

ポリペプチド超分子系の構築とセンシング材料への展開

日大生産工 ○柏田 歩 ・ 松田 清美

1. 当初の課題の意義、目的およびその概要

ポリペプチドによる二次構造や超二次構造のデザインは盛んに行われ、得られた形成理論や安定化などの成果は天然タンパク質に応用されている。そのなかで、coiled coil 構造は単純な構造に反して、天然のタンパク質の重要な機能を有しているため広く研究が進められている。coiled coil 構造が関与する種々の生体内反応のうち、膜融合反応はその代表例といえる。膜融合反応は生体内における神経伝達物質などの物質輸送やウイルス感染といった情報伝達において重要な役割を果たしており、融合タンパク質の刺激応答型(pH や金属イオンなどの存在による)コンホメーション変化をきっかけとした標的膜に対する認識を引き金に進行する。すなわち、モノマー状態である不活性型から coiled coil 構造である活性型へのポリペプチドの構造変化が生体機能を制御している。このような生体内における刺激応答型 coiled coil を基本にして、金属イオンなどの外部刺激に応答したポリペプチドのアセンブル系が可能となれば生体内におけるタンパク質の自己組織化機構のモデルとして解釈できるであろう。また、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と言える。しかしながら、刺激(金属イオン)応答性タンパク質を模して、水溶性ポリペプチドをプローブとしたセンシング系の構築例はほとんどない。このような人工ポリペプチドによるセンシング系の構築は天然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。

そこで、本プロジェクトでは、*de novo* 設計によるポリペプチドを用いた高精度・高感度な金属イオンセンシング系の構築を目的として、はじめに coiled coil ポリペプチドによる相補的認識および金属イオン選択的認識を目指した超分子系の構築に関して検討を行った。そして、この知見をもとに coiled coil ポリペプチドを用いた遷移金属イオンの蛍光センシング系ならびに希土類金属イオンの f-f 遷移発光に基づくセンシング系の構築に関する検討を行った。

2. 研究成果(当初の目的にどれだけ達したか、新たに得られた知見)

(1) coiled coil ポリペプチド超分子系の構築

① 相補的 coiled coil アセンブル系の構築

近年、ペプチド繊維やペプチドゲルなどの設計を目的とした合成ポリペプチドによる高次アセンブル系の構築が盛んに行われている。本研究ではバイオマテリアルという観点からだけでなく、機能性分子(ここではセンシング材)担持基材のビルディングブロック構築のために、二量化イソロイシンジッパー(IZ)ポリペプチドを用い、coiled coil 超分子を単分散的に二量化した。すなわち、N-末端に Cys を有する IZ ポリペプチドならびにペプチド鎖中央部に Cys を有する IZ ポリペプチド同士それぞれ、マレイミド基を有

Construction of Polypeptide Supramolecular Assembled Systems
and Application to Sensing Materials

Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA

設計どおりの coiled coil hetero block 構築に成功した。²⁾

本研究成果は、二つのドメイン間で機能の on, off 制御ができる新規人工タンパク質の創製のみならず、ポリペプチドのコンホメーション変化を利用した金属イオンセンシング系に大きく寄与できるものと考えられる。

(2) coiled coil hetero block を用いた遷移金属イオンセンシング系の開発

金属イオンセンシングにおいては特定の金属イオン種を選択的に検出するための定量的計測が必要とされる。そのためにはセンシング挙動の可視化が重要となる。そこで、本研究では上記の coiled coil hetero block 形成における、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 Fig. 2 の 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 の合成を行った。そして、Pep 5 および Pep 6 に導入した蛍光ドナー-アクセプター間の FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)現象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(Fig. 3)。すなわち、蛍光ドナーである Cy3B を励起することによるアクセプター-Cy5B の蛍光発光を観察することで FRET 効率を見積もる。その結果、Ni²⁺イオン存在下において高効率な FRET 挙動が観測された。これは coiled coil hetero block 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。^{3,4)}

本研究成果は、ポリペプチドのコンホメーション変化を利用した金属イオンセンシング系を蛍光センシングに移行することにより可視化できたことを示している。さらにセンシングにおける定量性や金属イオン選択性をより厳密に制御できるモデル構築が行うことができれば、ポリペプチドを有効な金属イオンセンシング材として供出できるものと考えられる。

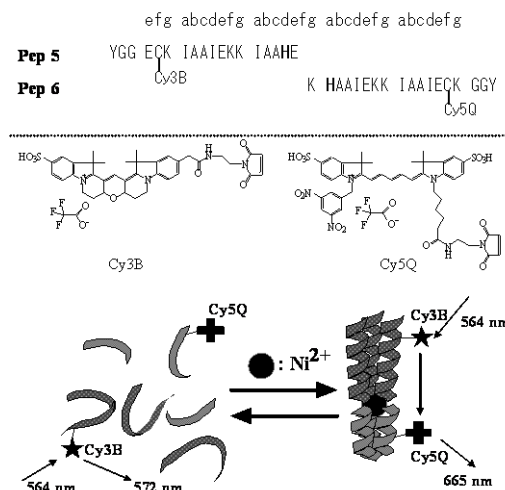


Fig. 3 Schematic illustration of Ni²⁺ ion induced coiled coil FRET system.

