

# Ni<sup>2+</sup>イオン応答性ブロック型 coiled coil アセンブル系の構築と 新規センシング材への応用

柏田 歩・松田清美 (応用分子化学科)

## 1. 緒論

天然には金属イオンの存在に応答して機能発現するタンパク質がある。この機能発現には金属イオンによるタンパク質のコンホメーション変化が大きく寄与している。このような系をモデル的に検討するために本研究では金属イオンの存在によって二種類のポリペプチドがブロック状 coiled coil 構造を形成する新規アセンブル系の構築を行なった。また、ブロック状 coiled coil 構造形成時の Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)現象を利用した遷移金属センシングシステムの構築も試みた。このような系は天然タンパク質の構造変化と機能発現機構のモデル的検討だけでなく、新規金属イオンセンサーの開発に関しても有意義であると考えられる。

## 2. 実験

### ・ポリペプチド合成

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。

### ・蛍光色素ラベルポリペプチドの合成

蛍光色素ラベル化用に Fmoc 固相法にて合成した含システインポリペプチド(Pep5 および Pep6)それぞれ 1.0 mg とマレイミド化 Cy 色素 (Cy3B および Cy5Q)それぞれ 1.0 mg を 1.0 cm<sup>3</sup> の DMSO に溶解した。40 μl のジイソプロピルエチルアミン添加後、遮光下、4 °C で 8 時間攪

拌することで目的化合物を得た。精製は 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。

### ・円二色性(CD)スペクトル測定

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 緩衝液に溶解したものを、セル長 0.2 cm で測定を行った。

### ・蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトル測定は HITACHI F4500 蛍光分光光度計を使用して行った。すべての測定試料は 10 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解したものを、セル長 1 cm で測定を行った。

## 3. 結果および考察

本研究において用いたポリペプチドを Fig. 1 に示す。Pep1 は Ile 残基のジッパー効果によ

	efg	abc	defg	abc	defg	abc	defg
Pep 1	YGG	EEK	IAA	IEKK	IAA	IEKK	IAA
Pep 2	YGG	EEK	IAA	IEKK	IAA	HEKK	IAA
Pep 3	YGG	EEK	IAA	IEKK	IAA	HE	
Pep 4						K	IAA
Pep 5	YGG	ECK	IAA	IEKK	IAA	HE	
Pep 6						K	IAA

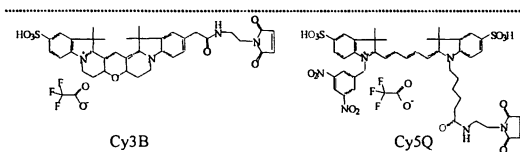


Fig. 1. Amino acid sequences of metal ion induced coiled coil polypeptides used in this study.

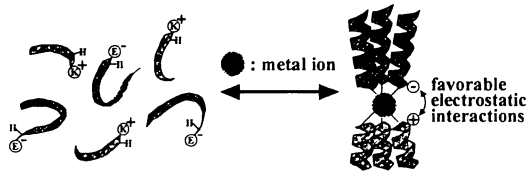


Fig. 2. Schematic view of the hetero-block  $\alpha$ -helical coiled coil formation from Pep3 and Pep4 in the presence of a metal ion.

て水溶液中で三本鎖 coiled coil 構造を形成するモデルである<sup>1)</sup>。また、Pep2 は Pep1 に金属イオン結合部位としての His 残基を付与したもので、金属イオンとの配位により三本鎖 coiled coil 構造が誘起されるモデルである<sup>2)</sup>。一方、Pep3 および Pep4 は Pep2 を分割したモデルであり、金属イオン存在下で  $(\text{Pep3})_3\text{-M}^{n+}\text{-(Pep4)}_3$  型ブロック状 coiled coil 構造を形成すると考えられる (Fig. 2)。さらに、金属イオンの存在によるポリペプチドのコンホメーション変化の可視化を目的として Pep3 および Pep4 それぞれに蛍光ドナー (Cy3B)、アクセプター (Cy5Q) を導入した Pep5 および Pep6 の合成も行った。

