

電子を運ぶ人工の蛋白質やペプチドを創る

「場と反応」領域 篠原 寛明

1. 研究のねらい

ある特定の物質を見分け、電子の受け渡し（酸化還元反応といいます）を触媒する酸化還元酵素蛋白質と、金属や半導体などの電極材料との間のスムーズな電子移動を実現することができれば、その特定物質を電流として迅速に計測するバイオセンサーや、電気や光のエネルギーによって特定物質の変換や合成を効率よく行うことができるリアクターを開発できると期待されています。しかし酸化還元酵素の酸化還元部位は一般にポリペプチドの殻の中に埋め込まれているため、電極材料との間の直接的な電子移動を行うことはそう簡単ではありません。両者間の電子移動を媒介し、機能を連結するためのインターフェイス場の設計が重要となっています。

一方生体系においては、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖電子伝達系や葉緑体チラコイド膜の光合成電子伝達系に見られるように、酸化還元機能基が特定の順序、配向で埋め込まれた酸化還元酵素や電子伝達蛋白質が、特定の向きで複合体を形成し、さらに脂質膜中に集積化され

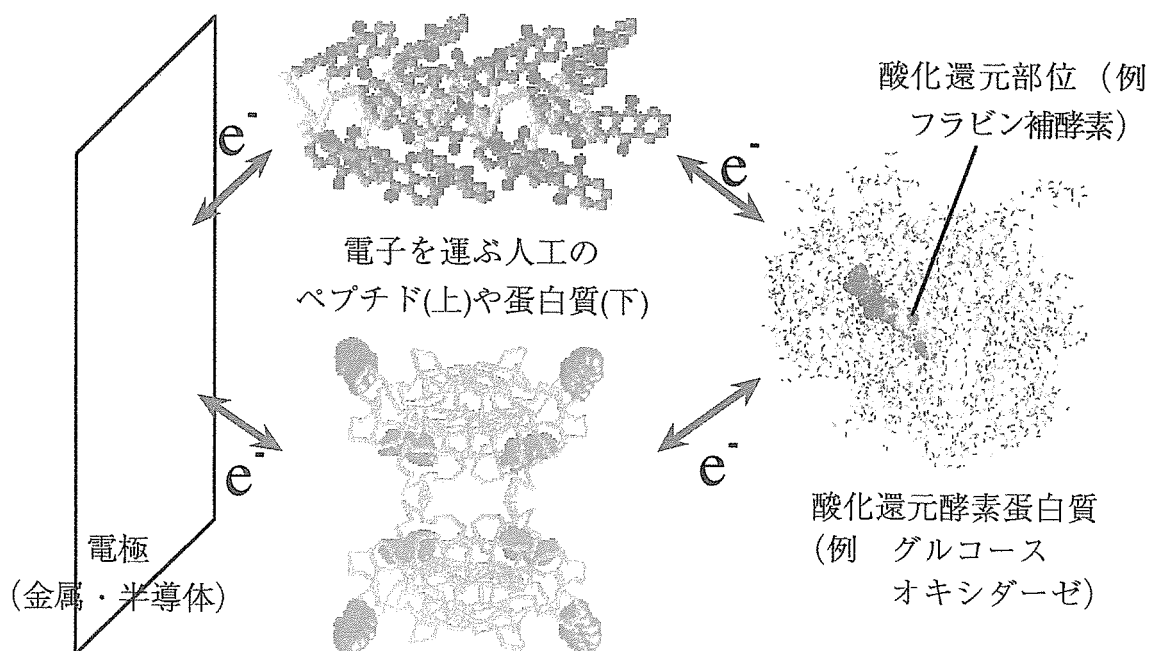


図1 酸化還元酵素と電極間の電子移動を媒介する人工のペプチドや蛋白質を創る

て効率のよい電子リレーが実現できるようシステムが組み立てられています。

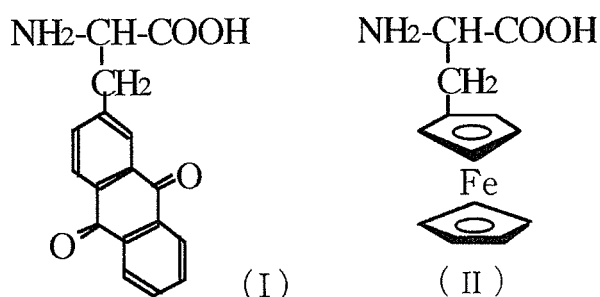
本研究では、この生体系の電子リレー分子システムに学び、酸化還元酵素蛋白質と金属電極材料とのスムーズな電子移動を媒介すると期待できるインターフェイス分子として、図1に示すように酸化還元機能基が空間位置固定され、さらに天然の酸化還元酵素や電極材料と特定の位置、向きで連結できる人工の酸化還元機能性ペプチドや蛋白質を創ることを目指しました。

