

無細胞翻訳系を用いた FMN 結合タンパク質の解析

愛媛大学工学部応用化学科
阿部 正人

はじめに

現在、様々な生物種でゲノム解析が終了し、タンパク質の機能や構造を解析するプロテーム解析に移行しているが、補因子結合タンパク質はゲノム上に多数コードされており、これらのタンパク質をいかにして生産するかが課題となっている。また、補因子がどのようにしてポリペプチド鎖に取り込まれるかという問題は補因子結合タンパク質研究の重要課題である。無細胞翻訳系は安定同位体やセレノメチオニン標識タンパク質の解析ツールとして利用され始めている(1,2)。そこで我々は小麦胚芽無細胞翻訳系(3)を用いて、補因子結合タンパク質のタンパク質合成・フォールディングと補因子の取り込みの相関について解析しようと考えた。

様々な補因子-フラビンについて

補因子にはヘム、鉄硫黄クラスター、ビオチンなど様々な物が存在するが、これらはポリペプチド鎖にない反応性をタンパク質に付加したり、フォールディングを助ける構造因子として機能している。我々の中でもフラビンに焦点を当てた。フラビンは補因子の中でも最もバリエーションが豊富で、様々な分光学的分析が利用できるというメリットを持っている。また、非酵素的にポリペプチド鎖に取り込まれると言われている。生体内にはフラビンモノヌクレオチド(FMN)やフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)などが存在する(図1)。これらの基本構造であるイソアロキサジン環は、酸化型・セミキノン型・還元型の3つの型をとることにより2電子の受け渡しを行っている。

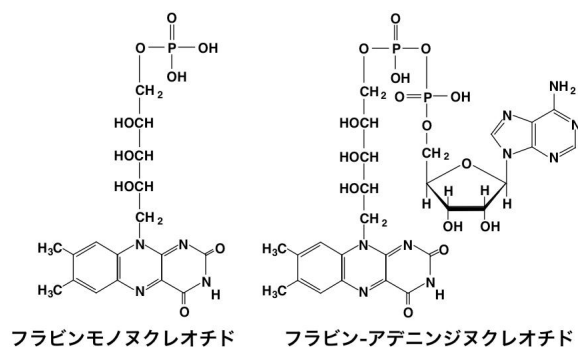


図1 生体内で用いられるフラビン

硫酸還元菌由来 FMN 結合タンパク質

我々は硫酸還元菌由来 FMN 結合タンパク質をモデルタンパク質として選択した。このタンパク質は1994年に北村らにより発見されたフラビンタンパク質である(4)。一サブユニットが122残基からなり、現在報告されている FMN 結合タンパク質の中では最も小さい。今のところ生理活性は確認されていないがおそらく硫酸還元菌の電子伝達系に関与しているものと思われる。後

に NMR 解析が行われ、キモトリプシンに似たフォールディングをしたポリペプチド鎖に FMN のイソアロキサジン環が表面に露出した状態で非共有結合するという非常に特殊な構造であることが明らかになった(5)。近年 X 線結晶構造解析によりホモ二量体構造であることが確認された(6)。

