

## 1. 緒言

タンパク質による生体内超分子アセンブル系は生体内における種々の機能発現ならびに反応制御に重要な役割を果たしている。それゆえに *de novo* 設計によって自発的に形成される高次アセンブル系の構築は生体内現象の理解において注目されているが、生体適応性および環境適応性を有する新規材料設計にも大きく寄与するものと考えられる。

これまでペプチド工学の観点から *de novo* 設計により、水系で安定な三本鎖 coiled coil 構造を形成するポリペプチドおよび遷移金属イオンや重金属イオンに応答して三本鎖 coiled coil 構造を形成するポリペプチドの設計が行われてきた<sup>1-4)</sup>。また、われわれは、本プロジェクトにおける 17 年度の成果として、Ni<sup>2+</sup>イオン極めて選択性高く応答する短鎖ポリペプチドによる coiled coil 新規アセンブル系の構築、ならびに coiled coil 構造形成時におけるポリペプチド鎖上の蛍光ドナーアクセプター分子間による蛍光エネルギー移動 (FRET) 現象を利用した Ni<sup>2+</sup>イオンセンシングシステムの構築について報告した<sup>5,6)</sup>。さらに 18 年度の成果として、新たに設計したポリペプチドの構造変化を利用した希土類金属イオン選択的センシング系の構築について報告した。すなわち、(1)三本鎖 coiled coil 構造中への希土類金属配位場の確保。(2)希土類金属イオン配位場付近のアミノ酸残基改変により  $\pi$ - $\pi^*$  励起可能な官能基を希土類金属イオン付近に固定し、希土類特有の f-f 遷移を利用した蛍光センシングの実現。の順にポリペプチド設計およびキャラクターゼーションについて示してきた<sup>7)</sup>。

上記の通り、本プロジェクトでは、*de novo* 設計による coiled coil ポリペプチドのセンシング材への利用可能性について示した。いずれの系も、学術的には新奇なモデルである。しかしながら、水系での金属イオン回収まで考慮すると、担体との複合化などが課題となる。

近年、ペプチド繊維やペプチドゲルなどの設計を目的とした合成ポリペプチドによる高次アセンブル系の構築が盛んに行われている。そこで、19 年度の課題として合成ポリペプチドを用いた環境適応材料の観点から、担体材料を目指した coiled coil アセンブル系の構築に取り組んだ。本検討においては二量化イソロイシンジッパー (IZ) ポリペプチドを用い、coiled coil 超分子を単分散的に二量化した。すなわち、N-末端に Cys を有する IZ ポリペプチドならびにペプチド鎖中央部に Cys を有する IZ ポリペプチド同士それぞれ、マレイミド基を有するリンカー分子で二量化した後、相補ポリペプチドとの選択的会合により水溶液中で量論比の定まった coiled coil アセンブル系構築を目指した (Fig. 1)。このような量論比が定まったアセンブル系構築が実現できれば、目的に応じた繊維化あるいはゲル化などが

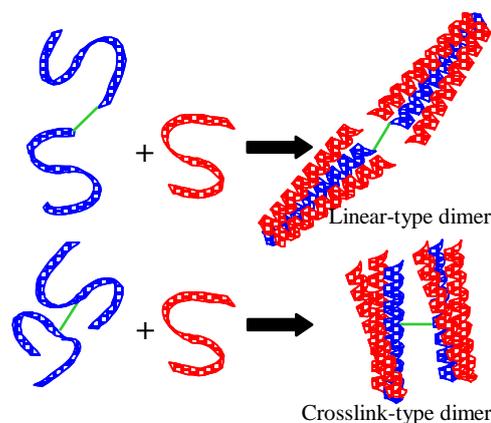


Fig. 1 Schematic illustration of construction of mono-dispersed coiled coil dimer compounds

可能になると考えられ、環境適応性を満たした担体構築に貢献できると考えられる。

## 2. 実験

### 2. 1 ポリペプチド合成と二量化

本研究で使用したポリペプチドはすべて Rink amide 樹脂を用いた Fmoc 固相法にて合成

## Monodispersed Dimerization of Isoleucine Zipper Coiled Coil Trimer

Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

した。そして精製は Sephadex G-50 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーおよび YMC-Pack ODS-A カラム (10 mm i.d. × 250 mm, 5 μm, YMC Inc., Japan) を用いた高速液体クロマトグラフィーによって行った。また、ポリペプチドの N-末端あるいは中央部には Cys を配しており、別途合成したリンカー分子(両末端にマレイミド基を有する)と選択的な二量化を行った。

