

Cu(II)応答性 α -helical coiled coil ポリペプチド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タンパク質の動的因子の解明、およびモデル化を目的とし、新規な 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、Cu(II)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、ペプチド配列中に導入した 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。Fig. 1 に本研究で設計したペプチドのアミノ酸配列を示す。

<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配している。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。

	<i>defgabc</i>	<i>defgabc</i>	<i>defgabc</i>	<i>defgabc</i>	<i>defgabc</i>	<i>def</i>
pep1	H-LKKAAQK	LKKIIDK	AKKHKSK	HKKAVNK	LKKKIRK	LKA GGC -OH
	<i>fga</i>	<i>bcdefga</i>	<i>bcdefga</i>	<i>bcdefga</i>	<i>bcdefga</i>	<i>bcdefga</i>
pep2	H-CGG	AII RELEEIV	NELEEAA	SEAEII	DELEEIV	QE WEEII -OH

Fig. 1 Amino acid sequences of *de novo* designed polypeptide in this study.

Design and characterization of Cu(II) responsive α -helical coiled coil polypeptide

Shun ANDO, Ayumi KASHIWADA, and Kiyomi MATSUDA

また、Cu(II)イオン存在下では 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。

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)イオン存在下 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)イオン存在下においても 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)イオン不在下より安定な 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 α -helical coiled coil 構造を形成するが Cu(II)イオン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)イオン存在下での会合数変化による構造再編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。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)イオン存在下における 1 : 1 溶液では dimer のほぼ二倍すなわち tetramer 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)イオンへの 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。

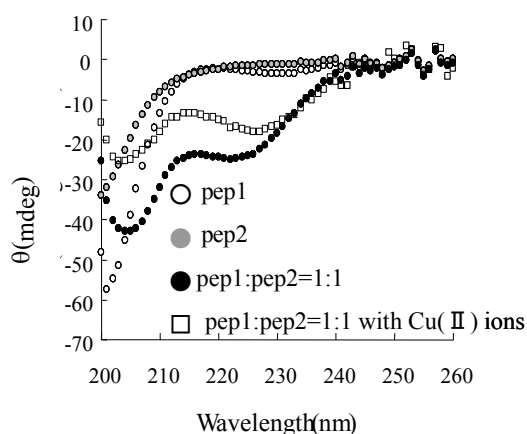


Fig. 2 CD spectra of pep1, pep2 and a 1:1 mixture of pep1 and pep2 in a 20 μ M Tris-HCl buffer at pH 7.0. The mixture of pep1 and pep2 was measured in the presence or absence of 20 μ M Cu(II) ions.

Table1 Analytical ultracentrifugation data for designed polypeptide

	M_{calc}	M_{obs}
pep1	4663.95	4658 ± 682.0
pep2	4686.17	4723 ± 523.0
pep1 + pep2 = 1:1	9350.12	8565 ± 989.0
(pep1 + pep2) + Cu(II)	18700.24	17893 ± 5620.5

【参考文献】

- (1) 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.