

化学変換を駆使したヘムタンパク質の解析と新規タンパク質集合体の構築

Chemical approach to the mechanism of hemoprotein and the construction of novel protein-protein interaction by reconstituted myoglobin

研究代表者 九州大学大学院工学研究科物質創造工学専攻 助教授 林 高史
Associate Professor, Dept. of Chem. & Biochem., Kyushu University,
Takashi HAYASHI

Myoglobin is an oxygen storage protein in which protoporphyrin IX iron complex as a prosthetic group contacts the peptide matrix of the protein via multiple weak interactions. Therefore, the native prosthetic group can be replaced with an artificial metalloporphyrin by usual reconstitutive technique. Focusing on this method, we have first prepared a myoglobin reconstituted with monoproionate hemin to elucidate the relationship between the stability of oxymyoglobin and protein-hemin interaction. The measurement of autoxidation and O₂ binding for the reconstituted myoglobin indicates that 6-propionate side chain plays an important role on the stabilization of oxymyoglobin. Second, we have prepared a new myoglobin reconstituted with modified prosthetic metalloporphyrin having a total of eight carboxylate groups at the terminal of two propionate side chains. As a result, the assembly of substituted carboxylates is located on the protein surface as a binding domain. Cytochrome c with positively charged domain can interact with the reconstituted myoglobin with a high affinity and the triplet electron transfer from the zinc myoglobin to ferricytochrome c occurs within the diprotein complex. Furthermore, compared to native myoglobin, the reconstituted myoglobin revealed the peroxidase activity in the presence of H₂O₂. The present model could be very useful for evaluating the molecular recognition event on the protein surface.

1. 研究目的

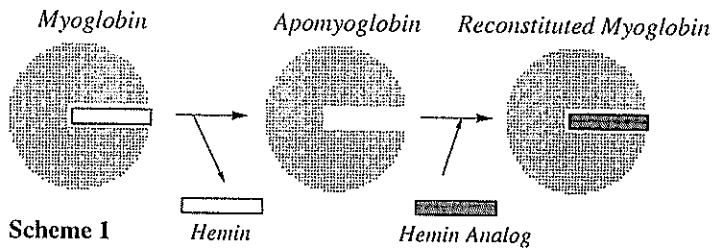
生体機能の中樞を占める酵素反応、情報伝達、物質輸送の中で分子認識過程はその機能制御と選択性発現に極めて深く関与しており、弱い分子間相互作用の集積に関する熱力学的・動力学的考察と認識過程によって誘起される生体機能発現の化学的解明が重要視されている。これにともない近年、生体系の分子認識に着目した低分子モデル系（ホスト-ゲスト複合体）が数多く報告され、分子間相互作用の分子レベルでの研究と超分子化学への応用が飛躍的に進んでいる。しかしながら、実際の生体内のタンパク質で繰り広げられる複雑な分子認識挙動と、その特異的な分子間相互作用に基づく機能発現の評価はまだこれからの課題であり、さらに高次なモデル系が望まれる。そこで我々はより生体系に密接なモデル系を設計するために天然に広く存在し、構造が既知であるヘムタンパク質（ミオグロビン）の改変に着目した。具体的には(i)タンパク質内での補欠分子団であるヘムとタンパク質マトリックスとの相互作用が制御するミオグロビンの機能の解析、及び(ii)ヘムタンパク質表面への人工的な分子認識部位のデザインと新しいタンパク質-タンパク質相互作用系の構築、の2つのテーマを掲げ、ヘムを化学修飾して人工的なタンパク質を調製する有機合成化学的アプローチを取り入れた研究を実施した。

2. 研究経過 及び3. 研究成果

[1] 再構成ミオグロビンの調製

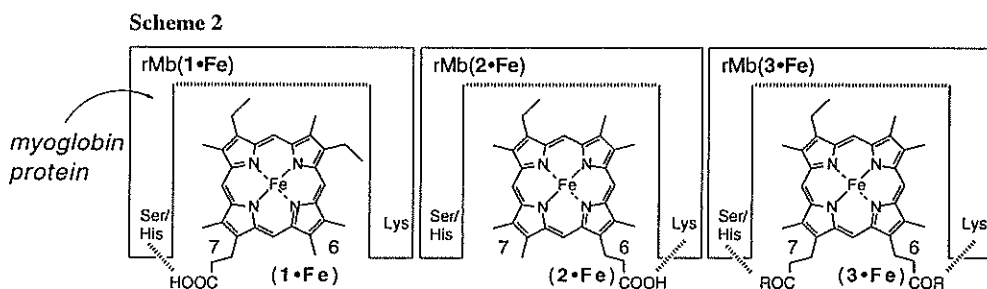
ミオグロビンは補欠分子団のヘムと153のアミノ酸残基からなるタンパク質によって構成されている。ヘムはタンパク質と弱い分子間相互作用を形成し結合しているため、特定の条件下で

