

α -helical coiled coil 形成ポリペプチドに基づく新規機能性高分子の設計および合成

日大生産工 (院) ○大田 正人
日大生産工 (専任教員) 柏田 歩 松田 清美

1. 緒言

多くの天然タンパク質は、自己組織的に数十から数百 nm 領域の超分子構造を形成することにより、様々な機能を発現している。すなわち、酵素にみられる高活性・高選択的な触媒作用、また、繊維状タンパク質中に見られる規則的な構造は、タンパク質の自己組織化によって生み出されている。しかし、天然のタンパク質は、複雑な立体構造を形成することから、人工的な合成は非常に困難である。一方、ペプチド工学的見地からは、*de novo* 設計と呼ばれる人工設計により、種々の自己組織化モチーフの設計・合成が試みられている。その中で、タンパク質中に存在する代表的なモチーフの1つであり、2本以上の α -helix鎖が寄り集まって形成する α -helical coiled coil(以下コイルドコイルと表記)構造は、単純な構造ながら天然の転写因子中に見出され、遺伝子発現調節に寄与するなど、生体内で重要な役割を果たしていることから、*de novo* 設計の対象とされている。コイルドコイル構造の形成には、疎水性相互作用による疎水性コアの形成と静電相互作用による構造の安定化が寄与している。さらに、疎水性コアを形成する疎水性アミノ酸を置換することにより、2量体や3量体など会合数が異なるコイルドコイルを形成することが知られている¹⁾。また、イミダゾイル基を有するヒスチジンをを用いることで、pHや金属イオンなどの外部刺激に応答するコイルドコイル形成ポリペプチドの構築も可能である。

一方、機能性高分子材料への展開を目的としてFletcherらはヒスチジンをを用いたpH応答性コイルドコイル形成ポリペプチドを用いたヒドロゲルの研究について報告している。このような

機能性高分子は、天然高分子の生体に対する親和性には劣るが、ウイルス感染などを考慮する必要がないとともに構造制御性などにおいて再現性が期待できる²⁾。

本研究では、合成高分子を幹ポリマーとし、コイルドコイル形成ポリペプチドをゲルの架橋点として用いることにより、pHや金属イオンなどの外部刺激に応答する新規機能性ゲルの合成を目的とし、架橋剤としてのコイルドコイル形成ポリペプチドの設計・合成を行う。

2. 実験

2-1 ポリペプチドの合成

本研究において使用したポリペプチドはFmoc-Gly Wang resinを用いたFmoc固相合成法により合成した。なお、固相合成法では、HBTU、HOBt活性化法を利用し、目的のアミノ酸をC末端からN末端までをWang resin上に伸長した。伸長後、トリフルオロ酢酸/水/トリイソプロピルシラン混合溶液を用いて脱樹脂を行った。得られた粗ポリペプチドは分画分子量1000のセルロースアセテート膜で透析処理することで精製した。

2-2 円偏光二色性(CD)スペクトル測定

精製したポリペプチドの水溶液中での構造確認をCDスペクトルで確認した。試料は0.1 M Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.0)を用い、ポリペプチド濃度が20 μ Mになるように調製した。なお、測定装置は、円二色性分散計J-820(JASCO)を使用した。

2-3 超遠心分析

CDスペクトル測定の際と同様に試料を調製し、28000, 30000, 32000 rpmで24 h、沈降平衡法により、会合状態の確認を行った。測定装置はXL-A(Beckman Coulter)を使用した。

Design and Synthesis of Novel Functional Polymer Based on
 α -Helical Coiled Coil Polypeptide

Masato OTA, Ayumi KASHIWADA and Kiyomi MATSUDA

3. 結果・考察

3-1 ポリペプチドの設計

$abcdefg$ $abcdefg$ $abcdefg$
 GG - KEKLA AI KEKLA AI KEKLA AI - GG
 $defgabc$ $defgabc$ $defgabc$
 GG - LEKEIAA LEKEIAA LEKEIAA - GG

Fig. 1 Amino acid sequences of designed polypeptides.