ポリペプチドのコンホメーション変化は CD スペクトル測定によって検討した。その結果、Pep1 は設計通り水溶液中において coiled coil 構

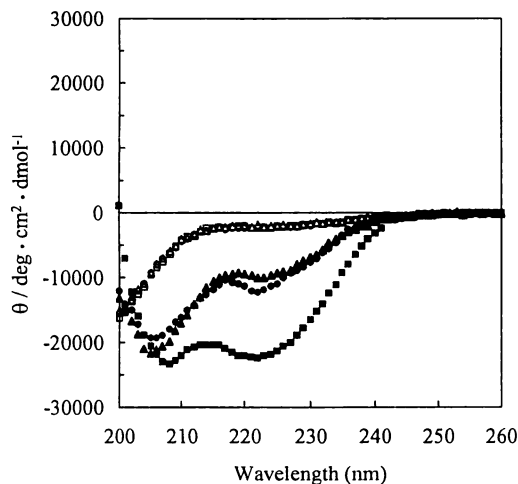


Fig. 3. Circular dichroism spectra of Pep3 (circles), Pep4 (triangles), and an equimolar binary Pep3/Pep4 mixture (squares) in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of  $\text{NiCl}_2$ . The measurements were performed in 10 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.0) at 20 °C. The polypeptide concentrations were 40  $\mu\text{M}$ .

造の形成を示す CD シグナルが観測された。また、Pep2 においても  $\text{Ni}^{2+}$  イオンの存在の有無による random/coiled coil 構造転移が観測された。

Fig. 3 には Pep3, Pep4 単独系および Pep3/Pep4 (1:1 混合系) の CD スペクトルを示した。いずれの系においても  $\text{Ni}^{2+}$  イオンの存在の有無による random/coiled coil 構造転移が観測されたが特に Pep3/Pep4 系で顕著であった。この結果は  $\text{Ni}^{2+}$  イオンに対するポリペプチド中の His 残基による軸配位に加え、会合体形成時における Pep3 および Pep4 間の静電相互作用による安定化が寄与していることに起因するものと考えられる。

さらに、水溶液中におけるポリペプチドの会合数を見積もるためにゲルろ過クロマトグラフィーによる Pep3/Pep4 系の分画分析を行った。その結果、Fig. 4 に示したように  $\text{Ni}^{2+}$  イオン存在下においてのみポリペプチド六量体に相当する分画 (Pep1 単位にすると三量体に相当する分画) に観測された。また、ポリペプチド六量体に相当する分画を分取して高速液体クロマトグラフィーにより成分分析を行った結果、Pep3/Pep4=1/1 の比であることが示された (Fig. 5)。以上の結果から  $(\text{Pep3})_3\text{-Ni}^{2+}\text{-(Pep4)}_3$  型ブロック状 coiled coil 構造の形成が示唆された。

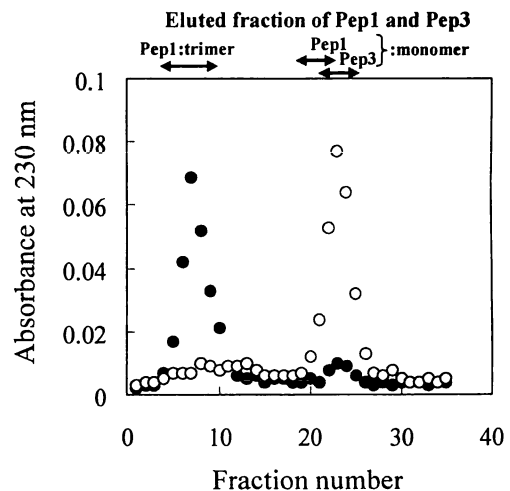
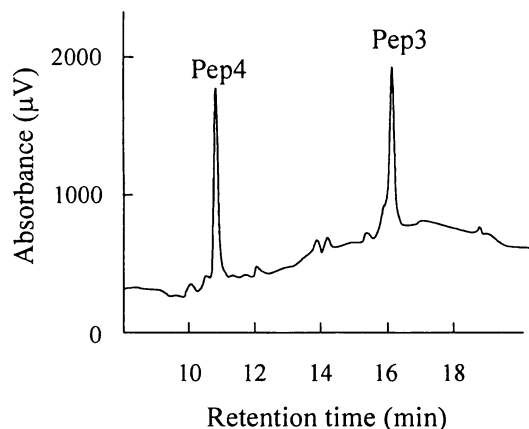


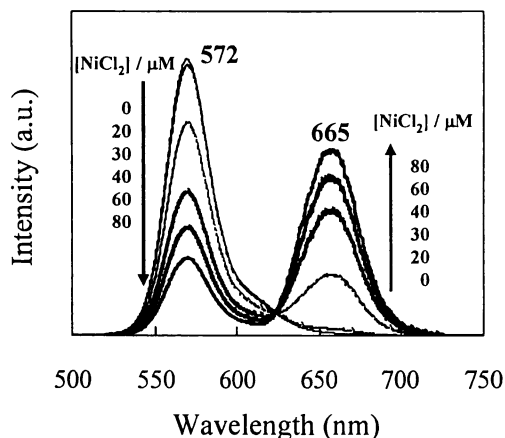
Fig. 4. Gel filtration chromatography profile of a mixture of Pep3 (20  $\mu\text{M}$ ) and Pep4 (20  $\mu\text{M}$ ) in the absence (open circles) and presence (closed circles) of  $\text{NiCl}_2$ . The arrows indicate the eluted position of the standards, Pep1 in 10 mM Tris-HCl buffer (trimer) and Pep1 in 6 M guanidine hydrochloride solution (monomer).



