

## 1. 緒言

化学センサーは特定の分子に応答してシグナルを発する超分子系であり、盛んに研究が行なわれている。また、金属イオンを標的にしたセンサー構築に関しても興味を持たれている。一方、生体内では金属応答性タンパク質が種々の機能発現に重要な役割を果たしている。この機能発現においては金属イオンによるタンパク質の構造変化が駆動力となっている。いわば、金属応答性タンパク質は水系で特定の金属イオン種を選択的に認識する高精度・高感度なセンサーである。しかしながら、タンパク質を模した水溶性ポリペプチドをプローブとしたセンシングシステムの構築例はほとんどない。タンパク質による高精度・高感度な金属イオンセンシング系を人工的に構築することが可能になれば、タンパク質の構造と機能の関係について知見を得られるだけでなく、“Green Sustainable”な材料による高選択的分離分析システムの構築に大きく貢献できるものと考えられる。

これまで *de novo* 設計により、水系で安定な三本鎖 coiled coil 構造を形成するポリペプチドおよび遷移金属イオンや重金属イオンに反応して三本鎖 coiled coil 構造を形成するポリペプチドの設計が行われてきた<sup>1-4)</sup>。さらに、本プロジェクトにおける 17 年度の成果として、Ni<sup>2+</sup>イオン極めて選択性高く応答する短鎖ポリペプチドによる coiled coil 新規アセンブル系の構築、ならびに coiled coil 構造形成時におけるポリペプチド鎖上の蛍光ドナー-アクセプター分子間による蛍光エネルギー移動(FRET)現象を利用した Ni<sup>2+</sup>イオンセンシングシステムの構築について報告した<sup>5-7)</sup>。

本発表では 18 年度の成果として、新たに設計したポリペプチドの構造変化を利用した希土類金属イオン選択的センシング系の構築について報告する。また、希土類金属イオン配位場付近のアミノ酸残基改変によりπ-π\*励起可能な官能基を希土類金属イオン付近に固定し、希土類特有の f-f 遷移を利用した蛍光センシングについても検討したので併せて報告する。

## 2. 実験

### 2. 1 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。

### 2. 2 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。

### 2. 3 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

### 3. 1 ポリペプチドの設計

本研究で用いたポリペプチドのアミノ酸配列を Fig. 1 に示す。Pep1 は EE(K)KIAAI (efgabcd) の 7 アミノ酸残基の繰り返し配列によって構成されている。Pep1 において *a* および *d* 位置には Ile が配置されており、そのジッパー効果による安定な疎水性コア形成の結果、水溶液中で三本鎖 coiled coil 構造を形成するモデルである<sup>2,5)</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

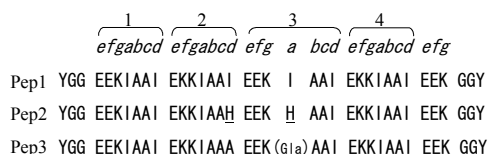


Fig. 1 Amino acid sequences of the metal ion sensing polypeptides used in this study.

## Construction of Lanthanide Ion-Selective Sensing System by the Use of *de novo* Designed Polypeptides

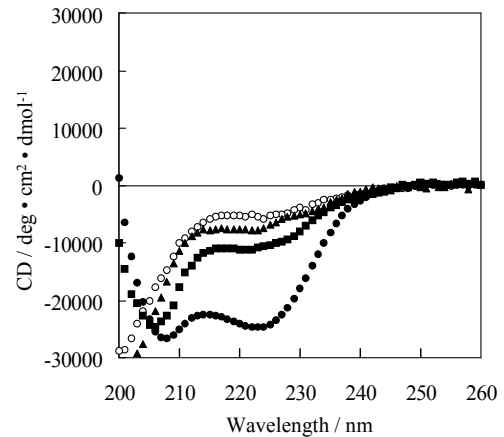
Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

モデルである<sup>3)</sup>。一方, Pep3は本研究の目的に応じて設計・合成した新規モデルポリペプチドで, Pep1の第2繰り返し単位*d*位置(2*d*位)および第3繰り返し単位*a*位置(3*a*位)のIleをそれぞれAlaおよびGla( $\gamma$ -carboxyglutamic acid)に置換したものである。3*a*位のGlaはこれまでの研究から希土類金属イオンに対して良好な配位子であることが報告されているため<sup>8,9)</sup>, 疎水部における認識部位として選択した。また, 2*d*位のAlaは認識された希土類金属イオン収容のための空孔として利用した。Pep3は希土類金属イオン不在下では親水的なGlaの側鎖および2*d*位のAlaが形成する空孔のため, 一方, 希土類金属イオン存在下ではGlaによる認識および空孔への収容が設計どおり行われ, 安定な三本鎖coiled coil構造が誘起されるものと考えられる。