本研究で設計・合成したポリペプチドのアミノ酸配列を Fig. 1 に示す。de novo 設計によるロイシンジッパー形成ポリペプチドのアミノ酸配列を参考に、疎水性コア形成に重要な a・d 位にロイシンとイソロイシンをそれぞれ配置して、疎水性相互作用により 2 量体コイルドコイルを形成させる設計を行った。また、ヘリックス間における静電相互作用による安定化に寄与する e・g 位は、PE には酸性アミノ酸であるグルタミン酸(Glu)を、PK には塩基性アミノ酸であるリシン(Lys)を多く配置することで、静電相互作用により PE・PK 間で選択的に会合し、構造を安定させる設計とした。

3-2 CD スペクトルによる構造確認

本研究で設計した 2 種類のポリペプチド(PE および PK)は、水溶液中で 1 : 1 の組成で選択的な会合体を形成することが予想される。そこで、設計したポリペプチドの構造について評価した。PE および PK 単独存在下および PE と PK の 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 スペクトルを示す。

PE および PK 単独存在下では、200 nm 付近に負の極大を有する CD シグナルが観測され、ランダム構造であることがわかった。このことにより、PE、PK はそれぞれ単独で会合することはなく、水溶液中に溶解していることを示している。一方、PE と PK の 1 : 1 混合系においては、208 nm および 222 nm 付近に負の極大が観測された。この CD シグナルはヘリックス構造に特有なものであり、予想どおり PE と PK が 1 : 1 で会合した結果、コイルドコイル構造に基づくヘリックス構造を形成したことが示唆された。

3-3 超遠心分析による会合数の確認

ポリペプチドの会合状況(1 : 1 会合体の形成)について検討するために沈降平衡法による超遠心分析を行った(Table 1)。PE および PK 単独存在下ではそれぞれの分子量に相当する観測値が得られ、

ポリペプチド間での会合体の形成は認められなかった。一方、PE と PK の 1 : 1 混合系を超遠心分析により評価した結果においては、PE と PK の分子量の和に相当する観測値が得られたことから、1 : 1 混合系は選択的に 2 量体を形成していることが示唆された。

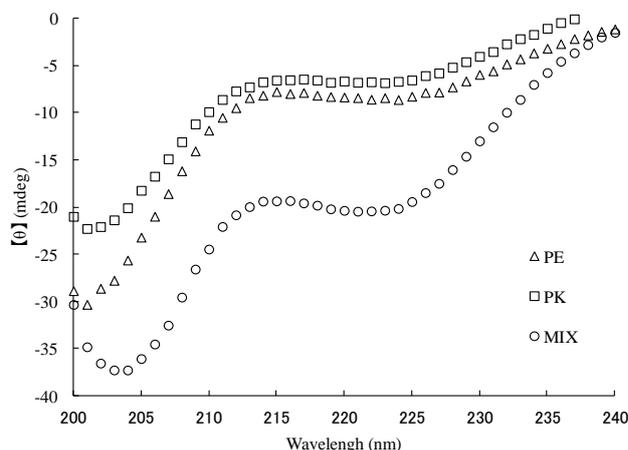


Fig. 2 CD spectra of the PE, PK and 1 : 1 mixture of PE and PK in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0).

Table 1 Results of ultracentrifugal analysis

	$M_{calc}(\text{Da})$	$M_{obs}(\text{Da})$
PE	2674	2608(\pm 642)
PK	2671	2831(\pm 1091)
PE + PK	5345	5548(\pm 891)

4. 結論・展望

CD スペクトル測定、超遠心分析の結果より、PE と PK は設計どおり 1 : 1 で混合することで 2 量体コイルドコイル構造を形成していることが示された。このことから、PE と PK はゲルの架橋点として有効であると考えられた。今後、PE と PK の N 末端に重合性モノマーを結合後、アクリルアミドなどとの共重合による高分子化、そして PE と PK 部位のコイルドコイル形成に基づくゲル化について検討する。

【参考文献】

- 1) Suzuki, K. ; Hiroaki, H. ; Kohda, D. ; Tanaka, T. *Protein. Eng.* **1998**, *11*, 1051-1055.
- 2) Fletcher, N. L. ; Lockett, C. V. ; Dexter, A. F. *Soft Matter* **2011**, *7*, 10210-10218.