



展 TENBO 望

X線結晶構造解析が解き明かす —かごタンパク質のガス放出—



藤田 健太
Fujita Kenta



上野 隆史
Ueno Takafumi

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

1 はじめに

タンパク質はアミノ酸が規則的に折り畳まれることによって、 $10^{-8} \sim 10^{-7}$ nm サイズの特異的な三次元構造を有する分子構造体である。さらに、このタンパク質分子が自己的に集合し、“タンパク質集合体”と呼ばれる超分子構造が形成される。天然においてタンパク質集合体は、生体機能を維持するために重要な役割を担っている。例えばフェリチン (Fr) と呼ばれるかご型タンパク質は生体内の鉄の貯蔵を、ウイルスケージはウイルスのゲノム DNA の保持等、種々の分子を内包する機能を有しており、そのサイズは、数十～数百 nm である (図 1)¹⁾。

筆者らの研究グループでは以前より、かご型の構造を有する Fr 内部への有機金属錯体の集積化及び新規触媒分子としての利用を報告してきた。有機金属錯体はそれ自身で多様な化学反応を触媒する能力を有しているが、水に溶けにくい、長期保存性に乏しい等の欠点がある。こ

れらを克服できれば、環境触媒やバイオ応用の可能性が拓けてくる。その解決策として、Fr のかご内部への有機金属錯体の集積を検討してきた。その際、金属錯体が Fr 内部に集積した構造を決定することは、分子機能を設計する上で必要不可欠であり、大型放射光施設を利用した高分解能の X 線回折像取得により、金属の結合位置やアミノ酸残基との距離、角度といった詳細な構造情報を得ることで、錯体の化学的

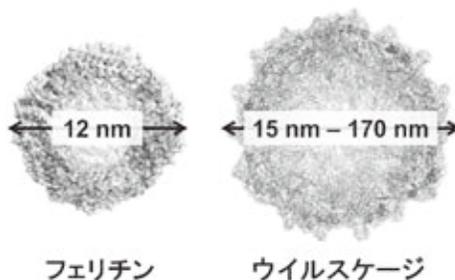


図 1 かご型構造を有するフェリチン及びウイルスケージの X 線結晶構造図

な反応性を議論することが可能となる^{2,3)}。

また、これまでに薬剤や金属ナノ粒子と Fr の複合体を細胞内へ送り込む試みがなされてきた⁵⁾。その理由は、Fr を用いることにより、内包分子の毒性を低減させたり、細胞への輸送効率を向上させたりすることが可能なためである⁶⁾。本研究では前述した Fr の特徴に着目し、金属カルボニル錯体の細胞内輸送法を開発した。

金属カルボニル錯体とは、一酸化炭素 (carbon monoxide : CO) を配位子に持つ金属錯体である。従来は化学工業的な触媒分子として利用されてきたが、2002 年に R. Motterilini のグループによって CO 放出分子 (carbon monoxide releasing molecules : CORMs) としての利用が報告されて以来、哺乳類の細胞やマウス等の生物に対して CO を輸送する手法としても利用されている^{7,8)}。生体中の CO の役割は、血中に存在するヘモグロビンタンパク質に結合している酸素と置き換わることにより、その酸素運搬能を阻害し、生体に対して毒性を引き起こすと考えられている。しかし、低い濃度では、細胞の機能を維持するために、薬として働くことも最近の研究により分かってきた。具体的には前述した CORMs によって CO の血管の弛緩作用や細胞保護作用が見いだされてきた⁹⁾。しかし、CORMs による輸送の場合、(1) 細胞環境下での CORMs の安定性が低く、CO の放出速度が非常に早いといった点や、(2) 細胞外から天然には存在しない金属を送り込むため、細胞の生存を脅かすような毒性を引き起こすといった問題点が確認されている⁹⁾。これらの問題点を解決し、生細胞内での詳細な CO の機能を探索するためには CORMs を安定に輸送するテンプレート分子の開発が必要となる。そこで筆者らは Fr への CORMs の内包による、新規細胞内 CORMs 輸送材料の合成を試みた⁴⁾。