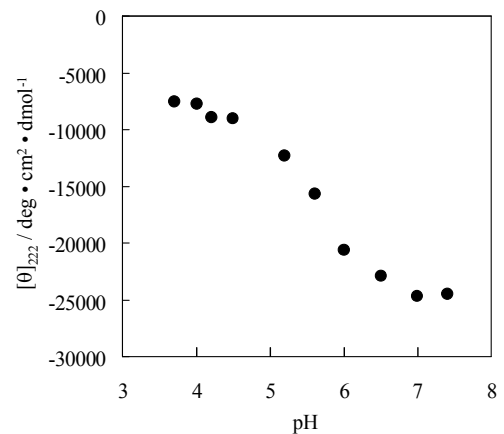
### 3.2 ポリペプチドの構造変化を指標とした希土類金属イオンセンシング系の設計

金属イオンに応答したポリペプチドの構造変化はCDスペクトル測定により検討した。これまでの検討から, Pep1のCDは208および222 nmに負の極大を有する典型的な $\alpha$ -helix構造のパターンを示し, 設計どおりの三本鎖coiled coil構造を形成することが確認された。一方, Pep2に関しては金属イオン不在下ではrandom構造によるCDパターンであったが, Ni<sup>2+</sup>イオン存在下においては $\alpha$ -helix構造特有のパターンを示した。これらの結果はPep2が設計どおりNi<sup>2+</sup>イオンの存在の有無によるrandom/coiled coil構造転移を起こしたことを示している。本研究で新規に設計・合成した希土類金属イオン応答性ポリペプチドPep3のCDスペクトルをFig. 2に示す。Pep3においても, 金属イオン不在下ではrandom構造であった。このことは, Pep1に対して, 2*d*位および3*a*位の改変が疎水性コアの不安定化をもたらしたことを示している。一方, 希土類金属イオンとしてEu<sup>3+</sup>イオン存在下におけるPep3は典型的な $\alpha$ -helix構造のパターンを示した。この構造変化はNi<sup>2+</sup>などの遷移金属イオンおよびCa<sup>2+</sup>イオン存在下では観測されなかったことから, 設計どおり3*a*位に配したGlaは希土類金属イオンに対して良好な配位子として機能していることが示唆された。

また, Pep3中のGlaによる希土類金属イオンへの配位挙動とcoiled coil構造形成との関係について調べるためにPep3のCDスペクトルのpH依存性を検討した。Fig. 3はEu<sup>3+</sup>イオン存在下でのPep3における $\alpha$ -helix構造形成の指標となる222 nmのCD値を種々のpHにおいてプロットしたものである。Fig. 3の結果はpHの低下



**Fig. 2** CD spectra of Pep3 in the absence (○) and presence of 80  $\mu$ M of metal ions (Eu<sup>3+</sup>(●), Ni<sup>2+</sup>(▲), Ca<sup>2+</sup>(■)). The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH7.0) at 20 °C. The polypeptide concentrations were 40  $\mu$ M.



**Fig. 3** pH dependence of the structure of Pep3 in the presence of Eu<sup>3+</sup> ions (80  $\mu$ M) monitored by CD spectroscopy. The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl at 20 °C. The polypeptide concentrations were 40  $\mu$ M.

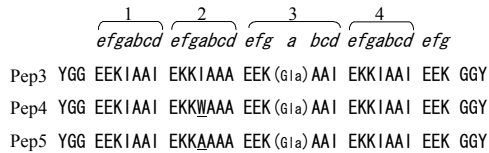
とともに $\alpha$ -helix性が低下することを示しており, カルボキシル基が解離したGlaが希土類金属イオンに対する配位子として機能していることを示唆している。

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の分画分析を行った。その結果, Eu<sup>3+</sup>イオン存在下においてのみポリペプチド三量体に相当する分画(Pep1の分画を基準とした)に観測された。

以上の結果から本研究で設計・合成したPep3は希土類金属イオン(Eu<sup>3+</sup>イオン)を選択的に認識して安定な三本鎖coiled coil構造を形成することが示された。

### 3.3 希土類金属イオンの蛍光センシングに向けたポリペプチドアセンブル系の構築

本実験系を希土類金属イオンセンシングへ展開する上で、希土類金属イオンの認識過程あるいはポリペプチドの構造変化を可視化することは必要不可欠である。そこで、われわれは三本鎖 coiled coil 構造の疎水場に收容された希土類の f-f 遷移を利用した蛍光センシングに着目した。そのために二種類のポリペプチド(Pep4 および Pep5)を新規に設計・合成した(Fig. 4)。

