

氏名	のむらあきこ 野村章子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第523号
学位授与の日付	平成15年3月24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	Redesign of the Metal Coordination Sites in the Zinc Finger Peptides (亜鉛フィンガーペプチド金属配位部位の再設計)

論文調査委員	(主査) 教授 杉浦幸雄	教授 藤井信孝	教授 富岡清
--------	-----------------	---------	--------

論文内容の要旨

序論 タンパク質内に見出される金属イオンはタンパク質構造安定化に寄与する構造金属イオンと酵素触媒反応などに携わる機能金属イオンの二つに大別される。特に亜鉛イオンはタンパク質内において構造金属イオンとしても、機能金属イオンとしても作用する特徴がある。前者の例としては亜鉛フィンガータンパク質の亜鉛イオンが挙げられる。例えば、 C_2H_2 型亜鉛フィンガーでは亜鉛イオンに2つのCysと2つのHisが配位することにより、コンパクトな $\beta\beta\alpha$ 構造が誘起・安定化され、高いDNA親和能を獲得する。機能亜鉛イオンの代表としては加水分解酵素のそれが挙げられるが、これらの機能亜鉛イオンには機能発現のために配位空座が存在し、亜鉛フィンガータンパク質内に見られる配位飽和の構造亜鉛イオンとは大きく異なる。本研究では、配位空座を有する C_2H_2 型亜鉛フィンガーペプチド変異体を作製し、各々の変異体の金属配位に伴う2次構造誘起と配位構造について検討した。さらに亜鉛フィンガーペプチド変異体の金属配位空座を利用した機能発現の一つとして、酢酸4-ニトロフェニルエステルおよびDNAの加水分解反応を検討した。

第一章 亜鉛フィンガーペプチドの金属結合とフォールディングに対する各配位子の寄与 配位飽和な亜鉛フィンガーへ配位空座を導入するためには、各配位アミノ酸残基の構造安定化への寄与に関する知見が必要不可欠だが、亜鉛イオン結合及びフォールディングに対する配位アミノ酸残基の個々の役割は未だ解明されていない。したがって、 C_2H_2 型亜鉛フィンガーの配位アミノ酸を各々Gly, Alaに変換した3配位型亜鉛フィンガーペプチド(以下、zf(XXXX)とする。X:C, H, G又はA)を合成し、亜鉛イオン結合とフォールディングとの相関について種々の分光学的手法を用いて検討した。亜鉛フィンガーに存在するTrp由来の蛍光強度変化から、全ての変異体において配位アミノ酸側鎖の欠如によっても亜鉛イオン結合能は失われず、野生型亜鉛フィンガーペプチド同様、安定に存在し得ることが明らかとなった。しかしながら、zf(CCGH)₃配位型ペプチドの円二色性スペクトルは亜鉛イオン添加によっても α ヘリックスの形成を示さないのに対し、亜鉛イオン存在下、他の3配位型ペプチドは野生型とほぼ同程度の α ヘリックスを形成した。これらの結果と分子動力学計算から、各々の配位アミノ残基のフォールディングへの寄与が異なること、さらに α ヘリックス形成においてHis23と β 構造から形成される疎水性コアが重要な役割を担っていることが示唆された。また、電子吸収スペクトルから各変異体における亜鉛は配位空座を有し、その配位構造は配位アミノ酸残基の種類に大きく依存することが明らかとなった。

第二章 構造亜鉛部位から機能亜鉛部位への変換 亜鉛フィンガーペプチド変異体の金属配位空座を利用した機能発現の一つとして、酢酸4-ニトロフェニルエステルの加水分解反応を検討した。野生型亜鉛フィンガーペプチドには触媒作用が認められなかったが、配位空座を有する変異型ペプチドはいずれも加水分解反応を促進した。その加水分解反応速度は配位アミノ酸残基の電子供与性と亜鉛の配位構造に大きく依存した。この知見をもとにzf(HHHH)を新たに設計した結果、代表的な加水分解酵素モデル化合物である亜鉛-サイクレン錯体の約25倍もの最も大きな反応性を示した。さらにpH依存性について検討した結果、金属に配位した水酸化物イオンからの直接的な求核攻撃による反応機構が示唆された。また、これらの変異型ペプチドは不斉選択性を示し、Boc-Gln 4-ニトロフェニルエステルに対する加水分解反応速度比(k_L/k_D)は