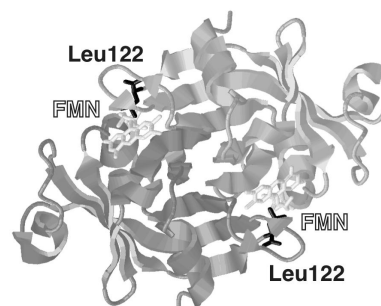


図2 FMN結合タンパク質の二量体構造

アポタンパク質の合成及び FMN との再構成

まず我々はこのタンパク質を無細胞翻訳系により合成した場合に、FMN 非存在下では FMN が結合していないアポタンパク質として生産されるかを確認した。その結果合成されることが判ったので、DE52 陰イオン交換カラムクロマトグラフィ及び Sephacryl S-100 ゲル濾過カラムクロマトグラフィを用いて単一標品にまで精製した。次にこのタンパク質が成熟型のホロタンパク質に変換されるかを調べた。アポタンパク質に FMN を加えてインキュベートし、未反応の FMN を除去した。これを可視・紫外吸収スペクトル測定したところ FMN の吸収がみられたのでホロタンパク質への変換は可能であることが判った。では、この FMN は結合サイトにきちんとはまっているのだろうか。この段階ではタンパク質に非特異的に吸着していることは否定できない。そこでこの変換ホロタンパク質の酸化還元電位測定を行ったところ、-277 mV という値を得た。この値は大腸菌で発現したリコンビナントタンパク質データと一致していたので FMN が結合サイトにきちんとはまっていることが証明された。さらに我々はフラビン結合能についても調べた。FMN 溶液にアポタンパク質を加えると消光という現象がおこることを利用し FMN の解離定数を算出した結果、0.68 nM であった。この値も大腸菌で発現したリコンビナントタンパク質データとよく一致していた。同様にリボフラビン(ビタミン B2)についても行ったところ結合しないデータが得られた。このことから結合には FMN のリン酸部位が重要であることが判った。

アポタンパク質とホロタンパク質の高次構造解析

我々はアポタンパク質の精製段階で奇妙な現象に気付いていた。それは、アポタンパク質が単量体ではないような挙動をしていたことである。そこで、Superdex75 分析用ゲル濾過カラムクロマトグラフィを行ってみたところ結果はホロタンパク質とほぼ同じ溶出位置を示していた。我々にとってこの結果は意外であった。というのは X 線結晶構造解析の結果からホロタンパク質は二量体構造であり(図2)、片方のサブユニットのカルボキシル末端に位置するロイシン 122 残基がもう片方のサブユニットの FMN を互いにロックしており、このロック構造が二量体形成に必須であると考えられていた。したがって、アポタンパク質の場合 FMN は存在しないためロック構造がとれず二量体ではないと思われていたからである。しかし、ゲル濾過分析のみでアポ

タンパク質が二量体である...と言い切るのは早合点である。というのも FMN 結合タンパク質は塩基性タンパク質で (pI=10.1)、ゲルマトリクスと相互作用する可能性が高い上、タンパク質分子が球状である保証はどこにもない。

そこで東京工業大学の有坂先生との共同研究で超遠心分析を行った。沈降速度法の結果より移動境界面がきれいなシグモイド曲線を描いていることからタンパク質溶液は流体力学的に均一であり、夾雑物が混在していないことを確認した。また、沈降平衡法の結果から分子量が求まり、アポタンパク質とホロタンパク質は二量体であることが証明された。さらに我々は摩擦比の値からホロタンパク質がやや楕円形であるのに対してアポタンパク質はほぼ理想的な球状タンパク質であることを見出した。ここでもし形状のみを比較した場合、摩擦比の小さいアポタンパク質の方がホロタンパク質よりも速く沈降するはずである。ところが沈降係数の値はこれと全く逆の事実を示していた。両者の分子量はほぼ同じである。

これはいったいどういうことなのであろうか。一見矛盾しているかのように見えるこの現象は次のように解釈できる。アポタンパク質は開いた構造をとっているのではなか。そうすると両タンパク質の CD スペクトルは違ったラインを示すのではないだろうか。

測定の結果はやはりそうで α -ヘリックスや β -シートなどの二次構造は大きく変化していた。さらに、トリプトファン (Trp) やチロシン (Tyr) 残基などの芳香族ア

ミノ酸残基の線光強度を示す波長領域ではより顕著な差が見られた。FMN 結合タンパク質には一サブユニットあたり二つの Trp 残基と一つの Tyr 残基が存在するが、これらは幸いにもすべて FMN 周辺に位置している (図3)。我々は次のように解釈した。ホロタンパク質の場合、これらのアミノ酸残基の芳香環は FMN のイソアロキサジン環と疎水的相互作用により安定化するため、FMN 周辺は閉じた構造をとっている。一方アポタンパク質の場合では FMN が存在しないために周辺が不安定になり開いた構造をとる。