2. 研究方法と成果

(1) 酸化還元機能を持つ人工ペプチドを創る

a. 酸化還元機能を有する非天然アミノ酸の合成

L-2-アントラキノニルアラニン (I) やL-フェロセニルアラニン (II) などの酸化還元電位 (酸化や還元され易さの指標) の異なる非天然アミノ酸を合成しました。



b. 酸化還元機能性非天然アミノ酸を構成ユニットとするペプチドの合成

N-カルボキシ無水物 (NCA) 法という方法を用いて、(I) や (II) の非天然アミノ酸を縮合させ、そのペプチドを合成しました。図2に示すような C 末端にポリエチレングリコールを付けた、あるいは両末端にポリ(γ-ベンジル L-グルタメート)を付けたブロック重合体を作ることによって、有機溶媒に溶けるペプチドを作ることができました。

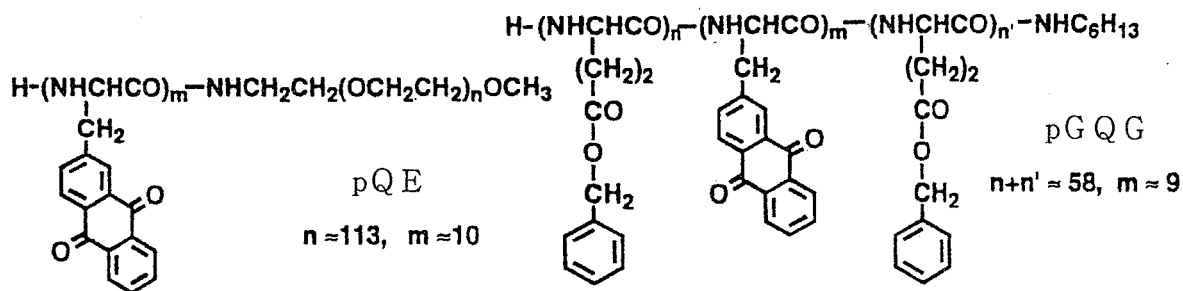


図2 合成した酸化還元機能性ペプチドの例：ポリ (L-2-アントラキノニルアラニン)

c. 合成したペプチドのコンフォメーション（立体構造）の検討

非天然アミノ酸を構成単位として合成したペプチドについて、実測した円二色性（CD）スペクトルと励起子理論により計算された CD スペクトルとを比較検討することにより、そのコンフォメーション（立体構造）を推定しました。

一例として図3に、L-2-アントラキノニルアラニンのペプチドの一つ pQE の有機溶媒中で測定した CD スペクトルと理論 CD スペクトルとを示します。図4に示すような左巻きの α -ヘリックス構造をとるものと推定することができました。

