

た分画の組成を分析するために、水 / CH₃CN 直線グラジエント系で分析を行い、会合体の組成について検討した。

【 結果・考察 】

本研究において使用した Polypeptide のアミノ酸配列を Fig. 1 に示す。

	efg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	
Pep1	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	IAAIEEK	GGY
PF1	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	IAAIEEK	GGC
PF2	CGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	IAAIEEK	GGY
PF3	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	IAAIEEK	GGY

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

PF1~PF3それぞれのCys残基とリンカーを介して二量化したPF1~PF3 dimerとPep1を組み合わせたことにより α -helical coiled coil trimerを二量化できると考えられる。

Fig. 2にはPF1 dimer + Pep1, PF2 dimer + Pep1 (直鎖型) およびPF3 dimer + Pep1 (H型)のCD測定の結果を示す。

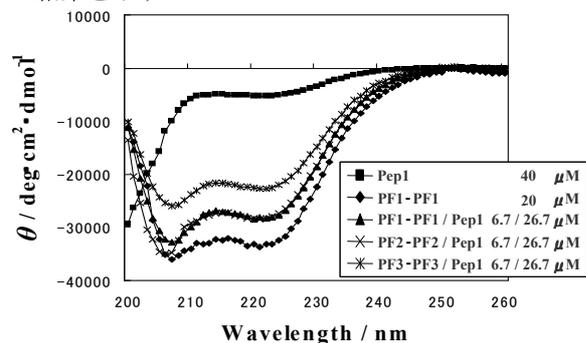


Fig. 2 Circular dichroism spectra of Pep1 (■), PF1-PF1 (◆), PF1-PF1 / Pep1 mixture (▲), PF2-PF2 / Pep1 mixture (×), PF3-PF3 / Pep1 mixture (*).

The measurements were performed in 10 μ M Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 20°C.

単独で α -helical coiled coil構造を形成することができるPep1は水溶液中において208, 222nmに α -helical coiled coil構造特有の負の極大が観測された。また、PF1 dimer単独では α -helical coiled coil構造を形成せずrandom構造であった。一方、PF1 dimerとPep1共存系(PF1 dimer / Pep1=1/4)では208, 222nmに負の極大が観測されることからPF1 dimer中における2つのIZ PolypeptideユニットがPep1と会合することで α -helical coiled coil構造の形成が示唆された。同様にPF2 dimer / Pep1についても α -helical coiled coil構造の形成が示唆された。

架橋型二量体であるPF3 dimer / Pep1についてもPep1との混合により α -helical coiled coil構造の形成を示したが、そのCD強度は直鎖型dimerの系に比べて小さかった。いずれの系についても水溶液中で α -helical coiled coil構造をとることが確認できた。

また、会合体のサイズについて知見を得るためにゲルろ過クロマトグラフィーによる分画分析を行った結果をFig. 3に示す。

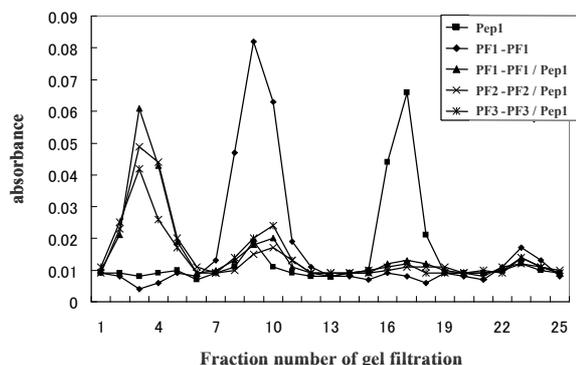


Fig. 3 Analysis of the eluted fraction of Pep1 (■), PF1-PF1 (◆), PF1-PF1 / Pep1 mixture (▲), PF2-PF2 / Pep1 mixture (×), PF3-PF3 / Pep1 mixture (*) using SEPHADEX G-50 fine column.

Pep1は単独で α -helical coiled coil trimerを形成する設計であるため7~10分画目の成分が三量体に相当すると考えられる。PF1 dimer単独系において15~18分画目に分画成分が観測され、Pep1単独系の結果との比較からPF1 dimer単独で溶出(Pep1単位で二量体)していることが示唆された。また、PF1 dimer / Pep1, PF2 dimer / Pep1, PF3 dimer / Pep1混合系においてはいずれもPep1単独系よりも早い2~5分画目に溶出成分が確認された。これは α -helical coiled coil trimer二量体が形成したためでありPep1単位で六量体に相当する分画であると考えられる。

これらの結果により、設計通りに直鎖型、H型の α -helical coiled coil trimer二量体が形成されることが示唆された。さらにこれら直鎖型及びH型の α -helical coiled coil trimer二量体を利用することで、三次元的な繊維構造を構築できると考えられ、さらなる多量化を目指した研究も合わせて報告する。

【 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) M.Zhou, D.Bentley, and I.Ghosh, *J.Am.Chem. Soc. VOL.126, NO.3, 2004, 734-735*