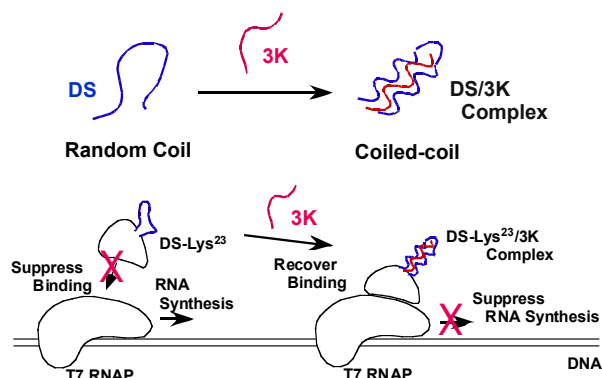


Fig. 12 Schematic illustration of ligand-peptide-induced switch of the function of T7 RNAP/T7 lysozyme complex

異を用いない手法の検討を行うことで、様々な天然蛋白質に応用可能な手法の提供が期待されるためである。

T7 lysozyme は5本の α -ヘリックスと12本の β -シートからなる151残基の蛋白質で、T7 RNAP への結合には、N-末端側の Ala²、Arg³、Val⁴、Gln⁵と Val²⁹から Glu³⁹までが形成する α -ヘリックスが重要であることが、結晶構造解析により確認されている。³¹⁾また、T7 lysozyme の T7 RNAP への結合位置は、T7 RNAP の RNA 合成に関与する活性部位と反対側に位置しており、T7 lysozyme の結合により転写反応が阻害されるメカニズムは、プロモーターに結合したコンホメーションである initiation complex から、転写反応の進行が可能な elongation complex へと T7 RNAP が構造変化することが抑制されるためであることも知られている。これらのメカニズムを鑑みて、T7 lysozyme 配列中の3カ所 (Pro23 と Ser24 の間、Glu62 と Met63 の間、Lys70 と Gly71 の間)を **IZ-DS** の導入位置の候補に挙げて、検討を行った。

まず始めに、これらの部位にヘリックスバンドル構造を取ったコイルドコイルを導入した変異体を構築し、それらが高次構造を保ち、かつ阻害活性を示すか検討を行うのに、2本の α -ヘリックスで形成する逆平行2本鎖コイルドコイル (**DC**)を、**IZ-DS+IZ-3K** により形成される3本鎖コイルドコイルの代わりに用いた。それぞれの変異体を大腸菌内発現系により発現し、SDS-PAGE によりそれぞれの蛋白質の

Table 1 IC₅₀ values of T7 lysozyme variants

T7 Lysozyme variants	IC ₅₀
WT-Lys	0.05
DC-Lys²³	0.10
DS-Lys²³	> 50
DS-Lys²³+IZ-3K	7.0

可溶性の評価を行ったところ、Pro23 と Ser24 の間に2本鎖コイルドコイルを導入した変異体 (**DC-Lys²³**)のみ、上清画分にみられた。これは、**DC-Lys²³** が、ヘリックスバンドル構造をとったコイルドコイルを含んでも、T7 lysozyme 部位の立体構造が破壊されていないために可溶性を保っていることを示唆した。そこで、この変異体に関して T7 RNAP の転写反応に対する阻害活性の評価を、通常の *in vitro* 転写系を用いて検討したところ、IC₅₀ が 0.10 μ M と、天然型の T7 lysozyme (**WT-Lys**)の約半分程度の阻害活性が依然保たれていることが確認された。そこで、この位置が **IZ-DS** の配列を導入するのに最適な部位であるとし、この変異体 (**DS-Lys²³**)の **IZ-3K** の有無による、阻害活性の変化の評価を行った。同様に *in vitro* 転写系を用いて評価を行ったところ、**IZ-3K** がいない場合には、IC₅₀ の値が、50 μ M 以上であるのに対して、**IZ-3K** が存在したときには、7.0 μ M といったん抑えられていた阻害活性の顕著な回復がみられた。CD スペクトルを用いた滴定実験においても、1当量の **IZ-3K** の添加により、ヘリックス含量の増加が飽和する現象もみられ、構造の変化するリンカーとして導入した **IZ-DS** の位置に選択的に **IZ-3K** が結合し、それにより、あらかじめある程度立体構造の壊されていた T7 lysozyme 部位の構造が回復し、同時に結合活性も復活したものと推測された。以上より、外部刺激応答性を付与したコイルドコイルを利用することにより、蛋白質間相互作用の調節も可能であることが示され、また同時に、蛋白質多量体の機能調節へも、我々の手法が応用可能であることも示せたと言えよう。

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人工蛋白質を利用することで、天然蛋白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。コイルドコイルを導入する位置に関して、1つのターゲット蛋白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、大きく、かつ明確な構造変化を起こす非天然の蛋白質配列を利用することで、合理的な手順に沿った機能設計が可能となったことは興味深い。そういった意味では、今回紹介した(蛋白質)分子の機能設計は、ラショナルデザインの粋である超分子化学そのものと著者は感じており、生体高分子の複雑な機能への憧れと模倣から始まった超分子化学が、蛋白質の新規機能設計に指針を与える形で回帰してきていることは、非常に興味深いところである。

5. 参考文献

- 1) C. Cohen, K. C. Holmes, *J. Mol. Biol.* **6**, 423-432 (1963).
- 2) J. Sodek, R. S. Hodges, L. B. Smillie, L. Jurasek, *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* **69**, 3800 (1972).
- 3) W. H. Landschultz, P. F. Johnson, S. L. Mcknight, *Science* **240**, 1759 (1998).
- 4) P. Mitchell, R. Tjian, *Science* **245**, 371 (1989).
- 5) M. A. Poirier, W. Xiao, J. C. Macosko, C. Chan, Y. K. Shin, M. K. Bennett, *Nat. Struct. Biol.* **5**, 765 (1998).
- 6) W. Xiao, M. A. Poirier, M. K. Bennett, Y. K. Shin, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 308 (2001).
- 7) V. N. Malashkevich, R. A. Kammerer, V. P. Efimov, T. Schulthess, J. Engel, *Science* **274**, 761 (1996).
- 8) L. Regan, W. F. DeGrado, *Science* **241**, 976 (1988).
- 9) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, T. Tanaka, *Protein. Eng.* **11**, 1051 (1998).
- 10) T. Kiyokawa, K. Kanaori, K. Tajima, M. Koike, T. Mizuno, J. Oku, T. Tanaka, *J. Pept. Res.* **63**, 347 (2004).
- 11) T. Kiyokawa, K. Kanaori, K. Tajima, T. Tanaka, *Biopolymer* **55**, 407 (2000).
- 12) T. Tanaka, T. Mizuno, S. Fukui, H. Hiroaki, J. Oku, K. Kanaori, K. Tajima, M. Shirakawa, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14023 (2004).
- 13) T. Mizuno, K. Murao, Y. Tanabe, M. Oda, T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11378 (2007).
- 14) P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber, *Science* **262**, 1401 (1993).
- 15) A. Kashiwada, H. Hiroaki, D. Kohda, M. Nango, T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 212 (2000).
- 16) T. Kiyokawa, K. Kanaori, K. Tajima, K. Kawaguchi, T. Mizuno, J. Oku, T. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **10**, 3548 (2004).
- 17) Y. Sakurai, T. Mizuno, H. Hiroaki, J. Oku, T. Tanaka, *J. Pep. Res.* **66**, 387 (2005).
- 18) T. Mizuno, K. Suzuki, T. Imai, Y. Furutani, M. Kudou, M. Oda, H. kandori, K. Tsumoto, T. Tanaka, *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 3102-3111 (2009).
- 19) S. Yuzawa, T. Mizuno, T. Tanaka, *Chem. Eur. J.* **12**, 7345 (2006).
- 20) C. N. Pace, U. Heinenmann, U. Hahn, W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343 (1991).
- 21) L. M. Mayr, D. Willbond, O. Lamdt, F. X. Schmid, *Protein Sci.* **3**, 227 (1994).
- 22) J. R. Brandts, K. J. Kaplan, *Biochemistry* **12**, 2011 (1973).
- 23) G. Marutake, W. Shalongo, E. Stellwagen, *Biochemistry* **30**, 4245 (1991).
- 24) O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell Comp. Physiol.* **59**, 223 (1962).
- 25) M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **273**, 1392 (1996).
- 26) D. P. Barondeau, C. D. Putnam, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12111 (2003).
- 27) D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4685 (2006).
- 28) T. D. Rae, P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta, T. V. O'Halloran, *Science* **284**, 805 (1999).
- 29) S. M. Herd, J. Camakaris, R. Christofferson, P. Wookey, D. M. Danks, *Biochem. J.* **247**, 341 (1987).
- 30) M. M. G. Krishna, W. Englander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1053-1058 (2005).
- 31) a) X. Cheng, X. Zhang, J. W. Pflugrath, F. W. Studier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4034-4038 (1994). b) D. Jeruzalmi, T. A. Steitz, *EMBO J.* **17**, 4101-4113 (1998). c) A. Kumar, S. S. Patel, *Biochemistry* **36**, 13954-13962 (1997).