はヘムをタンパク質から抜き取り、新しく合成ヘムを挿入して再構成体を調製することが可能となる。この点に着目し、再構成に用いるヘムの側鎖を変換したり、新しい官能基をヘムに修飾により、ヘムとタンパク質の相互作用に基づくミオグロビンとの機能評価や、新しい機能化ミオグロビンの調製を図った(Scheme 1)。



[2] ヘムとタンパク質の相互作用と機能との相関

ミオグロビンの本来の機能である酸素貯蔵に着目し、ヘム側鎖とタンパク質の分子間相互作用が酸素錯体形成にどのように関与しているかを、合成ヘムを有する再構成ミオグロビンを用いて検討を行った。具体的にはヘム6位と7位に結合したプロピオン酸側鎖とタンパク質との相互作用を評価するために、Scheme 2に示したようにそれぞれ片方のカルボン酸を欠いたヘム、 $1\cdot\text{Fe}$ と $2\cdot\text{Fe}$ を合成し、その再構成ミオグロビンを得た。その酸素錯体の自動酸化、酸素分子のon, off速度を測定した結果、6位のプロピオン酸が欠落したヘムを有するミオグロビンrMb($1\cdot\text{Fe}$)は酸素錯体からメト体への自動酸化速度および酸素分子のoff速度が天然ミオグロビン及び7位のプロピオン酸が欠落したミオグロビンrMb($2\cdot\text{Fe}$)より極めて大きいことが判明した。したがって、6位プロピオン酸とLys45の相互作用の形成が外部からの溶媒等の攻撃を防ぎ、酸素錯体を安定化していることが明らかとなった。



さらに、2つのカルボン酸の末端に極性官能基(アミド基、エステル基等)を結合させ、その再構成タンパク質rMb($3\cdot\text{Fe}$)を常磁性NMR、自動酸化速度などで検証した結果、天然のミオグロビンと顕著な構造及び安定性の差は認められず、プロピオン酸の末端に様々な化学修飾を施して、ミオグロビンを機能化することが可能であることを確認した。

[3] 認識部位を有する再構成ミオグロビンの構築

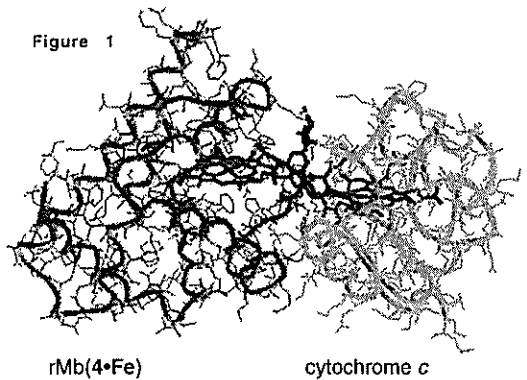
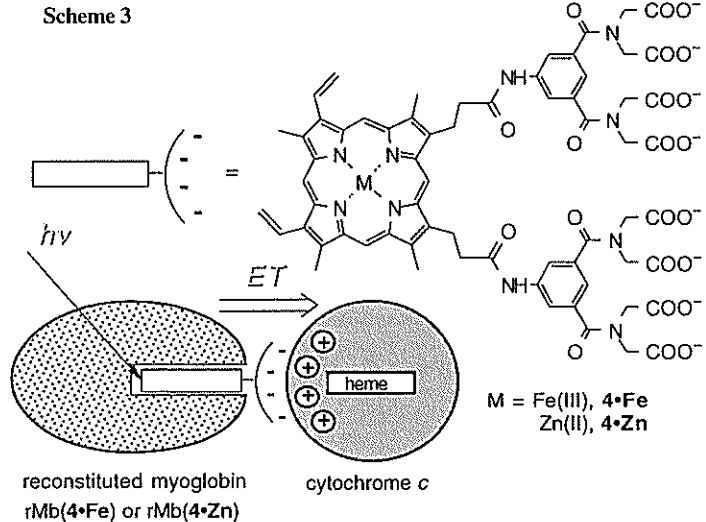
生体系でタンパク質間特異的会合はその組織化、機能化、反応の制御に重要な役割を果たし

ている。特にミトコンドリア膜で繰り広げられる、[チトクロムc]-[チトクロムcオキシダーゼ]や、[チトクロムc-ペルオキシダーゼ]の特異的相互作用は、両者間の電子移動反応を制御していることが明らかになっている。この点に着目し、チトクロムcと安定な複合体を形成する再構成ミオグロビンを用いた新しいモデル系を構築した。上記の知見からプロピオン酸側鎖に極性官能基を導入しても、

安定な再構成タンパク質が得られることが保証されたため、積極的にプロトポルフィリンのプロピオン酸側鎖に多数のカルボン酸を導入した新しいポルフィリンを合成し、アポミオグロビンに再構成したタンパク質rMb(4•Fe)、rMb(4•Zn)を調製した。