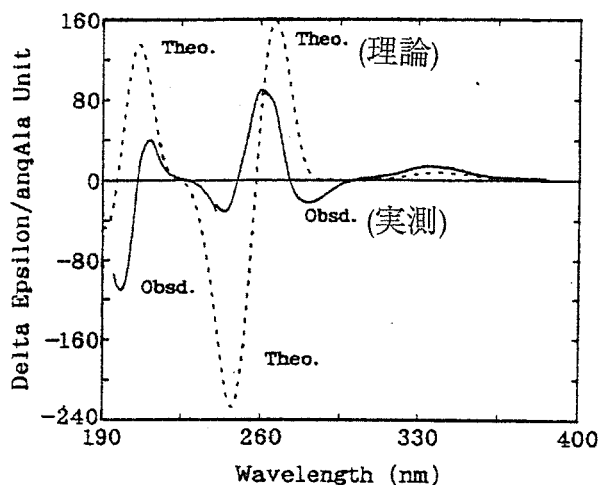


図3 pQE の実測及び理論 CD スペクトル

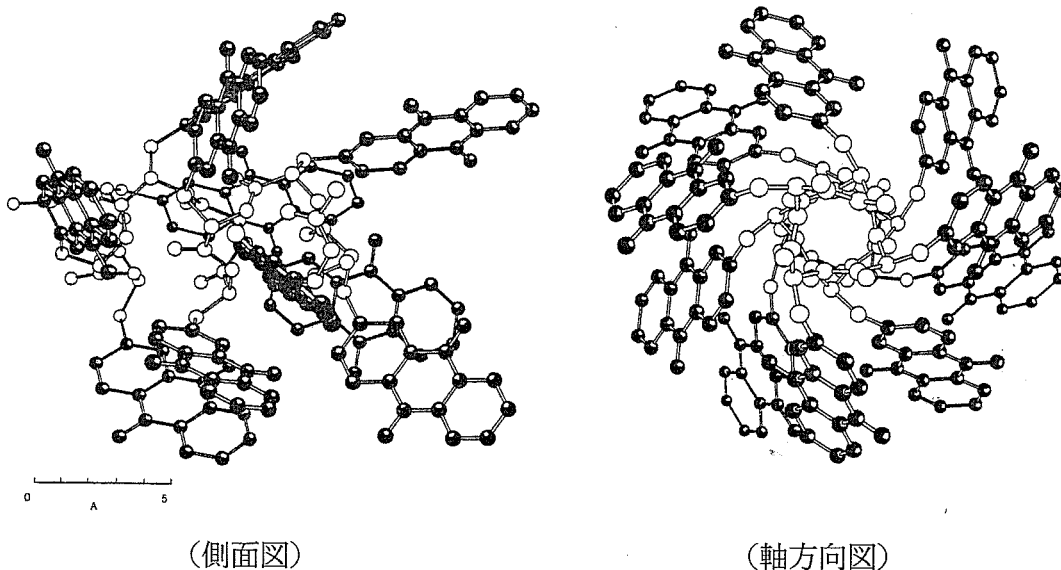


図4 pQE の推定された左巻き α -ヘリックス構造

d. 合成したペプチドの酸化還元機能の検討

有機溶媒中でサイクリックボルタンメトリーなどの電気化学測定を行い、合成したペプチドが可逆的な酸化還元機能を有することを明らかにしました。図5には pQE と pGGG の酸化還元波を示すサイクリックボルタモグラム（電位-電流曲線）を示します。L-フェロセニルアラニンのペプチドにおいても可逆的な酸化還元が可能であることが確かめられました。

さらに電位印加下でのスペクトル測定により、pQE や pGQG ではアントラキノニル基の1電子還元電位において2電子還元体が生成することから、図6に模式的に示すように、電極との1電子移動反応に引き続きアントラキノニル側鎖間での速やかな電子移動不均化反応が起こっている可能性が示唆され、これらの合成ペプチドの側鎖間で電子移動がおこる可能性が示されました。