研究紹介

外部刺激応答機能を持つ分割型タンパク質の設計に関する試み

東北大学多元物質科学研究所

坂本 清志

(sakamoto@tagen.tohoku.ac.jp)



1. はじめに

光照射や pH 変化等の外部刺激や酵素による任意の翻訳後修飾に応じて、その機能や触媒活性をコントロールすることが出来るタンパク質の人工構築は、タンパク質工学やナノバイオテクノロジー分野における重要な研究課題の一つである。また、そのような外部刺激応答型タンパク質は、細胞機能や生体機能関連材料特性を時空間特異的に制御可能な人工分子スイッチとして応用が期待できる。さらに、このような人工タンパク質は、特定の生体物質を検出するための分子プローブやセンサーとしても発展可能である。本研究では、分割型タンパク質と人工の刺激応答部位を組み合わせることで、任意の外部刺激によって自在に活性化可能な機能性タンパク質の開発を目指している。今回紹介する一連の実験では、分割型緑色蛍光タンパク質 (Split GFP) をタンパク質側の基体として用い、非天然型光反応性部位や酵素反応応答部位を合理的に複合化することによって、特定の外部刺激添加時や、任意の酵素存在下において蛍光強度の増加を示す GFP 変異体の作製を試みた。

2. 疎水性ゲスト化合物の添加に応答する分割型 GFP 変異体の構築

2-1. β -シクロデキストリンと蛍光色素を複合化した分割型 GFP 変異体の設計

近年のタンパク質工学の発展により、二分割した GFP の再会合を利用したタンパク質間相互作用の解析や特異的な核酸検出システムの構築が可能と成りつつある [1-4]。しかしながら、任意の有機小分子を認識して再構成効率と速度が向上する分割型 GFP の報告はこれまでに無い。これらの背景を踏まえた基礎的試みとして、ここで紹介する系では、超分子化学における代表的化合物である β -シクロデキストリン (β CDx) を人工の刺激応答部位として利用し、疎水性ゲスト化合物存在下、より高い蛍光強度を示す分割型 GFP 変異体の構築を行った [5]。この実験では、Waldo らによって報告された 214 位分割型 GFP 変異体である GFP OPT をタンパク質側の基体として利用している [6]。この変異体は、214 個のアミノ酸からなる N 末端断片 (1-214) (GFPN) と 17 残基からなる C 末断片 (214-230) (GFPC) から構成され、両断片を混合することで自発的に再結合とクロムフォア形成が進行する。他の分割型 GFP 変異体と比べて、C 末側ペプチド断片が比較的短鎖であるため、化学合成によって容易かつ位置特異的に非天然機能団を導入することができる。この系においては、GFP OPT の C 末断片 (GFPC) の両末端に蛍光色素である 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylate (DC) と β CDx を複合化した (DC-M2- β CDx) (Figure 1)。設計上、 β CDx に対する外部ゲストが無い状態において、ペプチド鎖に導入したクマリン色

素と β CDx とが自己包摂錯体を形成し、GFP N 末断片との相互作用が阻害されるものと予想した。一方、適切な疎水性分子の添加によって、ペプチド中の分子内ホスト・ゲスト相互作用が解消された場合、GFP N 末断片との再結合およびリフォールディング効率が向上することを期待した。

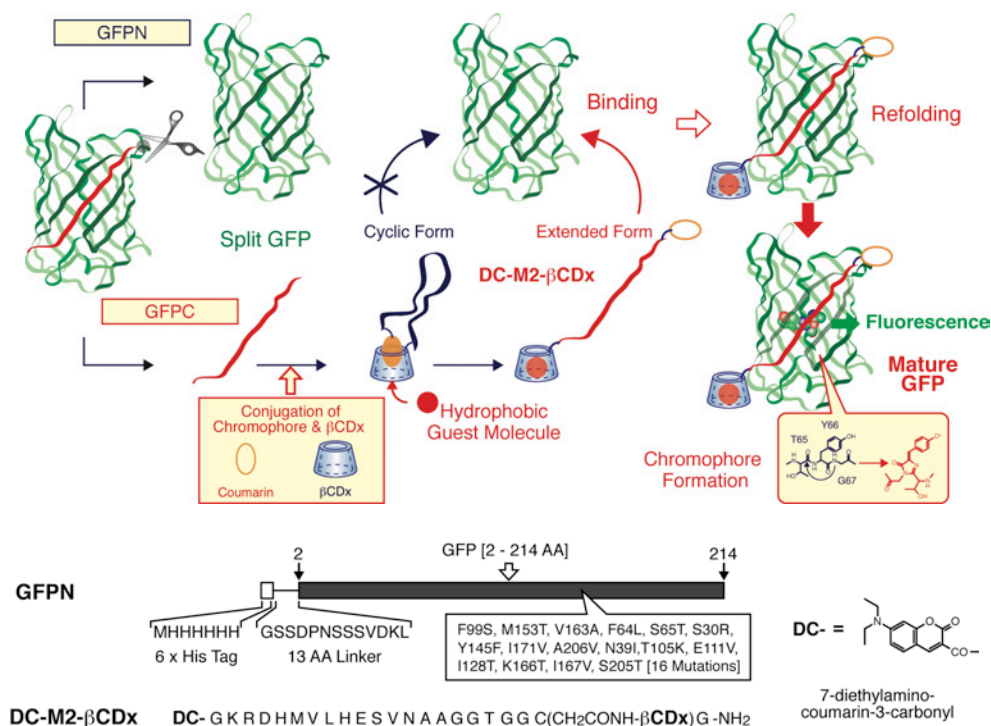


Figure 1. 疎水性ゲスト分子の添加によって活性化される分割型 GFP 変異体

2-2. 疎水性ゲスト分子添加による分割型 GFP のリフォールディング制御

緩衝溶液中における紫外可視吸収スペクトル、蛍光スペクトルならびに円二色性スペクトル測定の結果、導入したクマリン機能団と β CDx とが分子内で相互作用することによって、ペプチド DC-M2- β CDx は分子内環状構造を形成していることが判った。この状態のペプチドに N 末断片である GFPN を加えても、GFP に由来する蛍光の回復は非常に遅く、両断片間の再結合が強く阻害されていることが示唆された。一方、 β CDx に比較的強く相互作用することが知られている 1-アダマンタノール (1-AdOH) やウルソデオキシコール酸 (UDCA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA) 等のコール酸類の存在下においては、mature GFP に基づく波長 510 nm における蛍光強度の速やかな増加が観測された (Figure 2)。 β CDx に対して小さな結合定数を示すデオキシコール酸 (DC) やメントールを添加しても、分割型 GFP の再構成効率に変化は見られなかった。さらに、一定時間経過後における蛍光強度を比較した場合、ペプチドに対する結合定数が高いゲスト化合物程強い蛍光が観測されたことから、ペプチドとゲスト分子の結合によって分子内における自己包摂相互作用が弱まり、GFPN との再結合効率やリフォールディングの効率が向上したものと考えられた。

