

機能性人工タンパク質の
設計原理の解明

森 井 尚 之

①

機能性人工タンパク質の 設計原理の解明

Analysis on Principle and Design
of Functional Artificial Proteins

森井 尚之
Hisayuki Morii

第 1 章	緒論	1
第 2 章	基礎理論	10
第 3 章	実験装置と測定方法	20
第 4 章	実験結果と考察	30
第 5 章	結論	40
参考文献		45
索引		50
謝辞		55
略号		60
図目録		65
表目録		70
第 1 章	緒論	1
第 2 章	基礎理論	10
第 3 章	実験装置と測定方法	20
第 4 章	実験結果と考察	30
第 5 章	結論	40
参考文献		45
索引		50
謝辞		55
略号		60
図目録		65
表目録		70
第 1 章	緒論	1
第 2 章	基礎理論	10
第 3 章	実験装置と測定方法	20
第 4 章	実験結果と考察	30
第 5 章	結論	40
参考文献		45
索引		50
謝辞		55
略号		60
図目録		65
表目録		70

東京大学 学位(工学博士)論文 1998 年

[目次]

第1編	序論	
第1章	本研究の目的と意義	1
1.1	緒言	1
1.2	タンパク質の立体構造形成論	1
1.3	タンパク質のディノープ設計	4
1.4	人工タンパク質による機能発現	8
1.5	本研究の目的：タンパク質ワールドの拡張をめざして	10
第2編	人工タンパク質創出のための改良固相合成法	
第2章	カオトロピック溶媒の固相ペプチド合成法への適用	16
2.1	序論	16
2.2	実験：ペプチドの溶解性とカップリング反応性	17
2.3	結果と考察：溶媒系による伸長ペプチド鎖の溶解性改善	19
第3章	高溶解性のペプチド担持ビーズの開発	25
3.1	序論	25
3.2	実験：合成中間段階でのペプチド担持ビーズの組成分析	26
3.3.1	結果と考察：ジクロロメタン中における非凝集性	27
3.3.2	結果と考察：高親水性化ペプチド担持ビーズ	30
第3編	両親媒性ヘリックスタンパク質の二次立体構造形成	
第4章	超二次構造の形成	33
4.1	序論	33
4.2	両親媒性ヘリックスの設計	33
4.3	実験：合成および物理化学測定	35
4.4	結果と考察：ヘリックスバンドル構造の形成	37
第5章	両親媒性ヘリックスの予測法の開発と適用例	45
5.1	序論	45
5.2	両親媒性ヘリックスの予測	46
5.3	実験：キナーシンのネック領域の合成と解析	50
5.4	結果と考察：コイルドコイル構造の同定と機能上の意味	52
5.5	補遺1：AMPHISEARCH法のプログラム	62
5.6	補遺2：両親媒性傾向予測法の各種タンパク質への適用	64

第6章	両親媒性ヘリックス会合体の特殊な形成過程	69
6.1	序論	69
6.2	実験：合成、分子量分割、温度スキャン測定	70
6.3.1	結果と考察：モノマー、テトラマー、ミセル状態の同定	71
6.3.2	結果と考察：ミセル状態を経る唯一のテトラマー形成	74
第7章	2および4ヘリックス系における疎水性内部残基の役割	83
7.1	序論	83
7.2	実験：合成と測定	83
7.3	結果と考察：パッキングの重要性	87
第8章	内部にキャビティを有するヘリックス会合体	95
8.1	序論	95
8.2	実験：非天然アミノ酸含有DNA結合タンパク質の 合成と熱力学的解析	96
8.3	結果と考察：キャビティーの存在と役割	99
第4編	三次構造を制御した機能性人工タンパク質の基本設計	
第9章	ヘリックスバンドル形成による包接機能の発現	109
9.1	序論	109
9.2	実験：合成と蛍光プローブを用いるキャラクタリゼーション ..	110
9.3.1	結果と考察：柔軟なホスト分子としてのヘリックスバンドル ..	113
9.3.2	結果と考察：不斉性包接場の発現	116
第10章	ヘリックスバンドルの構造誘起機能	122
10.1	序論	122
10.2	実験：生理活性ペプチドとの複合体形成の解析	123
10.3	結果と考察：両親媒性部位の分子認識と構造誘起	125
第11章	ヘリックス間の配向制御のための分子設計	132
11.1	序論	132
11.2	実験：合成と蛍光エネルギー移動	133
11.3	結果と考察：疎水性パターンによる相補的配向と立体効果	136
第5編	新規機能を持つ人工タンパク質の合成	
第12章	金属イオン結合部を有する人工膜タンパク質	145
12.1	序論	145
12.2	実験：合成とリボソーム膜上での機能	146
12.3	結果と考察：リボソーム膜上の構造形成と金属イオンの結合 ..	149

第13章	ポルフィリン結合部位を持つ人工ヘムタンパク質	158
13.1	序論	158
13.2	実験：合成と結合実験	159
13.3	結果と考察：ヘム受容部位としての安定な ヘリックスバンドル構造	162
第14章	シクロデキストリンとヘリックスの複合超構造による分子認識	168
14.1	序論	168
14.2	実験：合成とゲスト分子認識	169
14.3	結果と考察：ダンシルアミノ酸の不斉認識と マルチサイト型複合体形成	173
第6編	総括	
第15章	本研究の総括	180
15.1	総括	180
発表論文リスト	183
化合物等の略称	186
謝辞	190

[本文中の図表リスト]

第1章

図 1.1	タンパク質構造の階層性.....	2
図 1.2	molten-globule 状態.....	3
図 1.3	アミノ酸配列と立体構造の関係.....	5
図 1.4	コイルドコイル構造およびヘリックスバンドル構造.....	6
図 1.5	機能性人工タンパク質の例.....	9
図 1.6	kinesin と elongation factor G の機能モジュールの類似性.....	10
図 1.7	タンパク質ワールドと本研究の流れ.....	11

第2章

図 2.1	固相合成法における問題点.....	16
図 2.2	評価対象のモデルペプチドのアミノ酸配列.....	17
表 2.1	合成ペプチドの分析結果.....	18
図 2.3	各ペプチドの高極性溶媒に対する溶解性.....	20
図 2.4	カップリング反応の進行曲線.....	21

第3章

図 3.1	設計合成したペプチド担持ビーズのリンカー部の構造と テスト用ペプチドの配列.....	26
図 3.2	各ペプチド担持ビーズ上での合成経過.....	28
図 3.3	異なるペプチド担持ビーズにより合成したテストペプチド粗生成物の HPLC.....	29
表 3.1	各ペプチド担持ビーズによる同一テストペプチド合成の収率および回収率.....	29
表 3.2	保護基の脱離前後における各ペプチド担持ビーズの種々の溶媒中での膨潤度.....	30

第4章

図 4.1	設計ペプチドの一次構造とヘリックス部分の helical-network 表示.....	34
表 4.1	合成ペプチドのアミノ酸分析結果.....	37
図 4.2	ペプチド粗生成物のイオン交換クロマトグラム.....	37
図 4.3	ペプチド PA の CD スペクトル.....	37
表 4.2	4種類の方法によるヘリックス含量の比較.....	39
図 4.4	ペプチド PA の非ヘリックス領域の換算 CD スペクトル.....	39
図 4.5	ペプチドのモル楕円率の温度依存性.....	40
図 4.6	222nm のモル楕円率の pH 依存性.....	40
図 4.7	グアニジン塩酸塩による変性曲線.....	41
図 4.8	変性過程の模式図.....	41
図 4.9	人工タンパク質 PA の推定構造.....	42