## 2. 2 円二色性(CD)スペクトル測定

ポリペプチドのアミド領域における CD スペクトル測定は JASCO J-820 分光計を使用して行った。すべての測定試料は 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)に溶解したものを、セル長 0.2 cm で測定を行った。また、coiled coil 形成の指標となる 222 nm における負の CD 極大値の温度変化を追跡することにより、熱安定性を評価した。

## 2. 3 超遠心分析(沈降平衡測定)

超遠心分析は Beckman XL-I Optima Analytical Ultracentrifuge を使用して行った。測定試料は 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)に溶解したものを、試料は 30000 rpm で 24 h 遠心分離した。なお、230 nm で吸収を追跡することで沈降平衡測定を行った。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 ポリペプチドの設計

直鎖および架橋型新規 coiled coil 構造構築のため、本研究で設計・合成した二量化 IZ ポリペプチドのアミノ酸シーケンスを Fig. 2 に示す。LD-IZW はリンカー分子を介して直鎖状に、そして CLD-IZW は架橋状に二量化したモデルである。そして、これらの二量化ポリペプチド LD-IZW および CLD-IZW に 4 等量の相補ポリペプチド IZA を添加することにより、AAB 型ヘテロ三本鎖 coiled coil 二量体を形成することが考えられる<sup>8,9)</sup>。

### 3. 2 CD スペクトル測定による coiled coil 二量体構造形成の検討

設計・合成したポリペプチドの二次構造について検討するために CD スペクトル測定を行った。Fig. 3(a)には直鎖型二量化ポリペプチドの CD スペクトルを示した。LD-IZW および IZA 単独ではランダム構造であったが、4 等量の IZA

存在下において LD-IZW は 208 nm と 222 nm に

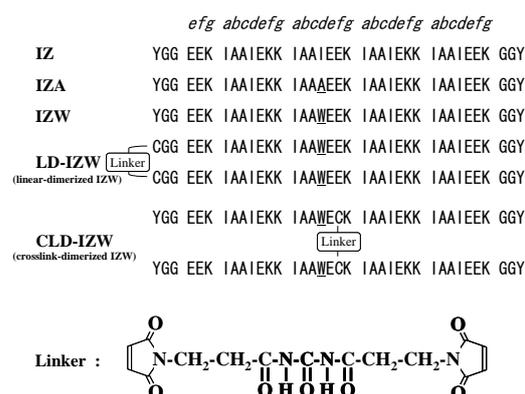


Fig. 2 Amino acid sequences of isoleucine zipper polypeptides used in this study.

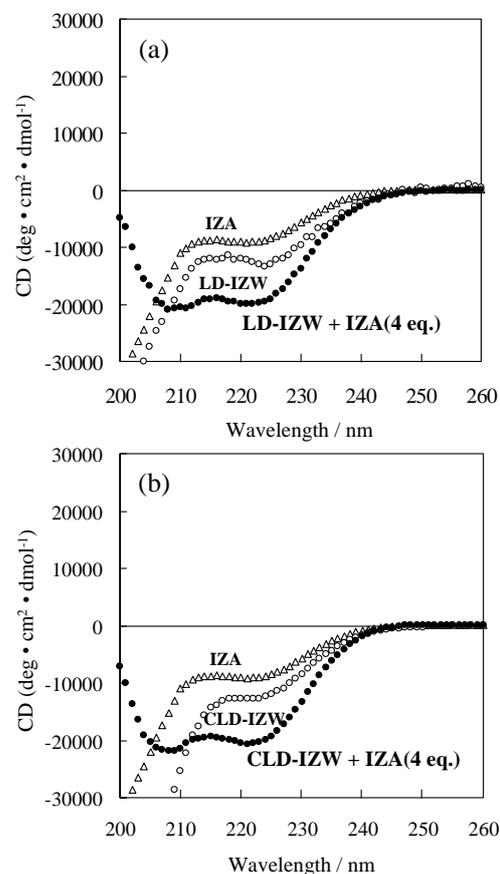


Fig. 3 CD spectra of LD-IZW/4IZA and CLD-IZW/4IZA assembled at pH 7.0 and 20 °C. (a) CD spectra of IZA(Δ), LD-IZW(○), and LD-IZW/IZA (1:4) mixture (●). (b) CD spectra of IZA(Δ), CLD-IZW(○), and CLD-IZW/IZA (1:4) mixture (●).