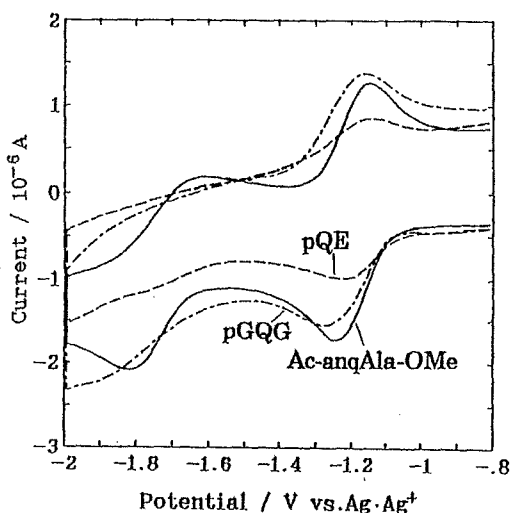


図5 ポリ(アントラキノニルアラニン)のサイクリックボルタモグラム

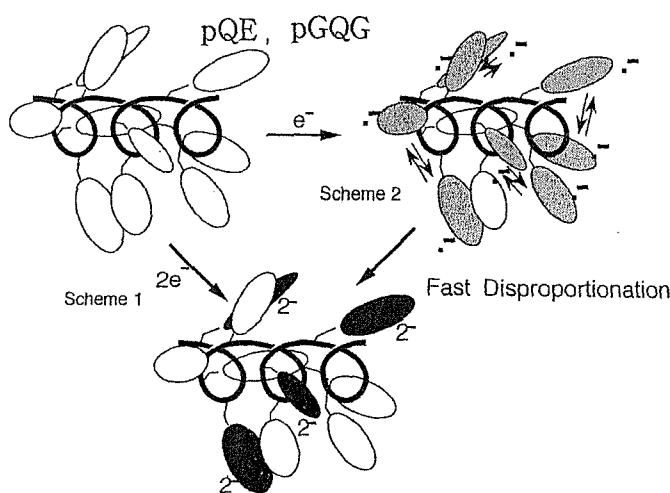


図6 推察されるポリ(アントラキノニルアラニン)の電気化学還元機構

(2) 酸化還元機能を持つ人工蛋白質を創る

a. 酸化還元機能性非天然アミノ酸を部位特異的に導入した人工蛋白質作製法の原理

本研究では、酸化還元サイトを空間位置固定した人工蛋白質を作製するために、化学合成法と遺伝子工学的手法とを組み合わせた生体外蛋白質合成法を利用して酸化還元機能を持った非天然アミノ酸を天然蛋白質に部位特異的に導入することを図りました。図7にこの人工蛋白質の合成スキームを示します。導入したい非天然アミノ酸を有機化学反応と酵素反応とを組み合わせ、3'末端に担持したアミノアシル tRNA を作製しておき、大腸菌からのリボゾーム抽出液を用い、微小な試験管の中で mRNA (メッセンジャーRNA) の翻訳による蛋白質合成を行わせます。この際非天然アミノ酸を組み込みたい部位のアミノ酸に対応する mRNA の3塩基コドンが4塩基コドン CGGG に組み換えられた変異 mRNA を用意します。また一方非天然アミノ酸を担持した tRNA のアンチコドンも対応するよう CCCG に組み換えておきます。この4塩基コドン-アンチコドンで翻訳が行われると組み換えた特定部位にのみ非天然アミノ酸が導入された蛋白質が合成され、もしも従来通り3塩基コドン-アンチ

コドンで翻訳が行われて導入部位に天然アミノ酸が入った場合には、図8に示すようにしばらく進んだところでストップコドンが現れ、途中で蛋白質合成が止まってしまう仕組みになっています。この方法は、完全長の蛋白質ができたときには必ず非天然アミノ酸が導入されるところが大きなポイントで、私の研究室の宍戸教授、芳坂助手が世界に先駆けて開発した新しい方法です。

