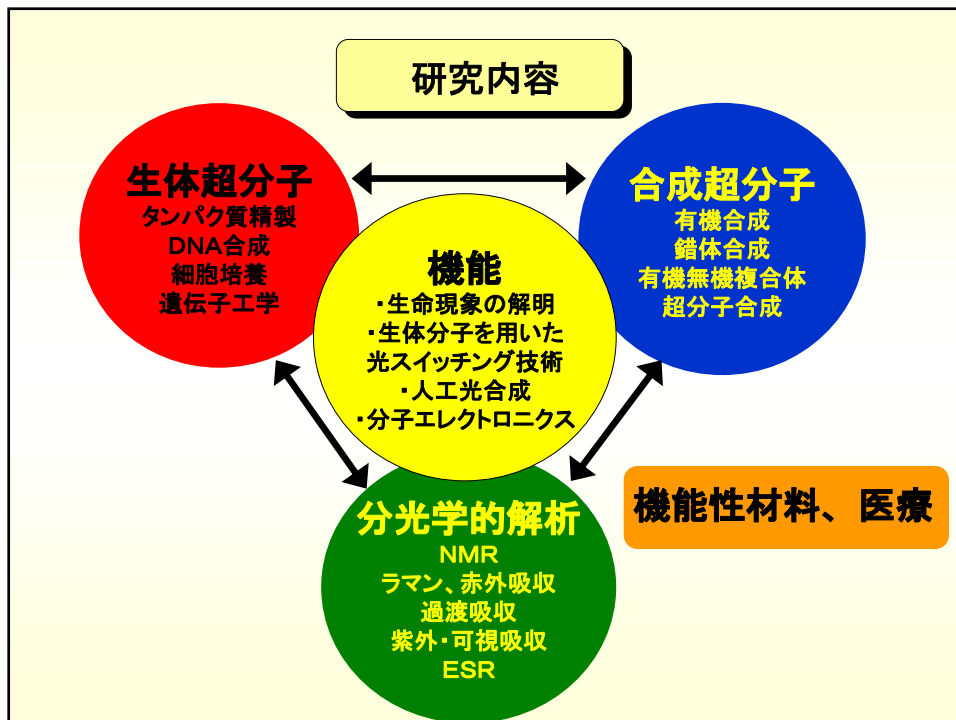


光応答性タンパク質 およびペプチドの創製と利用

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

廣田 俊



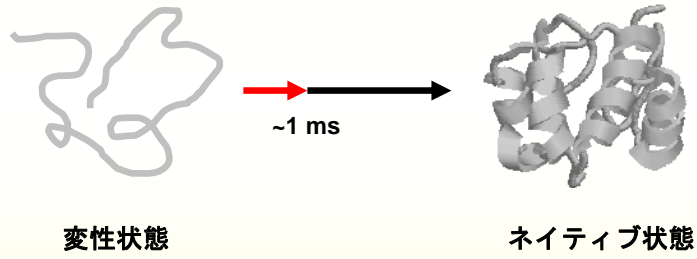
光応答性タンパク質
およびペプチドの創製と利用

1. 光応答性修飾基を用いたタンパク質の構造制御
タンパク質のフォールディング反応の追跡に利用
2. 光応答性環状ペプチドの創製
タンパク質-ペプチド複合体形成の光制御
3. アゾベンゼン連結金属ペプチド錯体の構造制御
DNA切断の光制御

光応答性タンパク質
およびペプチドの創製と利用

1. 光応答性修飾基を用いたタンパク質の構造制御
タンパク質のフォールディング反応の追跡に利用
2. 光応答性環状ペプチドの創製
タンパク質-ペプチド複合体形成の光制御
3. アゾベンゼン連結金属ペプチド錯体の構造制御
DNA切断の光制御

