

超分子タンパク質の合成を目的としたポリペプチドの *de novo* 設計

日大生産工（院） 高村 直秀

日大生産工 柏田 歩・松田 清美

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ただポロジ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。これまで低分子カテナンは鋳型合成により、しばしば合成されてきた。一方で、高分子カテナンは反応の選択性や精製方法の面から合成が困難であるとされていた。しかし、最近、天然タンパク質の高次構造を利用したポリペプチドカテナンの合成が報告され、この方法がトポロジ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ている¹⁾。このポリペプチドカテナンは天然タンパク質のアミノ酸配列をそのまま使用して合成されており、アミノ酸配列改変による詳細な構造的制御が難しいと考えられる。そこで、本研究では人工設計したポリペプチドにより、超分子構造を有するタンパク質を合成する方法を考案した。なお、タンパク質の人工設計の方法として *de novo* 設計を用いた。

De novo 設計は天然タンパク質のアミノ酸配列を参考とせず、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目的としており、構成単位である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。その例として、DNA 結合タンパク質 GCN4 中における coiled coil 構造を模倣し、Isoleucine 残基が疎水性コアを形成して

helix が会合することにより 3 量体 coiled coil を形成する Isoleucine Zipper polypeptide が報告されている²⁾。また、疎水性コアのアミノ酸残基を改変することで 2～5 量体 coiled coil を容易に形成できることが判明している。

本研究では超分子タンパク質としてポリペプチドカテナンを得ることを目的とし、その基盤構造に coiled coil 形成ポリペプチドの利用を考えた。そして、設計、合成したポリペプチドの超分子タンパク質合成への有用性の評価を行ったので報告する。

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。

2-2. 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、総ポリペプチド濃度 20 μ M の条件で測定を行った。

2-3. 超遠心分析

回転数 28000, 30000, 32000 rpm, 20 h 沈降平衡法によりそれぞれ測定を行い、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。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 Optima XL-A/XL-I Data Analysis Software Version 6.03 を使用した。

De novo design of polypeptide for synthesis of supramolecular protein

Naohide TAKAMURA, Ayumi KASHIWADA, and Kiyomi MATSUDA

3. 結果・考察

3-1. ポリペプチドの設計

設計したポリペプチドカテナンの合成系を **Fig. 1 a)** に示す. 本系の第一段階では *de novo* 設計ポリペプチドのモチーフとして coiled coil tetramer を用い, 交差型の二本鎖会合系を構築することを目的とする. **Fig. 1 b)** に coiled coil tetramer 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, b, c* 位に配した親水性アミノ酸による静電相互作用もポリペプチド鎖間の会合に寄与している. 設計したポリペプチドを **Fig. 2** に示す. Linker 部分に安定とされている Glycine linker を用いた EA54 および KW54 を設計・合成した.

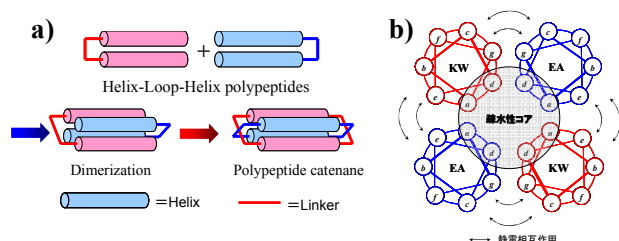


Fig. 1 a) Synthetic strategy of catenane by using coiled coil template. b) Helical wheel of coiled coil tetramer.

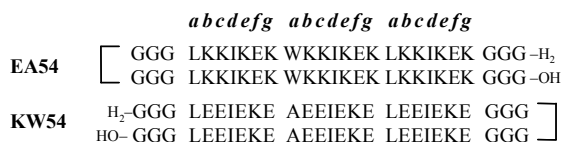


Fig. 2 Amino acid sequences of designed polypeptides in this study.

3-2. ポリペプチドの

キャラクタリゼーション

Fig. 3 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 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, KW54 単独系, EA54 単独系では 200 nm 付近に負の極大が観測され, KW54:EA54=1:1 混合系では 208, 222 nm 付近に負の極大が観測された. このため, 1:1 の系において選択的に helix を形成している

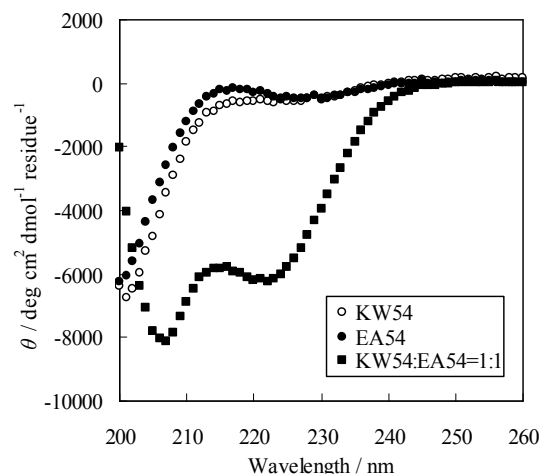


Fig. 3 CD spectra of KW54 (○), EA54 (●) and an equimolar mixture of KW54 and EA54 (■).

Table 1 Sedimentation equilibrium data of KW54 and EA54 system

	M_{calc}	M_{obs} (Da)
KW54	6057.38	5426 ± 395
EA54	5844.04	5237 ± 1064
KW54:EA54=1:1	11901.42	11903 ± 557

と考えられる.

Table 1 に超遠心分析の結果を示す. KW54 と EA54 の系においてはいずれの測定結果においても予測値とよく一致した値が得られた. CD スペクトル測定の結果を加味すると KW54 と EA54 との間で選択的に会合体が形成されていると考えられる.

今回の結果から EA54 および KW54 を用いることでカテナン合成のために有用な coiled coil テンプレートが効率よく得られると考えられるので, この系を用いて会合体の形状の確認, そしてカテナン化の実践を行う.

4. 参考文献

- 1) L. Z. Yan, P. E. Dawson, "Design and synthesis of a protein catenane", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, (2001) p.3625–3627.
- 2) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, T. Tanaka, "An isoleucine zipper peptide forms a native-like triple stranded coiled coil in solution", *Protein Eng.*, **11**, (1998) p.1051–1055.