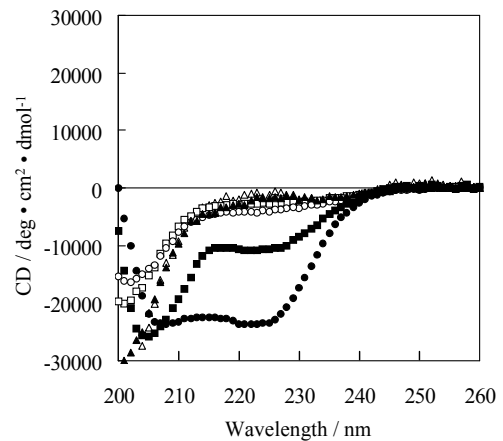


**Fig. 4** Amino acid sequences of the lanthanide ion-selective polypeptides for fluorescence sensing.

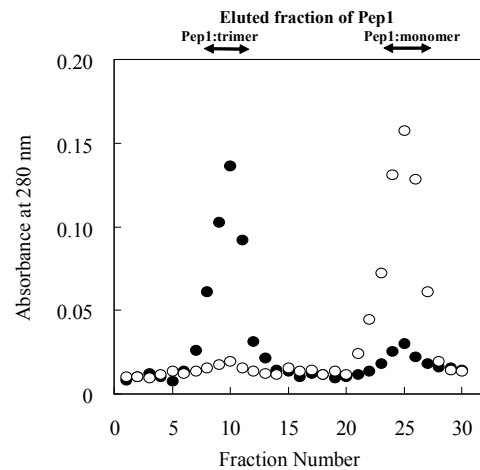
Pep4 および Pep5 は Pep3 をモチーフとしたポリペプチドであり、2a 位の Ile をそれぞれ Trp および Ala に置換したものである。この置換により、希土類金属イオン存在下で Pep4 : Pep5 = 1 : 2 の三本鎖 coiled coil ヘテロ構造を形成することが過去の研究から予測される<sup>10,11)</sup>。すなわち、三本鎖 coiled coil 構造形成時に 2a 位において Trp のインドール基が Ala の形成する空孔に適合することでヘテロ構造を選択的に形成するわけである。この三本鎖 coiled coil ヘテロ構造が形成されると、疎水場に收容された希土類の近傍に Trp のインドール基が位置することになる。そして Trp の  $\pi$ - $\pi^*$  励起 (Ex = 280 nm) により、禁制の希土類 f-f 遷移による発光を得ることができ、目的としたセンシングの可視化が実現可能となると考えられる。

はじめに希土類金属イオンに誘起されたポリペプチドの構造変化について調べるために CD スペクトル測定を行った。Fig. 5 には Pep4, Pep5, Pep4/Pep5(1:2 混合物)の CD スペクトルを示す。金属イオン不在下ではいずれの系も random 構造であった。一方、Eu<sup>3+</sup>イオン存在下では Pep4/Pep5(1:2 混合物)において  $\alpha$ -helix 構造のパターンが顕著に現れた。この結果は Eu<sup>3+</sup>イオン存在下において、設計どおり Pep4 : Pep5 = 1 : 2 の三本鎖 coiled coil ヘテロ構造が形成されたことを示唆している。

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分画分析を行った。その結果、Eu<sup>3+</sup>イオン存在下において Pep4/Pep5(1:2 混合物)はポリ



**Fig. 5** CD spectra of Pep4 (squares), Pep5 (triangles) and Pep4/Pep5 (1:2 mixture) (circles) in the absence (open symbols) and presence (closed symbols) of Eu<sup>3+</sup> ions (80  $\mu$ M). The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 20  $^{\circ}$ C. The polypeptide concentrations were 40  $\mu$ M.



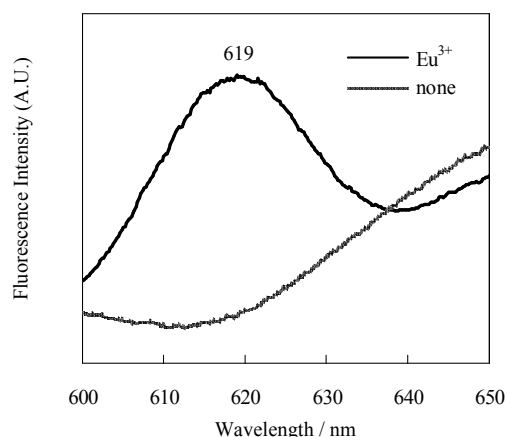
**Fig. 6** Analysis of the eluted fraction of Pep4/Pep5 (1:2 mixture) in the presence (●) or absence (○) of Eu<sup>3+</sup> ions using Sephadex G-50 column. The elution was performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 20  $^{\circ}$ C. The arrows indicate the eluted position of the standards, Pep1 in 10 mM Tris-HCl buffer (trimer) and Pep1 in 6 M guanidine hydrochloride solution (monomer).