第5章

図 5.1	キナーシンのアミノ酸配列.....	46
-------	-------------------	----

図 5.2	キナーシンの微小管上での運動と ncd との構造比較	46
図 5.3	AMPHISEARCH の計算フロー図	47
表 5.1	モデルアミノ酸配列への AMPHISEARCH の適用	49
図 5.4	キナーシンの予想されるネック領域と合成したペプチドのアミノ酸配列	50
図 5.5	キナーシンの両親媒性ヘリックス性プロフィール	52
表 5.2	キナーシンの両親媒性ヘリックス性の高い領域	53
図 5.6	ネック領域の helical-network 表示	53
図 5.7	キナーシンの部分タンパク質の CD スペクトル	54
図 5.8	合成したペプチドの CD スペクトルおよび 222nm でのモル楕円率のペプチド濃度依存性	54
図 5.9	蛍光ラベルしたペプチドの蛍光スペクトル	56
図 5.10	CD スペクトルおよび蛍光スペクトルでモニターした尿素変性曲線	57
図 5.11	ペプチド III の熱転移曲線	58
図 5.12	キナーシンと ncd の各モータードメインの AMPHISEARCH による比較	58
図 5.13	モータードメインの遠紫外域 CD スペクトル	59
図 5.14	キナーシンと ncd の近紫外域 CD スペクトル	59
図 5.15	AMPHISEARCH 法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (I)	64
図 5.16	AMPHISEARCH 法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (II)	65
図 5.17	AMPHISEARCH 法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (III)	66
図 5.18	AMPHISEARCH 法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (IV)	67
図 5.19	AMPHISEARCH 法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (V)	68
第 6 章		
図 6.1	一般のペプチドの典型的な会合平衡	69
図 6.2	ovine CRF のアミノ酸配列	70
図 6.3	サイズ排除クロマトグラム	72
図 6.4	分子量分割した monomer と tetramer の CD スペクトル	73
図 6.5	CRF 溶液に添加した ANS の蛍光スペクトルと蛍光強度の CRF 濃度依存性	73
図 6.6	濃縮および希釈によるヘリックス含量の変化	75
図 6.7	温度スキャン CD 法による各種濃度試料溶液の熱転移挙動	75
図 6.8	tetramer およびミセルの推定含有率の濃度依存性	76
図 6.9	各種濃度の CRF 水溶液の DSC 曲線と 0.08mM における理論曲線との比較	77
図 6.10	monomer および tetramer 試料液の TFE 滴定によるヘリックス含量変化	78
図 6.11	ミセル状態会合から特定の安定 k 量体を与えるランダム解離モデル	79
図 6.12	CRF の 0.1mM 以上の濃度における 3 状態間の構造変換過程	81
第 7 章		
図 7.1	設計したヘリックスバンドルタンパク質のアミノ酸配列と ヘリックス性部分のネットワーク表示	84
図 7.2	タンパク質 DB の 14 位置換体の熱転移曲線	87
図 7.3	タンパク質 DB の 11 位および 14 位置換体の熱転移挙動の比較	88

図 7.4	各種置換体の熱転移温度と転移エンタルピー	88
図 7.5	タンパク質 DB の各置換体の DSC 曲線	89
図 7.6	0.02mM での CD 指定および 0.4mM での DSC 測定結果の比較	90
図 7.7	calorimetric enthalpy と van't Hoff enthalpy の比較	90
図 7.8	タンパク質 DB とその置換体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル	91
図 7.9	4ヘリックス型タンパク質 FB の熱転移挙動	92
図 7.10	ヘリックスバンドル構造の多形性	92
図 7.11	タンパク質 FB の尿素変性曲線	93
第 8 章		
図 8.1	Myb タンパク質の R2 ドメインの溶液中での立体構造	95
図 8.2	Myb-R2 の一次構造と合成した 103 位置置換体のアミノ酸側鎖構造	97
図 8.3	103 位置置換体の CD スペクトル	99
図 8.4	Myb-R2 の蛍光スペクトル	100
図 8.5	CD と蛍光の特性値による各置換体のマッピング	100
図 8.6	円偏光二色性でモニターした熱転移曲線	102
図 8.7	CD による転移パラメータの pH 依存性	103
図 8.8	転移エンタルピーの転移温度依存性	103
図 8.9	Cys を含まない 130 位置置換体の DSC	104
図 8.10	各 103 位置置換体の補正した DSC 曲線	104
図 8.11	転移温度と転移エンタルピーの相関	105
図 8.12	転移エネルギーと転移温度の関係	105
図 8.13	転移のエントロピーとエンタルピー値における各置換体の特徴	105
図 8.14	103 位の側鎖体積およびキャビティ容積と熱転移エネルギーの関係	106
図 8.15	キャビティ周辺の空間的制約の模式図	107
第 9 章		
図 9.1	人工設計ペプチドのアミノ酸配列と包接機能の発現原理	110
図 9.2	回転楕円体近似における形態因子の数値計算結果	112
図 9.3	各種プローブの蛍光強度のペプチド濃度依存性	113
図 9.4	AODB - ペプチド系の Hill プロット	114
図 9.5	各種溶媒中およびペプチド共存時の ANS の蛍光極大波長	114
表 9.1	AODB - ペプチド複合体の蛍光減衰パラメーター	115
表 9.2	ANS - ペプチド複合体の蛍光減衰パラメーター	116
図 9.6	蛍光プローブの遷移双極子モーメント	117
図 9.7	蛍光偏光解消法による複合体サイズの推定	117
図 9.8	複合体サイズのイメージ比較	118
図 9.9	AODB - ペプチド系の誘起 CD	118
図 9.10	誘起 CD スペクトルのシミュレーション	118
図 9.11	包接された AODB ダイマーのねじれと包接複合体の推定構造	119

第10章

図 10.1	人工タンパク質 PA4w と生理活性ペプチドの一次構造	123
図 10.2	生理活性ペプチドの単独および PA4w との複合体の CD スペクトル	125
図 10.3	複合体 CD 強度の PA4w モル比依存性	125
図 10.4	生理活性ペプチドの Trp 残基の蛍光スペクトル	126
図 10.5	複合体の蛍光強度の PA4w モル比依存性	127
表 10.1	生理活性ペプチドと PA4w の複合体の蛍光寿命データ	127
表 10.2	PA4w との複合体の蛍光異方性減衰のデータ	128
図 10.6	蛍光偏光解消法によって得られた複合体の流体力学的サイズ	128
図 10.7	melittin-PA4w 複合体混合液の熱転移	129
図 10.8	melittin-PA4w 複合体の解離定数の温度依存性	129
図 10.9	ヘリックスバンドルによる生理活性ペプチドへの構造誘起現象の模式図	130

第11章

図 11.1	コイルドコイル構造のモデル図と断面投影図	132
図 11.2	基本配列 LZ0 の helical-network 表示	134
図 11.3	設計した各種コイルドコイル性ペプチドのアミノ酸配列	134
図 11.4	ペプチドの CD スペクトル	136
図 11.5	ペプチド LZ2 および LZ6 の DSC 曲線	137
図 11.6	LZ13 の吸収スペクトルと LZ15 の蛍光スペクトル	137
図 11.7	ドナーアクセプター系の混合溶液の蛍光スペクトル	138
図 11.8	蛍光エネルギー移動のモデル計算結果	139
図 11.9	ドナーアクセプター間の蛍光エネルギー移動	140
表 11.1	蛍光エネルギー移動の実測パラメータ	141
図 11.10	各コイルドコイルの優性なヘリックス間配向の模式図	142