ミオグロビンは本来中性タンパク質($pI = 7.5$)であるが、得られた再構成タンパク質の等電点は $pI = 5.5$ であり、表面にカルボン酸集積ドメインが表面に呈示されていることが示された。これに対して結合部位として多数のリジン残基を表面に有するチトクロムcとの相互作用を常磁性NMRで観測した結果、両タンパク質のヘムエッジを向き合わせた状態で安定な複合体を形成していることが支持された(Scheme 3, Figure 1)。さらに複合体形成挙動と電子移動反応についての知見を得るために、レーザー閃光過渡吸収測定を行った結果、ミオグロビンrMb(4•Zn)の三重項励起状態はチトクロムcの添加に伴って急速に失活し、同じタイムスケールで亜鉛ポルフィリンのカチオンラジカルとチトクロムcの還元体の特徴的な吸収がそれぞれ観測された。これらの知見よりミオグロビンからチトクロムcへの光駆動型電子移動反応の進行が明らかとなった($k_{et} = 2.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, $K_a = 6.5 \times 10^4 \text{ M}$ in 5 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 25 °C)。一方認識部位を持たない天然型亜鉛ミオグロビンとチトクロムcでは全くこのような電子移動反応は観測されなかった。

近年、人工ヘムをタンパク質に挿入した再構成体の研究は幾つか報告されているが、この様にミオグロビンを用いて人工的にタンパク質-タンパク質相互作用を構築したのは本系が初めての例である。これまでにミオグロビン表面のリジン残基を化学修飾してチトクロムcとの電子移動反応を観測した例もあるが、本系は認識部位を容易に合成できること、また相手のタンパク質に合わせて変換可能な点に長所がある。

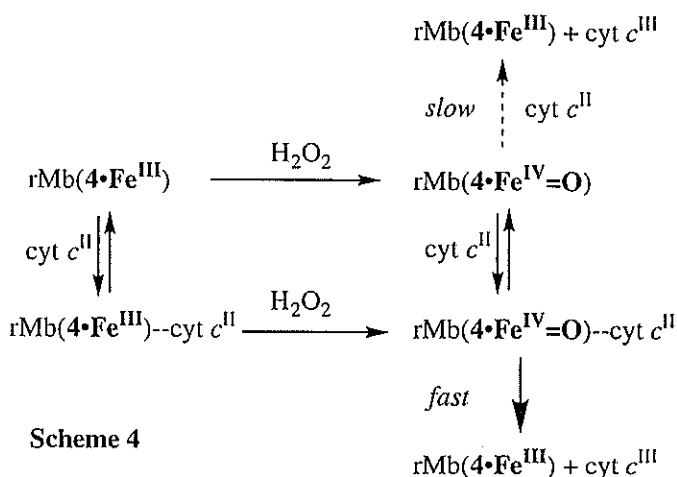


[4] ミオグロビンのペルオキシダーゼへの機能変換

生体内で還元体チトクロムcはチトクロムcペルオキシダーゼと特異的な結合を介して一電子酸化されることが知られている。

我々は前項で示したチトクロムc認識能を有するミオグロビンrMb(4•Fe)のferryl体を過酸化水素を用いて調製してチトクロムc溶液と混合させることによって認識部位を介したスムーズなチトクロムcの触媒的酸化反応を観測した。この事実は、ミオグロビンがチトクロムcと安

定な複合体を形成した結果、チトクロムcペルオキシダーゼ類似活性を有したと考えられる。これまでミオグロビンの活性中心近傍を遺伝子工学手法で変換し、高いペルオキシダーゼ活性を得た例はあるが、この様に化学的に結合部位を構築して、ミオグロビンに新しい酵素機能を付与した例はこれが初めてである(Scheme 4)。



Scheme 4

4. 今後の課題と発展

本研究の後半部分の特徴は、合成化学的にヘム末端を修飾しアポタンパク質に再構成することにより、容易にタンパク質表面に新しい官能基の呈示を可能にしたことにある。特にこの手法を用いると次のような利点がある。

(a) 様々な官能基（基質認識部位）を簡便に導入できるため、バラエティーに富んだ多数の化学修飾タンパク質を容易に調製することが可能である。

(b) ヘム末端に認識部位を修飾するため、タンパク質の顕著な構造変化を伴うことなく活性部位であるヘム近傍に必然的に基質を固定させることが可能となり、ヘムと基質との反応がスムーズに進行すると期待される。

以上の2点は、遺伝子工学的手法では実現不可能なアプローチである。これまでヘム側鎖に化学修飾を施してミオグロビン本来の機能を検討した研究は我々を含め幾つかのグループが行ってきたが、修飾ヘムの再構成手法によってタンパク質表面に積極的に認識部位を構築する手法を提案したのは我々が初めてであり、この知見を生かして、有機合成化学的手法からの新しいタンパク質工学的な展開を行いたい。

5. 発表論文リスト

T. Hayashi, T. Takimura, Y. Aoyama, Y. Hitomi, A. Suzuki, H. Ogoshi, *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 275, 159. (その他投稿中の論文2報)

最後に、本研究にあたって御支援いただいた日産科学振興財団に対して厚く御礼申し上げます。