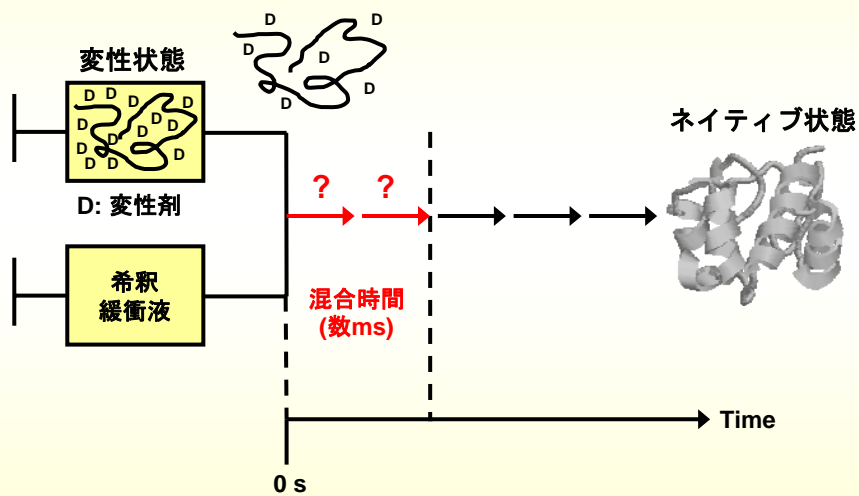
タンパク質のフォールディング反応



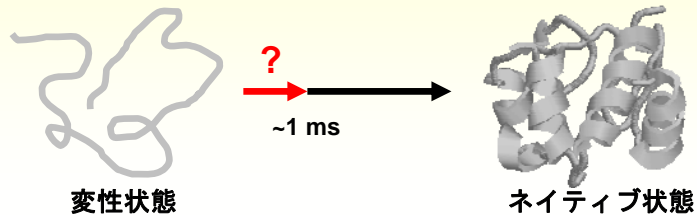
変性状態

ネイティブ状態

ストップフロー法によるタンパク質のフォールディング反応の追跡



タンパク質のフォールディング反応



タンパク質のフォールディング反応の初期段階を追跡するのが困難

- 混合測定法の限界

ストップフロー法、急速混合法、急速凍結法など

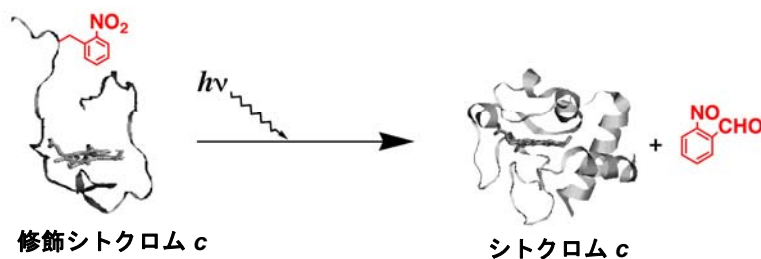


タンパク質のフォールディング反応の初期段階を追跡する一般的方法の開発が望まれている

新しい測定法の提案

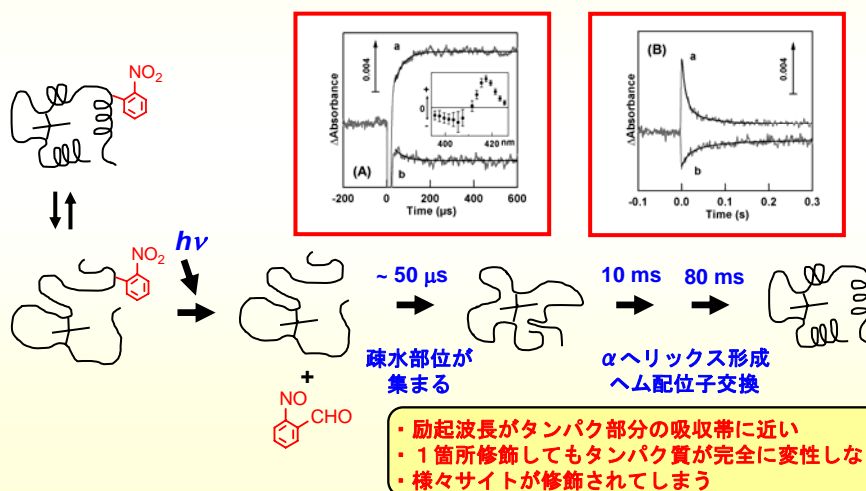
タンパク質への光解離性修飾基の導入

o-nitrobenzyl基導入とパルス光照射による反応

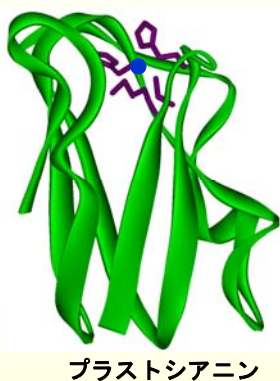


o-nitrobenzyl基導入タンパク質への光照射による シトクロム c のフォールディング反応

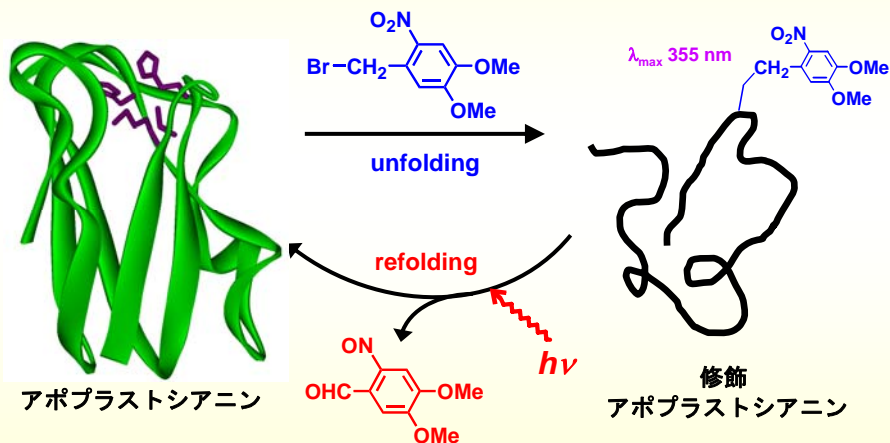
パルス光照射後の時間分解吸収変化



