

ホモおよびヘテロ型二量体コイルドコイルを架橋点とする新規ヒドロゲルの

合成とキャラクターゼーション

日大生産工(院) ○花倉 優 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

コイルドコイルは遺伝子発現調節機能を有するGCN4などのタンパク質中に見出される基本的な会合形態として知られている。コイルドコイルは2本以上のヘリックス鎖が自己組織化することにより形成しており、その一次構造は7残基反復によって特徴づけられる。この特徴から容易に人工的設計による再現が可能であり、種々のコイルドコイル形成ポリペプチドが合成されている。人工的設計によるコイルドコイルは7残基反復のうちaおよびd位に配置した疎水性アミノ酸を変化させることで会合数を制御できることが知られている¹⁾。また7残基反復のうちeおよびg位に電荷を有するアミノ酸を配置することにより、静電相互作用によるコイルドコイルの安定化制御が可能であることが示されている。このコイルドコイルの自己組織化能を利用することにより生体内におけるタンパク質の会合様式の解明のみならず新規な生体材料の創出も期待される。

Brandenburgらは酸性条件下でβ-シートリッチなアミロイド繊維を形成するVW19と安定な三量体コイルドコイルに自己組織化するVW10の2種類のポリペプチドを設計した。そして、酸性条件下でVW19とVW10を2:1の割合で混合すると均一な三量体コイルドコイル繊維に自己組織化することを報告している²⁾。

一方、ヒドロゲルの架橋点にコイルドコイルの自己組織化能を利用した研究が報告されている³⁾。ヒドロゲルは生体材料や薬物担体への応用も可能な材料であるため、コイルドコイルを架橋点に利用することは有意義であると考えられる。

本研究では、ホモおよびヘテロ型二量体コイルドコイル構造を形成するポリペプチドの設計・合成を行い、水溶液中での会合状況に関する評価を行った。さらに、コイルドコイル形成ポリペプチドを高分子側鎖に導入することによるヒドロゲルの形成についても検討した。

2 実験

2-1 ポリペプチドの合成

ポリペプチドはFmoc固相合成法により合成した。反応試薬であるHBTU, HOBt, DIEAを用いてFmoc-Gly Wang resin上に目的のアミノ酸を伸長した。伸長したポリペプチドはトリフルオロ酢酸 / 純水 / トリイソプロピルシラン混合溶液によって脱樹脂を行った。その後、分画分子量1000のセルロース膜を用いた透析処理により精製を行った。

2-2 円偏光二色性(CD)スペクトル測定

ポリペプチドの0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH7.0)中での構造をCDスペクトルにより確認した。ポリペプチドの濃度が20 μMになるように試料を調製した。測定装置は円二色性分散計J-820(JASCO)を使用した。測定は200~240 nmの波長範囲で行った。

2-3 超遠心分析

CDスペクトル測定を行った際と同様に試料を調製し、平衡沈降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。測定は28000, 30000, 32000 rpm それぞれの回転速度で24 時間行った。

3 結果と考察

3-1 ポリペプチドの設計

本研究では3種類ポリペプチド(HM, HT1, HT2)を設計した。いずれのポリペプチドもaおよびd位にロイシンを配置し、コイルドコイル構造形成時にロイシンジッパー効果により二量体コイルドコイルを形成するような設計である。HMにおいてはeおよびg位にはグルタミン酸とリシンを適切に配置することにより、静電相互作用により逆平行二量体コイルドコイルを形成するような設計である。また、HT1のeおよびg位にはグルタミン酸による負電荷を、一方、HT2にはリシンによる正電荷がリッ

Synthesis and characterization of novel hydrogels with homo- or hetero- dimeric coiled-coil cross-linker

Yu KEKURA and Ayumi KASHIWADA

チとなるように配置し、HT1とHT2が選択的に会合することでヘテロ二量体コイルドコイルを形成するような設計とした。なお、ヒドロゲルの架橋点としてこれらポリペプチドを高分子鎖中に導入するためにN末端にはアクリル酸を導入した。HM, HT1, HT2のアミノ酸配列をFig. 1に示す。

fg abcdefg abcdefg abcdefg abcdef
 HM AA-GG WKLEELKEK LEELKKE LKKLEKE LKKLEE GG

g abcdefg abcdefg abcdefg
 HT1 AA-GG ELAALKEK LQQLKEK LAALKEK GG
 HT2 AA-GG KLAALKEK LQQLKEK LAALKEK GG
AA: Acrylic acid

Fig. 1 Amino acid sequences of designed coiled-coil forming polypeptides.

