

コイルドコイルを鋳型とするペプチドカテナンの創製

日大生産工 (院) ○片桐 龍哉
 日大生産工 (専任教員) 柏田 歩 松田 清美
 日大生産工 (研) 安藤 隼

1. 緒言

近年, 超分子化合物への興味・関心が非常に高まっており, 様々な方面から研究が行われている。その中でもカテナンは, 2つ以上の環が絡み合っ構成している特殊な超分子化合物である。カテナンを構成する環は, 空間を介して絡み合っているために互いに分離することはできない。しかし, この環の絡み合いがカテナンに高い運動性および伸縮性を持たせると考えられており, 分子モーターや分子スイッチなどへの応用が期待されている。カテナン合成に関する初めての報告は, 1960年 Wasserman らによるものであり, 大環状化合物に糸状分子を通し, その後環化反応を経てカテナンを得ることができたが, この反応は偶然性に頼ったものであり収率は低かった。一方, この報告以降は高収率でカテナンを得るために, 鋳型分子を用いる方法が盛んに研究されている。その中で, がん抑制遺伝子である p53 タンパク質に特徴的な U 字が絡み合った構造を模倣し, 鋳型として利用したカテナン合成の成功例が報告されている¹⁾。Yan らが着目した鋳型としての p53 タンパク質における U 字部分は, helix 鎖が交差した形態であり, 我々の研究対象であるコイルドコイル構造と類似している。そのため, カテナン合成のための鋳型としてコイルドコイル構造を利用できると考えられる。これまで多くのコイルドコイル形成ポリペプチドが *de novo* 設計により合成されている。例えば, 水溶液中でのコイルドコイル形成に寄与する疎水性アミノ酸残基の改変によって, 会合数を制御できることが知られている²⁾。本研究では, *de novo* 設計による選択的な 2 量

体化により, 交差型 4 本鎖コイルドコイル(Fig. 1) 形成について検討する。そのため, はじめに 2 種類のポリペプチド(A および B)を設計・合成し, 水溶液中での会合挙動について分析を行い, カテナン合成のための鋳型としての可能性について評価する。

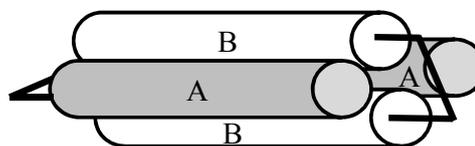


Fig. 1 Schematic illustration of structure of cross type double-stranded anti-parallel coiled coil tetramer.

2. 実験

2-1 ポリペプチドの合成

ポリペプチドの合成は, Fmoc 固相合成法によって行った。反応試薬として 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール 1 水和物(HOBt), 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3,テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU), *N,N'*-ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)を用い, 目的のアミノ酸を Wang resin 上に伸長した。伸長したポリペプチドは, トリフルオロ酢酸 / トリイソプロピルシラン / 水 / フェノール混合溶液によって樹脂から切断した。得られた粗ポリペプチドは透析によって精製を行った。

2-2 円偏光二色性(CD)スペクトル測定

0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)を用い, 総ポリペプチド濃度を 20 μ M の溶液に調製して構造確認(helix 構造の形成)を行った。測定装置は, 円二色性分散計 J-820(JASCO)を使用した。

Construction of a peptide-catenane by the use of a coiled coil template

Ryuya KATAGIRI, Shun ANDO, Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

2-3 超遠心分析

0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)を用い、総ポリペプチド濃度を 20 μ M の溶液に調製し、沈降平衡法による会合状態(2 量体の形成)の確認を行った。測定装置は XL-A(Beckman Coulter)を使用した。

3. 結果・考察

3-1 ポリペプチドの設計

本研究で設計・合成した 2 種類のポリペプチド A および B のアミノ酸配列を Fig. 2 に示す。カテナンの鑄型となる 2 量体(4 本鎖コイルドコイル)形成のために、配列中の a, d 位それぞれにイソロイシンとロイシンを配置した。さらに、それぞれのポリペプチド中の疎水性コア内の一部にトリプトファン、アラニンを配置した。これは、トリプトファン側鎖のインドール環と、アラニン側鎖のメチル基が疎水場内で合致することによる 1:1 の選択的な会合系を目指すものである。

