

金属イオン応答性 α -helical coiled coil polypeptide の設計とその特性評価

日大生産工(院) ○中村 洋平

日大生産工 柏田 歩

日大生産工 松田 清美

【 緒論 】

天然タンパク質は 20 種類のモノマー単位であるアミノ酸の配列化を利用して多様な立体構造および機能を発揮できる生体高分子である。タンパク質の機能発現に寄与する部位は、ある特定の構造を有しているものに限定されているため構造上の特徴を模倣した簡単なポリペプチドを開発することにより、天然における機能を模倣できると考えられる。

その中で α -helical coiled coil 構造は、その単純な構造にもかかわらず生体内では外部刺激に応答してタンパク質の会合を調整する役割など重要な機能を果たしている。また、インフルエンザや HIV のウィルス感染機構においても重要な役割を果たしている¹⁾。 α -helical coiled coil 構造を利用した外部刺激により可逆的な構造変化を伴うシステムの構築は生体内におけるタンパク質機能解明のみならず、コラーゲン様の人工ペプチド繊維の開発といった材料方面への応用も期待できる。

本研究では外部刺激として種々の金属イオンの存在にに応答し、可逆的に α -helical coiled coil 構造を形成するポリペプチドアセンブル系の構築を目指す。設計したモデルは単独で α -helical coiled coil trimer を形成するポリペプチドに金属イオン結合部を導入したものであり、このモデルは金属イオン非存在下で random 構造であるポリペプチドが金属イオンの存在によって錯化し安定な α -helical coiled coil 構造を形成する。

また、生体内におけるタンパク質やウィルスの中には、複数の異なったタンパク質ドメインが金属イオンの存在などの外部刺激により会合し、機能を発揮するものが存在する。そこで、2つのユニットが金属イオンの存在によりブロック状に会合する α -helical coiled

coil モデルについての構築も行い、*in vitro* での挙動を検討した。

このような系は天然タンパク質の構造変化と機能発現機構のモデル的検討だけでなく、新規金属イオンセンサーの開発に関しても有意義であると考えられる²⁾。

【 実験 】

・ ペプチド合成

9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) 連続フロー合成法を用いた、ポリペプチド合成用反応器を用い Rink amide resin (反応活性点 2.5 mmol) を溶媒である NMP で攪拌洗浄した後、NMP を除去し、piperidine により保護基である Fmoc 基を除去した。また、Kaiser Test を行うことで、脱 Fmoc を確認した。

一方、polypropylene 製容器内に Fmoc アミノ酸 (0.25mmol)、HOBt/HBTU (Fmoc アミノ酸に対して 5 当量) を取り、NMP を溶媒としてカルボキシル末端の活性化を行った。なお、Fmoc アミノ酸のラセミ化を防ぐため DIEA を添加した。この溶液を脱反応器内に移し、攪拌することで縮合反応 (60 min 程度) を行った。その後、NMP で攪拌洗浄し Kaiser Test を行うことで Fmoc アミノ酸が縮合されていることを確認した。以後、同様に脱 Fmoc および縮合を繰り返すことにより、Rink amide resin 上にペプチド鎖を伸長させた。

・ CD スペクトル

ポリペプチド単独存在下および Ni^{2+} イオン存在下における CD スペクトルを 10 mM Tris-HCl 緩衝溶液中 (pH 7.0) で測定した。また Ni^{2+} イオン (NiCl_2) 存在下においては 40 μM NiCl_2 を含む Tris-HCl 緩衝溶液中で測定した。

・ゲルろ過クロマトグラフィー

ガラス管 (11cm × 6mm φ) に SEPHADEX G-50 を充填し、40μmol / dm³ Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) を溶出液とした。Ni²⁺ イオン存在下における試料の分画採取の際には、40μmol / dm³ の NiCl₂ を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0) を溶出液とした。