2 研究内容

2.1 野生型 Fr へのカルボニル錯体の内包

トリス緩衝溶液中で、ルテニウムカルボニル錯体 (RuCO) 分子と野生型 Fr を反応させることによって、RuCO を Fr に内包した複合体 **1** を合成した。**1** はタンパク質結晶を得る一般的な手法であるハンギングドロップ法により結晶化させた。大型放射光施設 SPring-8 ビームライン BL38B1 を用いて X 線回折像を取得し、2.00 Å の分解能で同定した。図 2 (a) に **1** の全体構造と Ru 原子の集積の詳細構造を示す。**1** の内部に複数の Ru 原子が確認できた。さらに、図 2 (b) には Fr のかご構造を形成している 24 個の単量体のうち 1 つの結晶構造を示した。単量体上では、3 つの Ru 結合サイトが確認された。これらのより詳細な構造を図 3 に電子密度とともに示す。3 つの結合サイトの構造は次のように説明できる。

サイト 1 (Ru1) では、Glu45 のカルボキシル側鎖 (Fr を構成するアミノ酸配列のうち N 末

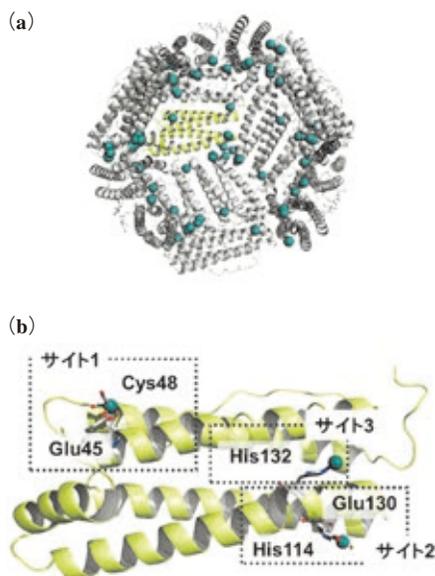


図 2 複合体 **1** の X 線結晶構造。(a) Fr 全体構造における Ru 原子 (図中 緑球) の結合、(b) Fr 単量体における Ru 原子の結合サイト

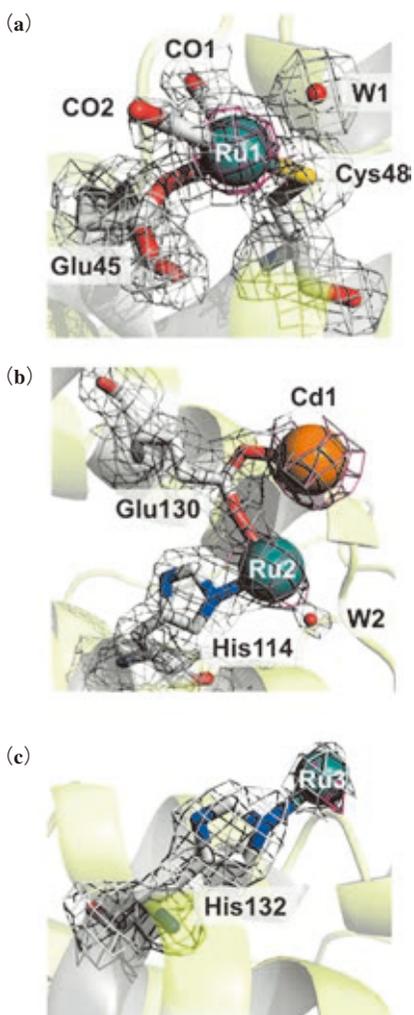


図3 Ru結合サイトの拡大図：結合サイト1 (a), サイト2 (b), サイト3 (c)

オレンジ色の球はカドミウム原子を、赤色の球は酸素原子を示す。また、Ru由来の電子密度をピンク色の網線で、その他のアミノ酸由来の電子密度を灰色の斜線で示した

端側から数えて45番目の意)とCys48のチオール側鎖の間へ挟まれるような結合が形成されている。Ru原子へは水分子(W1)及び2つのCO配位子(CO1, CO2)の結合も確認できる。

サイト2では、His114のイミダゾール側鎖とGlu130のカルボキシル側鎖の間へ挟まれるような結合が存在する。Ru2へは水分子(W2)

が結合している。Glu130のカルボキシル側鎖へは、結晶化溶液に含まれるカドミウム原子(Cd1)も配位していることが明らかとなった。サイト3(Ru3)では、His132のイミダゾール側鎖への結合が見られた。

このように、X線結晶構造解析を行うことによって、外部から導入したRu錯体のFr内部のアミノ酸残基への結合構造を明らかにした。次に、Ruが結合するアミノ酸残基の種類を変えることによって、CO放出量の増加を期待し、Fr変異体の合成を検討した。