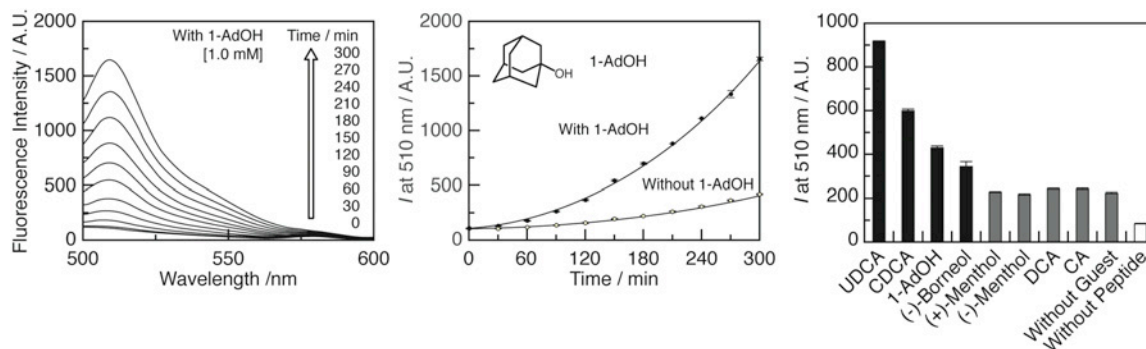


Figure 2. 疎水性ゲスト分子添加による分割型 GFP のリフォールディング制御

3. 光照射によって活性化される分割型 GFP 変異体の構築

ある特定波長領域の光照射によってその機能や構造をコントロールできるケージドタンパク質の開発は、タンパク質フォールディング研究や細胞機能を自在にコントロールする上で重要と考えられる。ここで紹介する研究では、人工の光応答機能団である 7-diethylamino-4-hydroxymethylcoumarin (DECM) と Split GFP を組み合わせることによって、特定波長領域の光照射によって蛍光機能を回復できる GFP 変異体の構築を試みた。この実験においても、上記の系で用いた分割型 GFP 変異体 (GFP OPT) を基体として用いている。特定波長の光に応答する分割型 GFP を構築するために、C 末断片ポリペプチド鎖中、222 位の Glu 残基側鎖上に DECM 基をエステル結合によって導入した (cE-M2)。過去に報告された GFP の三次構造解析からこの Glu222 残基はタンパク質立体構造内部に存在し、GFP のクロモフォア近傍に位置していることが明らかとなっている。従って、導入した DECM 基の立体障害によって、C 末断片と N 末断片の再構成を阻害できるものと考えた。一方、特定波長領域の光照射下では、DECM 基の特異的光切断が生じ、両断片間の再結合およびリフォールディング効率が向上することを期待した (Figure 3)。

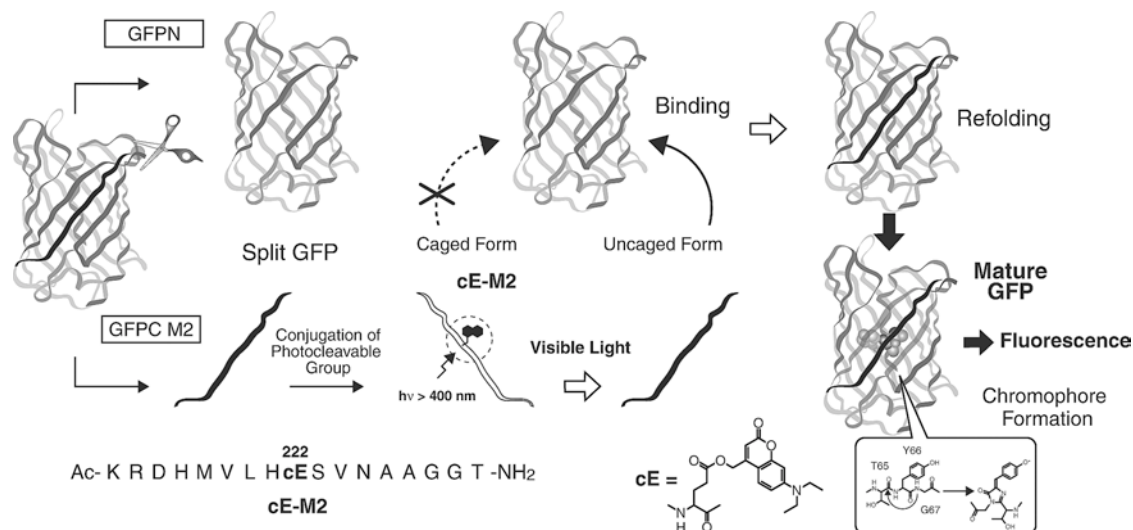


Figure 3. 特定波長領域の光照射によって活性化される分割型 GFP 変異体

溶液中における蛍光スペクトル測定の結果、光照射を行っていない cE-M2 と GFPN の再構成反応はほぼ完全に抑制されることが判った。一方、可視光 ($> 400 \text{ nm}$) を照射した場合、cE-M2 上の DECM 基

が効率よく切断されると同時に (量子収率, $\phi = 0.06$)、GFP に由来する蛍光強度の速やかな増加が見られた (Figure 4)。特定波長領域の光照射によって DECM 基のケージングが解除された結果、GFP 断片間の再結合が可能となり、リフォールディングとクロモフォア形成が迅速に進行したものと考えられる。今回得られた結果は、人工的な光反応性基を分割型タンパク質に複合化することで、タンパク質立体構造や機能の制御が可能であることを示唆するものであると考えている。

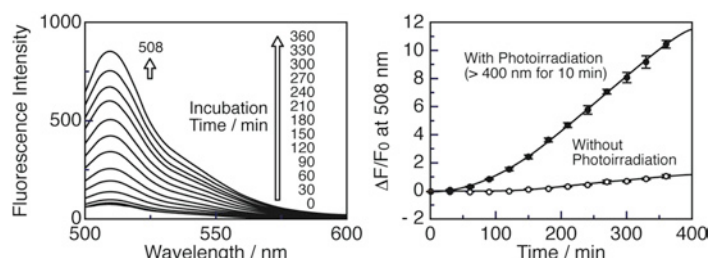


Figure 4. 可視光照射をトリガーとする分割型 GFP の蛍光回復挙動

4. リン酸化・脱リン酸化反応の検出を指向した分割型 GFP 変異体の構築

4-1. SH2 ドメインを複合化した分割型 GFP 変異体の設計

生体内におけるタンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、細胞内シグナル伝達の主要機構として重要な役割を担っている。従って、任意のキナーゼやホスファターゼの酵素活性を可視化・検出できれば、複雑な細胞内現象の一部を分子レベルで理解できるものと考えられる。以上の背景を踏まえて、この実験系では分割型 GFP を利用した新規のタンパク質リン酸化・脱リン酸化反応検出系の構築を試みた。具体的には、GFP OPT の N 末側断片に、リン酸化 Tyr 認識能を有する p85 α 由来の SH2 ドメイン