アポプラストシアニンの構造崩壊とその巻き戻り反応 —4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl基の導入—



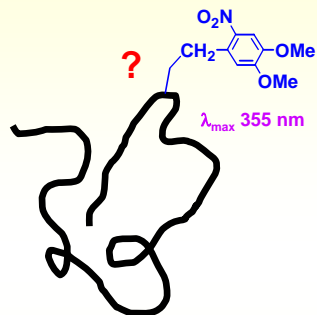
アポプラストシアニンの構造崩壊とその巻き戻り反応
 —4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl基の導入—



修飾アミノ酸の特定

修飾アポプラストシアニン

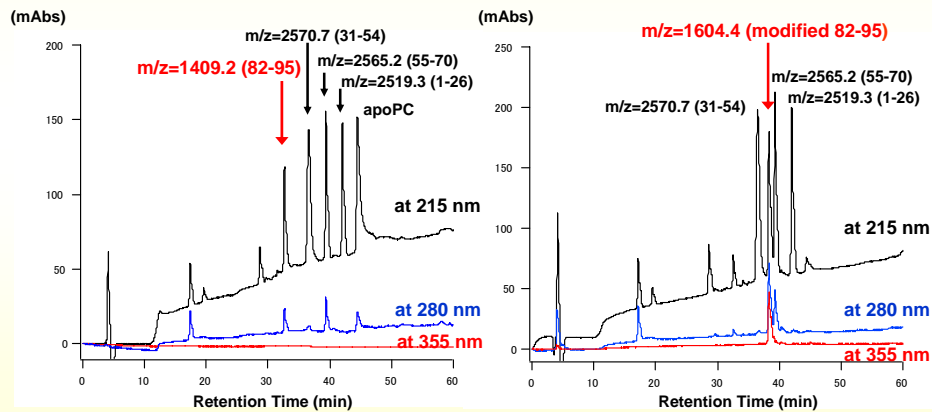
- ◆ リジルエンドペプチダーゼによる酵素消化
37°C、20時間、200 mM NH₄HCO₃ 緩衝液 (pH 8.0)
- ◆ HPLCを用いたペプチド断片の分画
- ◆ 各ペプチド断片の分析
 - アミノ酸シーケンス (エドマン分解)
 - MALDI-TOF MS, MS/MS
 - エルマン試験 (SH基の有無)



未修飾および修飾アポプラストシアニンから得られたペプチド断片のHPLC溶出曲線

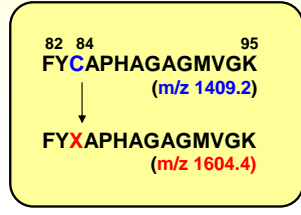
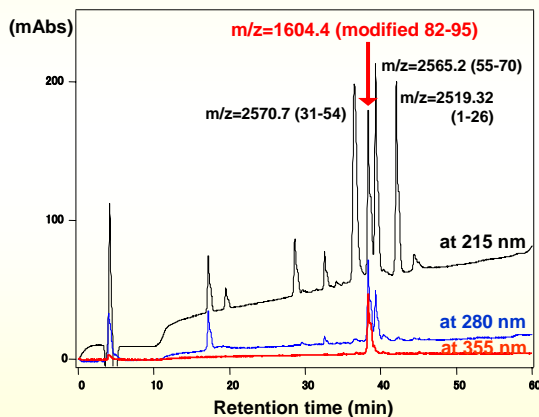
未修飾アポプラストシアニン