ペプチド三量体に相当する分画(Pep1 の分画を基準とした)に観測された(Fig. 6)。

以上の結果から希土類金属イオンの蛍光センシングに有効と考えられる Pep4 : Pep5 = 1 : 2 の三本鎖 coiled coil ヘテロ構造が Eu<sup>3+</sup>イオン存在下で構築できることが示された。

### 3. 4 希土類金属イオンの蛍光センシング

前項で構築した Pep4/Pep5/Eu<sup>3+</sup>による三本鎖 coiled coil ヘテロ構造について蛍光スペクトル測定を行った。Fig. 7に Trp の $\pi$ - $\pi^*$ 励起(Ex = 280 nm)による Eu<sup>3+</sup>の f-f遷移領域の蛍光スペクトルを示す。その結果、619 nm 付近に赤色蛍光が観測された。この蛍光は Eu<sup>3+</sup>由来 f-f 遷移領域の発光帯特有のものであった。なお、Em = 619 nm における励起スペクトル測定の結果、280 nm 付近にピークが観測された。これらの結果は形成した三本鎖 coiled coil ヘテロ構造中の Trp から Eu<sup>3+</sup>イオンへのエネルギー移動が起こっていることを証明している。



**Fig. 7** Fluorescence emission spectra of Pep4/Pep5 (1:2 mixture) in the presence and absence of Eu<sup>3+</sup> ions (80  $\mu$ M) with the excitation wavelength at 280 nm. The measurements were performed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) at 4 °C. The polypeptide concentrations were 40  $\mu$ M.

なお、他の希土類金属イオン(Tb<sup>3+</sup>および Ce<sup>3+</sup>)存在下においても同様の蛍光測定を行った。Table 1に示すように Tb<sup>3+</sup>イオン存在下では 516 nm 付近に緑色蛍光が、Ce<sup>3+</sup>イオン存在下では 491 nm 付近に青緑色蛍光が観測された。

**Table 1** Results of Fluorescence Emission measurements of Eu<sup>3+</sup>, Tb<sup>3+</sup>, and Ce<sup>3+</sup> in the Presence of Pep4/Pep5 (1:2 mixture)

	Ex / nm	Em / nm		
Eu <sup>3+</sup>	280	619	→	Red
Tb <sup>3+</sup>	280	516	→	Green
Ce <sup>3+</sup>	280	491	→	Turquoise

以上の結果から新たに設計・合成したポリペプチドアセンブル系を用いることによって、水系における希土類金属イオンの蛍光センシ

ングの可能性が示唆された。

### 4 結言

本発表でわれわれは *de novo* 設計による coiled coil ポリペプチドを用いた希土類金属イオン選択的なアセンブル系構築の可能性について報告した。また、希土類金属イオンの配位場付近のアミノ酸残基改変による希土類特有の f-f 遷移を利用した蛍光センシングの可能性についても併せて報告した。センシングという観点から見れば、蛍光強度の定量性や蛍光量子収率、そして蛍光寿命についての議論が不足しており、今後の検討課題として挙げられる。また、反復利用に向け、ポリペプチドの基板や高分子への担持などについても検討する必要がある。これらの検討課題が克服されれば、EL 素子や MRI 造影剤、そしてガンの放射線療法において用いられる希土類金属を対象とした新規センシングシステムを提案できるものと考えられる。

### 5 参考文献

- 1) Harbury, P. B., Zhang, T., Kim P. S., Alber, T., *Science*, **262**, 1401-1407 (1993).
- 2) Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., Tanaka, T., *Protein Eng.*, **11**, 1051-1055 (1998).
- 3) Suzuki, K., Hiroaki, H., Kohda, D., Nakamura, H., Tanaka, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 13008-13015 (1998).
- 4) Li, X., Suzuki, K., Kanaori, K., Tajima, K., Kashiwada, A., Hiroaki, H., Kohda, D., Tanaka, T., *Protein Sci.*, **9**, 1327-1333 (2000).
- 5) Kashiwada, A., Nakamura, Y., Matsuda, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005).
- 6) Kashiwada, A., Nakamura, Y., Matsuda, K., *Sens. Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005).
- 7) 柏田 歩, 松田清美, 日本大学生産工学部ハイテク・リサーチ・センター平成 17 年度研究報告書, p25-28 (2006).
- 8) Sperling, R., Furie, B. C., Blumenstein, M., Keyt, B., Furie, B., *J. Biol. Chem.*, **253**, 3898-3906 (1978).
- 9) Kohn, W. D., Kay, C. M., Sykes, B. D., Hodges, R. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1124-1132 (1998).
- 10) Kashiwada, A., Hiroaki, H., Kohda, D., Nango, M., Tanaka, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 212-215 (2000).
- 11) Kiyokawa, T., Kanaori, K., Tajima, K., Tanaka, T., *Biopolymers*, **55**, 407-414 (2000).