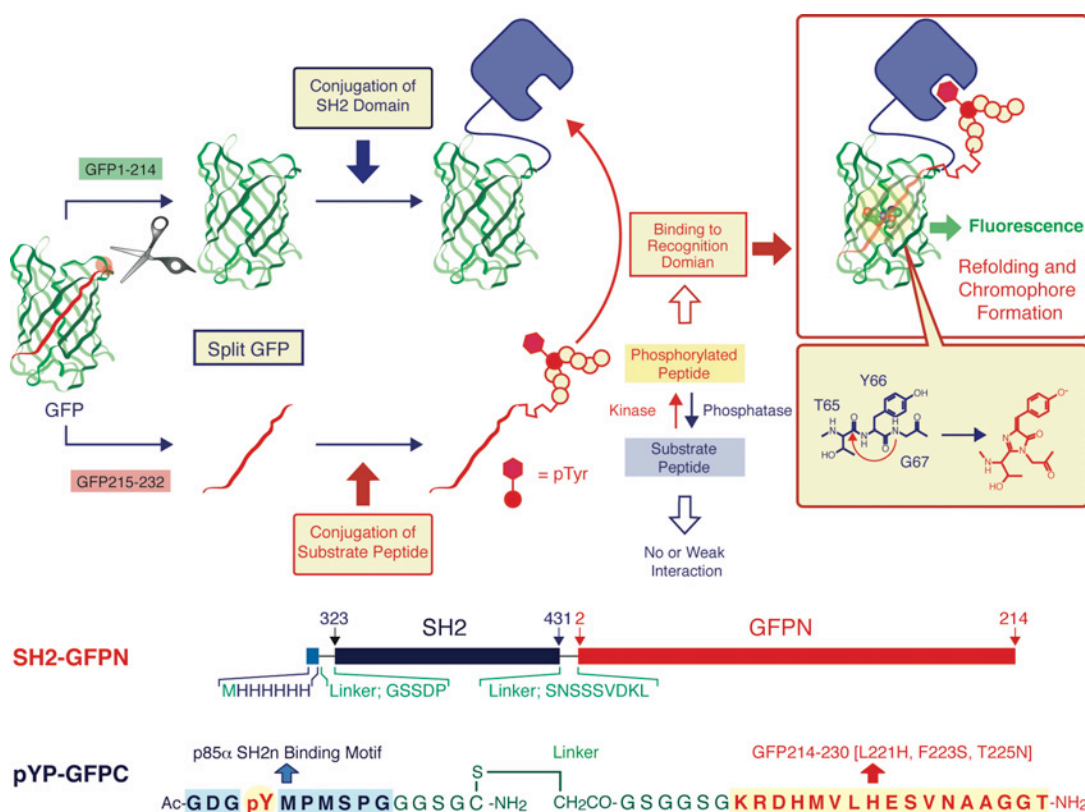


Figure 5. リン酸化・脱リン酸化反応の検出を指向した分割型 GFP 変異体

ンを複合化した (SH2-GFPN) (Figure 5)。加えて、C 末側断片に、SH2 認識モチーフを含む配列を連結した 2 種のペプチドを設計かつ合成した (pYP-GFPC および YP-GFPC) (Figure 5)。基質配列中のリン酸化状態が、分割型 GFP の再構成反応に与える効果を調べるために、pYP-GFPC 中の Tyr 側鎖上にはリン酸基を導入した。

4-2. SH2 ドメインを融合した分割型 GFP の機能評価

初めに、SH2 ドメインを複合化した GFPN タンパク質とペプチドとの再構成過程を調べるために、ペプチド pYP-GFPC および YP-GFPC 存在下における SH2-GFPN の蛍光スペクトルを測定した。pYP-GFPC 存在下では、非リン酸化ペプチドである YP-GFPC と比べて、SH2-GFPN は、10 倍の蛍光強度増加を示した (Figure 6A)。この結果は、GFPN-SH2 中の SH2 ドメインが、特異的にリン酸化 Tyr 残基を認識することで、GFP のリフォールディング効率や速度が向上したことを示唆する。次に、今回構築した系を用いて、試験管内におけるキナーゼおよびホスファターゼ活性の検出を試みた。非リン酸化ペプチドである YP-GFPC を特異的チロシンキナーゼである INSR とインキュベートし、GFPN-SH2 との再構成反応を行った場合、キナーゼ非存在下と比べて著しい GFP 蛍光強度の増加が見られた (Figure 6B)。キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリン (STS) 添加時や基質特異性の異なるキナーゼである Abl を用いた場合には、顕著な蛍光強度の変化は得られなかった。この結果は、INSR によって YP-GFPC 中の Tyr 残基が配列特異的にリン酸化され、分割型 GFP のリフォールディング効率を向上させたことを示唆している。また、リン酸化ペプチドである pYP-GFPC をチロシンホスファターゼである YOP とブレインキュベートし、GFPN-SH2 と混合した場合、GFP 蛍光強度の有意な減少が観測された (Figure 6C)。以上の結果は予備的なものではあるが、将来的には、任意のキナーゼやホスファターゼの活性を定量的に検出したいと考えている。

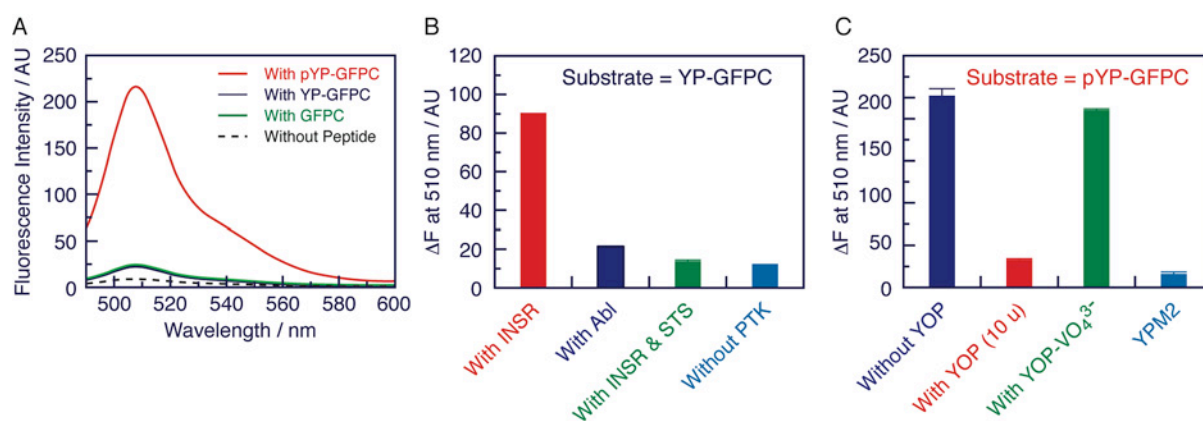


Figure 6. 基質ペプチドのリン酸化状態が分割型 GFP 変異体の再構成反応に与える効果

5. カスパーゼ活性の検出を指向した分割型 GFP 変異体の構築

5-1. カスパーゼ活性の特異的検出を目的とした分割型 GFP 変異体の設計

アポトーシスは、生物の個体発生、神経系ネットワーク構築、細胞交換および免疫系の成立等、生命を維持していく上で重要な役割を担っている。また、アポトーシス過程の破綻は、癌、自己免疫疾患、アルツハイマー病等の発症に密接に関与していることが知られている。細胞内におけるアポトーシス実

行においては、システインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーが中心的な役割を果たしている。従って、任意のカスパーゼ活性を選択的に可視化・検出することは、アポトーシス機構を分子レベルで解明するために重要であると考えられる。以上の背景を踏まえた基礎的研究として、この研究では、分割型 GFP を利用したカスパーゼ活性検出システムの開発を目指している。この実験では、GFP OPT の C 末断片の N 末端側に、カスパーゼ 3 の基質配列 (DEVD) を付加した。さらに、ペプチドの N- および C- 末端を、共有結合を介して架橋することで、環状ペプチドを構築した (cM2-Casp3) (Figure 7)。設計上、カスパーゼの添加によって、ペプチド中の基質配列部位が特異的に切断され、GFP N 末断片との再結合およびリフォールディングが速やかに進行することを期待した。

5-2. 分割型 GFP 変異体を用いたカスパーゼ 3 活性の検出

テストチューブ内において、cM2-Casp3 と GFPN を含む溶液にカスパーゼ 3 を添加した場合、カスパーゼ 3 非存在下と比べて、GFP 蛍光強度が顕著に増加した (Figure 8)。カスパーゼ 3 阻害剤である

Ac-DNLD-CHO を添加した場合、阻害剤濃度依存的に GFP 由来蛍光強度の減少が見られた。また、カスパーゼ 3 の代わりにカスパーゼ 9 を添加しても、目立った蛍光強度変化は認められなかった。従って、カスパーゼ 3 活性によって cM3-Casp3 中の基質配列部位での選択的切断が起こり、分割型 GFP の再構成反応と蛍光の回復が生じたものと考えている。今後、複合化した DEVD 基質配列部分を他の酵素の認識・切断配列に置換することで、任意のプロテアーゼ活性の検出に応用したいと考えている。