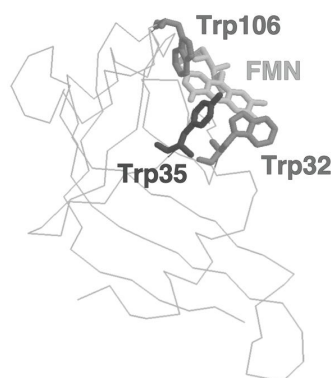


図3 FMN周辺の芳香族アミノ酸残基

FMN の取り込みとタンパク質フォールディング

以上の結果をまとめると、次のようになる (図4)。まず、FMN 結合タンパク質を無細胞翻訳系により FMN 非存在下で合成すると、アポタンパク質として合成される。このアポタンパク質はすでに二量体である。アポタンパク質に FMN を加えると結合サイトにきちんとは

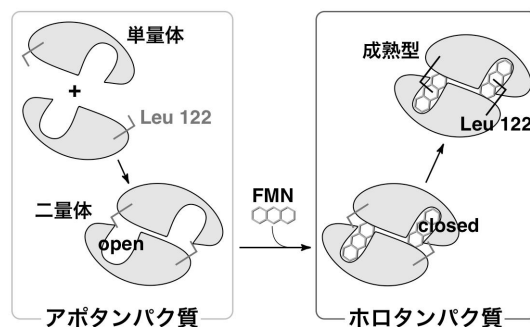


図4 FMNの取り込みとタンパク質フォールディング

まり、それまで開いていた結合サイトが閉じる。この際 FMN のリン酸部分が結合に重要である。そして、おそらく最後にロイシン 122 残基が FMN をロックし、安定で成熟型の二量体構造が形成されると考えられる。(7、8)

非天然アミノ酸を導入する

我々は FMN が結合することにより周辺の芳香族アミノ酸残基の高次構造が変化することを見いだしたが、これを何らかの方法を使ってさらに追跡出来ないかと考えた。幸いなことにチロシン残基は 1 サブユニット中に 1 個しか存在しないため、ここに非天然アミノ酸を導入することにした。最初に考えたのが、3-アジドチロシンに変換することである(図5)。3-アジドチロシンは非常に反応性が高く、これがタンパク質に取り込まれるとトリアリールホスフィン誘導体(TAPD)で化学修飾することができる。この TAPD を前もってフルオレセインで標識しておく

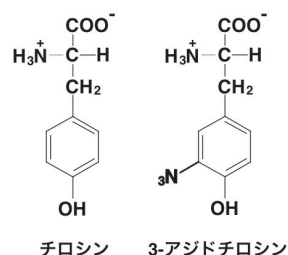


図5 チロシンと3-アジドチロシンの構造

しておく

と修飾されたタンパク質が蛍光を発する。我々はこの化学的性質を解析に利用しようと考えた。

いったい我々が何をやりたいかという、ということである(図6)。まず、3-アジドチロシンを取り込ませたアポタンパク質とホロタンパク質を合成・精製した後にそれぞれフルオレセイン標識した TAPD で化学修飾する。ここで、もし、ホロタンパク質が閉じた構造をとっているならば立体障害で反応性が低下するためアポタンパク質に比べて蛍光強度が低下するはずである。

そこで我々は以下の実験を行った。3-アジドチロシンは不安定なので、得られたタンパク質を迅速に精製する必要がある。そこでまず、FMN 結合タンパク質遺伝子のアミノ末端にヒスチジンタグを付加した。次に、部位特異的変異法によりチロシンの”UAC”コドン、アンバーストップコドンである”UAG”に変換し、このアンバーストップコドン

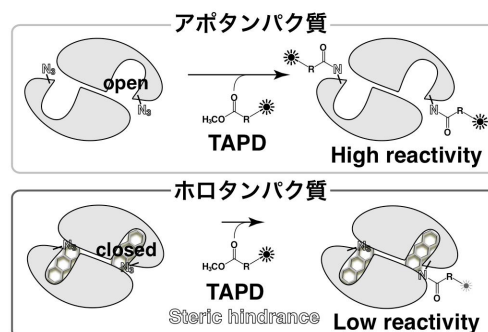


図6 我々の仮説

を認識するアンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr}を準備した。また、野生型のチロシル tRNA 合成酵素では、3-アジドチロシンを効率よく取り込ませることができないため、その43番のチロシンをグリシンに変えた酵素を準備した(9、10)。これにより、アンバーサプレッサー-tRNA^{Tyr}の3'末端に3-アジドチロシンが結合するはずである。実際このアミノアシル化反応が試験管内で再現されるかを酸性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べた。その結果、反応が起こることが判ったので、無細胞翻訳系に