(3) Coiled Coil ポリペプチドを用いた希土類金属イオンセンシング系の構築

(2)では、Ni²⁺イオンなどの遷移金属イオンに応答した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 FRET 現象を利用した遷移金属センシング系の構築について記したが、本研究では希少性が高く、かつ EL 素子や造影剤などの用途において重要な役割を果たしている希土類金属イオンの coiled coil ポリペプチドによる選択的センシングについて検討した。本研究で用いた coiled coil ポリペプチドは希土類金属イオン結合部位としてγ-カルボキシグルタミン酸(Gla)残基を有しており、希土類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。また、希土類金属イオン結合部位近傍に Trp 残基を配し、π-π*励起による希土類特有の f-f 遷移を利用した発光センシングを目指したモデル設計を行った。

希土類金属イオン存在下におけるポリペプチドの構造変化は CD スペクトル測定から判断した。その結果、Eu³⁺などの希土類金属イオンに選択的応答を示す新規ポリペプチドアSEMBル系の構築に成功した。また、Trp のπ-π*励起による Eu³⁺の f-f 遷移領域の発光が観測された。これらの結果は形成 coiled coil 構造中の Trp から Eu³⁺

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おり、希土類金属イオンの蛍光センシングの可能性が示された。⁵⁾

本研究成果は、coiled coil 構造が形成する疎水コアに希土類金属イオンを配位させ、f-f 遷移由来の発光をもとにセンシングを実践できたことから希少な金属イオンに対する高感度センシングに有効であると考えられる。

3. 問題点および今後の展開

本研究課題を通して、*de novo* 設計による coiled coil ポリペプチドのセンシング材への利用可能性について示した。遷移金属に応答する coiled coil hetero block に関しては、学術的には新奇なモデルである。しかしながら、実用性に関しては対象となる遷移金属イオンの選択性が必ずしも高いとは言えず、配位場付近のアミノ酸残基改変によるモデル変更が今後の課題となる。また、水系での金属イオン回収まで考慮すると、2(1)①で提案した担体との複合化なども課題となる。また、より希少性の高い希土類金属検出を目的とした f-f 遷移利用センシングの可能性についても、18 年度以降検討したが、希土類金属イオンの発光がブロードであるため、蛍光強度の定量性や蛍光量子収率などが問題となる。検討課題として希土類金属イオンの配位場のさらなる改良をコンセプトにした新規ポリペプチド設計が挙げられ、現在進行中である。これらの検討課題が克服できれば、EL 素子や MRI 造影剤、そしてガン放射線療法において有効な希土類金属イオンを対象とした新規センシング系が確立できるものと考えられる。

4. 社会および学協会等への貢献度

本研究では種々の「金属イオンの存在により構造変化をおこすポリペプチド会合体設計」に成功した。特にペプチド工学分野における興味対象としてだけでなく、「金属イオンセンシング材としてのポリペプチド設計」と置き換えるこ

とで金属応答性の可視化の手法についても開発することができた。これらの成果は種々の目的に応じた、新規金属イオンセンシング系へ展開できるものと考えられる。本研究課題の成果は国内外学会で発表が行われ、中でも希土類金属イオンの蛍光センシングに関する発表は第 42 回ペプチド討論会ポスター賞を受賞した。さらに研究成果は国内外英文雑誌にも掲載された。特に 2(1)①における成果は日本化学会欧文誌 BCSJ 賞として表彰されるとともに、日本化学会の刊行物「化学と工業 2007 年 8 月号」にその旨掲載された。

5. 参考文献

- 1) A. Kashiwada, A. Sakakibara, Y. Nakamura, K. Matsuda: Monodispersed Dimerization of Isoleucine Zipper Coiled Coil Trimer, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 1296-1301 (2007).
- 2) A. Kashiwada, Y. Nakamura, K. Matsuda: Metal Ion-induced Hetero-Block α -Helical Coiled Coil, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1291-1295 (2005).
- 3) A. Kashiwada, Y. Nakamura, K. Matsuda: Fluorescence Resonance Energy Transfer by α -Helical Coiled Coil Polypeptides in Response to Metal Ions, *Sens. and Actuat. B.*, **108**, 845-850 (2005).
- 4) A. Kashiwada, K. Ishida, Y. Nakamura, K. Matsuda: Development of the Novel Metal Ion Sensing System by the Use of *de novo* Designed Polypeptides, *Pept. Sci. 2005 : T. Wakamiya (Ed.)*, 429-432 (2006).
- 5) A. Kashiwada, K. Ishida, Y. Nakamura, K. Matsuda: Lanthanide Ion-Induced Folding of *de novo* Designed Coiled Coil Polypeptides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, in press (2007).