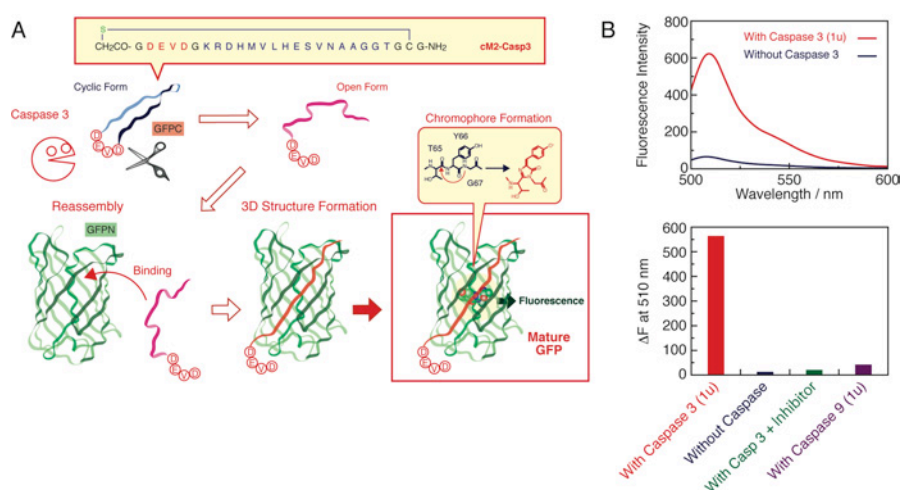


Figure 7. (A) カスパーゼ 3 活性の特異的検出を指向した分割型 GFP 変異体. (B) カスパーゼ 3 活性による分割型 GFP の蛍光機能の回復.

6. おわりに

今回の記事では、人工の外部刺激応答部位や酵素反応部位を複合化した分割型 GFP の設計と外部刺激に依存した GFP 蛍光機能の制御に関して簡単に紹介させていただいた。今のところ、分割型 GFP の自発的再構成反応を利用しているため、刺激入力による機能の“スイッチ・オン”のみであり、自在に“スイッチ・オフ”することはできていない (可逆性の欠如)。また、GFP のクロモフォア形成は比較的遅い過程であるため、刺激添加後、十分な強度のシグナルを得るために時間を要するという欠点も持つ。今後は、分割型ルシフェラーゼやサーキュラーパーミューテーションタイプの GFP 等を利用することで、実際に有用な系の構築に取り組んでいきたいと考えている。また、導入する外部刺激応答部位として、非天然機能団や人工アミノ酸、核酸誘導体、Single-Chain Antibody 等を用いることで、任意の外部刺激や特定の生体物質存在下においてのみ、その機能を発現する人工タンパク質の構築を目指したいと夢みている。

7. 参考文献

- 1) Magliery, T. J.; Wilson, C. G. M.; Pan, W.; Mishler, D.; Ghosh, I.; Hamilton, A. D.; Regan, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 146–157.
- 2) Stains, C. I.; Furman, J. L.; Segal, D. J.; Ghosh, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9761–9765.
- 3) Ozawa, T.; Natori, Y.; Sato, M.; Umezawa, Y. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 413–419.
- 4) Valencia-Burton M.; McCullough, R. M.; Cantor, C. R.; Broude, N. E. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 421–427.
- 5) Sakamoto, S.; Kudo, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9574–9582.
- 6) Cabantous, S.; Waldo, G. S. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 845–854.



気になった論文

森崎 達也 (もりさき たつや)

京都大学化学研究所 生体機能化学研究系 生体機能設計化学領域 博士後期課程 3 年

tatsuya.morisaki@p12.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

この度は、生命化学研究レターの論文紹介への執筆機会を頂き、心より感謝致します。現在、私は京都大学化学研究所の二木史朗教授の指導の下、DNA 結合モチーフの 1 つであるジンクフィンガーの DNA 結合特性に関する研究を行っております。

今回は、分子イメージングに関する論文を 3 報紹介させていただきます。生体あるいは細胞内で特定分子の局在や動き、機能を可視化するためには一般的に蛍光タンパク質や小分子による染色や標識が必要となります。これら蛍光タンパク質の中でも波長の最も長い赤外蛍光タンパク質、及び最も短い群青色蛍光タンパク質の開発について 2 報、さらに従来の光学顕微鏡とは異なったアプローチにより特定の分子を標識することなく可視化する新規イメージング技術について 1 報紹介させていただきます。

Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome.

Shu, X.; Royant, A.; Lin, M. Z.; Aguilera, T. A.; Lev-Ram, V.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y.

Science, **324**, 804-7 (2009).

「緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発見とその応用」により 2008 年度ノーベル化学賞を受賞した 1 人である Roger Tsien 博士はこれまでに様々な励起/蛍光波長を有する蛍光タンパク質を開発されてきました。これら色とりどりの蛍光タンパク質は複数の分子を同時に観察することを可能とし、また適切な 2 色の蛍光タンパク質間のエネルギー移動 (FRET) を観察することにより、分子間の距離や分子内の構造変化を評価することをも可能にしました。しかしこれまでに報告されている蛍光タンパク質は波長が短すぎて、生体組織を深部まで可視化することには適していませんでした。可視化のためにはヘモグロビンや水、脂質による吸収及び光散乱を抑えることができる 650 nm から 900 nm の光を用いることが望ましく、そこで赤外蛍光タンパク質 (IFP) の登場が切望されていました。

今回、Roger Tsien 博士らのグループは哺乳動物個体内で発現し、組織の深部までを生きたまま光学的に可視化できる新規 IFP の創製に成功しました。著者らは従来蛍光タンパク質デザインに用いられてきたクラゲやサンゴ由来の骨格ではなく、*Deinococcus radiodurans* 由来のビリベルジン (BV) を発色団として内包する細菌性フィトクロム DrBphP に着目しました。DrBphP 中の BV の内包に必要十分である発色団結合ドメインのみを切り

出し、発色団中のピロール環の回転による非放射減衰を抑えるために近傍アミノ酸への変異導入、及び全体へのランダム変異によって励起/蛍光波長が 684 nm/708 nm の単量体 IFP を創出しました (図 1A)。この IFP 遺伝子を肝臓に感染するアデノウイルス Ad5 に組み込みマウスに感染させたところ肝臓特異的

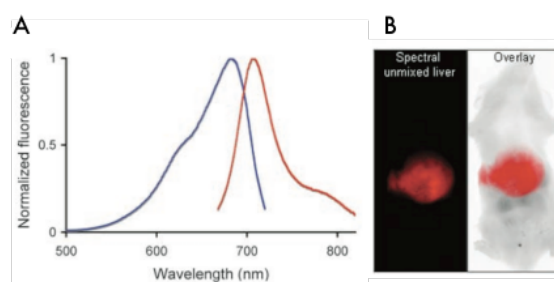


図 1 (A) 赤外蛍光タンパク質の励起/蛍光スペクトル、
(B) IFP 発現マウス (論文より一部改変)

な赤外蛍光を検出することに成功しました (図 1B)。細菌性フィトクロムに類似した配列は 1500 以上存在し、既存の骨格に捕われることなく今後さらに高感度または新規機能を付した IFP が創製されることが楽しみです。

An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity.

Tomosugi, W.; Matsuda, T.; Tani, T.; Nemoto, T.; Kotera, I.; Saito, K.; Horikawa, K.; Nagai, T.

Nat. Methods, **6**, 351-3 (2009).