**Fig. 5.** HPLC profile of the major peak sample in elution of gel filtration chromatography with linear gradient of 40-55% CH<sub>3</sub>CN containing 0.1% (v/v) TFA for 30 min.

また、種々の金属イオンに対する Pep3/Pep4 系の会合体形成挙動についての検討も行った。ポリペプチド濃度一定(20 μM)のもと、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>および Zn<sup>2+</sup>濃度変化に伴う CD スペクトル変化を追跡することで会合体形成に対するアフィニティーとしての指標である結合(会合)定数を求めた。その結果、Ni<sup>2+</sup>イオンにおいて K<sub>d</sub>=29.0 μM と最も高い会合体形成能を示した。また、Co<sup>2+</sup>イオンにおいても会合体は形成したものの K<sub>d</sub>=302 μM と Ni<sup>2+</sup>イオンに比べて低いアフィニティーであった。一方、Cu<sup>2+</sup>および Zn<sup>2+</sup>イオン存在下では金属イオンの濃度変化に伴う CD スペクトル変化は観測されず、(Pep3)<sub>3</sub>-M<sup>2+</sup>-(Pep4)<sub>3</sub>型ブロック状 coiled coil 構造の形成が行われなかったことが示された。以上の結果は Pep3 および Pep4 中の His 残基による金属イオンへの軸配位だけでなく、正八面体型六配位による配位様式が会合体形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

さらに本研究では金属イオンセンシングの観点から、Pep5 および Pep6 に導入した蛍光ドナー-アクセプター間の FRET を用いることによる金属イオンに対するポリペプチドの構造変化の可視化について検討を行った。Pep5/Pep6 混合系においてエネルギードナー分子である Cy3B 励起による蛍光スペクトル測定の結果、金属イオン不在下では Cy3B 由来の 572 nm 付近に発光が観測されたが Ni<sup>2+</sup>イオン存在下ではアクセプター分子である Cy5Q 由来の 665 nm 付近に発光

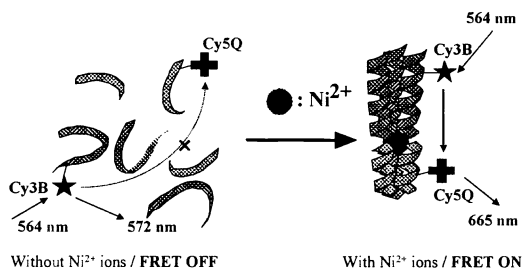


**Fig. 6.** Fluorescence emission spectra of the equimolar binary Pep5/Pep6 mixture in the absence and presence of Ni<sup>2+</sup> ions with the excitation wavelength at 564 nm. The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.0) at 20 °C. The polypeptide concentrations were 40 μM.

が観測された(Fig. 6)。なお、Ni<sup>2+</sup>イオン濃度 80 μM におけるエネルギー移動効率は 72%であった(Table 1)。高濃度(1000 μM)の Co<sup>2+</sup>イオン存在下においても同様の FRET 挙動は観測されたがそのエネルギー移動効率は低かった。一方、CD スペクトル測定において顕著な構造変化が観測されなかった Cu<sup>2+</sup>および Zn<sup>2+</sup>イオン存在下においては FRET が認められなかった。これらの結果から Ni<sup>2+</sup>イオン存在下においては安定なブロック状 coiled coil 構造が形成するため、Pep5 および Pep6 それぞれに配した Cy3B-Cy5Q 間距離が Förster 半径内に近づいたことに起因して FRET が観測されると考えられた(Fig. 7)。以上の結果は Ni<sup>2+</sup>イオンの存在に伴うポリペプチド(Pep5 および Pep6)の構造変化を蛍光センシング(FRET)に置き換えることができたことを示し