修飾アポプラストシアニン



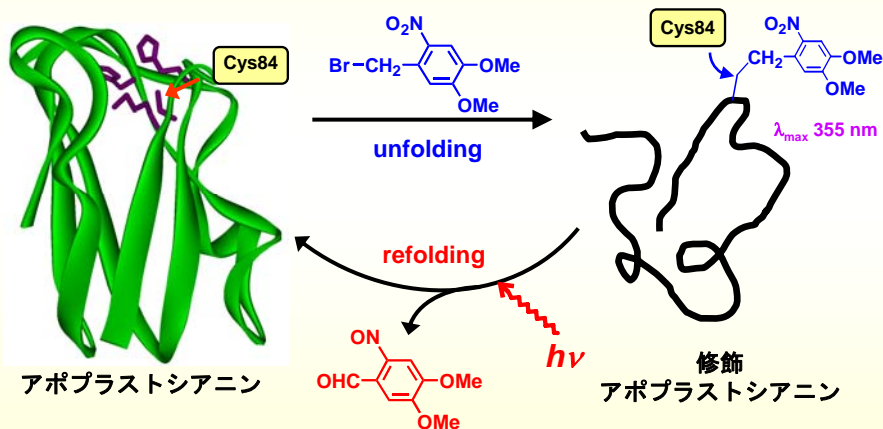
修飾アミノ酸の特定

修飾アポプラストシアニンから得られたペプチド断片のHPLC溶出曲線

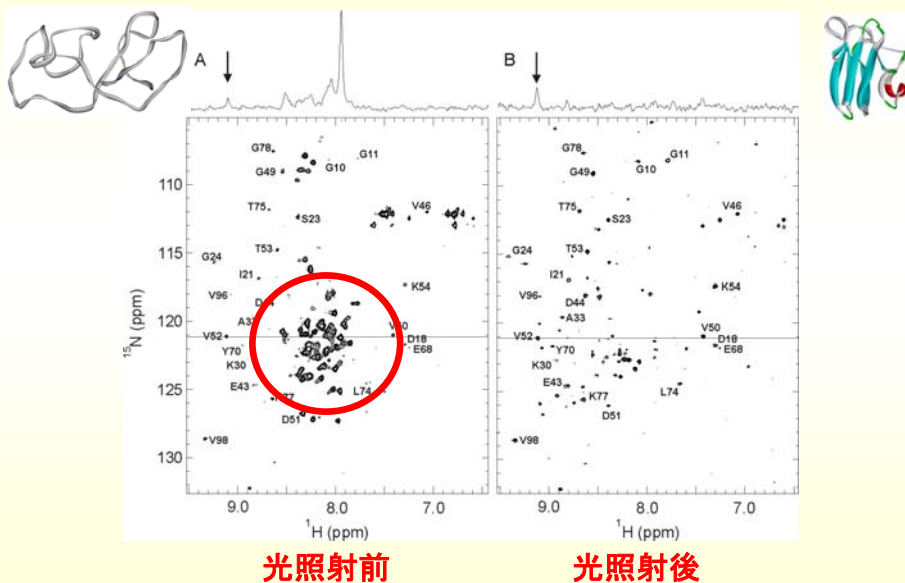


- ペプチドマッピング
MALDI-TOF MS, MS/MS
- アミノ酸シーケンス分析より、システイン残基以外は修飾されていない
- エルマン試験
apoPCは1つのシステイン残基(Cys84)を有するが、SH基はない

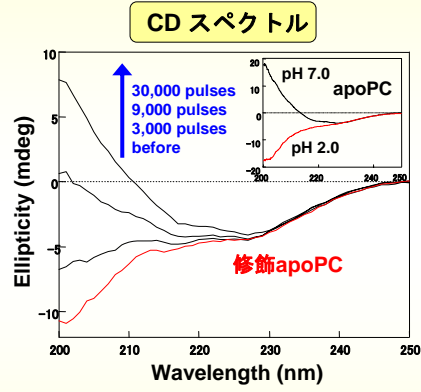
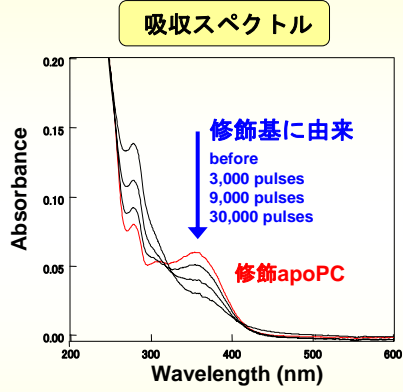
アポプラストシアニンの構造崩壊とその巻き戻り
 -4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl基の導入-



