

新規機能性ゲルの架橋点構築を目的とした α -helical coiled coil 形成 ポリペプチドの設計および合成

日大生産工 (院) ○大田正人
日大生産工 (専任教員) 柏田歩 松田清美

1 緒言

タンパク質は、単独あるいは階層化に基づく会合体形成により、極めて多彩な機能を発揮することから、生体材料のみならず機能性材料の設計において魅力的な生体材料である。また、タンパク質の持つ多彩な機能の要因となるドメイン・ユニットのみを取り出したり、機能部位や構造モチーフを構成する短いペプチド鎖を利用することで、材料としての応用範囲が格段に広がるのが期待される。しかし、タンパク質は生体内という限られた環境において複雑な高次構造形成に基づき高度な機能を発現しているため、人工的にその構造と機能を再現することは難しい。一方、ペプチド工学的見地からは、*de novo* 設計と呼ばれる人工設計により、種々の自己組織化モチーフの設計・合成が試みられている。その中で、2本以上の α -helix 鎖が寄り集まって形成するコイルドコイル構造は、単純な構造ながら生体内での機能発現には欠かせないモチーフであり、*de novo* 設計の対象とされている。コイルドコイル構造の形成には、種々の相互作用が駆動力として働いており、相互作用に関与するアミノ酸を選択することにより、会合数や刺激応答性を制御できる。このようなコイルドコイル構造の利用は天然タンパク質に見られる特定の機能との関係についての解明とともに、自己組織化を利用した新規な機能発現についても期待されている^{1,2)}。

生体内利用を目的とした材料研究例として Robert らは、ヘパリンを介したポリペプチドの自己組織化を利用したゲルの架橋点形成に関する報告をしている。この機構は、ポリペプチドの自己組織化における駆動力を変化させることで、新規機能性ナノゲルを作ることができる³⁾と期待されている³⁾。

一方、機能性材料への展開を目的として Fletcher らは生理的 pH 付近で電荷の制御を考慮し、ヒスチジンをういた pH 応答性コイルドコイル形成ポリペプチドを用いたヒドロゲルの研究について報告している。このような機能性高分子は、天然高分子の生体に対する親和性には劣るが、ウイルス感染などを考慮する必要がないとともに構造制御性などにおいて再現性が期待できる⁴⁾。

本研究では、合成高分子を幹ポリマーとし、コイルドコイル形成ポリペプチド側鎖をゲルの架橋点として用いることにより、pH や金属イオンなどの外部刺激に応答する新規機能性ゲルの合成を目的としており、本講演会では架橋点としてのコイルドコイル形成ポリペプチドの設計・合成とキャラクタリゼーションについて発表する。

2 実験

2-1 ポリペプチドの合成

ポリペプチドは Fmoc-Gly Wang resin を用いた Fmoc 固相合成法により合成した。なお、固相合成法では、HBTU、HOBt 活性化法を利用し、目的のアミノ酸を Wang resin 上に伸長した。伸長後、トリフルオロ酢酸 / 純水 / トリイソプロピルシラン混合溶液を用いて脱樹脂を行った。得られた粗ポリペプチドは分画分子量 1000 のセルロースアセテート膜で透析処理することで精製した。

2-2 円偏光二色性(CD)スペクトル測定

精製したポリペプチドの水溶液中での構造を CD スペクトルにより確認した。試料は 0.1 M Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7.0) を用い、ポリペプチド濃度が 20 μ M になるように調製した。測定装置は、円二色性分散計 J-820 (JASCO) を使用し、200 nm から 240 nm の波長範囲で測定を行った。

2-3 超遠心分析

CD スペクトル測定の際と同様に試料を調製

Design and Synthesis of α -Helical Coiled Coil Polypeptides for Crosslinking Agents of Functional Hydrogels

Masato OTA, Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

し、28000, 30000, 32000 rpmで24 h, 沈降平衡法により、会合状態の確認を行った。測定装置は、XL-A(Beckman Coulter)を使用した。