3-2 CDスペクトル測定による二次構造の評価

水溶液中におけるポリペプチドの構造について調べるためにCDスペクトル測定を行った。その結果をFig. 2に示す。HM単独系とHT1およびHT2の 1:1 混合系では208 nm付近と222 nm付近に負の極大が観測された。このCDスペクトルにおけるシグナルパターンはヘリックス構造特有のものであるため、コイルドコイル形成を示唆するヘリックス構造の形成が示された。

3-3 水溶液中におけるポリペプチドの会合数の検討

沈降平衡法による超遠心分析により水溶液中におけるポリペプチドの会合数を検討した。Table 1に示すとおり、HMは分子量の2倍に相当する観測値が得られた。このことから二量体を形成していることが示された。また、HT1およびHT2の 1:1 混合系においてもHT1とHT2の分子量の和に相当する観測値が得られたことから二量体を形成していることが示された。

本研究の結果から、水溶液中においてHMは設計通り自己組織化しホモ二量体コイルドコイルを形成していることが確認できた。また、HT1とHT2は単独ではそれぞれ単量体で存在しているが 1:1 の比で混合すると選択的に自己組織化しヘテロ二量体コイルドコイルを形成していることが確認できた。以上、CDスペクトル測定による結果と超遠心分析の結果から設計どおりにホモおよびヘテロ二量体コイルドコイルが形成されたと示された。

さらに、それぞれのポリペプチドのN末端に導入したアクリル酸とアクリルアミド等と共重合させ、高分子側鎖にコイルドコイル形成ポ

リペプチドを導入した。そして、HMにより形成されるホモ二量体コイルドコイルおよびHT1とHT2からなるヘテロ二量体コイルドコイルを架橋点として形成するヒドロゲルについて評価を行ったのでポスター発表にて紹介する。

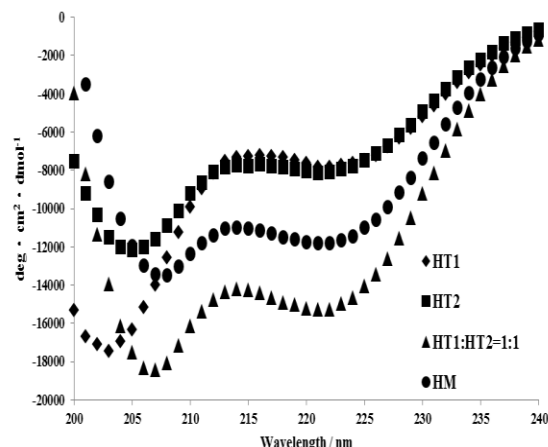


Fig. 2 CD spectra of HM, HT1, HT2 and a 1:1 mixture of HT1 and HT2 in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0) at 20 °C. The total concentration of polypeptides were 20 μ M.

Table 1 Results of ultracentrifugal analysis

Polypeptides	Mcalc(Da)	Mobs(Da)
HM	3788	7451 $\pm$ 951
HT1	2679	2471 $\pm$ 319
HT2	2673	2797 $\pm$ 476
HT1:HT2=1:1	5352	4852 $\pm$ 1806

[参考文献]

- 1) P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber. *Science* **1993**, 262, 1401-1407.
- 2) E. Brandenburg, H. V. Berlepsch, J. Leiterer, F. Emmerling, and B. Kokschi *Biomacromolecules* **2012**, 13, 3542-3551.
- 3) J. Yang, C. Xu, C. Wang, and J. Kopeček *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1187-1195.