**Table 1** Energy transfer efficiency of the equimolar binary Pep5/Pep6 mixture

Metal ion	Structure of polypeptide	Energy transfer efficiency (%)
Ni <sup>2+</sup> (80 μM)	Coiled coil	72
Ni <sup>2+</sup> (40 μM)	Coiled coil	48
Ni <sup>2+</sup> (20 μM)	Random coil	4
Co <sup>2+</sup> (1000 μM)	Mixture	49
Cu <sup>2+</sup> (1000 μM)	Random coil	0
Zn <sup>2+</sup> (1000 μM)	Random coil	0
none	Random coil	0

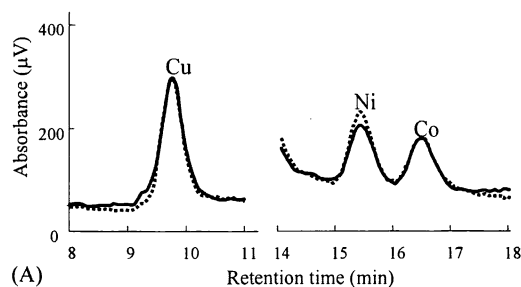


**Fig. 7** Schematic illustration of the  $\text{Ni}^{2+}$  ion-induced structural change of the Pep5/Pep6 mixture accompanied by FRET.

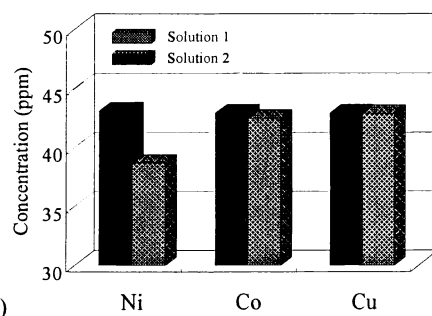
ており、センシング材への応用に関して意義深いものと考えられる。

しかしながら、上記の検討は単一の金属イオン存在下におけるものであるがセンシングの観点から考えると、複数種の金属イオン共存下における選択性が重要となる。そこで、 $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下における Pep5 および Pep6 の構造変化と FRET 現象について検討を行った。Pep5/Pep6 (1:1 混合系) の CD スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した結果、 $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  イオン共存下(各  $80 \mu\text{M}$ )においても random/coiled coil 構造転移に伴う FRET 現象が観測された。なお、観測された FRET 効率は 74% であり、 $\text{Ni}^{2+}$  イオン単独存在下で観測された効率とほぼ等しかった。

さらに形成したブロック状 coiled coil 構造中に捕捉された(センシングされた)金属イオン組成を高速液体クロマトグラフィーおよび原子吸光測定により分析した。分析試料は Pep5 および Pep6(各  $20 \mu\text{M}$ )存在下、 $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  イオン(各  $80 \mu\text{M}$ )を混合させた後、限外ろ過にて複合体を除いた残液を用いた(Solution 1)。なお、Pep5 および Pep6 不在下での金属イオン混合液をコントロール(Solution 2)とした。Fig. 8 には分析結果を示した。高速液体クロマトグラフィーおよび原子吸光測定いずれの分析結果においても Solution 2 に対して Solution 1 中における各金属イオン濃度を比較すると他の金属イオンに比べて  $\text{Ni}^{2+}$  イオン濃度の低下は顕著であった。この事実は Pep5 および Pep6 が  $\text{Ni}^{2+}$  イオンを優先的に捕捉していることを示している。また、HPLC による分析の結果と合わせると、本実験において捕捉された金属イオンに占める  $\text{Ni}^{2+}$  イ



(A)



(B)

**Fig. 8** (A) HPLC profiles of Solution 1 (solid line) and Solution 2 (dotted line) containing  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  ions  $80 \mu\text{M}$  each. (B) Results of atomic absorption analyses of metal furnace atomic absorption spectrometry.

オンの割合は約 90% であり、 $\text{Ni}^{2+}$  イオン選択的センシングが実現できたといえる。

#### 4. 結論

新規に設計・合成した短鎖ポリペプチドを用いた  $\text{Ni}^{2+}$  イオン誘導型ブロック状 coiled coil 構造の構築に成功した。また、random/coiled coil 構造転移の可視化を目的とした  $\text{Ni}^{2+}$  イオン選択的 FRET 系が実現できた。観測される FRET 現象は  $\text{Ni}^{2+}$  イオンの有無で鋭敏であり、新規なセンシング系として期待できる。センシング濃度が 10 ppm 程度と比較的高い点についてはアミノ酸配列の改変などで改善できるものと考えられる。また、希少性の高い、あるいは有害なイオンを標的としたセンシングシステムの構築についても検討を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

- 1) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, T. Tanaka, *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055 (1998)
- 2) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda, H. Nakamura, T. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13008-13015 (1998)