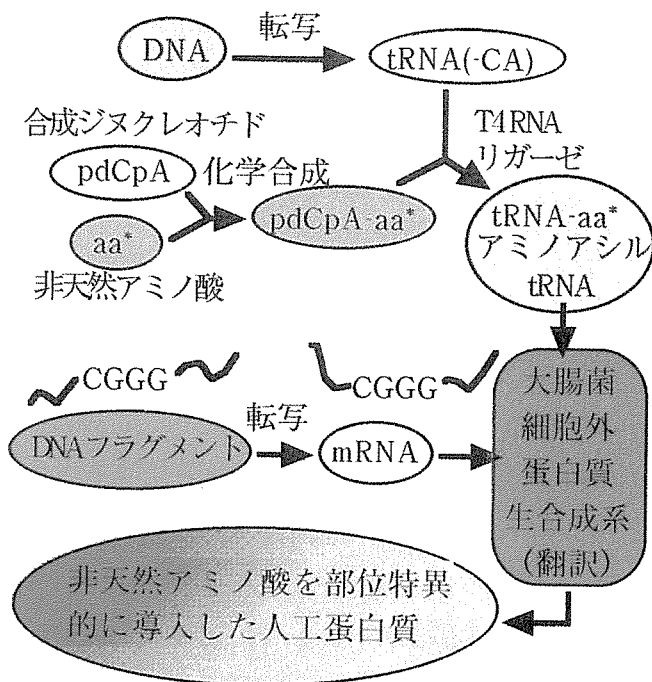


図7 生体外蛋白質合成法による非天然アミノ酸の蛋白質への部位特異的導入

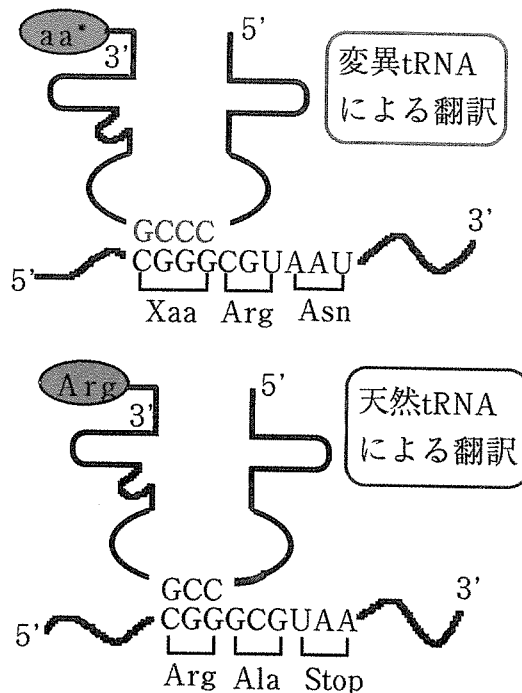


図8 4塩基コドン-アンチコドンを利用する人工蛋白質の合成

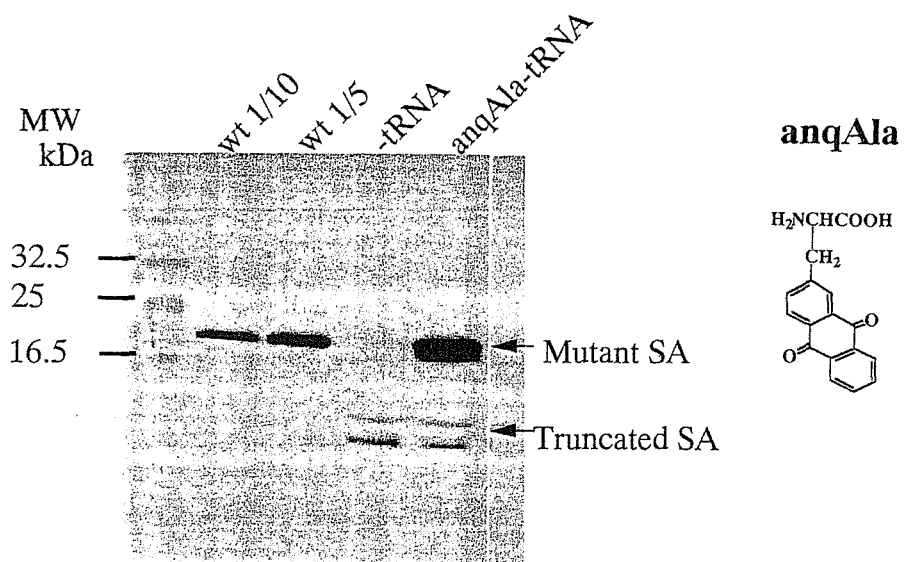
b. 酸化還元機能性非天然アミノ酸を部位特異的に導入したストレプトアビジンの合成

本研究では、電極基板や酸化還元酵素蛋白質と特定の向き、位置で結合できる人工蛋白質を創りたいと考え、ビオチンという分子を特異的に結合するストレプトアビジンという蛋白質（四量体で4つのビオチンを結合できる）に着目しました。L-2-アントラキノニルアラニンやL-フェロセニルアラニンなどの酸化還元機能性アミノ酸を担持させた変異 tRNA を合成し、変異 mRNA の翻訳を生体外蛋白質合成法により行い、酸化還元機能性非天然アミノ酸を部位特異的に導入したストレプトアビジンの合成を試みました。