修飾アポプラストシアニンの¹⁵N-HSQC NMRスペクトル



修飾アポプラストシアニンへの355 nmの光照射による吸収及びCDスペクトル変化

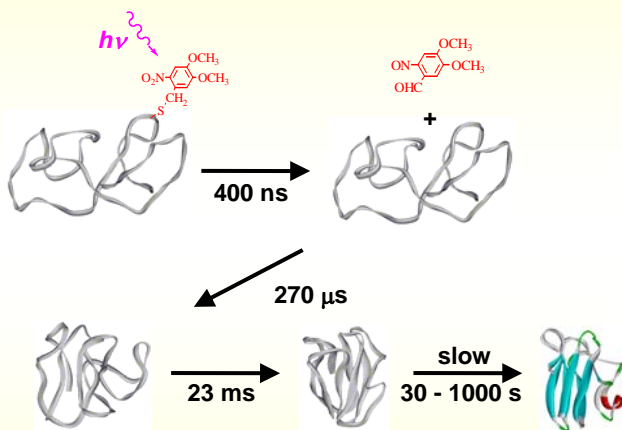


修飾プラストシアニンへの光照射により修飾基が解離することを確認

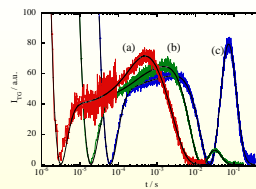
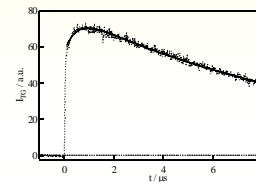
修飾によりタンパク質の構造が崩れ、修飾タンパク質への光照射により構造が元に戻る

時間分解測定によるフォールディング反応の追跡が可能に

アポプラストシアニンのフォールディング反応の模式図



過渡回折格子シグナル

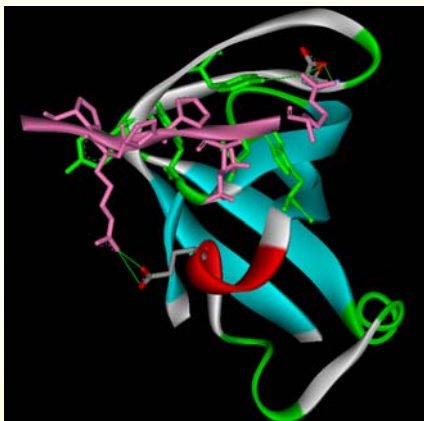


J. Am. Chem. Soc., 128, 7551-7558 (2006).

光応答性タンパク質 およびペプチドの創製と利用

1. 光応答性修飾基を用いたタンパク質の構造制御
タンパク質のフォールディング反応の追跡に利用
2. 光応答性環状ペプチドの創製
タンパク質-ペプチド複合体形成の光制御
3. アゾベンゼン連結金属ペプチド錯体の構造制御
DNA切断の光制御

