

氏名	ほり 雄一郎 ほり ゆういちろう
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第545号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	亜鉛イオンにより構造変化を誘発する人工タンパク質の設計に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 杉浦幸雄 教授 半田哲郎 教授 加藤博章

論文内容の要旨

序論 タンパク質の構造変化は、細胞内シグナル伝達や細胞周期の進行といった生命維持に必須なものやウイルス感染や狂牛病のような疾病に対しても、深く関わっていることが知られている。しかしながら、その物理化学的メカニズムは、対象となる天然タンパク質の分子サイズが大きく解析に支障をきたす場合や、構造変化が小さい、一過性である、凝集を伴う等の問題がある場合が多く、不明な部分が多い。一方、構造変化を誘起するタンパク質を人工的に設計するアプローチは、構造変化のモデルシステムを構築し、機能制御能を有する新規タンパク質の創出につながると期待できる。本研究では、Zn(II)に結合し構造変化を誘起するタンパクを設計し、構造変化、金属結合能及び機能制御能について検討した。また、設計したタンパク質のフォールディング安定性と金属結合能の構造変化における熱力学的相関について検討した。

第一章 Zn(II)により構造変化を誘発する人工タンパク質の設計と機能制御 Zn(II)結合配列としてC2H2型亜鉛フィンガーモチーフの共通配列を、構造の解明されている天然タンパク質に導入することによって目的とする人工タンパク質を設計した。C2H2型亜鉛フィンガーは、約30アミノ酸からなる小さなドメインであり、共通配列をなす7つのアミノ酸残基のうち2つのCysと2つのHisがZn(II)に四面体配位することにより、 $\beta\beta\alpha$ 構造を形成し、残りの3つの残基が疎水性コアを形成し安定化することが知られている。共通配列の導入にあたり、構造・機能への影響を少なくするために、変異によって大きく配列特性が変化しないようなタンパク質をモチーフ検索した。その結果、*Drosophila Melanogaster* 由来のDNA結合タンパク質である *Antennapedia Homeodomain* (Ant-wt) を目的のタンパク質とした。このAnt-wtに対し上記の共通配列を導入した Antennafinger (Ant-F) を設計し、Fmoc固相法にて化学合成した。

CDスペクトルの測定の結果、Ant-FはZn(II)非存在下でAnt-wtと同様の二次構造を有し、Zn(II)添加により、Ant-FはZn(II)を結合し、 α ヘリックスの減少を伴う二次構造変化を誘起することが分かった。Zn(II)の分光プローブであるCo(II)とAnt-Fの錯体の吸収とS2N2型の四面体配位をすることが示唆された。また、亜鉛フィンガーの共通配列のうちCysまたはHisを欠くAnt-Fの変異体とCo(II)の吸収スペクトル測定の結果から、変異を導入したCys及びHisがAnt-Fと金属イオンとの結合に関与していると考えられた。次に、Ant-FのDNAに対する結合制御能の有無を検討するためにゲルシフトアッセイを行ったところ、Zn(II)非存在下において、DNA結合能を有する一方、Zn(II)存在下において、そのDNA結合親和性を10倍以上低下させることが示された。以上の結果からAnt-Fは、Zn(II)との結合により構造変化を誘起し、DNA結合能を抑制することのできる新規分子であることが示された。

第二章 Ant-Fの構造変化におけるZn(II)の結合とアポタンパク質の安定性の影響 構造変化を誘起するタンパク質において、そのフォールディング安定性と基質結合能は構造変化の重要な熱力学的因子である。それらの相関関係の理解は、構造変化の物理化学的メカニズムの解明に有用な知見を提供すると考えられる。本章では、Ant-Fのアポ構造の安定化に伴うZn(II)の結合能の変化についても検討すると同時に、Zn(II)の α ヘリックス構造を、ヘリックス双極子相互作用、静電相互作用、ヘリックス形成能の高いアミノ酸への変換等を考慮して種々の変異を導入することにより試み、その変異体を

