1. 緒言

近年,超分子化学の発展が目覚しく,その 特殊な形態に由来する機能から分子コンピュ ーターや不斉触媒などの様々な分野への展開 が期待されている. 超分子化合物の中で, 共 有結合や分子間相互作用により構成されてい るものとは異なり, 二つ以上の環状ユニット が絡み合ってトポロジー的に切り離すことの できない構造を持ったものにカテナンがある. カテナンは構成分子の各々の駆動性を生かせ る点で非常に興味深い研究対象であり、分子 シャトルや分子モーターなどの素材として注 目されている. これまでカテナンは鋳型合成 により、しばしば合成されてきた.過去に、 タンパク質の高次構造形成を利用した環状ペ プチドの合成が報告され¹⁾,最近,この報告 を参考にした高次構造利用のポリペプチドカ テナンの合成が報告されており、トポロジー 的な構造のポリペプチドを合成するのに有用 であると考えられる²⁾.

アミノ酸を構成要素とするタンパク質はそ れぞれのアミノ酸残基の性質から,その配列 により多様な高次構造を形成する.天然タン パク質のアミノ酸配列を部分的に模倣してポ リペプチドを合成し,天然類似の高次構造を 形成させることにより,天然タンパク質に関 する知見を得る目的で種々の研究が進められ てきた.また一方で,構造上の特徴を模倣す ることにより特有の機能を発現させることを 主体とする de novo 設計が,これまでタンパ

日大生産工(院)	高村	直秀	
日大生産工	柏田	步·松田	清美

ク質の機能や、その構成単位のアミノ酸のタ ンパク質の機能への寄与の知見を得るために 行われてきた.タンパク質は超二次構造や四 次構造のような超分子構造を形成することが 知られており、その一つとして超二次構造で ある Leucine Zipper (coiled coil 構造)を形成 する DNA 結合タンパク質 GCN4 が挙げられ る。このタンパク質の特徴である Leucine Zipper 構造を模倣し、Ile が疎水性コアを形成 して α -helix が会合することにより三量体を 形成する Isoleucine Zipper polypeptide (IZ ポ リペプチド)が報告されている³⁾.

そこで、本研究では *de novo* 設計した coiled coil 形成ポリペプチドを用いたポリペプチド カテナンの合成を目的とする. Coiled coil は 二つ以上の helix が縒り合うことにより形成 され、縒り合う際に捻れが生じる. 二つのポ リペプチド鎖がそれぞれ helix を形成して会 合している場合,その捻れを生じた状態で各 ポリペプチド鎖の末端同士をそれぞれ繋ぎ合 わせて環化すれば[2]カテナンとなる(*Fig. 1*).

最終的に、ポリペプチドカテナンの合成を 行うためには二つの異種ポリペプチドを選択 的に会合させる必要がある.そこで、第一段 階として α -helical coiled coil heterodimer の構 築を行ったので報告する.



Fig. 1 Synthesis of catenane via coiled coil structure.

Design of α -helical coiled coil heterodimer for polypeptide catenane synthesis

Naohide TAKAMURA, Ayumi KASHIWADA, and Kiyomi MATSUDA

2. 実験

2-1. ポリペプチドの合成

今日,様々な方法でポリペプチドの化学合成が行われているが,最も容易に短時間でポリペプチドを合成できる固相合成法が一般的に用いられている.この合成法は保護アミノ酸の脱保護,縮合の繰り返しにより,合成用樹脂上でポリペプチドをC末端側からN末端側へと伸長させ,最後に脱樹脂操作によりポリペプチドを得る合成法である.本研究ではより温和な条件で合成ができる Fmoc 固相合成法を用いてポリペプチドの合成を行った.