2.2 変異型Frの設計

Frを構成するアミノ酸残基は、既存の遺伝子工学的な手法を用いることにより変換できる。本研究では、2つの変異型Frを作製した(図4)。

1つはGlu45をCysに、Cys48をAlaに置換したGlu45Cys/Cys48Ala-Frであり、もう1つはArg52をCysに置換したArg52Cys-Fr変異体である。これらを野生型と同様にRuCO錯体と複合化し、X線結晶構造解析を行った。

2.3 変異型FrへのRuCO錯体の内包

図5(a)に得られた結晶構造を示す。Glu45Cys/Cys48Ala-FrとRuCOの複合体(複合体2)では変異導入したCys45上に2個のRuの集積が確認された(Ru4, Ru5)。Ru4-Ru5間の距離が2.71 Åであることから、Ru-Ru間の結合を有するクラスター構造が形成されていると推定できる。この構造は、Ru5がHis49へ結合することにより安定化される。つまり、Glu45Cys/Cys48Ala-Fr変異体を用いることで、新たにCys-Ru-Hisの結合を形成させ、Ruの結合数を増加させることに成功した。

一方で、Arg52Cys-FrとRuCOの複合体(複合体3)についても、同様に配位構造の異なるRuとRuの結合数の増加が同定された(図5(b))。Ru6は野生型と同様にGlu-Ru-Cysの結合を有し、Ru7はCys48とCys52に結合している。Arg52Cys-Frをテンプレートとすることによって、Cys-Ru-Cysの構造が作られている

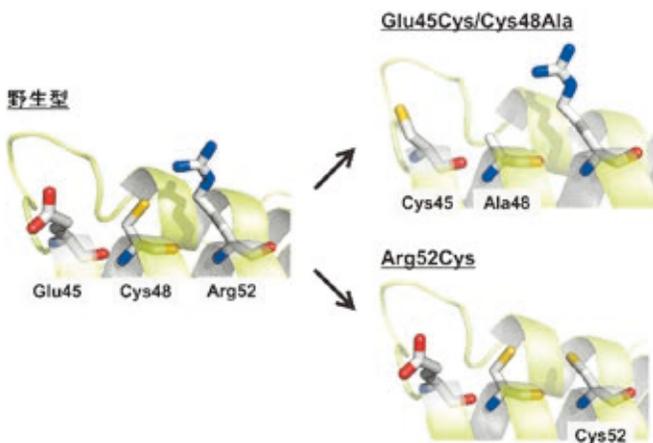


図4 Fr 変異体の設計
Fr 単量体の構造のうち、アミノ酸を置換した領域のみを示した

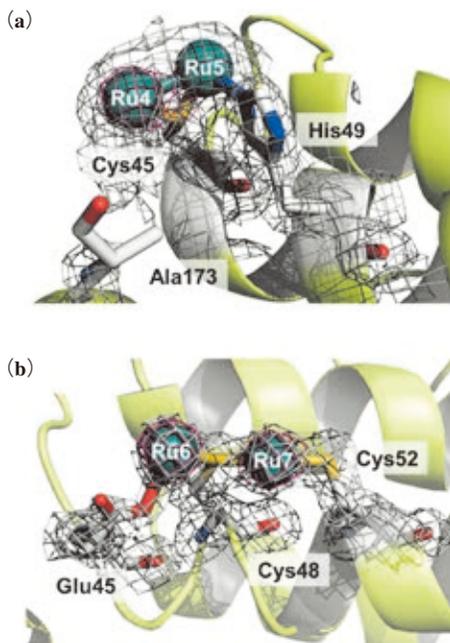


図5 変異型 Fr と RuCO 錯体との複合体の結晶構造。
(a) 複合体 2, (b) 複合体 3

ことを明らかにした。

このように、X線結晶構造解析で得られた構造を基に変異型タンパク質を設計し、異なる結合様式を持つ複合体を合成することができた。

2.4 Fr-RuCO 複合体の CO 放出特性

CO ガスの放出は、ミオグロビンを用いたアッセイにより評価した。ミオグロビンはその構造内にヘムを有し、そのヘムへの CO の結合による紫外可視吸収スペクトルの変化から CO の放出量を定量できる。スペクトルの時間変化追跡から CO 放出速度の半減期と Ru 一原子当たりの放出量を算出した(表1)。また、Mottlerlini らが 2003 年に合成し、汎用性の高い CORM の 1 つである CORM-3 との CO 放出特性も比較した。

Fr-RuCO 複合体 1~3 は CORM-3 に比べ、18 倍ゆっくと CO を放出することが分かった。これは、CO 放出の反応点が Fr の分子かごに保護されているためだと考えられる。また、2 は 1, 3 よりも 2 倍多くの CO を放出していることが明らかとなった。これは、2 が有している Cys-Ru-His の構造が影響していると推定できる。