続いては上述の紹介とは正反対の、蛍光波長が最も短い蛍光タンパク質の開発についての紹介です。これまでも極めて明るく成熟の早い黄色蛍光タンパク質 Venus や Ca^{2+} インジケータタンパク質 cameleon、Pericam の開発に携わってこられた永井健治博士は、いつも講演で「主流と逆に向かうことも大事」と仰っています。今回紹介する論文はその哲学を華麗に示された研究であると思います。

永井健治博士らのグループは、世の中の大半の興味が長波長の蛍光タンパク質に向かっている中、青緑色蛍光タンパク質 (CFP) をさらに改変することにより、これまでに報告されているどの蛍光タンパク質よりも蛍光波長の短い 424 nm にピークを持つ蛍光タンパク質 Sirius の開発に成功しました。これまでに GFP の 66 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した 442 nm にピークを持つ蛍光タンパク質が報告されていましたが、蛍光量子収率が極めて小さく生体イメージングには適すものではありませんでした。筆者らは CFP 変異体 (mseCFP) の 66 番目をフェニルアラニンに置換した mseCFP-W66F を基に、その発色団を取り囲む 4 アミノ酸に変異を加え、さらに 37°C における発色団形成を促進する変異及び、全体へのランダム変異によって蛍光ピークを 424 nm に持つ、明るい群青色蛍光タンパク質を得ることに成功し Sirius と名付けました。この大きな低波長側へのシフトによって、CFP、YFP 及び RFP との 4 色での同時イメージングが可能となりました。Sirius は蛍光波長が短いのみならず、多くの蛍光タンパク質は酸性化で蛍光性を喪失するのに対し、pH3-9 という広範なプロトン濃度において安定して蛍光を放出するという特筆すべき性質を有します。この特徴を利用して筆者らは、最終的に酸性条件になるファゴソームによる食食の全過程を可視化することに成功しました (図 2A)。さらには Sirius は mseCFP の FRET ドナーとして優れており、Sapphire-DsRed の FRET ペアと同時に用いることで、1 励起 - 4 蛍光測定による dual-FRET が可能となります。このシステムを用いることで、TNF-alpha 刺激によるアポトーシス誘導における Ca^{2+} オシレーションと、caspase-3 の活性化の同時観察に成功しました (図 2B)。この dual-FRET システムは 1 細胞内における種々の生物学的現象のみならず、それらの現象間のダイナミックな関係性を明らかにする可能性をもつもので、極めて有力なツールとなって行くのではないのでしょうか。

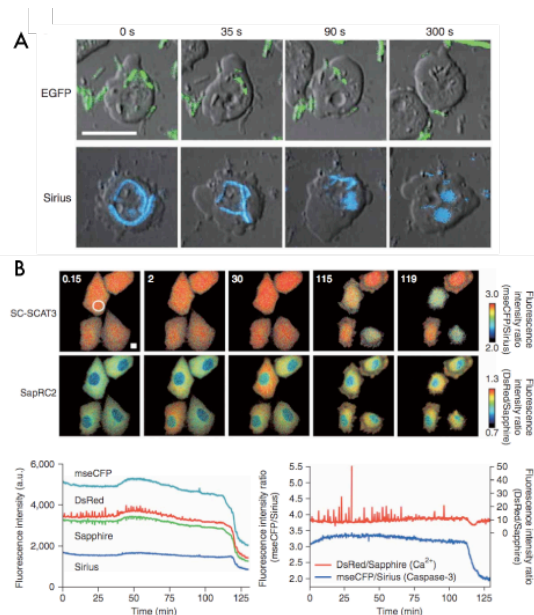


図2 (A) 酸性条件下での蛍光イメージング、(B) dual-FRET による Ca^{2+} オシレーションと caspase-3 活性化の同時観察 (論文より一部改変)

Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy.

Freudiger, C. W.; Min, W.; Saar, B. G.; Lu, S.; Holtom, G. R.; He, C.; Tsai, J. C.; Kang, J. X.; Xie, X. S.

Science, **322**, 1857-61 (2008).

ここまで2報、「標識のため」の蛍光タンパク質の開発の論文を紹介しましたが、最後に「標識することなく」特定分子を可視化する新規イメージング技術について紹介させていただきます。

Sunney Xie 博士らのグループはこれまでにラマン効果を応用することで「標識することなく」高分解能、高感度なイメージング技術を開発してきました。ラマン散乱は入射光の波長に依存しないため、顕微鏡に応用した際にも高分解能を確保できますが、自然発生的ラマン散乱は頻度が低いため生体や生細胞を観察することは困難です。そこで CARS (Coherent anti-Stokes Raman Scattering) の利用が考えられました。CARS とは、2種の異なった波長のパルスレーザー (Pump laser と Stokes laser) を試料に照射した場合、入射光のエネルギーの差が特定の分子振動の周波数と等しくなったとき、anti-Stokes 線の強度が著しく増強される現象を指します (図 3A)。この CARS シグナルつまり anti-Stokes 線を検出することで、特定の化合物を観察することが可能となります。これまでに CARS 顕微鏡を用いた生体分子の観察が多く行われてきましたが、CARS スペクトルは非共鳴性のバックグラウンドを含んでしまうために自然発生的ラマンスペクトルとは一致しません。このことがスペクトルの帰属を複雑にし、検出感度に限界を与えていました。そこで著者らは今回 SRS (Stimulated Raman Scattering) を応用した顕微鏡の開発を試みました。CARS では anti-Stokes 線の強度を検出していたのに対し、SRS では pump laser 強度の減少(SRL)、あるいは Stokes laser 強度の増強(SRG)を検出するため、非共鳴性のバックグラウンドの影響を受けません (図 3B)。さらに、強度変化を直接検出するのではなく、Stokes laser を周期的に変調させ、その周波数と SRL の周波数が一致するか否かでシグナルを検出する方法を考案し、生体試料での極めて微弱なシグナルでも観察可能なシステムを構築しました (図 3C)。

著者らはこのシステムを用いることで、非標識、非染色での生細胞による不飽和脂肪酸の取り込み、神経細胞、皮膚組織のイメージングに成功しました。さらに皮膚浸透賦活薬である DMSO とニキビなどの治療に用いられるレチノイン酸 (RA) の2種の薬物の皮膚浸透のドラッグデリバリーのモニタリングを試みました。その結果、親水性の DMSO はタンパク質相を通して皮膚へ 60 μm 以上の浸透すること、また脂質との2色同時観察により脂質画分には不溶であることが観察されました。一方疎水性の RA は表皮中、角質細胞間の脂質に富む領域から浸透することが観察されました (図 3D)。特に標識をつけることで本来の生物学的な機能を変えてしまう恐れがある、代謝産物や薬剤といった小さな分子のイメージング技術として今後需要が高まってくることが予想され、ますますの技術の発展が期待されます。

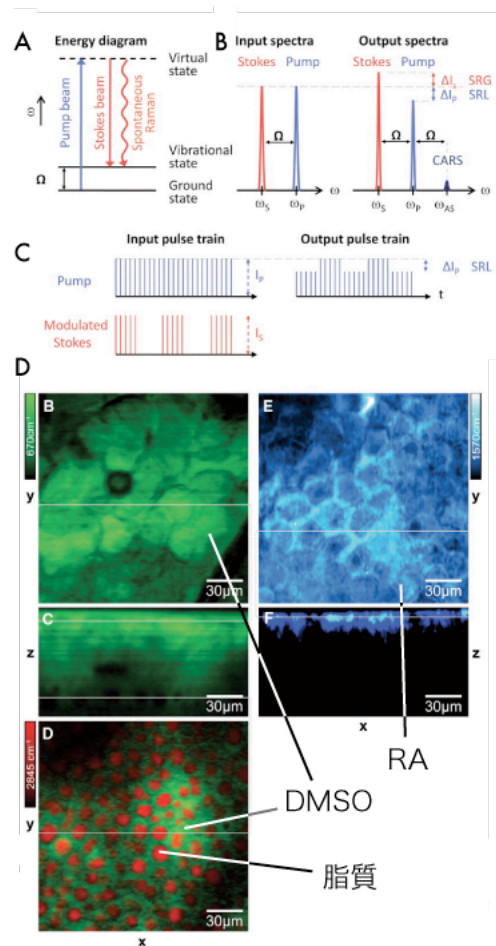


図3 (A, B, C) SRS 顕微鏡の原理、(D) 非標識の DMSO、RA、脂質のイメージング (論文より一部改変)

気になった論文

岩崎 一浩 (いわさき かずひろ)

東京大学大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 博士課程一年

東京大学先端科学技術研究センター

iwasaki@cbl.rcast.u-tokyo.ac.jp

この度は生命化学研究レターの論文紹介「気になった論文」の執筆機会を賜り、心から感謝いたします。私は現在、東京大学先端科学技術研究センターの菅裕明教授の下、癌に関連したタンパク質を標的とした特殊ペプチド阻害剤の探索を mRNA ディスプレイ法により行っております。

mRNA ディスプレイ法とは、遺伝型 (DNA、RNA) と表現型 (ペプチド、タンパク質) を 1 対 1 に対応付けし、遺伝型の情報から活性のあるペプチドやタンパク質のアミノ酸配列を同定する技術の一つで、その他にファージディスプレイ法やリボソームディスプレイ法などがあります。近年、ディスプレイ法と様々な技術を組み合わせることにより、より活性の高いペプチドやタンパク質を得ようとする試みがなされています。そこで今回は、今年発表された論文の中から、それぞれ①架橋剤の添加による二環性ペプチドの形成技術、②遺伝暗号拡張による特殊アミノ酸の導入技術、③マイクロ流路と組み合わせたディスプレイ法に関する 3 報を紹介したいと思います。

Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides.