ペプチド合成用樹脂として最も一般的な Wang resin を選択した. 初めに, 目的のポリ ペプチドの反応スケールに応じた Wang resin を反応容器に採取する. そして, NMP (*N*-methyl-2-pirrolidinone)で3回洗浄後, 20% Piperidine (NMP溶液)中20min 攪拌す ることで, 脱保護 (Fmoc 基の除去) を行う. 脱保護終了後、樹脂を NMP で充分洗浄後、 Dichloromethane で1回洗浄する. 脱保護の確 認は Kaiser Test (Ninhydrin 反応) で行う. ア ミノ基の検出を確認した後,再び NMP で洗 浄する.その後,目的のFmoc-アミノ酸,活 性・縮合剤である HBTU, HOBt をいずれも Wang resinの反応点に対して5当量ずつ採取 し、NMPに溶解させ、さらに反応開始剤とし て DIEA も5 当量加えて混合し、反応容器に 入れる. 40 min 程度反応後,樹脂を NMP で 充分洗浄し,再び Kaiser Test を行う. (ここ ではN末端側にFmoc-アミノ酸が結合してい るため,縮合が完了していれば Ninhydrin 反 応は起こらず呈色は見られない)Fmoc-アミ ノ酸の結合が確認できたら、上記と同様の手 法により脱保護・縮合を繰り返し、目的のポ リペプチド配列に伸長する.

樹脂上のポリペプチド鎖の伸長後,脱樹脂 操作を行う.脱樹脂はポリペプチド伸長 Wang resin 0.2 gに対し,氷冷下, TFA / H₂O / Tis (95.0 /2.5/2.5)の混合溶液2 cm³中,室温で90 min
反応させることで行う.その後,樹脂をろ別
し,反応溶液を冷 Diethyl ether に滴下して沈
殿物を得る.沈殿物としてのポリペプチド粗
生成物は遠心分離により分離する.その後, ポリペプチド粗生成物はゲルろ過クロマトグ
ラフィー(Sephadex G-50)により精製する.

2-2. 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0)中,総ポ リペプチド濃度が 100 μ M となるようにサン プル溶液を 0.5 cm³調製し,充分な平衡時間を 置いてから測定を行った.円二色性分光光度 計の測定時の条件を以下のとおり設定して測 定を行う. (温度: 20 °C,感度: Standard,波 長:開始 260 nm;終了 200 nm,スリット間隔: 1 nm,走査速度: 50 nm/min,積算回数: 10 回)

2-3. 超遠心分析

前述の CD スペクトル測定で使用したサン プルと同等のポリペプチド溶液を調製後,分 析用セルに 140 µl 注入し,35000,38000,42000 rpm で 24 h 沈降平衡法でそれぞれ測定を行っ た. 超遠心分析装置には BECKMAN COULTER 製の XL-A を使用し,データの解 析には付属のソフトウェア(Optima XL-A/XL-I Data Analysis Software Version 6.03)を使用した.得られた3種類の回転数の 測定結果を用いて,それぞれのサンプルごと にグローバルフィッティングを行うことによ り分子量を求めた.

3. 結果・考察

3-1. ポリペプチドの設計

Fig. 2 にα-helical coiled coil dimer のヘリカ ルホイール構造を示す. 二量体形成の要因と して最も大きいものはポリペプチド鎖の繰り 返し単位中にある *a*, *d* 位の疎水性アミノ酸 (Leu)の疎水性相互作用による疎水性コア の形成である.また, *e*, *g* 位の親水性アミノ 酸による静電相互作用も構造の安定化に寄与 している.

また,合成したポリペプチドのアミノ酸配 列を *Fig. 3* に示す.二量体の選択的形成には 2 種類のポリペプチドが必要となるため, SDP+および SDP-をそれぞれ設計・合成した.



Fig. 2 Helical wheel of α -helical coiled coil dimer.

		abcdefg abcdefg abcdefg abcd	
EK		(LGALEKK LGALEKK) _n	
SDP-	$H_{2}-$	YGG LAALEQE LAALEQE LAALEQE LAAL GG	ОН
SDP+	H_2-	YGG LAALKQK LAALKQK LAALKQK LAAL GG	он

Fig. 3 Amino acid sequences of designed polypeptides in this study.

