

de novo 設計ポリペプチドを用いた 金属イオン応答性ブロック型 coiled coil の構築

日大生産工 ○柏田 歩・松田 清美

1 緒言

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。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 実験方法

・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 cm³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。

・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 結果と考察

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って水溶液中で三本鎖coiled coil構造を形成するモデルである。¹⁾ 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coiled coil構造が誘起されるモデルである。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(Pep3)₃-M²⁺- (Pep4)₃型ブロック状 coiled coil構造を形成すると考えられる。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。

	efg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg					
Pep 1	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	IAAIEKK	IAAIEEK	GGY			
Pep 2	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIEEK	HAAIEKK	IAAIEEK	GGY			
Pep 3	YGG	EEK	IAAIEKK	IAAIE						
Pep 4					K	HAAIEKK	IAAIEEK	GGY		
Pep 5	YGG	ECK	IAAIEKK	IAAIE						
Pep 6		Cy3B				K	HAAIEKK	IAAIECK	GGY	Cy5Q

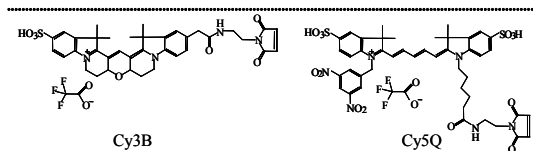


Fig. 1 Amino acid sequences of the metal induced polypeptides used in this study.

Construction of the Metal Ion Induced Block Type Coiled Coil
by the Use of *de novo* Designed Polypeptides

Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

CD スペクトル測定の結果, Pep1 は設計通り coiled coil 構造の形成を示す CD シグナルが観測された。また, Pep2 においても 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。また, Pep3/Pep4 (1:1 混合系) の CD スペクトルにおいても Ni^{2+} イオンの存在の有無による構造転移が観測された (Fig. 2)。この結果は 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ところポリペプチド六量体に相当する分画に観測された。また, 分画の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。以上の結果から (Pep3)₃- Ni^{2+} -(Pep4)₃ 型ブロック状 coiled coil 構造の形成が示唆された。²⁾

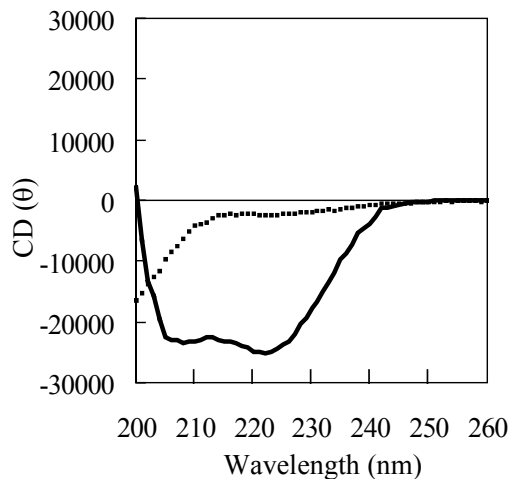


Fig. 2 CD spectra of the equimolar binary Pep5/Pep6 mixture in the absence (dotted line) and presence (solid line) of NiCl_2 (80 μM).

また, 種々の金属イオンに対する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^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} および Zn^{2+} 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^{2+} イオンにおいて $K_d=33.0 \mu\text{M}$ と最も高い会合体形成能を示した。また, Co^{2+} イオンにおいても会合体は形成したものの $K_d=313 \mu\text{M}$ と Ni^{2+} イオンに比べて低いアフィニティーであった。一方, Cu^{2+} および Zn^{2+} 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)₃- M^{2+} -(Pep4)₃ 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^{2+} 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 付近に発光が観測された (Fig. 3)。この結果は Ni^{2+} イオン存在下においてブロック状 coiled coil 構造が形成した際に 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すると考えられた。³⁾

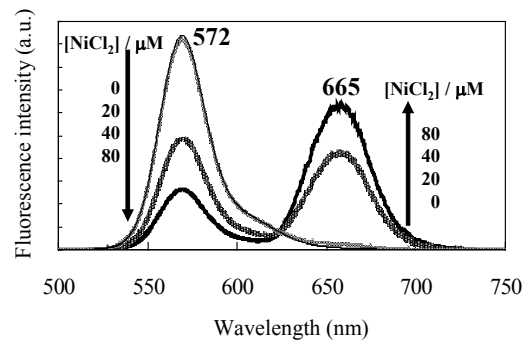


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of the equimolar binary Pep5/Pep6 mixture in the absence and presence of NiCl_2 with the excitation wavelength at 564 nm.

4 今後の展望と計画

本研究では Ni^{2+} イオンに応答してブロック状 coiled coil 構造を形成するポリペプチドアセンブル系の構築に成功した。さらに, アセンブル系に FRET 機能を付与することで水溶液中における Ni^{2+} イオンセンシングへの展開についても言及することができた。現時点においては対象とする金属イオン濃度がやや高いため, 今後の検討においてアミノ酸残基の改変等の工夫が必要となる。さらに, 遷移金属だけでなく希土類イオンなどのセンシングを目指した新規な系の構築を目指す。

5 参考文献

- 1) K. Suzuki, H. Hiroaki, D. Kohda and T. Tanaka, *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055 (1998).
- 2) A. Kashiwada, Y. Nakamura, and K. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005)
- 3) A. Kashiwada, Y. Nakamura, and K. Matsuda, *Sens. Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005)