負の極大を示すα-helix 構造に特有なスペクトルであった。このスペクトル変化は LD-IZW が IZA と相互作用することにより、直鎖型ヘテロ

三本鎖 coiled coil 二量体を形成することを示唆している。また、Fig. 3(b)は架橋型二量化ポリペプチドの CD スペクトルを示したが、直鎖型同様に顕著なスペクトル変化を観測することができ、架橋型ヘテロ三本鎖 coiled coil 二量体の形成が示唆された。

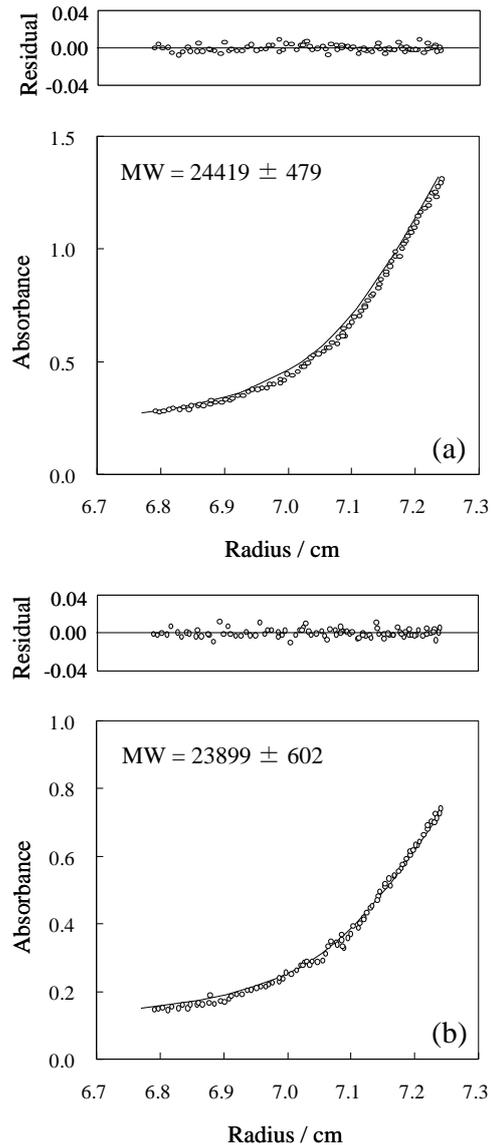
### 3.3 会合状況の検討

ポリペプチドの会合状況は Sephadex G-50 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより見積もった。IZA 不在下では LD-IZW および CLD-IZW いずれの二量化ポリペプチドも IZ ポリペプチド単位で二量体に相当する分画に溶出が認められた。一方、4 等量の IZA 存在下における二量化ポリペプチドは IZ ポリペプチドからなる三本鎖 coiled coil より早い時間での溶出が確認され、より大きな会合体(三本鎖 coiled coil 二量体)の形成が示唆された。また、得られた会合体の組成を分析するために、この溶出分画の HPLC 分析を行った。その結果、4 等量の IZA 存在下における LD-IZW 会合体においては LD-IZW/IZA=1.0/4.0 の組成であることが示された。同様に、4 等量の IZA 存在下における CLD-IZW 会合体においてもゲルろ過における溶出分画を HPLC により組成分析した結果、CLD-IZW/IZA=1.0/3.9 であることが示された。

さらに、詳細な会合度について知見を得るために超遠心分析による沈降平衡測定を行った。その結果、Fig. 4 に示すとおり LD-IZW/IZA については  $24419 \pm 479$  Da (Calc. 24074 Da)、そして CLD-IZW/IZA については  $23899 \pm 602$  Da (Calc. 24142 Da) に相当する分子量が得られ、いずれの二量化ポリペプチドも 4 等量の IZA と単分散的に会合体形成していることが示された。

### 3.4 熱安定性評価

得られた三本鎖 coiled coil 二量体のキャラクター化として LD-IZW/IZA および CLD-IZW /IZA 複合体の熱安定性の評価を行った。実験項(2.2)に示したとおり、熱安定性は coiled coil 構造形成の指標である CD スペクトルの 222 nm における負の極大値を温度の上昇とともに追跡することにより評価した。測定の結果 LD-IZW/IZA および CLD-IZW/IZA 複合体における変性中点温度  $T_m$  はそれぞれ  $52.7^\circ\text{C}$  および  $50.1^\circ\text{C}$  に観測された。これら得られた  $T_m$  は



**Fig. 4** Sedimentation equilibrium analysis of the mixture of LD-IZW/4IZA (a) and CLD-IZW/4IZA (b) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at  $25^\circ\text{C}$ .