3 結果・考察

3-1 コイルドコイル形成ポリペプチドの設計

本研究で設計したポリペプチドのアミノ酸配列をFig. 1に示す。このアミノ酸配列は、*de novo*設計によるロイシンジッパー形成ポリペプチドのアミノ酸配列とホモ型逆平行コイルドコイル形成ポリペプチドのアミノ酸配列を参考に、疎水性コア形成に重要なa・d位それぞれにロイシンを配置して、2量体コイルドコイル構造を形成させ、また、ヘリックス間における静電相互作用による安定化に寄与するe・g位のアミノ酸の電荷を制御することで、逆平行型コイルドコイル構造を形成する設計である。また、ポリペプチドをゲルの幹ポリマーに導入するためにアクリル酸(AAc)をポリペプチドのN末端に導入したポリペプチド-AAcも同様に合成した。

8 abcdefg abcdefg abcdefg abcdef
GG K LEELKEK LEELKKE LKKLEKE LKKLEE GG

Fig. 1 Amino acid sequence of coiled coil forming polypeptide designed in this study.

3-2 CDスペクトルによる構造確認

本研究で設計したポリペプチドは、水溶液中で選択的な会合し、ホモ型逆平行2量体コイルドコイルを形成することが予想される。そこで、設計したポリペプチドの水溶液中での構造を評価した。合成したポリペプチドとポリペプチドのN末端にAAcを結合させたポリペプチド-AAcのCDスペクトル測定を行った。Fig. 2にはそれぞれの系におけるCDスペクトルを示す。

水系におけるポリペプチドのCDスペクトルでは、208 nmおよび222 nm付近に負の極大が観測された。このCDパターンは、ヘリックス構造に特有なものであり、予想どおり合成したポリペプチドは水溶液中で会合した結果、コイルドコイル構造に基づくヘリックス構造を形成したことが示唆された。また、ポリペプチド-AAcについても同様な結果が得られた。このことから、AAcを結合させたポリペプチド-AAcにおいても自発的に会合し、ヘリックス構造を形成していることが示唆された。

3-3 超遠心分析による会合数の確認

ポリペプチドの会合状況について検討するために沈降平衡法による超遠心分析を行った(Table 1)。ポリペプチド単独系およびポリペ

チド-AAcをそれぞれ超遠心分析により評価した結果においては、分子量の2倍に相当する観測値が得られた。このことから、ポリペプチドおよびポリペプチド-AAcは水溶液中で自発的に2量体を形成していることが示唆された。

本研究における結果から、設計したポリペプチドは水溶液中で自発的に会合して2量体コイルドコイル構造を形成していることが確認できた。また、AAcを結合させたポリペプチド-AAcについても自発的に会合することが確認できた。そのため、合成したポリペプチドが逆平行型であることを確認し、さらに、ポリペプチド-AAcをアクリルアミドなどの共重合による高分子化、そしてポリペプチド部位のコイルドコイル形成に基づくゲル化について検討する。

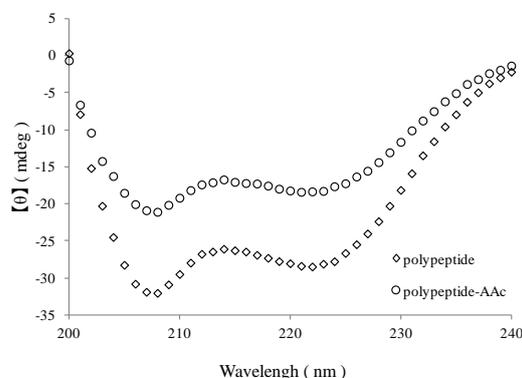


Fig. 2 CD spectra of designed polypeptides in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH7.0).

Table 1 Results of ultracentrifugal analysis of designed polypeptide in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH7.0)

	$M_{calc}(Da)$	$M_{obs}(Da)$
polypeptide	3724	7879(±618)
polypeptide-AAc	3778	7451(±957)

[参考文献]

- 1) Suzuki, K. ; Hiroaki, H. ; Kohda, D. ; Tanaka, T. *Protein. Eng.* **1998**, 11, 1051-1055.
- 2) Kevin, P. ; Karsten, S. ; Bettina, S. ; Alessandra, V. ; Alan, E. M. ; Stefan, B. ; Beate, K. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 1189-1194.
- 3) Robert, W. ; Mikhail, T. ; Karolina, C. ; Priyanka, M. ; Mirko, N. ; Uwe, F. ; Christoph, N. ; Carsten, W. ; Yixin, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2919-2922.
- 4) Fletcher, N. L. ; Lockett, C. V. ; Dexter, A. F. *Soft Matter* **2011**, 7, 10210-10218.