Heinis, C.; Rutherford, T; Freund, S.; Winter, G.

Nat. Chem. Biol. **5**, 502-507 (2009).

まず、架橋剤の添加により得られる二環性ペプチドを用いたファージディスプレイ法の論文を紹介します。ペプチドは直鎖状よりも一環性、一環性よりも二環性と、構造が硬くなるにつれて、標的との結合の際の構造変化によるエントロピーの損失が小さくなり、より強く標的に結合できると考えられます。実際これまでにファージディスプレイ法により得られた阻害ペプチドの多くで、ジスルフィド結合による環構造が見られ、環構造による結合能の上昇が示唆されます。本報ではこのことを踏まえ、二環性ペプチドのセレクションを行いました。

システイン残基を 3 つ有し、その間に 6 残基のランダム配列を 2 つ有するペプチドライブラリ (Cys-(Xxx)₆-Cys-(Xxx)₆-Cys) を設計し、これをファージに提示させた後、トリス - (ブロモメチル) ベンゼン (TBMB) を加えることで、二環性ペプチドが得られます (図 1)。このライブラリを用い、ヒト血漿カリクレインを標的タンパク質としてファージディスプレイ法によりセレクションを行ったところ、IC₅₀ が 400 nM のペプチドが得られました。さらに強い阻害ペプチドを得るため、得られたペプチドの一部をランダムなアミノ酸配列にしたライブラリを用意しました (Cys-Ser-Asp-Arg-Phe-Arg-Asn-Cys-(Xxx)₆-Cys)。このライブラリを用い、もう一度セレクションを

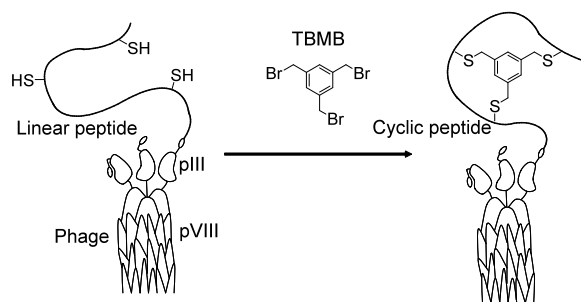


図 1 二環性ペプチドの調製

行うことで、 IC_{50} が 20 nM、 K_i が 1.5 nM という、ヒト血漿カリクレインを効果的に阻害するペプチドの獲得に成功しています。さらにこのペプチドは、TBMB の添加による二環の形成により高い阻害活性を示します(二環を形成していない直鎖状のペプチドに比べて 5000 倍以上)。この結果から、本方法論により二環性の活性ペプチドが獲得できることがわかりました。今後、二環性ペプチドを様々な標的に対する薬剤候補とすることで、強力な活性を有するペプチドが得られるかもしれません。

Evolution of proteins with genetically encoded “Chemical Warheads”

Liu, C. C.; Mack, A. V.; Brustad, E. M.; Mills, J. H.; Groff, D.; Smider, V. V.; Schultz, P. G.

J. Am. Chem. Soc. **131**, 9616-9617 (2009).

次に、20 種類の天然アミノ酸と 1 つの特殊アミノ酸を導入した、21 アミノ酸によるファージディスプレイ法に関する論文を紹介します。通常ファージディスプレイ法では、大腸菌内に特殊アミノ酸特異的なアミノアシル tRNA 合成酵素および tRNA が存在しないため、特殊アミノ酸を有するペプチドをファージに提示することはできません。しかし筆者らのグループは 2008 年、*Methanococcus jannaschii* 由来のアンバーサプレッサーチロシル tRNA とチロシル-tRNA 合成酵素を用いることにより、大腸菌内でアンバーコドン (TAG) に対応して *p*-ボロノフェニルアラニン (BF) を導入し、ファージに提示することに成功しています (Boro-X-*E. coli*)。BF はジオールと反応してボロネートエステルを形成することができ (図 2a)、BF を有するペプチドはジオールを有する標的に対して強く結合することが期待できます。

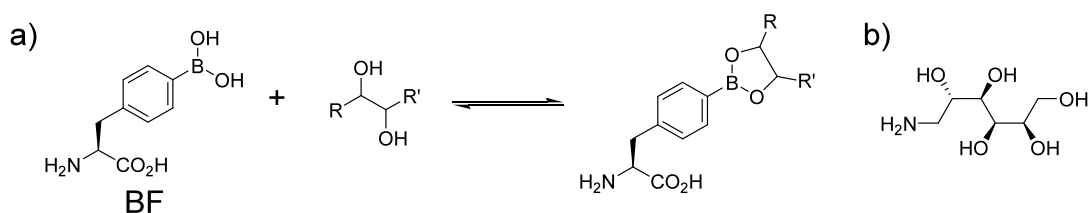


図 2 a) ボロネートエステルの形成 b) D-グルカミン

そこで今回、single-chain variable fragment (scFv) 内に 6 残基のランダム配列を有するライブラリを作製し、Boro-X-*E. coli* を用いたファージディスプレイ法により、D-グルカミン (図 2b) を標的としたセレクションを行いました。その結果、最初に設計したライブラリでは、TAG の出現率、すなわち、BF を含むペプチドの割合が 17%でしたが、3 ラウンド目では 83%まで上昇しました。3 ラウンド後に得られた scFv のアミノ酸配列には相同性が見られませんでした。D-グルカミン特異的に結合し、BF だけでなく BF 以外のアミノ酸もその結合能と選択性に寄与していることがわかりました。さらに、scFv に対応した antigen binding fragment (Fab) を調製し、酵素免疫測定法 (ELISA) により D-グルカミンとの結合能を評価したところ、BF の代わりにチロシンを有する Fab に比べて、BF を有する Fab は約 5 倍の結合能を示し、BF 依存的に抗体の結合能が上昇することがわかりました。この結果は、20 種類の天然アミノ酸だけでは達成できない新規の薬剤を生み出す道を開き、今後特殊ペプチドの利点を活かした創薬が期待されるでしょう。また、今回のボロネートエステルは可逆的な結合ですが、標的と不可逆的な結合を形成する特殊アミノ酸を用いれば、より強力な薬剤の獲得が可能になるかもしれません。

Rapid antibody selection by mRNA display on a microfluidic chip.

Tabata, N.; Sakuma, Y.; Honda, Y.; Doi, N.; Takashima, H.; Miyamoto-Sato, E.; Yanagawa, H.

Nucleic Acids Res. **37**, e64 (2009).