・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

0.1% TFA を含む H₂O および CH₃CN による有機溶媒-水グラジエント系を移動相として、逆相 ODS カラムによるポリペプチドの分析および分取を行った。なお検出はアミノ酸シーケンス中の Tyr (Y) の最大吸収波長 280nm にて行った。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにより得られた分画の組成を分析するために、水 / CH₃CN 直線グラジエント (水 75%(0min) - 55%(30min)) 系で分析を行い、会合体の組成について検討した。

・金属イオン会合能測定

これまでの実験においては金属イオンとして Ni²⁺ イオンを用いていたが、金属イオンの種類による会合能の違いについて検討するため Ni²⁺ イオンの他、Co²⁺ イオン、Zn²⁺ イオン、Cu²⁺ イオンを用いたポリペプチドと水溶液中での会合状況について調べた。

ポリペプチドと Ni²⁺ イオンの水溶液中での会合能について、さらなる検討を行うために会合体を形成する際の Ni²⁺ イオン濃度依存性を調べた。そして会合体形成時における平衡濃度からポリペプチドと Ni²⁺ イオンの会合定数を算出した。また、他の金属イオンについても同様に検討した。

【 結果・考察 】

本研究において生体内におけるタンパク質の外部刺激に応答した構造変化をモデル的に金属イオンに反応して α-helical coiled coil 構造に転移するポリペプチド会合システムを Fig.1 に示す。

	efg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abc
Pep1	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	GGY
Pep2	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	GGY
Pep3	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIE		
Pep4				K	IAAIEKK	GGY

Fig.1 Amino acid sequences of the metal induced polypeptides used in this study

Pep1 は Ile 残基により疎水性コアを形成し、ジッパー効果によって水溶液中で三本鎖 coiled coil 構造を形成するモデルである。また Pep2 は Pep1 に金属イオン結合部位としての His 残基を付与したもので、金属イオンとの配位により coiled coil 構造が誘起されるモデルである。一方、Pep3 および Pep4 は Pep2 を分割したモデルであり、金属イオン存在下で (Pep3)₃-M²⁺-(Pep4)₃ 型ブロック状 coiled coil 構造を形成すると考えられる。CD スペクトル測定の結果、Pep1 は設計通り coiled coil 構造の形成を示すシグナルが観測された。さらに、水溶液中におけるポリペプチドの会合数を見積もるためにゲルろ過クロマトグラフィーによる Pep3/Pep4 系の分画分析を行ったところポリペプチド六量体に相当する分画に確認された。また分画の HPLC 成分分析を行った結果、Pep3/Pep4 = 1/1 の比であることが示された。以上の結果から (Pep3)₃-Ni²⁺-(Pep4)₃ 型ブロック状 coiled coil 構造の形成が示唆された。

また、種々の金属イオン (Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) との Pep3/Pep4 会合能を検討した結果、正八面体型六配位錯体を形成することが知られている Ni²⁺, Co²⁺ イオンは効率よく α-helical coiled coil ブロック会合体を形成することが確認された。Zn²⁺ イオン、Cu²⁺ イオン存在下では、設計した α-helical coiled coil 構造を形成しなかった。この理由として Zn²⁺ イオンは五配位の金属イオンであるため、Pep3 および Pep4 が配位した際に、正八面体型六配位において期待されるジッパー効果、静電相互作用による安定化が働かず、設計したブロック状の会合体形成が起こらないものと考えられる。また、Cu²⁺ イオンは六配位の金属イオンであるが Jahn-Teller 効果により、ひずんだ八面体型錯体を形成するため、Cu²⁺ イオンとポリペプチド (pep3 / pep4 (1:1) 混合系) 間での配位結合は起こると考えられるが、ひずんだ構造となってしまうため、ジッパー効果、静電相互作用による安定化が働かず、設計したブロック状の会合体形成が起こらないものと考えられる。

【 参考文献 】

- 1) 後藤祐児, 谷澤克行, タンパク質の分子設計, 共立出版, **2001**, 135-137.
- 2) Lau, S.Y.M.;Taneja, A.K.;Hodges, R.S.J.Biol.Chem, **1984**, 259, 13253-13261.