その結果、例えばチロシン (Tyr) 83位に L-2-アントラキノニルアラニン (anqAla) を導入したストレプトアビジンの合成がウエスタンブロット (図9 A) より確認されました。また合成された人工ストレプトアビジンは、ビオチン結合活性を有することがドットブロッ

ト (図9 B) より示されました。この人工ストレプトアビジンの予想される立体構造を図10に示します。83位のほかに 54位や 22位のチロシン部位への導入も可能で、生成したストレプトアビジンはいずれもビオチン結合能を持っていました。

A 電気泳動により生成した蛋白質の分子量を調べる。



B ストレプトアビジンとビオチンの結合をビオチン修飾酵素を用いて調べる。

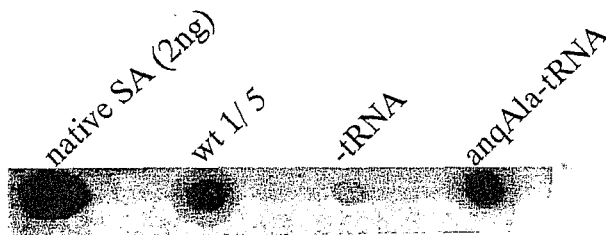


図9 ストレプトアビジンの生合成を確かめるためのウェスタンブロット(A)とビオチン結合能を調べるためのドットブロット(B)

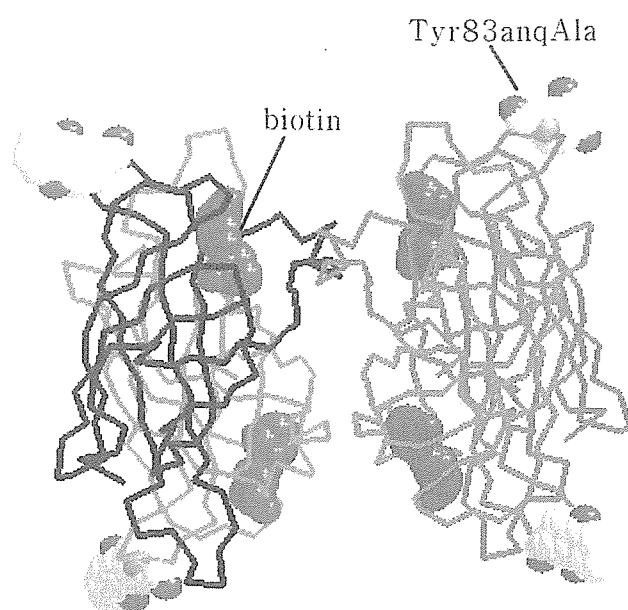


図10 anqAla を Tyr83位に導入したストレプトアビジン (4量体) の立体構造予想図

c. 非天然アミノ酸を部位特異的に導入したストレプトアビジンの酸化還元機能の検討

アントラキノニルアラニン部位特異的に導入したストレプトアビジンは、ビオチン結合能も保持していることが確かめられたので、ビオチンを化学結合させた金電極を作製しその表面に合成した蛋白質を特異的に結合させた後、電気化学測定を行ったところ、図11のボルタモグラムに示すように確かにアントラキノニル基の酸化還元電位付近に電流ピークが認められました。よって合成された人工ストレプトアビジンは、期待した通り、決まった位置で電極と結合できる酸化還元蛋白質として働くことが示されました。