PI3-K SH3ドメインとペプチドリガンドの相互作用

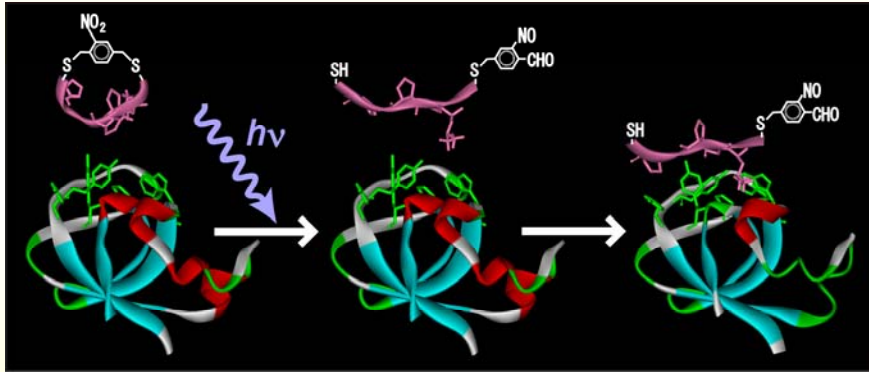


SH3ドメイン
クロスβ構造

ペプチドリガンド (RLP1)
RKLPPRPSK

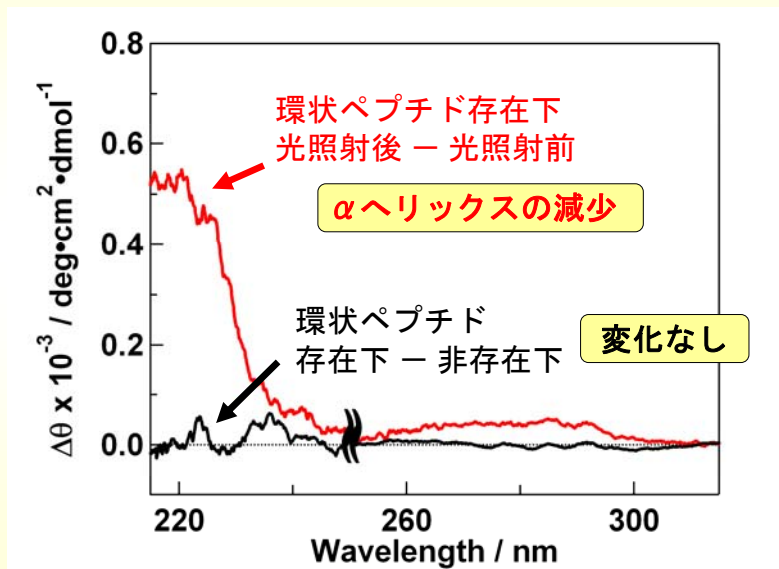
Cys導入ペプチドリガンド
CRKLPPRPSKC
(C-RLP1-C)

光応答性環状ペプチドを用いた
タンパク質-ペプチドの複合体形成の制御



特許: 光制御ペプチドおよび光制御ペプチドを用いたペプチド-蛋白質複合体の制御法、
特願2005-238275

SH3ドメインのCDスペクトル変化

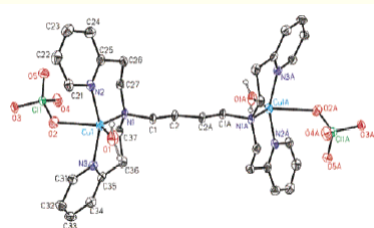


光応答性タンパク質 およびペプチドの創製と利用

1. 光応答性修飾基を用いたタンパク質の構造制御
タンパク質のフォールディング反応の追跡に利用
2. 光応答性環状ペプチドの創製と利用
タンパク質-ペプチド複合体形成の光制御
3. アゾベンゼン連結金属ペプチド錯体の構造制御
DNA切断の光制御