ポリペプチドのアミノ酸配列には過去に報 告されている α -helical coiled coil dimer (EK) のもの(*Fig. 3*)を参考にし、helixの安定化を 目的として b 位および c 位を Ala 残基に置換 した⁴⁾. また、二量体の選択的形成には helix 構造形成時に縒り合う二本のポリペプチド鎖 間において近接する e 位および g 位の静電相 互作用を利用することにより可能となること が知られているため、e 位および g 位を SDP+ では Lys 残基に、SDP-では Glu 残基にそれぞ れ置換した.最後に、精製を行う際の UV 検 出のための標識として Tyr を N 末端に導入し た.

3-2. ポリペプチドの

キャラクタリゼーション

*Fig. 4*に CD スペクトル測定の結果を示す. ポリペプチドが helix 構造 (α -helix あるいは α -helical coiled coil) を形成している際に, 208, 222 nm 付近に負の極大を有するスペク トルが観測されることが知られている.また, ポリペプチドが random 構造である場合,200 nm 付近に負の極大が観測されることも知ら れている. 今回の測定結果から, SDP-単独系, SDP+単独系および SDP+/ SDP-=1/1 混合系 のいずれのサンプルにおいても 208, 222 nm 付近に負の極大が観測された. このため、い ずれの系においてもポリペプチドが helix 構 造を形成している可能性が考えられる. SDP+ 単独系および SDP-単独系の結果では 222 nm 付近に観測されたシグナルは同等の強度だが, 208 nm 付近に観測されたシグナルの強度は SDP-単独系の方が大きい. 208 nm 付近のシ グナルがやや短波長側に観測されているため, 200 nm 付近に観測される random 構造のシグ ナルの混合が考えられる、そのため、SDP-単独系ではポリペプチド鎖中に random 構造 を形成している部分が含まれていると考えら れる. SDP+/SDP-=1/1 混合系の結果では 他のいずれの二つの結果よりも 208, 222 nm 付近のシグナルが顕著に観測される. このた め、より安定な helix 構造を形成していること が考えられる.



Fig. 4 CD spectra of the designed polypeptides (SDP- only (○), SDP+ only (●), and 1:1 mixture of SDP- and SDP+ (●)) in this study.

次にポリペプチドの会合状況について検討 するために超遠心分析を行った.その結果を *Fig.5* に示す.



Fig. 5 Results of sedimentation equilibrium analysis by ultracentrifugation of a) SDP–, b) SDP+, and c) 1:1 mixture of SDP+ and SDP–. The samples were centrifuged at 35000 rpm at 20 $^{\circ}$ C, and the absorbance was monitored at 230 nm.

なお, *Fig.5* に示した結果はいずれも回転 数:35000 rpm で分析したものである.

その結果, SDP+/SDP-=1/1 混合系 (*Fig. 5* c))においてのみ二量体に想定される予測分 子量の計算曲線 (実線)に実測値が完全に 一致していることが観察される.また,単量 体に匹敵する分子量 3000 の計算曲線 (破 線)と相関性が確認できる部位がないため, ほぼ完全に二量体を形成していると考えられ る.

CD スペクトル測定および超遠心分析の結 果から, SDP+および SDP-単独系では安定な α -helical coiled coilを形成することができず, 水溶液中で単量体として存在しているが, SDP+ / SDP-=1 / 1 混合系では安定な α -helical coiled coilを形成しており,完全に 二量体を形成していることが示唆された.

以上のことから, SDP+および SDP-混合系 はポリペプチドカテナン形成において有用で あると考えられる. 今後はカテナン形成ポリ ペプチドの設計・合成の検討を行う予定であ る.

4. 参考文献

- 1) J. A. Camerero, J. Pavel, T. W. Muir, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 347–349.
- L. Z. Yan, P. E. Dawson, Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 3625–3627.
- K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, T. Tanaka, *Protein Eng.*, 1998, 11, 1051–1055.
- N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, J. Mol. Biol., 1994, 237, 500–512.