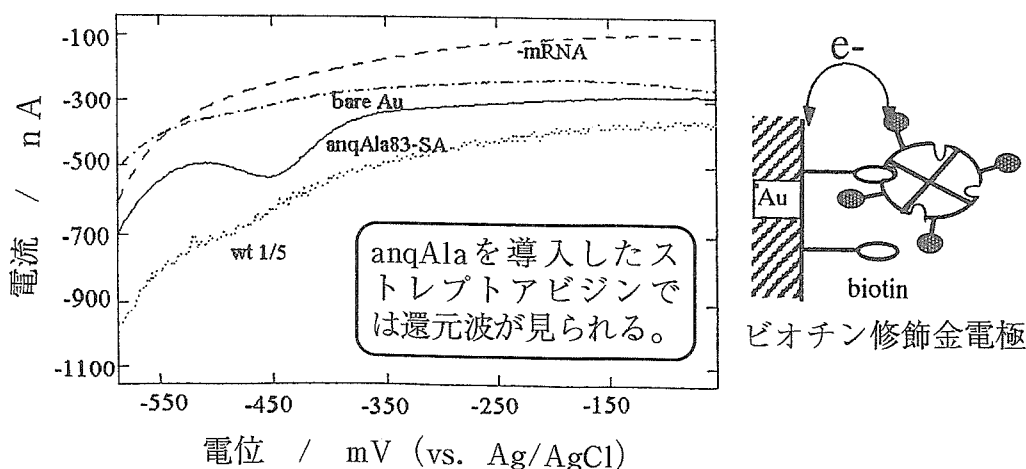


図11 ビオチン修飾電極上に結合させた anqAla 導入ストレプトアビジンの微分パルスボルタモグラム

(3) 人工ペプチド・蛋白質と酸化還元酵素とをつなぐ電子リレー分子を作る

作製された人工の酸化還元ペプチドや蛋白質を天然の酸化還元酵素と特定の位置で結合させ、スムーズな電子移動を行わせるには工夫が必要です。本研究では酸化還元酵素の電子授受サイトである酸化還元補酵素自体を両者をつなぐ接続分子兼電子リレー分子にしようと考えました。最も代表的な酸化還元補酵素であるフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)に、ペプチドや他の分子と接続できるようにアミノヘキシル基という分子を付けたN⁶-(6-アミノヘキシル)F

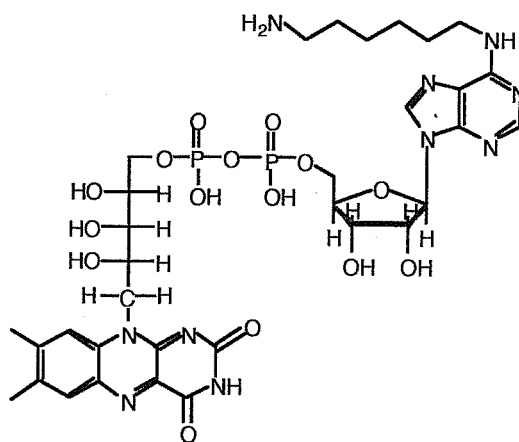


図12 N⁶-(6-アミノヘキシル)FAD

AD (図12) を化学合成しました。このアミノヘキシルFADは、FADをはずした酸化還元酵素(アポ型と呼びます)にFADの代りに組み込むことができ、同様な酸化還元触媒作用を出せることを明らかにできました。これから酸化還元ペプチドに化学結合させ、アポ型酵素と再構成させて電子移動を検討する予定です。

3. 今後の展望

この3年間で酸化還元機能を有する人工のペプチドや蛋白質を分子設計し、作製できるようになってきました。分子内における電子移動効率の改善や修飾補酵素との連結を図り、所期の目的通り酸化還元酵素蛋白質と電極との間の電子伝達インターフェイスとしての応用を進めていく予定です。生体分子と無機電子材料との効率的な電子コミュニケーションが実現され、バイオエレクトロニクスシステムの発展に大きく寄与するものと期待しています。

4. 発表リスト

論文

1. M.Kira, T.Matsubara, H.Shinohara, M.Sisido, Synthesis and Redox Property of Polypeptides Containing L-Ferrocenylalanine, Chemistry Letters, 1997, 89-90 (1997).
2. T.Matubara, H.Shinohara, M.Sisido, Synthesis and Conformation of Poly(L-2-anthraquinonylalanine), Macromolecules, 30(9), 2651-2656(1997).

3. H.Shinohara, T.Matsubara, M.Sisido, Electrochemical Properties of Poly(L-2-anthraquinonylalanine) , Macromolecules, 30(9), 2657-2661(1997).
4. H.Shinohara, T.Kusaka, E.Yokota, R.Monden, M.Sisido, Electron Transfer between Redox Enzymes and Electrodes through the Artificial Redox Proteins and Its Application for Biosensors, Sensors & Actuators Part B(Chemical), submitted.