第12章

図 12.1	膜貫通ヘリックスの特徴	146
表 12.1	膜貫通ヘリックスにおける極性残基の周期性	146
表 12.2	各アミノ酸の出現頻度	146
図 12.2	ヘリックス部分のアミノ酸配列	147
図 12.3	合成した人工膜タンパク質の一次構造	147
図 12.4	カルシウム結合ループのアミノ酸配列	147
図 12.5	合成ペプチドの hydropathy プロット	148
図 12.6	各種媒体中での CD スペクトル	150
図 12.7	リボソームおよびミセル系での Trp 残基の蛍光スペクトル	150
図 12.8	異なる方法で調製した CB30W/リボソーム系の消光 Stern-Volmer プロット	150
図 12.9	リボソーム上でのドナーアクセプター系の蛍光スペクトルと CB13W の相対蛍光強度のモル分率依存性	151
図 12.10	DMPC リボソームに担持した CB30W のヘリックス含量の熱転移曲線	152

図 12.11	CB13C の acridinyl 基の時間分解蛍光スペクトル	152
図 12.12	DMPC 膜中における蛍光性分子の円錐内揺動のゆらぎ角	153
図 12.13	ペプチド CB を担持したリボソーム系中の Tb^{3+} の蛍光スペクトル	153
図 12.14	CB30W の Trp 近傍の Tb^{3+} の蛍光強度	154
図 12.15	リボソーム上の CB30W に結合した Tb^{3+} の Ca^{2+} による交換	154
表 12.3	各種ペプチドタンパク質の Ca^{2+} 結合能の比較	154
図 12.16	リボソーム膜内外に異なるイオン種を置いた後の $DiOC_5(5)$ の蛍光の時間過程 ..	155
図 12.17	脂質二分子膜上に構成された人工タンパク質 CB の推定構造	155
第 13 章		
図 13.1	合成した人工ヘムタンパク質の一次構造と用いた protoporphyrin IX の構造 ..	159
図 13.2	各タンパク質のヘリックス部分の車輪表示	160
図 13.3	各タンパク質のヘリックス部分の helical-network 表示	160
図 13.4	MF4-ヘム系の滴定による吸収スペクトル変化	162
図 13.5	MF11-ヘム系の滴定による吸収スペクトル変化	162
図 13.6	Soret 帯の吸収強度のタンパク質濃度依存性	163
図 13.7	タンパク質 MF11 の CD スペクトル	164
図 13.8	人工ヘムタンパク質の Soret 帯周辺の CD スペクトル	164
図 13.9	MF4-ヘム系の還元による吸収スペクトル変化	165
図 13.10	分岐型ペプチド鎖を有するヘムタンパク質の吸収スペクトル	166
図 13.11	分岐型ヘムタンパク質 MF16 の推定構造	166
第 14 章		
図 14.1	両親媒性ヘリックスと β -シクロデキストリンの複合超分子のアミノ酸配列	169
図 14.2	HA2 および HB2 の予想機能構造	170
図 14.3	ペプチド-シクロデキストリン複合分子の合成スキーム	171
図 14.4	設計合成したゲスト分子	172
図 14.5	HA2 と HB2 の CD スペクトル	173
図 14.6	HA2 による ethyl orange の包接	173
図 14.7	Dansyl-Leu に対する複合体ペプチドの包接能	174
図 14.8	Dansyl-Phe に対する複合体ペプチドの包接能	174
図 14.9	Dansyl-Trp に対する DL 認識能	175
図 14.10	ペプチド-シクロデキストリン複合超分子の推定構造	177
図 14.11	ペプチド複合分子 HC3 と HC6 の 水溶液中および 50% TFE 中の CD スペクトル	177
図 14.12	各種ゲストペプチドに対する HC3 および HC6 の包接能	178
図 14.13	ゲスト分子の GU12 および GUW2A の ペプチド複合超分子存在下の蛍光スペクトルのピーク極大値	178

第1編

序論

第1章 本研究の目的と意義

1.1 緒言

「タンパク質工学」の概念が1980年代に提唱¹⁾されて十数年が経過した。当時、飛躍的に発展しつつあった組み替えDNA実験技術を中心とした遺伝子工学を背景に、タンパク質のアミノ酸配列を操作することによって、人工的なタンパク質の創出が多数試みられた²⁻⁵⁾。それらは、天然のアミノ酸配列の部位特異的な置換、欠失、挿入であったり、また、異なるタンパク質の一部をつなぎ合わせたキメラ体であった。これらは、基本的には天然タンパク質の高次構造形成を前提にしたもので、タンパク質の本質の理解には大いに貢献したものの、工学的な視点、特に機能の面から見ると、あるものは天然タンパク質の機能やその特性を変化向上させたが、改変体の大部分のものは機能が低下し、ある意味で失敗例であった。このことは、天然タンパク質、例えば酵素の機能が、自然の力によってほぼ最適化されていて改良の余地がないという見方もできるが、それだけではなく、微視的かつ全体的な高次構造の重要性を認識すべきであることを我々に教えている。

タンパク質は生命現象を支える最も主要な生体分子のひとつである。その重要性は機能の高度性、多様性と特異性にもとづいている⁶⁻¹⁰⁾。機能面で見ると、タンパク質の機能は物理的すなわち材料としての機能と化学的機能に分けられる。さらに後者は、触媒機能(酵素)、分子認識機能、分子情報機能、輸送機能、運動機能、など多岐にわたる。これらの機能はいずれもタンパク質の高次構造に基づいている。あるいはペプチドなどの単独では高次構造を形成しない場合でも、他分子との相互作用時には特定の高次構造を形成していると考えられている。また、酵素機能や運動機能などでは機能の微視的な段階に応じた構造変化が機能そのものの本質である。すなわち、タンパク質のほとんどの「機能」は単独および複合系における「高次構造形成=folding」に内包されていると理解することができる。

本研究における問題意識は、こうした理解に立って「高次構造をいかにして構築し、そこから機能を持った人工的なタンパク質をいかにして創造していくか」という点にある。

1.2 タンパク質の立体構造形成論

タンパク質の立体構造に関しては、多くの書物にまとめられている⁶⁻¹⁰⁾。ここでは本研究に特に関係の深い、いくつかの概念について記述することにする。

タンパク質を特徴づけている最も重要な性質は、「構造の階層性」である¹¹⁾。一次構造

(アミノ酸配列、disulfide結合、糖鎖やhemeなどの結合位置)からはじまって、二次構造、超二次構造、三次構造(二次構造単位の立体的な配置あるいは全原子座標)、四次構造(タンパク質複合体、オリゴマー)

四次構造	複数のタンパク質相互間の立体構造
三次構造	タンパク質全体の立体構造
超二次構造	二次構造単位を複数組み合わせた構造 (helix-bundle, β -sheet, β/α -barrel など)
二次構造	連続した主鎖の結合回転角を規定した構造 (α -helix, β -strand, turn など)
一次構造	アミノ酸配列

図 1.1 タンパク質構造の階層性

ンパク質、ウイルスタンパク質、膜タンパク質複合系、繊維状タンパク質のマイクロフィブリル構造)という階層性が存在する(図 1.1)。ここで注目したいのは、個々の階層の構造には、最小のおよび最適な「サイズ」が存在するということである。言い換えると、ある構造を実現するにはそれに応じたサイズが必要である、ということである。同様の階層性は「機能」についてもあてはまる。すなわち、例えば三次構造がないと実現しない酵素機能、四次構造がないと機能しない4量体ヘモグロビン⁹⁾など、機能のレベルは構造の階層性に基づいている。このことから「ある機能の実現には相応のサイズが必要である」と考えることができる。1993年に約30残基の環状ペプチドがトリプシンの酵素機能を完全に再現できたと報じられた¹²⁾が、複数の追試の結果はこの報告を否定するものであった^{13,14)}。すなわち「タンパク質の機能」の実現には、それにふさわしい「サイズ」と「構造」が不可欠であることが再認識された。