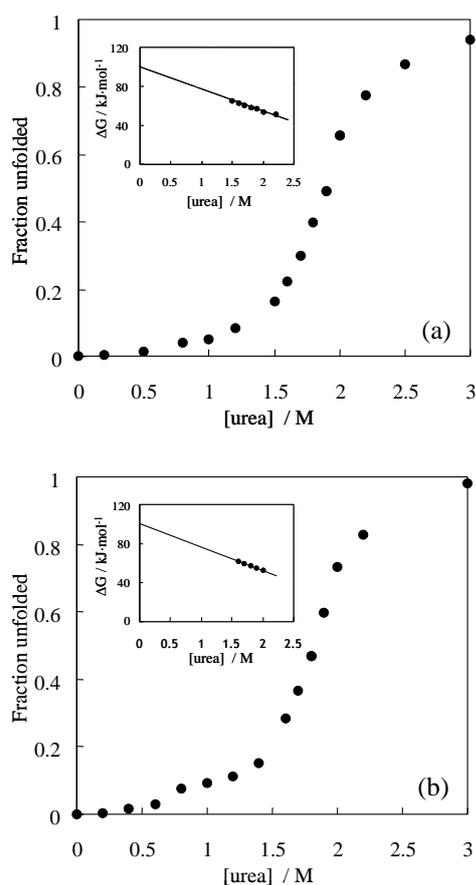
比較のために測定された三本鎖 coiled coil (IZ ポリペプチド由来)で観測された  $57.7^\circ\text{C}$  および過去に報告された類似の coiled coil モデル<sup>2)</sup>と比べても妥当な値であった。

本研究で得られた結果は三本鎖 coiled coil 二量体がさらなる高分子(超分子)化を实践する上で十分な熱安定性を有していることを示している。

### 3.5 変性剤安定性評価

三本鎖 coiled coil 二量体の熱力学的安定性は

尿素の添加による変性実験によって評価された。20 °Cにおける変性自由エネルギー $\Delta G^\circ$ は二状態転移に基づく最小二乗近似により計算した。安定な三本鎖 coiled coil 構造を形成することが知られている IZ は尿素変性中点濃度 2.1 mol/dm<sup>3</sup>を示し、 $\Delta G^\circ$ は 110 kJ/mol となった。また、LD-IZW および CLD-IZW 単独ではそれぞれ 21.1, 17.4%の $\alpha$ -helix性を示し、 $\Delta G^\circ$ は 55.6, 52.7 kJ/mol となったが、4等量の IZA 存在下で十分に構造形成した三本鎖 coiled coil 二量体はそれぞれ 100, 102 kJ/mol の $\Delta G^\circ$ 値を示した(Fig. 5)。この結果は LD-IZW および CLD-IZW が IZA との coiled coil 形成により約 45-50 kJ/mol 安定化していることを示している。



**Fig. 5** Urea denaturation profiles of LD-IZW/IZA (a) and CLD-IZW/IZA (b) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 20 °C. The insets show the linear dependence of DG on the urea concentration. DG is the free energy of unfolding at a given concentration of urea.

## 4 結言

19年度の成果としてわれわれは *de novo* 設計による直鎖および架橋型三本鎖 coiled coil 二量体の構築について報告した。これまでの関連研究の多くは coiled coil 構造などの規則構造の高次組織化に注目が置かれてきたが、本研究では規則構造を単分散的に二量化できたことが新規な点である。本研究で用いたリンカーを介し、ポリペプチドの多量化が実現できれば、これまでに類のないポリペプチド超分子ネットワークを単分散的に構築できることが期待される。このようなポリペプチド超分子は新規繊維材料や環境適応性素材としての応用展開が考えられる。17年度および18年度の成果として報告した金属イオンセンシングポリペプチドは水溶液中で鋭敏な挙動を示し有用であったが、再利用のために高分子などへの担持することが課題として挙げられていた。そこで、本研究成果を知見としたポリペプチド超分子の構築、そして金属イオンセンシングポリペプチドとの複合化が行われれば上記課題の克服が期待される。

## 5 参考文献

- 1) Harbury, P. B., Zhang, T., Kim P. S., Alber, T., *Science*, **262**, 1401-1407 (1993).
- 2) Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., Tanaka, T., *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055 (1998).
- 3) Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., Nakamura, H., Tanaka, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13008-13015 (1998).
- 4) Li, X., Suzuki, K., Kanaori, K., Tajima, K., Kashiwada, A., Hiroaki, H., Kohda, D., Tanaka, T., *Protein Sci.*, **9**, 1327-1333 (2000).
- 5) Kashiwada, A., Nakamura, Y., Matsuda, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005).
- 6) Kashiwada, A., Nakamura, Y., Matsuda, K., *Sens. Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005).
- 7) Kashiwada, A., Ishida, K., Matsuda, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 2203-2207 (2007).
- 8) Kashiwada, A., Hiroaki, H., Kohda, D., Nango, M., Tanaka, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 212-215 (2000).
- 9) Kiyokawa, T., Kanaori, K., Tajima, K., Tanaka, T., *Biopolymers*, **55**, 407-414 (2000).