Ant-F-H1はAnt-Fに比べそのアポ構造は1.3kcal/mol安定化していることが分かった。次に、EGTAを競合剤としたZn(II)の滴定実験からZn(II)の結合エネルギーを算出したところ、Ant-F-H1はAnt-Fに比べZn(II)の結合エネルギーは、1.4kcal/mol低下していることが明らかとなった。このことから、アポ構造の安定化は、Zn(II)の結合能の低下につながり、Zn(II)の結合と共役した構造変化に大きく影響を与えることが明らかとなった。一方、Zn(II)添加に伴い、両タンパク質とも不安定化することが明らかとなった。この結果と熱力学的相関関係から、Zn(II)がタンパク質のアンフォールドした構造に対して結合することが示唆された。従って、構造変化の熱力学的因子として、アポ構造の安定性に加え、アンフォールドした構造に対するZn(II)の結合も重要であると考えられた。

本研究の結果は、構造変化のメカニズムについて基礎的知見を提供し、構造変化によって機能制御可能な人工タンパク質の創製に対し有用な情報を与えると考えられる。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の構造変化は、生体内での機能制御や疾病に対して深く関わり生命現象と密接に関連していることから、そのメカニズムを解明することは、生物学において重要な課題といえる。構造変化を誘起するタンパク質の人工設計は、この問題に対する有力なアプローチであるうえ、制御可能な新規機能分子の創製につながることを期待できることから、化学的観点からも興味深いといえる。本研究では、亜鉛イオンをリガンドとして、構造変化を誘起する人工タンパク質の設計法を構築し、その機能制御や、熱力学的解析からメカニズムについて検討を行い、以下のような価値ある知見を得た。

設計は、C2H2型亜鉛フィンガーモチーフの共通配列をリガンド配列として、構造の解明されている天然タンパク質に導入することによって行った。共通配列の導入にあたり、構造・機能への影響を少なくするために、変異によって大きく配列特性が変化しないようなタンパク質をモチーフ検索した。その結果、黄色ショウジョウバエ由来のDNA結合タンパク質である *Antennapedia* Homeodomain (Ant-wt) を目的のタンパク質とし、上記の共通配列を導入した Antennafinger (Ant-F) を設計した。

CDスペクトルの測定の結果から、Ant-FがZn(II)非存在下でAnt-wtと同様な二次構造を有し、Zn(II)との結合によって、 α ヘリックスの減少を伴う二次構造変化を誘起することを示した。Zn(II)の分光プローブであるCo(II)とAnt-Fまたはその誘導体の錯体から得られるスペクトルから、Ant-Fのホロ型は、導入したCysとHisにより天然の亜鉛フィンガーと同様のS2N2型の四面体の金属結合部位を構築していることが示唆された。また、ゲルシフト法から、Ant-FのZn(II)非存在下でDNA結合能を有し、Zn(II)添加により、DNA結合能10倍以上低下させることを明らかにした。このことから、Ant-Fが、Zn(II)と結合することにより構造変化を誘起し、DNA結合能を制御することのできる新規分子であることを示した。

次に、Ant-Fの構造変化のメカニズムを熱力学的観点から明らかにするため、Zn(II)の結合とフォールディング安定性の相関関係について検討した。まず、Ant-Fのアポ構造の安定化を試み、フォールディング安定性の変化がZn(II)の結合にどのような影響を与えるかを調べたところ、再設計したタンパク質であるAnt-F-H1はAnt-Fに対しアポ構造のフォールディング安定性が向上し、それに伴ってZn(II)の結合エネルギーは低下していることを明らかにした。次にZn(II)の結合によりフォールディング安定性が低下することを示し、変性実験の結果と変性条件下での金属イオンの結合及び熱力学的相関から、Zn(II)は非変性条件下で、アンフォールドした構造に対して強く結合していることが示唆された。以上の結果から、構造変化においてアポ構造及びホロ構造の安定性に加え、アンフォールドした構造に対するZn(II)の結合が重要な熱力学的因子であるという結論を導いた。

以上、本研究は、金属イオンを結合し構造変化を誘起するタンパク質の設計および機能制御分子の創製に関し新しい方法論を開拓するとともに、リガンドの結合によるタンパク質の構造変化のメカニズムに関して有益な知見を提供したと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月24日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。