Anfinsenのドグマとして知られているように、タンパク質の立体構造は、アミノ酸配列と溶媒環境によって一義的に決定される¹⁵⁾。従って、構造形成すなわちfoldingの過程を理解することは人工タンパク質創出にとって、設計面においてもまた実験面においても重要である¹⁶⁾。foldingの研究には、速度論的なものと平衡論的なものがある。速度論的研究ではミリ秒から秒の時間スケールでfoldedからunfolded(あるいはその逆)の構造変化を追跡するもので、平衡論的研究では、一定速度の温度上昇あるいは変性剤濃度変化に対する構造変化を追跡する⁴⁾。個々のタンパク質分子について見ると、このfolding(あるいはunfolding)の過程は単純な系では基本的には二状態転移である。すなわちある中間的なタイミングでは、foldedとunfoldedの分子が共存している。こうした二状態転移は「構造形成の協同性」の結果である。別の表現をすれば、各残基の性質

が周囲の残基の環境として働いて周囲の構造を決め、そのもとで自身の構造が決まるということである。このことに関与する最も典型的な相互作用は、親水性と疎水性のそれぞれの相互作用であろう。水中においてはこれらは親水性の分子表面と、疎水性の分子内部という構造を形成する。このことは、球状タンパク質の最も顕著な特徴であり⁸⁾、本研究において主要な設計原理として使用される。

foldedとunfolded状態間の転移の実験から得られる情報は、(i)転移の協同性からタンパク質分子中で構造化されている部分の量、換言すればfoldingしている程度、(ii)平衡論的研究から、構造的熱力学的ドメインの数 (Kidokoro, Uedaira による理論的、実験的研究がある¹⁷⁻¹⁹⁾)、(iii)速度論的研究から、構造形成における過渡的な中間状態の存在¹⁶⁾、などである。

特に近年、タンパク質の転移現象の解析から明らかになった転移中間体としての molten-globule 構造 (図 1.2) の存在は種々の面でその重要性が注目されている^{16,20)}。molten-globule 構造の主な特徴は、(i)ストークス半径が native なタンパク質と同等かやや大きい程度でコンパクトである、(ii)二次構造は native なものと同程度に存在する、(iii)多くの側鎖は三次構造を失っている、などである。また性質としては疎水性側鎖が露出しやすいために粘着性(sticky)を示しやすい。molten-globule 構造は、低 pH または高 pH などの条件で安定に形成される場合と、refolding 実験の速度論的な解析で folding の中間体として見いだされた過渡の状態があるが、これらは上記のような共通の特徴を有している²¹⁾。

機能の面においても、生合成されたタンパク質の輸送や、colicin A に見られる膜挿入時の傘モデルへの移行²²⁾、chaperon との相互作用による folding²³⁾ など、ダイナミックな機能において molten-globule 構造の重要な関与が明らかにされている。人工タンパク質との関連では、初期の de novo 設計タンパク質は、シャープな熱転移を示さず、NMR

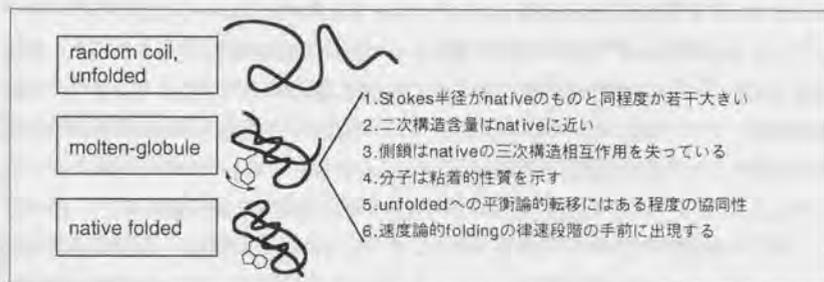


図 1.2 molten-globule 状態

スペクトルにおいても分離のよいピークを与えなかった。また、ANSなどの蛍光プローブを取り込むなどの性質を有し、一義的な native-like な構造ではなく、molten-globule 性を有した構造および多形構造であることが推測されていた^{3,24)}。天然タンパク質を模倣した機能の開発においては、native-like な構造を構築することが不可欠であると考えられることから、これらの molten-globule 性や多形性の問題点の解決は重要である。また、脂質二分子膜の膜透過性をはじめとする機能が、相転移温度以下では脂質分子層がゲル状態にあり、転移温度以上では液晶状態になることによって、大きく変化することとの類似性からも、タンパク質がどのような folding 状態にあるかを把握することは重要である。

生体系においては、タンパク質の folding はランダムコイル構造からの自発的 folding 過程だけではなく、むしろ多くの場合、リボソームで合成された後、輸送などを経て cpn60 等の chaperon や protein disulfide isomerase, peptidyl prolyl cis-trans isomerase などの作用によって folding が実現する^{3,25)}。このことは自発的 folding すなわち self-assembly のみによる folding には限界があるかもしれないことを示唆している。また換言すれば、タンパク質の立体構造の情報はそのアミノ酸配列にすべてが書き込まれているのではなく、chaperon などの folding 装置をはじめとする種々のプロセッシング過程の要因が関与していることを示している。

タンパク質の構造形成を高分子ゲルの視点からとらえた Tanaka らの研究^{26,27)}は、分子設計にとって示唆的である。高分子に複数の種類の相互作用を導入することで、そのゲルがタンパク質の native 構造に対応するひとつの相を形成することが実験的に示されている。単一の相互作用ではタンパク質らしさが発現しない点に注目すべきである。

1.3 タンパク質のディノボ設計

タンパク質のある特定の立体構造をもたらすアミノ酸配列は多数存在する。このことは同一タンパク質の生物種による変異からも容易に結論できる²⁸⁾。自然界の全タンパク質の立体構造が比較的少数の種類に限られている事も推測されている^{29,30)}。また、遺伝子工学的な変異の導入実験からも知られているように、あらゆる任意のアミノ酸配列のタンパク質が folding するわけではない。このことは純粋に理論的な立場からも推論されている。アミノ酸配列と立体構造の関係を模式的に示すと図 1.3 のようになる。人工タンパク質の設計は、この図式の中でいかにして目的の機能あるいは立体構造を有するタンパク質に対応するアミノ酸配列を見いだすか？という問題に帰着される。

一般に、人工タンパク質の創出には、構造や機能を予測して分子設計する「タンパク

質工学」的手法と、多数の変異体ライブラリーを作り、そこから目的の機能を有する物を選択する「進化分子工学」的手法^{31,32)}がある。化学の視点から見ると、前者は演繹的な設計、後者は「コンビナトリアルケミストリー」と呼ばれる選択手法とも概念的には共通の帰納的設計、と考えることができる。あるいは、生体系の特異的な抗体産出能を利用した「抗体工学」や「抗体触媒」³³⁾の研究も後者の範疇に入ることができよう。前者のタン

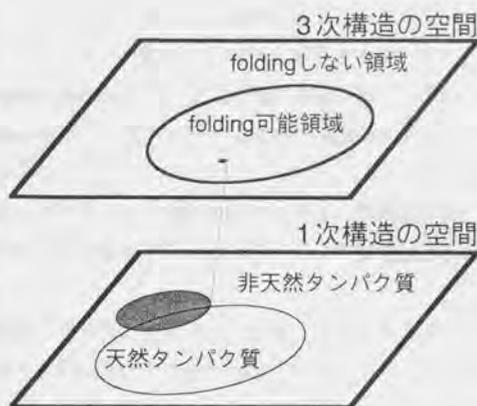


図1.3 アミノ酸配列と立体構造の関係

パク質工学はもともとは天然タンパク質の改造を行う手法であったが、アミノ酸配列そのものではなくてアミノ酸配列と立体構造を関係づける原理のみを天然に学んで、全く新規にアミノ酸配列からタンパク質を設計する手法、すなわち「ディノーボ設計」の手法が新たに展開しつつある。ディノーボ (de novo) とは、「一からの、新規な」の意味で、この場合にはタンパク質のイメージ画からそれを実現しうるアミノ酸配列を導き出すという手法である。同時にディノーボ設計は「非天然要素の導入」をも取り込んで、天然物としてのタンパク質を、人工物としてのタンパク質へと、その世界を開拓している²⁴⁾。