約20であった。

第三章 亜鉛フィンガーペプチドによる DNA 加水分解 前章において最も高い反応性を示した zf(HHHH) による DNA 加水分解能について検討した。基質として Sp1 亜鉛フィンガー結合部位を導入したプラスミド pUC19GC を作製し用いた。37°C, 72時間反応の結果, pUC19GC の form I から form II への切断が確認された。反応性はイオン強度に依存し, 正に帯電した zf(HHHH) が静電相互作用により効果的に DNA と結合してリン酸エステルを加水分解することを示唆している。基質 DNA への亜鉛フィンガー結合部位導入の有無による差異はほとんど認められず, 亜鉛フィンガーペプチド zf(HHHH) による DNA 認識は主に静電相互作用によることが示唆された。

以上の結果は, 構造金属イオンの機能金属イオンへの変換が新しい機能性金属タンパク質の創出において有用な手法であること, および多様な変異体が簡便に合成可能な比較的短い亜鉛フィンガーペプチドが機能性金属タンパク質の創出において有望な基本骨格となり得ることを示している。

論文審査の結果の要旨

人工蛋白質の設計はポリペプチドの折り畳み機構解明や天然蛋白質の機能解明に役立つだけではなく, 新規機能あるいは複合機能を有する人工蛋白質創製への期待から広い分野からの注目を集めている。特に金属蛋白質の設計はその機能の多様性から有用であり, これまでに多くの研究がなされてきた。これらとは異なり, 本研究では機能性人工蛋白質の新規創製法として, 金属蛋白質内における構造金属イオンと機能金属イオンの特徴に着目している。即ち, 亜鉛フィンガーペプチドの構造亜鉛イオンを機能亜鉛イオンに変換することにより, 機能性金属蛋白質の構築に成功している。得られた人工金属蛋白質の機能評価を行い, 以下のような知見を得ている。

まず, 構造亜鉛の機能亜鉛への変換を目的に, 亜鉛フィンガーの亜鉛配位構造に新たな配位空座の導入を試みた。具体的には, C₂H₂ 型亜鉛フィンガーの配位アミノ酸が各々 Gly, Ala に変換された 3 配位型亜鉛フィンガーペプチドを合成した。これらの配位アミノ酸残基の欠如が亜鉛イオンへの結合および構造に与える影響について分光学的手法を用いて詳細に調べた結果, 各亜鉛フィンガーペプチド変異体は配位アミノ酸残基の欠如にも関わらず, 配位空座を有する安定な亜鉛錯体を形成し, その配位構造は配位アミノ酸残基に依存することを示した。さらに実験結果と分子動力学計算から, His23 が C₂H₂ 型亜鉛フィンガーの α ヘリックスの形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

次に, 変異型亜鉛フィンガーペプチドの金属配位空座を利用した機能発現の一つとして, 酢酸 4-ニトロフェニルエステルの加水分解反応について構造機能相関を中心に評価した。配位空座を有する亜鉛フィンガーペプチドは何れも加水分解触媒活性を示したのに対し, 野生型亜鉛フィンガーペプチドおよび亜鉛イオン単独では触媒作用は認められず, 配位空座を有する亜鉛イオンが反応に関与していることが示唆された。反応性には配位子の電子供与性が重要であることが示唆された。これらの知見をもとに全ての Cys を His に置換した亜鉛フィンガーを新たに設計し, 反応性のさらなる向上を実現した。また, pH 依存性から亜鉛イオンに配位した水化物イオンからの求核攻撃により反応が進行していることを明らかにした。さらにペプチドのフォールディングによって生じる亜鉛活性部位の不斉空間に着目し, 光学活性なアミノ酸 4-ニトロフェニルエステルの加水分解について調べた。その結果, 本人工金属蛋白質が十分に高い不斉選択性を有することが明らかとなり, 配位空座を有する亜鉛フィンガーペプチドの多様な機能が示された。

亜鉛フィンガーの本来の機能である DNA 結合能と新規機能である加水分解能との複合機能の発現を目的とし, 変異型亜鉛フィンガーペプチドの DNA 加水分解能について評価した。その結果, 変異型ペプチドの DNA 加水分解能が観測され, DNA との親和性は主として正に帯電した亜鉛フィンガーペプチドと DNA との静電相互作用によることが示唆された。

以上, 本研究は, 機能性金属蛋白質の設計において構造金属から機能金属イオンへの変換という有用な新規手法を開拓したのみならず, 多様な変異体合成の簡便さの観点から亜鉛フィンガーペプチドが機能性金属蛋白質設計の有望な基本骨格となり得ることを実証した。これらの成果は機能性金属蛋白質の分子設計に有益な知見を示したと考えられる。

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。

さらに, 平成15年2月27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。