5. 口頭発表

(国際会議)

1. H. Shinohara, T. Matsubara, M. Sisido, Syntheses and Electrochemical Characterization of Redox Polypeptides as Molecular Electric Wire, The 7th International Conference on Molecular Electronics & Bio-computing, (1997年11月、中華人民共和国 南京市)
2. H. Shinohara, T. Kusaka, E. Yokota, R. Monden, M. Sisido, Electron Transfer between Redox Enzymes and Electrodes through the Artificial Redox Proteins and Its Application for Biosensor, The 7th International Meeting on Chemical Sensors, (1998年7月、中華人民共和国 北京市、優秀論文賞を受賞)
3. H. Shinohara, T. Kusaka, T. Hohsaka, M. Sisido, Synthesis of Artificial Redox Proteins and Their Molecular Assembly on the Electrode Surface, 1st International Symposium on Atomic Scale Processing and Novel Properties in Nanoscopic Materials, (1998年11月、大阪大学吹田キャンパス)

(国内会議)

1. 篠原寛明, 松原輝彦, 宍戸昌彦、電子伝達ポリペプチドの合成と酸化還元機能、電気化学会第63回大会 (1996年4月)
2. 篠原寛明, 松原輝彦, 宍戸昌彦、分光電気化学手法を用いたアントラキノニル側鎖を持つポリペプチドの酸化還元機能の検討、1996年電気化学秋季大会 (1996年9月)
3. 日下太一, 芳坂貴弘, 篠原寛明, 宍戸昌彦、アントラキノリル基を持つ非天然アミノ酸のストレプトアビジンへの部位特異的導入、第46回高分子学会年次大会 (1997年5月)
4. 篠原寛明, 松原輝彦, 宍戸昌彦、酸化還元機能を有するポリペプチドの合成と電気化学、1997年電気化学秋季大会 (1997年9月)

5. 日下太一, 芳坂貴弘, 篠原寛明, 宍戸昌彦、レドックスアミノ酸を導入したストレプトアビジンの作製と機能、第2回バイオテクノロジー部会シンポジウム (1997年9月)
6. 日下太一, 芳坂貴弘, 篠原寛明, 宍戸昌彦、酸化還元機能基を有する非天然アミノ酸のストレプトアビジンへの部位特異的導入、第46回高分子討論会, (1997年10月)
7. 日下太一, 芳坂貴弘, 篠原寛明, 宍戸昌彦、アントラキノニル基を導入したアビジン蛋白質の酸化還元機能、日本化学会第74春季年会 (1998年3月)
8. 吉谷孝治, 永広晋哉, 桑原正靖, 篠原寛明, 宍戸昌彦、アミノヘキシル機で修飾したFADの合成とその機能、日本化学会第74春季年会 (1998年3月)
9. 篠原寛明, 日下太一, 芳坂貴弘, 宍戸昌彦、酸化還元機能を有する非天然アミノ酸を部位特異的に導入した人工レドックス蛋白質、第47回高分子学会年次大会 (1998年5月)
10. 篠原寛明, 吉谷孝治, 横田栄作, 宍戸昌彦、酸化還元補酵素を修飾したアビジンの電子移動インターフェイス機能、第47回高分子学会年次大会 (1998年5月)
11. 篠原寛明, 日下太一, 宍戸昌彦、レドックス基を導入した結合蛋白質の作製とその電極界面電子移動、第22回エレクトロオーガニックケミストリー討論会 (1998年6月)
12. 吉谷孝治, 篠原寛明, 宍戸昌彦、ビオチン化FADを介するフラビン補酵素-アビジン複合体の形成とその触媒活性、第3回バイオテクノロジー部会シンポジウム (1998年9月)
13. 篠原寛明, 横田栄作, 吉谷孝治, 日下太一, 宍戸昌彦、レドックス基導入結合蛋白質の電極上での集積化と界面酸化還元機能、98年電気化学秋季大会 (1998年10月)
14. 篠原寛明, 吉谷孝治, 宍戸昌彦、酸化還元酵素-電極間インターフェイスの設計とバイオエレクトロキャタリシス、98年電気化学秋季大会 (1998年10月)