ディノーボ設計の研究は、Kaiserらによる apolipoprotein A-I の両親媒性ヘリックス部分をモデルにした人工ペプチドの設計に始まる³⁴⁾。疎水性残基をほとんど Leu にし、親水性残基を Lys と Glu に単純化したペプチドは α -ヘリックスを形成し、濃度依存的な会合体形成や、LB膜展開実験におけるヘリックス形成が確認されている。これに続いて、melittin や calcitonin など多くの生理活性ペプチドが両親媒性をもとにした設計のみによって機能発現しうることが示された³⁵⁾。また、膜融合ペプチドやシグナルペプチドなどの天然のアミノ酸配列をモデルにした研究³⁶⁾においても、活性発現には残基の親水性と疎水性の性質が主要な寄与をしていることが示されている。このように親水性疎水性の特徴は、構造と機能の両面に重要な役割を担っていると理解できる。

人工的なアミノ酸配列の設計はまた、シーケンシャルポリペプチドへも適用された。collagen や elastin などの繊維状タンパク質においては、数残基程度の繰り返し配列の存

在が知られている。これをモデルとしてpoly(ValProGlyValGly)やpoly(ValProGlyGly)が合成されている³⁷⁾。前者のポリマーは β -ターンを含む β -spiral構造をとると考えられている。側鎖に発色団を有するnaphthylalanineなどのアミノ酸(Xaaで示す)を用いたシーケンシャルポリペプチドpoly(Lys(Z)Lys(Z)Xaa)が合成され、規則的な配列による発色団間の相互作用が示されている³⁸⁾。

ペプチドの設計研究において環状オリゴペプチドの研究も重要である。膜透過に関与する抗生物質gramicidin Sやvalinomycinの変異体設計の研究の他、不斉触媒に応用した例³⁹⁾など広範にわたる。

上述した例は二次構造のレベルの設計であるが、人工タンパク質とするためにはさらに高次の超二次構造や三次構造の設計をする必要がある。Hodgesらはコイルドコイル構造を有するtropomyosinのモデルとして、7残基周期(heptad)の両親媒性ペプチド、poly(LESLESK)、poly(LEALEAK)あるいはAc-(KLEALEG)_n-K (n=1-5)、Ac-KCAELEG-(KLEALEG)_n-Kなどを合成し、ヘリックス性を調べている^{40,41)}。 α -ヘリックス性が現れるには鎖長の効果があり、例えば22残基以上必要なこと、ペプチド鎖の末端付近でのdisulfide架橋がヘリックスの安定性を向上させることなどが示されている。heptadの両親媒性の分子設計によってコイルドコイル構造ができていていると考えられている(図1.4)。

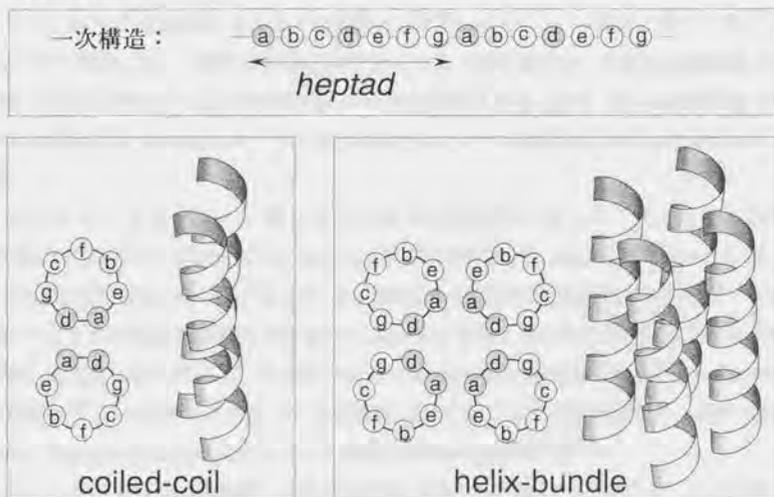


図1.4 コイルドコイル構造およびヘリックスバンドル構造
(各左側の円形図はヘリックス軸方向からの投影図)

Nishinoらは、両親媒性の heptad からなる 21 残基のペプチド、(ALARALA)₃などを設計してアミノ酸残基の効果を調べている⁴²⁾。SEC カラムによるゲル濾過実験により、ヘリックス構造をとる時に高分子量位置で溶出することや、臨界ミセル濃度に対応する性質から集合体形成が結論されている。DeGradoらは、やはり heptad を基本としたペプチド、Ac-GELEELLKCLKELLKG等を設計してヘリックス性の濃度依存性を詳細に検討して、会合体が4量体であることを示した⁴³⁾。この知見をもとに、両親媒性のヘリックス部分を連結した、Ac-GELEELLKCLKELLK-GPRRG-ELEELLKCLKELLKGなどを設計し、4量体形成が容易になることを示し、さらに、4つのヘリックス部分を含むペプチドを合成して、グアニジン塩酸塩による変性中点が6.3Mにも及ぶ非常に安定な4量体、すなわち4ヘリックスバンドルを実現した⁴⁴⁾。また、Richardsonらは、多様な種類のアミノ酸残基を使用した4ヘリックスバンドルを遺伝子工学的な手法で合成している⁴⁵⁾。本論文の第3編は、これらの研究の展開と並んで進行したものである。こうした研究によって、高次構造の典型であるヘリックスバンドルの設計原理としての両親媒性ヘリックスの重要性はほぼ確立されたといつてよい。

ヘリックスバンドルと並んで天然に存在する典型的な超二次構造である β -シート構造の設計も試みられた。免疫グロブリンの2枚重ねの β -シート構造をモデルとして、改良を重ねた末、HTLTASIPDLTYSIDPNTATCKVDPFTLSIGX (X= β -alanine)を設計して中心部分でSS架橋することで水溶性の2枚重ねの β -シート構造を得ている⁴⁶⁾。 β -strandの設計には、一般にValなどの β 分岐アミノ酸の使用や、親水性と疎水性のアミノ酸を交互に配置することが有効であると考えられている。また、 β -strand間をつなぐターン部分には-ProAsn-や-ProAsp-などの短いターン構造性のある配列が使われている。

α ヘリックスと β シート構造の両方からなる設計もなされ⁴⁷⁾、 $\beta\alpha\beta$ 構造のKVQIQVKGSGEAXQQLXEXLQQLQSGSGEIQVQIGや、MutterらによるT5-($\beta\alpha\beta\alpha\beta$)などが報告されている⁴⁸⁾。特に後者では、Ac-KKKPGKEKなどの短いターン構造性のペプチドのLysの側鎖に α あるいは β 構造を意図して設計したペプチド鎖を櫛型に配置した構造になっている。これはTASP (template-assembled synthetic proteins) と称され⁴⁹⁾、天然タンパク質が一本鎖を基本とすることとは対照的な分子設計である。また、Tanakaらによる β/α パレル構造の構築も注目される⁵⁰⁾。

以上は主に水溶性の球状タンパク質の構造を基にした設計例であるが、非水溶性のタンパク質を目的とした設計もなされている。基本的には疎水性のアミノ酸残基を多用することで非水溶性化は可能で、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスをモデルとした設計例