2.5 細胞内の Fr-RuCO 機能

本研究では、細胞内のタンパク質発現を調節し、細胞を保護する役割を担う核転写因子の一種である Nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性に CO が与える影響を評価した。プレート上に生育させた HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) へ複合体 1~3 及び CORM-3 を混合し、12 h 経過後の NF- κ B の活性を発光測定により測定した(図6)。CORM-3 よりも複合体 1 と 3 は 2.5 倍、CO 放出量の多い複合体 2 では更に 4 倍、NF- κ B を活性化した。Fr-RuCO 複合体を用いることによって、(1) CO 放出速度を遅くすること、(2) より多くの CO を細胞内へ送り込むことが NF- κ B の活性化に重要であることを新たに見いだした。

表 1 複合体の CO 放出速度半減期及び CO 放出量

Composites	$t_{1/2}/\text{min}$	Release amounts of CO/Ru
1	37.3 ± 0.5	0.08 ± 0.01
2	36.2 ± 0.6	0.17 ± 0.03
3	36.0 ± 0.2	0.08 ± 0.02
CORM-3	2.2 ± 0.2	0.60 ± 0.06

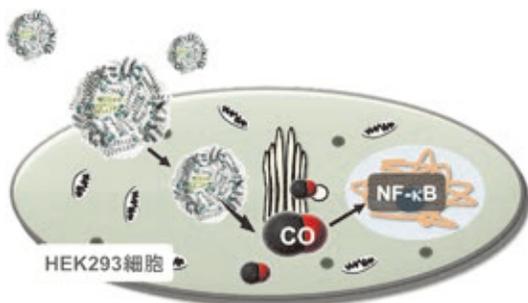


図 6 CO 放出フェリチン複合体の HEK 細胞への導入及び CO 放出, NF- κ B への作用のイメージ図

3 今後の展望

今回紹介した研究では, CORM を安定に細胞内へ輸送するために, Fr を利用するという点に焦点が当てられたが, CO の細胞内機能に関してはいまだに不明な点が多く残されている。特にいつ, どこで, どれだけの CO が必要かについてはほとんど議論がなされていない。現在は CO を放出するタイミングや量を外部刺激によって調節する系の構築に努めており, それを実現すれば従来の薬剤分子の合成設計とは全く異なる手法で, 医薬品開発へ寄与できると考えられる。

筆者らのグループでは, 前述した Fr を用いた系以外にも結晶状態のタンパク質集合体による CO 輸送について報告している^{9,10}。これら一連のタンパク質集合体をキャリアとした手法の開発は, カルボニル錯体の反応性の制御という化学的な視点と, ガス状分子による生理機能の調節という生物学的な視点を併せ持つ学際領

域の研究である。その詳細な議論を可能にしているのは, タンパク質と金属分子との複合化反応の技術と, タンパク質 X 線結晶構造解析技術の進展であり, 今後 CO 輸送以外の研究分野においてもこれらの手法を上手く活用して, 生体内で有効に機能する様々な分子の精密合成が進められていくと期待される。

【謝辞】

本研究は全て東京工業大学大学院生命理工学研究科の筆者の研究室と同研究科の近藤研究室との共同研究の成果である。また, 内閣府の最先端・次世代研究開発支援プログラム(課題番号 LR019)の研究助成により行われた。タンパク質結晶の X 線回折データ取得は, SPring-8 ビームライン BL38B1(課題番号 2013B1262, 2013B1382)及び, 名古屋大学超強力 X 線回折実験室において行われた測定で取得した。この場を借りて共同研究者の皆様深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Maity, B., *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **25**, 88–97 (2015)
- 2) Abe, S., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10512–10514 (2008)
- 3) Abe, S., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6958–6960 (2009)
- 4) Fujita, K., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 16902–16908 (2014)
- 5) Ueno, T., *et al.*, *Chem. Asian J.*, **8**, 1646–1660 (2013)
- 6) Liu, X., *et al.*, *J. Mater. Chem.*, **21**, 7105–7110 (2011)
- 7) Motterlini, R., *et al.*, *Circ. Res.*, **90**, 17–24 (2002)
- 8) Romao, C.C., *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 3571–3583 (2012)
- 9) Garcia-Gallego, S., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 9712–9721 (2014)
- 10) Tabe, H., *et al.*, *Inorg. Chem.*, **54**, 215–220 (2014)
- 11) Tabe, H., *et al.*, *Chem. Lett.*, in press