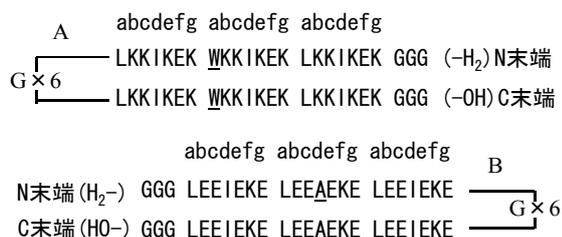


Fig. 2 Amino acid sequences of designed polypeptides.

3-2 ポリペプチドの会合状況(水溶液中)

Fig. 3 に CD スペクトル測定の結果を示す。ポリペプチド A および B 単独存在下においては、random 構造特有の 200 nm 付近における負の極大が観測された。一方、A, B 混合系(1:1)においては、helix 構造特有の 208 および 222 nm 付近に負の極大が観測された。この結果は、ポリペプチド A と B が、1:1 で共存している際にコイルドコイル構造に由来する helix 構造形成を示唆している。すなわち、設計どおりポリペプチド A と B は選択的な 2 量体形成により、カテナン合成の鑄型として有効と考えられる 4 本鎖コイルドコイル構造を形成していることが示唆された。

Table 1 に超遠心分析の結果を示す。沈降平衡法を用いて、回転数 28000 および 30000 rpm にて

測定を行った。それぞれの回転数において、A および B 単独存在下では単量体に相当する値が得られた。一方、1:1 混合系においては 2 量体に相当する値が得られた。以上の超遠心分析と CD スペクトル測定の結果より、ポリペプチド A と B は選択的な 2 量体(4 本鎖コイルドコイル)形成することが示された。

本研究における結果から、カテナン合成に必要な鑄型としてのコイルドコイル形成が確認できたことから、今後はカテナン合成のために重要なポリペプチドの会合様式に関する検討を蛍光スペクトル測定などを用いて行う。そしてカテナン化のために環状化を行っていく予定である。

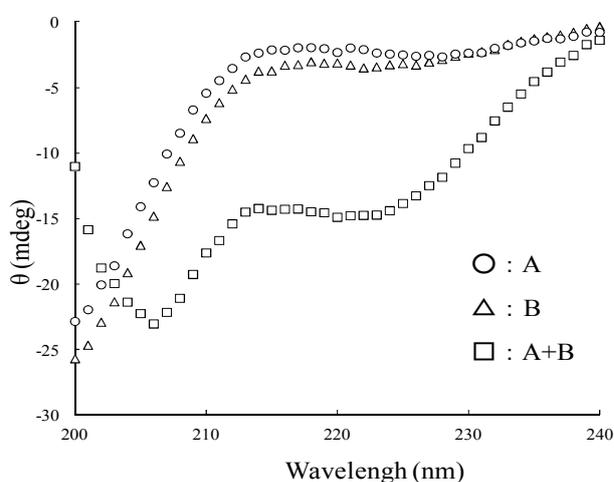


Fig. 3 CD spectra of designed polypeptides (A (○), B (△)) and an equimolar mixture of A and B (□) in phosphate buffer solution (pH 7.0). The concentration of all polypeptides were 20 μ M.

Table 1 Results of ultracentrifugal analysis

	M _{calc} (Da)	M _{obs} (Da) 28000 rpm	M _{obs} (Da) 30000 rpm
A	6272	6919(± 1110)	6363(± 962)
B	6259	7008(± 765)	6519(± 791)
A+B	13331	12744(± 1242)	13615(± 1106)

【参考文献】

- 1) Yan, Z. ; Dawson, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *19*, 3625-3627.
- 2) Pehr, B. H. ; Tao, Z. ; Peter, S. K. ; Tom, A. *Science* **1993**, *262*, 1401-1407.