が多い⁵¹⁾。膜タンパク質の多くは、20数残基程度の疎水性のヘリックスの脂質膜中での集合が構造形成の基本で、この部分に含まれるわずかな親水性あるいは極性の残基が細かなヘリックス間の配向を規定していると考えられている。また膜中での集合化は脂質のアルキル鎖とペプチドの相分離であると同時に、疎水性ヘリックスの長さや脂質の疎水層の厚みの差が、表面張力として働き、集合化をもたらしているという説もある⁵²⁾。膜貫通ヘリックスは、hydropathyのプロットによって比較的明確にアミノ酸配列から、その部分を予測できる⁵³⁾。また、あるアミノ酸配列の α -ヘリックスがどのような分子環境を好むかについては、疎水性モーメントと平均疎水性度の2つのパラメータで分類が可能であることが示されている^{54,55)}。このような天然タンパク質のデータから導かれた特性値で予め、人工設計したアミノ酸配列を評価することは、有効である。

ディノープ設計においては、両親媒性の原理の他に、目的とするfoldingを確実にするために分子内での架橋構造を用いた例もいくつかある。HandelらによるHis間をZn²⁺で配位架橋させたヘリックスバンドル⁵⁶⁾は、そうでない場合よりもかなり安定化している。また、disulfide結合を利用した分子設計も、Kurodaら⁵⁷⁾、Futaki⁵⁸⁾ら、Kobayashi⁵⁹⁾らが報告している。

これらの研究以降のディノープ設計研究の展開は、いくつかの総説^{24,60-66)}や論文⁶⁷⁻⁷⁰⁾に記述されている。しかしながら両親媒性原理などのディノープ設計の基本原則となっている事柄は、上述の内容から特別な進展をみていない。try-and-error、言い換えれば、ひとつの結果の再設計へのフィードバックが依然としてディノープ設計では必要である。コンピュータを用いたデータベース的解析、あるいは分子力学的な解析や、一方で熱力学的な実験の集積が、タンパク質のよりファインな分子設計に有効であることが認識されつつあるし、また重要である。

1.4 人工タンパク質による機能発現

ディノープ設計による高次構造形成の研究が進むにつれて、機能を有する人工タンパク質の研究開発も展開しつつある(図1.5)。多様なタンパク質機能の原型は、タンパク質と他分子との相互作用あるいはその結果としての分子認識であると考えられる。Moserらによって、分子モデリングによりDDT(1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane)に対して高い結合能を有する β -シート分子が合成された⁷¹⁾。こうした特異的結合能を目的とした設計例はむしろ特殊で、多くは酵素と同様の疎水性場への基質分子の取り込みを意図して分子設計されている。Nishinoらは両親媒性ヘリックス中にHisとCysを配置し、システインプロテアーゼの機能モデルとして、その触媒

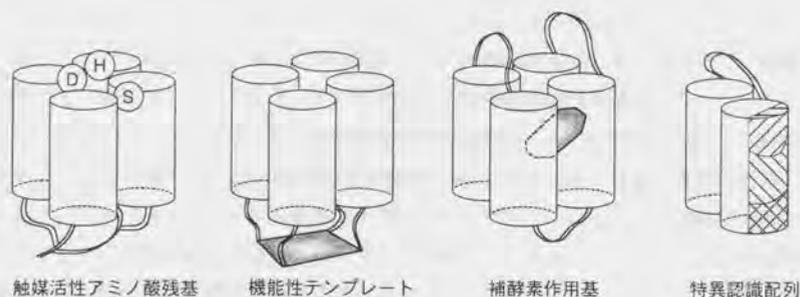


図 1.5 機能的な人工タンパク質の例 (文献は本文中参照)

活性を調べている⁷²⁾。p-nitrophenylacetate の加水分解に対して、ペプチドの集合体形成濃度以上で触媒活性の増大が認められた。このことは酵素と同様にヘリックスバンドルの疎水性のコア領域に基質が取り込まれていることを示している。Hahnらは同様にヘリックスバンドルを用い、各ヘリックスの末端にcatalytic triadと呼ばれるHis, Ser, Aspを配して chymotrypsin のモデルとしてエステラーゼ活性を測定した⁷³⁾。これらの例は設計において、高い基質特異性を目的としていないが、ディノープ設計が、構造面で native-like な folding を目指すのと同様に、機能面でも基質特異性をいかにして実現するかが、今後の重要な研究の焦点である。

いくつかの天然酵素がそうであるように、アミノ酸以外の活性グループを導入することで、酵素活性の実現を試みた例も多い。Sasakiらによる porphyrin 誘導体の環に4本の両親媒性ヘリックスをつないだ分子は、Fe(III)錯体として aniline のヒドロキシル化活性を示す⁷⁴⁾。Mihara, Nishino によるフラビン誘導体を用いた人工酵素も報告されている^{60,75)}。ここで興味深いのは、両親媒性ヘリックスからなる人工タンパク質に、ミセル性低分子をある一定割合で添加した時に触媒活性が非常に高くなるという点である。これは catalytic molten-globule と呼ばれ⁷⁶⁾、酵素における進化論的な意義も示唆されている。

分子内で機能分担させた設計もなされている。Hin recombinase の DNA 結合領域の配列に Gly-Gly-His-をつないで、ここに Cu^{2+} を配位させることで、DNA 鎖の切断能を持たせた人工制限酵素が報告されている⁷⁷⁾。また、特定の超二次構造を形成するように設計した分子の一表面に抗原性を与えるような残基配列を用いた研究もある⁷⁸⁾。これは、より安全な合成ワクチンとしての可能性が期待される。

一方、膜タンパク質をモデルにしたディノープ設計は、人工的なイオンチャネルを指

factor G (EF-G) である⁸³⁾。kinesinはATP、EF-GはGTPの加水分解酵素であり、ともに酵素反応の分子構造変化がレール上への結合と脱離の運動に転換される。タンパク質は、酵素反応による起動部分、レール上での動作決定部分、モータータンパク質の運動による輸送等の機能部分、などからなっており、一分子でありながら、いくつもの機能素子、すなわち機能モジュールから構成されていると考えることができる。タンパク質の機能の高度さは、素機能の特異性などだけではなく、こうした機能モジュールの連携体であることに依っている部分が多い。人工タンパク質のターゲットとして、機能連携を意識した設計が重要である。

従来から、天然タンパク質をベースにした多くの人工タンパク質が生み出されてきた。これらは残基レベルでの置換欠失挿入、ある長さの配列のカセット的変換、poly (ethyleneglycol)化に代表されるタンパク質表面の修飾⁸⁴⁻⁸⁶⁾、異なるタンパク質の部分配列を組み合わせたキメラタンパク質⁸⁷⁾などであり、それぞれの有効性が示されてきた。しかし、構造的には天然のタンパク質の構造に立脚しており、その意味では未開拓なタンパク質ワールド (汎タンパク質と呼ぶこともできる) がまだまだ広く残されているといえる (図1.7)。本研究が目的とする点はまさに、天然物とその周辺に限られてきたタンパク質ワールドをより広範に拡張するという試みである。その手法の中心として用いたディノープ設計には、「非天然トポロジー」と「非天然ユニット」という基本的な設計思想が存在する。そのいくつかの例は上述した通りである。後者の非天然ユニットは、構造的な意味でも、また機能的な意味でも捉えることができる。先に述べた機能モジュールの考え方も同様なものである。

そして、このような「非天然トポロジー」と「非天然ユニット」を実際に作り出すには、当然ながら自然界の方法のままでは不可能であり、新規な合成方法の開発⁸⁸⁻⁹⁰⁾は欠かすことができない。遺伝子工学的手法の非天然への応用^{91,92)}も盛んに研究されているが、化学的合成方法の本質的な多様性のメリットは大きい。しかしながら、現状では100残