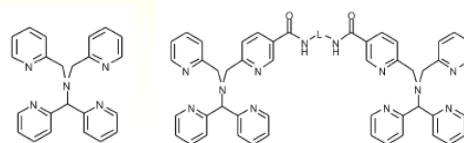
金属錯体によるDNA切断

人工酵素、抗がん剤



K. D. Karlin *et al.*,
J. Am. Chem. Soc., 128, 7003 (2006).

複核銅錯体

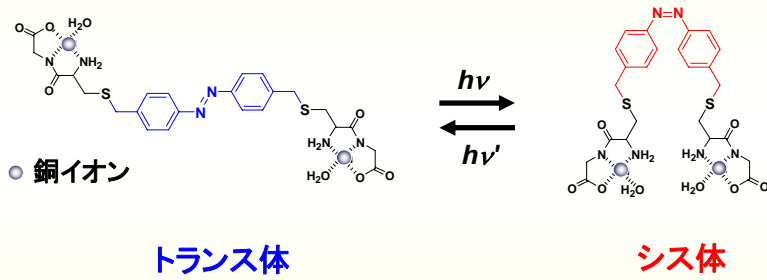


V. A. Tieme *et al.*,
Chem. Commun., 180 (2007).

単核および複核鉄錯体

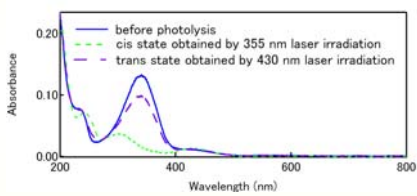
複核金属錯体のほうが単核金属錯体よりも
DNA切断活性が高い

金属部位間距離の光制御

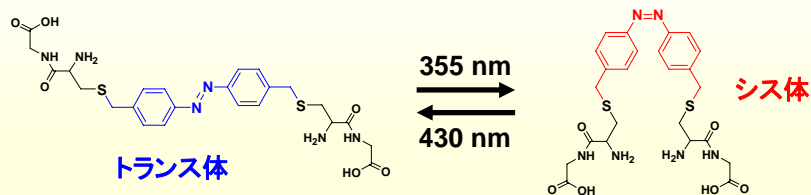
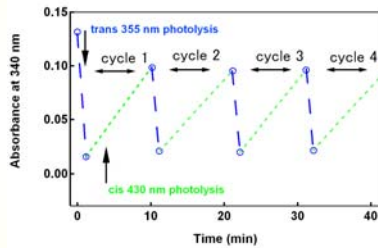


光照射 (355 および430 nm) によるGlyCys アゾベンゼン連結体の吸収スペクトル変化

吸収スペクトル

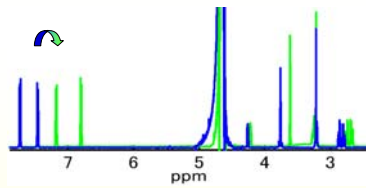


430 nmの吸光度変化



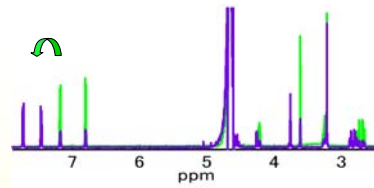
光照射 (355 および 430 nm) による GlyCys アゾベンゼン連結体の NMR スペクトル変化