最後に、マイクロ流路を用いた mRNA ディスプレイ法に関する論文を紹介します。mRNA ディスプレイ法はファージディスプレイ法に比べ、扱えるペプチドライブラリの多様性の面で優位性があります。ファージディスプレイ法の多様性が $10^8 \sim 10^9$ 程度であるのに対し、mRNA ディスプレイ法の多様性は $10^{13} \sim 10^{14}$ 程度です。通常のセレクションでは濃縮効率が 1 ラウンドで $10 \sim 10^3$ 倍ですので、活性種の濃縮には、ファージディスプレイ法で 3~8 ラウンド、mRNA ディスプレイ法で 5~13 ラウンドかかることになります（もちろん標的や条件によって変わりますが）。すなわち、mRNA ディスプレイ法では多様性が大きい分、活性種の濃縮に多くのラウンド数が必要ということになります。この論文では、マイクロ流路を mRNA ディスプレイ法に用いることで、濃縮効率を 1 ラウンドで $10^6 \sim 10^8$ 倍にし、1~2 ラウンドで活性種を濃縮することに成功しています。

健常人のリンパ球由来の抗体遺伝子を基に構築された scFv ライブラリを用い、p53（ヒト癌抑制タンパク質）および MDM2（ヒト癌関連タンパク質）をモデル抗原として、マイクロ流路を用いた mRNA ディスプレイ法によりセレクションを行ったところ（図 3）、2 ラウンド後にそれぞれ 1 種類および 2 種類の活性種が得られました。これらの scFv はいずれも高い結合能を示すものの、抗原に対する特異性が低いものでした。そこで、1 ラウンド後の活性種

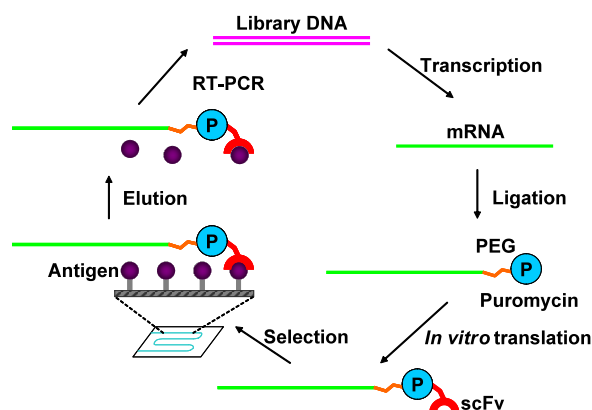
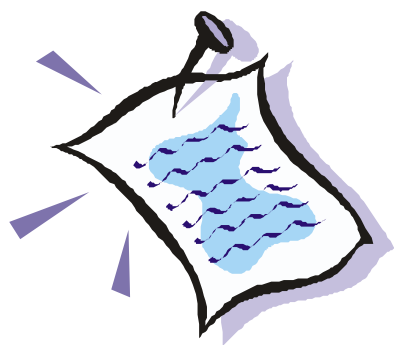


図 3 マイクロ流路を用いた mRNA ディスプレイ法の模式図

を調べることにより、それぞれ 22 nM および 5.9 nM の $K_D (= k_{off}/k_{on})$ を有する抗原特異的な scFv を獲得

しました。ここで得られた MDM2 に結合する scFv に対して、さらに人工的なランダム変異を導入したライブラリを作製し、同様にセレクションを行いました。この際、反応場としてマイクロ流路を用いた利点を活かし、速い流速により反応時間を短くすることで、高い k_{on} の scFv が選択されやすい条件、および、洗浄操作を長時間行うことで、低い k_{off} の scFv が選択されやすい条件によりセレクションを行いました。その結果、 K_D が 0.7 nM という非常に強力な scFv の獲得に成功しました。セレクションの戦略通り、この scFv は元となった scFv に比べてより高い k_{on} 、より低い k_{off} を示しました。一方、濃縮効率が大幅に向上したことにに関して、筆者らは予想外としながらも、標的タンパク質を固定化したチップが負に帯電しており、mRNA の負電荷との反発により非特異吸着が抑えられたためではないかと考察しています。いずれにしても、マイクロ流路を組み合わせた mRNA ディスプレイ法を用いることで、場合によっては活性種の濃縮に 10 ラウンド以上も要するセレクションの操作が、たった 1~2 ラウンドの操作に短縮され、なおかつ十分強力な抗体の獲得が可能であることが示唆されました。このことは抗体作製のハイスループット化を意味し、これまでの抗体作製に要した時間と労力が大幅に短縮されることが期待されます。



シンポジウム等会告

第 12 回 生命化学研究会

～化学者だからできる生命科学～

主催 日本化学会フロンティア生命化学研究会

会期 2010 年 1 月 8 日 (金) ～9 日 (土)

会場 芦原温泉 清風荘 (福井県あわら市温泉 3 丁目, TEL 0776-77-2500)

<http://www.seifuso.com/>

○タイムスケジュール:

1 月 8 日 (金)

13:00-16:45 招待 / 依頼講演 (3 件)

- ・「非天然アミノ酸導入技術のタンパク質の構造機能解析への応用」芳坂貴弘 (JAIST)
- ・「アルツハイマー病関連ペプチド凝集の解析と制御」今野 卓 (福井大医)
- ・「Garage Chiba における Evolutionary Synthetic Biology」梅野太輔 (千葉大工)

17:00-18:00 ポスターセッション (20 件程度)

19:00～ 夕食&フリーディスカッション

1 月 9 日 (土)

9:00-13:45 招待 / 依頼講演 (4 件)

- ・「生命現象解明ツールとしてのジंकフィンガー型人工転写因子の創製」今西未来 (京大化研)
- ・「励起子相互作用: 新しい光化学制御法による核酸イメージング」岡本晃充 (理研)
- ・「階層的な組織化による化学ナノ空間の創製」田中健太郎 (名大院理)
- ・「イメージングを活用した糖鎖の in vivo 生体分子科学」深瀬浩一 (阪大院理)

● 会費: 参加登録費 7,000 円, 宿泊費 (食事代込) 13,000 円 (当日徴収)

● 参加申込: 氏名・所属・役職 (学年)・E-mail アドレス・ポスター発表の希望の有無を明記の上、11/30 (月) までに、下記の連絡先へ申し込み下さい。

● カニ料理が苦手な方は、事前に申し出てください。

● 交通情報 : <http://www.seifuso.com/access.html>

問い合わせ・連絡先 :

〒819-0395 福岡市西区元岡 744 番地

九州大学大学院工学研究院 応用化学部門 松浦和則

Phone : 092-802-2833 Fax : 092-802-2839

E-mail: ma2ra-k【atmark】mail.cstm.kyushu-u.ac.jp
(【atmark】は半角文字の@を手入力して下さい)

第12回生命化学研究会 in 芦原温泉 世話人

松浦和則 (九大院工)・三浦佳子 (JAIST)

お知らせ



受賞

山東信介 (九州大学稲盛フロンティア研究センター)

平成20年度 日本化学会 進歩賞

「生体分析を目指した機能性核酸システムの創製」

(2009年3月28日、日本化学会春季年会において受賞)

異動



山東信介

九州大学稲盛フロンティア研究センター

次世代機能性分子超構造研究部門

〒819-0395 福岡市西区元岡 744

TEL:092-802-6960

FAX:092-802-6960

E-mail: ssando@ifrc.kyushu-u.ac.jp



編集後記

ここに生命化学研究レターNo.31をお送りします。今回も、執筆者の皆様および編集委員の皆様のご協力もあり、何とか編集作業を終えることができました。心からお礼申し上げます。9月上旬に東京大学駒場リサーチキャンパスコンベンションホールにて第2回スイス-日本生命化学シンポジウム(SJBCS2009)が開催されました。この会議の第1回会議は2年前の2007年にスイスのローザンヌにて開催されたものです。スイスからの参加者16名を加えて、総勢140名にのぼる生命化学研究者が集まり、非常に有意義な会議となりました。今回の会議を通じてスイス、日本両国における生命化学研究の質の高さを十分に感じることができ、非常に有意義な2日間を過ごすことができました。詳細は、ベルン大学のJean-Lous Reymond教授による巻頭言にも書かれていますので、そちらもご覧ください。なお、次回の第3回シンポジウムは2年後にスイスで開催される予定です。

平成21年10月31日

円谷 健

大阪府立大学大学院理学系研究科
(tsumu@b.s.osakafu-u.ac.jp)

編集担当

井原敏博(熊本大学)

大神田淳子(大阪大学)