はこの3-アジドチロシル tRNA^{Tyr}の状態を加えた。ここで最も重要なことが一つある。それは小麦胚芽 S-30 画分から内在性のチロシンを可能な限り除去することである。これによりサプレッサー-tRNA^{Tyr}が小麦由来チロシル tRNA 合成酵素によりミスアシル化する問題を最小限に抑えることが可能となる。そこで S-30 画分を Sephadex G-25 ゲル濾過カラムに通し、思惑通り Tyr が除けたかを調べるために Green Fluorescent Protein を合成し、¹⁴C で標識したロイシンの取り込み量をチロシン存在下及び非存在下で比較した。その結果、合成量が十分に多ければ、内在性のチロシンによる影響を最小限に抑えられることが判った。

我々はこの非天然アミノ酸導入に最適化した無細胞翻訳系を用いて FMN 結合タンパク質のアポタンパク質とホロタンパク質を合成し、Ni-NTA カラムクロマトグラフィにより精製した。この精製した両タンパク質間の濃度を一定にした後 TAPD で化学修飾した。これらを 18% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、蛍光イメージアナライザーで蛍光検出した結果、アポタンパク質の蛍光強度がホロタンパク質のそれに比べて高くなった(図7)。これは FMN が結合したことにより結合サイトが閉じた構造に変化することを示唆しており、我々の仮説を裏付ける結果となった。



図7 蛍光検出の結果

おわりに

このように我々は無細胞翻訳系を用いて FMN 結合タンパク質を合成し、様々な分光学的分析や超遠心分析、さらには非天然アミノ酸導入を利用した全く新規な分析手法によりポリペプチド鎖のフォールディングと FMN の取り込みについて検討してきた。その結果、フラビンがタンパク質表面に非共有結合したタイプのタンパク質についてはフラビンの取り込みの追跡が可能であることを見出した。また他の補因子結合タンパク質についても、補因子が非酵素的にタンパク質に取り込まれ、その結合様式が似たタイプであれば、同様に無細胞翻訳系を利用して追跡出来ると考えられる。無細胞翻訳系の応用可能な補因子結合タンパク質の種類は多く、ポストゲノム・プロテオーム解析の一環として利用されるだろう。

参考文献

1. Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., & Yokoyama, S. (2002) *J. Struct. Funct. Genomics* **2**, 29-35.
2. Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., & Yokoyama, S. (1999) *FEBS Lett.* **442**, 15-19.
3. Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., & Endo, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14652-14657.

4. Kitamura, M., Kojima, S., Ogasawara, K., Nakaya, T., Sagara, T., Niki, K., Miura, K., Akutsu, H., & Kumagai, I. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5566-5573.
5. Liepinsh, E., Kitamura, M., Murakami, T., Nakaya, T., & Otting, G. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 975-979.
6. Suto, K., Kawagoe, K., Shibata, N., Morimoto, Y., Higuchi, Y., Kitamura, M., Nakaya, T., & Yasuoka, N. (1999) *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1089-1090.
7. Abe, M., Hori, H., Nakanishi, T., Arisaka, F., Ogasawara, T., Sawasaki, T., Kitamura, M., and Endo, Y. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **48**, 143-144 (2004)
8. Abe, M., Hori, H., Nakanishi, T., Arisaka, F., Ogasawara, T., Sawasaki, T., Kitamura, M., and Endo, Y. *Flavins AND Flavoproteins 2005*, 663-668.
9. Ohno, S., Yokogawa, T., & Nishikawa, K. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)* **130**, 417-423.
10. Ohno, S., Yokogawa, T., Fujii, I., Asahara, H., Inokuchi, H., & Nishikawa, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 1065-1068.
11. Hori, H., Abe, M., Nakanishi, T., Yokogawa, T., Ohno, S., Suzuki, M., Hosoya, T., Ogasawara, T., Sawasaki, T., Nishikawa, K., Kitamura, M., and Endo, Y. *Flavins AND Flavoproteins 2005*, 669-674