Cu(II)応答性α-helical coiled coil の設計および特性評価

| 日大生産工(院) | ○安藤 | 隼 | |
|----------|-----|------|----|
| 日大生産工 | 柏田 | 歩・松田 | 清美 |

<緒言>

天然タンパク質中に多く見られる超二次 構造のうち、 α -helical coiled coil はその単純 な構造にもかかわらずタンパク質の会合制 御や遺伝子発現制御など生体内での機能制 御において重要な役割を果たしている.単純 な構造とはいえ、これらの構造形成は目的に 応じた機能発現のために天然では 20 種類の アミノ酸を用いて、緻密になされている.一 方、ペプチド工学的な立場からは天然様の構 造形成を目的として *de novo* 設計に基づき、 より単純なアミノ酸配列からなる、種々の α -helical coiled coil ペプチドが合成されてい る.本研究では、外部刺激に応答する天然の 酵素の動的因子の解明、およびモデル化を目 的とし、新規の α -helical coiled coil を設計、

合成する. このモデルペプチドは,水溶液中 では dimer 構造を形成しているが,金属イオ ンの存在により tetramer 構造に再編する設計 である. この構造再編は,ペプチド中に導入 した Histidine(His)残基による金属イオンへ の配位の寄与によるものである.

<実験>

ペプチド合成は Wang resin を用いた Fmoc 固 相合成法により行った.なお,固相合成法で は HOBt, HBTU 活性化法を利用し,目的の アミノ酸を C 末端から N 末端まで Wang resin 上に伸長させた.

伸長後, TFA/water/Triisopropylsilane により 脱樹脂を行い, 得られた粗ペプチドは透析に より精製を行った.

精製後、ペプチドの水溶液中での構造について Circular Dichroism (CD) スペクトル測定により検討を行った.また、ペプチドの会合状態については超遠心分析によって検討を行った.

<結果および考察>

本研究において設計, 合成した 2 種類のペ プチド(pep1, pep2)は α -helical coiled coil 構造 形成における最小単位であるアミノ酸 7 残 基の a, d 位置に疎水性アミノ酸を, e, g 位置 に電荷を有するアミノ酸を有している. そし て a, d 位置での疎水性相互作用および e, g 位 置での静電相互作用を引き金として, 水溶液 中において pep1, pep2 間で安定な α -helical coiled coil dimer 構造を形成することが予想 される.

また、Cu(II)存在下では pep1 中の His に よる配位結合を経て最安定状態の α -helical coiled coil tetramer 構造に再編する設計であ る. Fig. 1 に本研究で設計したアミノ酸配列 を示す.

| dejg | abc aejga | ide aejgade | c aejgaoc | aejgabc | aej | |
|----------|----------------------------|---|--|---|--|---|
| H –LKKA | AOK LKKIID | K AKKHKSK | HKKAVNK | LKKKIRK | LKA GGC | -0H |
| | | | | | | on |
| | fga bcdefg | a bcdefga | bcdefga | bcdefga | bcdefga | |
| FigH1CGG | AII RELĘE | IV NELEEAA | SEĄEEIĮ | DELEEIV | QE WEEII | -0H |
| | deJg H−LKKA FigH⊢CGG | <i>defgabc aefga</i> H−LKKAAQK LKKIIC <i>fga bcdefg</i> FigH—CGG AII RELEE | H–LKKAAQK LKKIIDK AKKHKSK fga bcdefga bcdefga FigH–CGG AII RELEEIV NELEEAA | H–LKKAAQK LKKIIDK AKKHKSK HKKAVNK fga bcdefga bcdefga bcdefga FigH–CGG AII RELEEIV NELEEAA SEAEEII | defgabcaefgabcaefgabcaefgabcH-LKKAAQKLKKIIDKAKKHKSKHKKAVNKLKKKIRKfgabcdefgabcdefgabcdefgaFigH-CGGAIIRELEEIVNELEEAASEAEEIIDELEEIV | H–LKKAAQK LKKIIDK AKKHKSK HKKAVNK LKKKIRK LKA GGC fga bcdefga bcdefga bcdefga bcdefga bcdefga FigH–CGG AII RELEEIV NELEEAA SEAEEII DELEEIV QE WEEII |

Design and characterization of Cu(Π) responsive α-helical coiled coil Shun ANDO, Ayumi KASHIWADA, and Kiyomi MATSUDA

水溶液中におけるペプチドの構造確認の ために pep1, pep2, pep1: pep2=1:1 混合系, および Cu(II)存在下での1:1 混合系の 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 スペクトル測定の結果を 示す. pep1 および pep2 単独下では, 200 nm 付近に負の極大を示しており, ランダム構造 であることがわかった.

また, pep1 および pep2 を1:1 で混合した 溶液では, 222 nm および 208 nm 付近に負 の極大が観測されるため、設計したα-helix 構造を形成していると考えられる. また, Cu(Ⅱ)存在下においても 1:1 混合溶液は α-helical coiled coil 構造を形成してると考え られるが208 nmおよび222 nmのシグナル比 が 0.712 と1 に近く, Cu(II)不在下より安定 なα-helical coiled coil 構造を形成しているこ とが確認できた.以上の結果から、pep1 お よび pep2 は 1:1 の組成でa-helical coiled coil 構造を形成するが Cu(Ⅱ)の存在により構造 再編し、より安定な構造に変化することが示 唆された. そこで, Cu(Ⅱ)存在下での構造変 化を確認するために超遠心分析を行った. Table 1 に超遠心分析の測定結果を示す. は じめに, pep1, pep2 単独下ではそれぞれの分 子量に相当する観測値を得たので会合は起 きてはいないと考えられる.次に,pep1:pep2 を1:1 で混合させた系を超遠心分析により 評価した結果は, pep1と pep2 が 1:1 で dimer 構造を形成していることを示唆する観測値 が得られた. そして, Cu(Ⅱ)存在下での1:1 溶液では dimer 構造の分子量のほぼ二倍であ り, tetramer 構造に匹敵する観測値が得られ た. このことから, 設計どおり Cu(Ⅱ) へ の His の配位に伴う α-helical coiled coil の構

造変化を経て tetramer 構造が形成していると

考えられる.



Wavelength(nm)

Fig. 2 CD spectra of pep1, pep2 and a pep1/pep2 (1:1 mixture) in a 20 mM Tris-HCl buffer at pH 7.0. The mixture of pep1 and pep2 was measured in the presence or absence of 20 mM Cu(II).

| Table 1 | Analytical ultracentrifugation data for |
|---------|---|
| | designed polypeptide |

| | M _{calc} | M _{obs} | |
|-------------|-------------------|--------------------|--|
| pep1 | 4663.95 | $4658 \pm \ 682.0$ | |
| pep2 | 4686.17 | 4723± 523.0 | |
| pep1+pep2 | 9350.12 | 8565± 989.0 | |
| = 1:1 | | | |
| (pep1+pep2) | 18700.24 | 17893 ± 5620.5 | |
| +Cu(II) | | | |

【参考文献】

- K. Suzuki ; H. Hiroaki ; D. Kohda ; T. Tanaka , *Protein Eng* . , 11 (1998), 1051-1055.
- (2) T. Tanaka ; T. Mizuno ; S. Fukui ;
 H. Hiroaki ; J. Oka ; K. Tajima M. Shirakawa , J. Am. Chem. Soc . , 126 (2004) , 14023-14028.