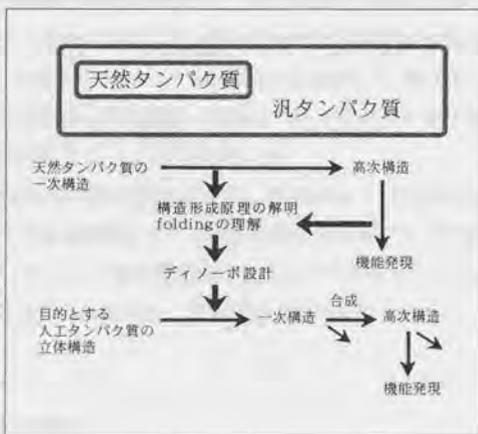


図1.7 タンパク質ワールドと本研究の流れ

基程度のタンパク質は、数例の成功⁹³⁾を除いて実用化レベルにあるとはいえない。主要な原因は、純度低下による精製法の問題と、合成時の反応性の問題であるが、一次構造が実現されていても高次構造が保証されていない、言い換えると自発的foldingに限界がある可能性も否定できない。従って、いかにして高次構造に導くかまでを考慮した合成方法の開発は特に重要である。

また、近年の分子生物学あるいは生化学の分野において、立体構造を解明することの意義は非常に大きい。これらの多くの雑誌において示される構造解析のインパクトは言うまでもない。X線結晶構造とともに同位体ラベル試料に対する多次元NMR法の最近の展開は著しい。本研究においても、こうした重要性から、構造解析に適した人工タンパク質の設計を試みた。第7章で記述するように、疎水性内部に芳香族側鎖を有するタンパク質は側鎖構造が規定されるため、NMR解析が可能である。しかしながら、本研究を含め、初期のディノボ設計タンパク質は安定性を追求するあまり、molten-globule性や多形性を有するものが多かった。そのためNMR解析には適さず、また結晶化も一部の小分子を除いてうまく実現していないようである。ここにディノボ設計の次の課題がある。

図1.7に示すように、天然のタンパク質が一次構造から高次構造へ、そして機能を発揮するというきちんとした因果関係を示すのとは対照的に、人工タンパク質においては、一次構造ができて高次構造は実現しない例、あるいは高次構造ができて機能が発現しない例に多く遭遇する。いかにしてこれらの関係を効率よく一本の矢印でつないでいけるかが重要である。本研究は、天然タンパク質に学んで、構造形成原理の解明やfoldingの理解を行い、これをもとにディノボ設計をするという解決方法を選択した(図1.7)。一次構造→二次構造と超二次構造→三次構造と四次構造→機能というスキームに従って研究を展開し、これに対応して本論文の第2, 3, 4, 5編を構成した。

本研究の主題は、タンパク質の高次構造形成に基礎をおいて、天然のタンパク質ワールドにとどまらない新規な人工タンパク質を創造して、より多様性に満ちたタンパク質ワールドを拡張することにある。特に、タンパク質の典型的なユニットである α -ヘリックス、とりわけ両親媒性ヘリックスを全章にわたって、研究対象として設定した。

引用文献

1. K. Ulmer, *Science*, 219, 666-671 (1983)
2. 渡辺公綱, 小島修一 著, 蛋白質工学概論, コロナ社(1995)
3. 赤坂一之 編, 蛋白質この絶妙なる設計物, 吉岡書店(1994)
4. 油谷克英, 中村春木 著, 蛋白質工学, 朝倉書店(1991)

5. 日本化学会 編, 新生物化学実験講座 タンパク質 VII, 東京化学同人(1993)
6. G. E. Schulz, R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979)
/ 大井龍夫 監訳, タンパク質, 化学同人(1980)
7. 勝部, 京極, 崎山, 高木, 中川 編, タンパク質 I & II, 東京化学同人(1988)
8. C. Branden, J. Tooze, Introduction to Protein Structure, Garland Publishing (1991)
9. M. Perutz, Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins, Cambridge University Press (1989) / 林利夫, 今村保忠 訳, 生命の第二の秘密, マグロウヒル出版(1991)
10. M. Perutz, Protein Structure; New Approaches to Disease and Therapy, W.H. Freeman and Company (1992) / 黒田玲子 訳, タンパク質立体構造と医療への応用, 東京化学同人(1995)
11. 日本化学会 編, 新生物化学実験講座 タンパク質 III, 東京化学同人(1993)
12. M. Z. Atassi, T. Manshourí, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8282-8286 (1993)
13. B. W. Matthews, C. S. Craik, H. Neurath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4103-4105 (1994)
14. D. R. Corey, M. A. Phillips, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4106-4109 (1994)
15. C. B. Anfinsen, *Science*, 181, 223 (1973)
16. R. H. Pain, Mechanisms of Protein Folding, Oxford University Press (1994) / 崎山文夫 監訳, タンパク質のフォールディング, シュプリンガーフェアラーク東京(1995)
17. S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, *Biopolymers*, 27, 271-297 (1988)
18. 城所俊一, *Netsu Sokutei* (熱測定), 14, 143-153 (1987)
19. 上平初穂, *Netsu Sokutei* (熱測定), 15, 130-142 (1988)
20. 後藤祐児, 高木俊夫, 蛋白質核酸酵素, 37, 772-780 (1992)
21. K. Kuwajima, *Proteins*, 6, 87 (1989)
22. F. G. van der Goot, J. M. Gonzales-Manas, J. H. Lakey, F. Pattus, *Nature*, 354, 408 (1991)
23. J. Martin, T. Langer, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich, F.-U. Hartl, *Nature*, 352, 36 (1991)
24. W. F. DeGrado, D. P. Raleigh, T. Handel, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1, 984-993 (1991)
25. M.-J. Gething, J. Sambrook, *Nature*, 355, 33-45 (1992)
26. 田中豊一, 高分子, 44, 8 (1995)
27. A. Annaka, T. Tanaka, *Nature*, 355, 430 (1992)
28. D. Voet, J. G. Voet, Biochemistry 2nd Ed., John Wiley & Sons (1995) / 田宮, 村松, 八木, 吉田 訳, ヴォート生化学, 東京化学同人(1996)
29. C. Chothia, *Nature*, 357, 543-544 (1992)
30. A. V. Finkelstein, O. B. Ptitsyn, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 50, 171 (1987)
31. Y. Fusimi, *Adv. Biophys.*, 25, 1-43 (1989)
32. T. L. Blundell, Protein Engineering Towards Rational Design?, Trends in Biotechnology, 12 (1994)
33. 藤井郁男, 蛋白質核酸酵素, 37, 654-666 (1992)
34. D. Fukushima, J. P. Kupferberg, S. Yokoyama, D. J. Kroon, E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 3703 (1979)