トランス体への 355 nm
レーザー照射



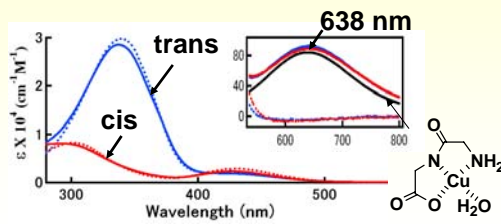
シス体へ変化

シス体への 430 nm
レーザー照射



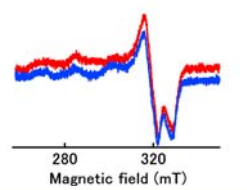
トランス体へ変化

GlyCys アゾベンゼン連結体の吸収および ESR スペクトル

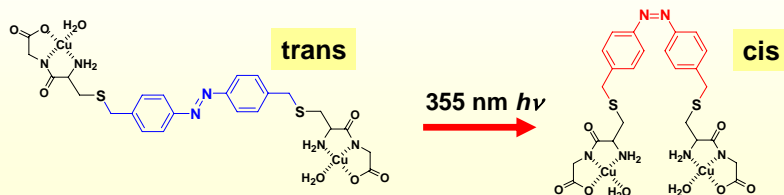


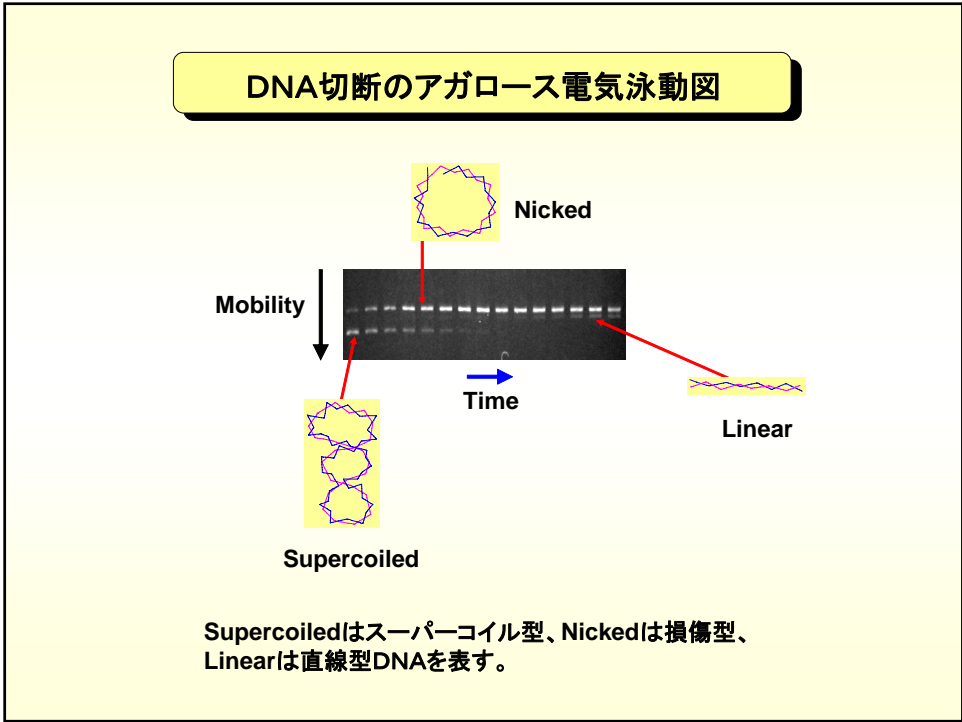
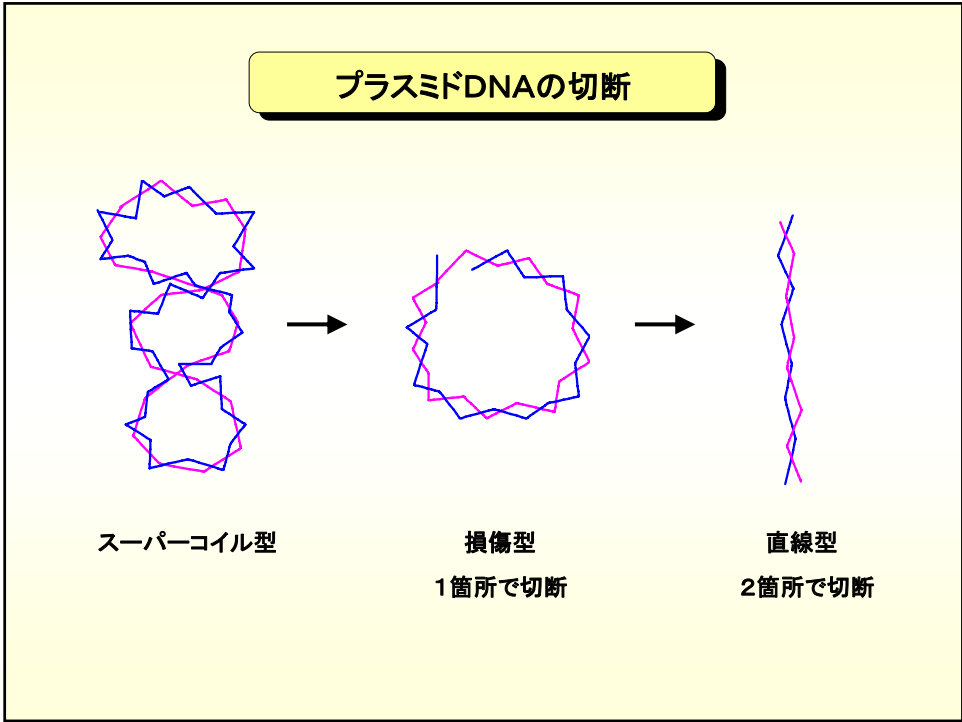
Dotted line, azopeptide
Solid line, azopeptide: copper = [1]:[2]
blue line, trans; red line, cis form

$g_{\parallel} = 2.255$
 $A_{\parallel} = 174 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

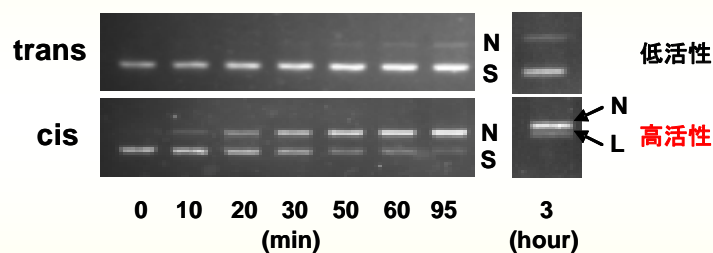


銅錯体の吸収および ESR スペクトルに変化なし
2つの銅部位の間隔が変化





**CysGly-アゾベンゼン銅錯体のシス体およびトランス体
によるDNA切断のアガロース電気泳動図**



Sはスーパーコイル型、Nは損傷型、Lは直線型DNAを表す。

特許:アゾペプチド複合体、特願2007-179592

**光応答性タンパク質
およびペプチドの創製と利用**

1. 光応答性修飾基を用いたタンパク質の構造制御
タンパク質のフォールディング反応の追跡に利用
2. 光応答性環状ペプチドの創製と利用
タンパク質-ペプチド複合体形成の光制御
3. アゾベンゼン連結金属ペプチド錯体の構造制御
DNA切断の光制御