35. E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Science*, 223, 249 (1984)
36. M. Murata, K. Nagayama, S. Ohnishi, *Biochemistry*, 26, 4056 (1987)
37. D. W. Urry, *J. Protein Chem.*, 7, 1 (1988)
38. M. Sisido, Y. Imanishi, *Macromolecules*, 19, 2187 (1986)
39. M. Tanihara, Y. Imanishi, *Polym. J.*, 15, 509 (1983)
40. S. A. St-Pierre, R. S. Hodges, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 581 (1976)
41. R. S. Hodges, A. K. Saund, P. C. S. Chong, S. A. St-Pierre, R. E. Reid, *J. Biol. Chem.*, 256, 1214 (1981)
42. N. Nishino, Y. Sugita, T. Yamamoto, T. Fujimoto, *Rep. Asahi Glass Found. Ind. Technol.*, 45, 191 (1984)
43. W. F. DeGrado, J. D. Lear, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 7684 (1985)
44. S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 6751 (1987)
45. M. H. Hecht, D. C. Richardson, J. S. Richardson, R. Ogden, *J. Cell. Biochem.*, 13A, 86 (1989)
46. J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Trends Biochem. Sci.*, 14, 304 (1989)
47. M. Mutter, K.-H. Altmann, *Angew. Makromol. Chem.*, 145/146, 211 (1986)
48. I. Ernest, S. Vuilleumier, H. Fritz, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.*, 28, 4015 (1990)
49. M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 535-554 (1989)
50. T. Tanaka, M. Hayashi, H. Kimura, M. Oobatake, H. Nakamura, *Biophys. Chem.*, 50, 47-61 (1994)
51. J. D. Lear, Z. R. Wasserman, W. F. DeGrado, *Science*, 240, 1177 (1988)
52. A. Kusumi, J. S. Hyde, *Biochemistry*, 21, 5978 (1982)
53. J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157, 105 (1982)
54. D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall, *J. Mol. Biol.*, 179, 125 (1984)
55. D. Eisenberg, R. M. Weiss, C. Terwilliger, *Nature*, 299, 371 (1982)
56. T. Handel, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 6710 (1990)
57. Y. Kuroda, T. Nakai, T. Ohkubo, *J. Mol. Biol.*, 236, 862-868 (1994)
58. S. Futaki, K. Kitagawa, *Tetrahedron Lett.*, 35, 1267 (1994)
59. Y. Kobayashi, H. Sasabe, N. Saito, *J. Prot. Sci.*, 12, 121-131 (1993)
60. 西野憲和, *Biophysics(生物物理)*, 37, 161-164 (1997)
61. 西野憲和, *高分子*, 43, 616-619 (1994)
62. G. Tuchscherer, M. Mutter, *J. Pept. Sci.*, 1, 3-10 (1995)
63. 三原久和, 青柳東彦, 西野憲和, *Koubunshi Ronbunshu(高分子論文集)*, 52, 797-808 (1995)
64. 日本化学会 編, 季刊 化学総説, 31, 超分子をめざす化学, 学会出版センター (1997)
65. M. D. Struthers, R. P. Cheng, B. Imperiali, *Science*, 271, 342-345 (1996)
66. S. F. Betz, W. F. DeGrado, *Biochemistry*, 35, 6955-6962 (1996)
67. H. Mihara, Y. Tanaka, T. Fujimoto, N. Nishino, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1995, 1915-1921 (1995)
68. M. R. Ghadiri, M. A. Case, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 1594 (1993)
69. R. Moser, S. Frey, K. Munger, T. Hehlhans, S. Klauser, H. Langen, E.-L. Winnacker, R. Mertz, B. Gutte, *Prot. Engineer.*, 1, 339 (1987)
70. N. Nishino, Y. Sugita, T. Yamamoto, T. Fujimoto, *Rep. Asahi Glass Found. Ind. Technol.*

- 48, 149 (1986)
73. K. W. Hahn, W. A. Klis, J. M. Stewart, *Science*, 248, 1544 (1990)
74. T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 380 (1989)
75. H. Mihara, K. Tomizaki, N. Nishino, T. Fujimoto, *Chem. Lett.*, 1993, 1533-1536 (1993)
76. W. F. DeGrado, *Nature*, 365, 488-489 (1993)
77. D. P. Mack, B. L. Iverson, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 7572 (1988)
78. P. T. P. Kaumaya, K. D. Berndt, D. B. Heidorn, J. Trehwella, F. J. Kezdy, E. Goldberg, *Biochemistry*, 29, 13 (1990)
79. H. Mihara, N. Nishino, R. Hasegawa, T. Fujimoto, *Chem. Lett.*, 1992, 33 (1992)
80. M. O. Montal, T. Iwamoto, J. M. Tomich, M. Montal, *FEBS Lett.*, 320, 261 (1993)
81. S. Lee, T. Kiyota, T. Kunitake, S. Yamashita, K. Anzai, G. Sugihara, *Biochemistry*, 36, 3782-3791 (1997)
82. R. A. Cross, *Nature*, 285, 18-19 (1997)
83. M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, V. I. Katunin, W. Wintermeyer, *Nature*, 385, 37-41 (1997)
84. 稲田祐二, タンパク質ハイブリッド, I, II, III, 共立出版 (1987, 88, 90)
85. 小寺洋, 松島瑞子, 廣戸三佐雄, 西村裕之, 稲田祐二, *化学と生物*, 32, 735-739 (1994)
86. M. Muraki, K. Harata, Y. Jigami, *FEBS Lett.*, 335, 271 (1994)
87. S. Kimura, H. Nakamura, T. Hashimoto, M. Oobatake, S. Kanaya, *J. Biol. Chem.*, 267, 21535-21542 (1992)
88. K. Severin, D. H. Lee, A. J. Kennan, M. R. Ghadiri, *Nature*, 389, 706-709 (1997)
89. P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, *Science*, 266, 776-779 (1994)
90. J. P. Tam, Y.-A. Lu, C.-F. Liu, J. Shao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 12485-12489 (1995)
91. T. Hoshaka, K. Sato, M. Sato, M. Sisido, K. Takai, S. Yokoyama, *FEBS Lett.*, 344, 171 (1994)
92. J. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science*, 244, 182 (1989)
93. T. Inui, J. Bodi, S. Kubo, H. Nishio, T. Kimura, S. Kojima, H. Murata, T. Muramatsu, S. Sakakibara, *J. Pept. Sci.*, 2, 28-39 (1996)

第2編

人工タンパク質創出のための改良固相合成法

第2章 カオトロピック溶媒の固相ペプチド合成法への適用

2.1 序論

人工的なタンパク質の創成をめざした研究においてその合成技術の高度化は必要不可欠な要素技術のひとつである。タンパク質の機能はその高次構造に基づいており、したがって、設計されたアミノ酸配列の正確さとともに構造形成に必要な一定以上の鎖長を必要とする。これまで、精密にアミノ酸配列を構築するための手法は非常に精力的に研究され、Merrifieldらによる固相ペプチド合成法¹⁻⁵⁾は、簡便な操作で短時間にペプチド鎖を合成できる手法として優れたものである。このような方法において使用されるペプチド担持用樹脂⁶⁻¹³⁾、側鎖保護基¹⁴⁾、N-保護基^{15,16)}、カップリング試薬^{17,18)}、脱保護試薬^{19,20)}などが種々考案され最適な結果を与えるこれらの組み合わせが検討されている。一方、長鎖のペプチドを合成するための手法は、単に化学的な問題ではなく、高分子物理に関わる問題を含んでいる。すなわち、Naritaらによって指摘されているように、ペプチド鎖は合成途中の側鎖保護基を有する状態で、主鎖のアミド結合が水素結合を形成し、 β -シート構造あるいはさらに凝集体となってカップリング反応性を著しく低下させる(図2.1)²⁵⁻²⁷⁾。このようなペプチド鎖の低溶解性を解決するために、N-置換アミノ酸(Proやsarcosineなど)や α 、 α -二置換アミノ酸(Aibなど)の導入が水素結合のネットワーク形成を阻害して溶解性向上に有効であることが示されている。しかし、設計した人工タンパク質の配列にこれらのアミノ酸が適当でない場合には、合成に使用する溶媒の工夫によって溶解性の改善を行うしかない。固相合成法の発展の初期の頃は、ペプチド鎖に対する溶解性の点ではあまり適当でないとして現在では考えられているdichloromethaneが主要な溶媒として用いられていたが、これはカップリング試薬として用いられたDCCの反応性からの要請であった²⁸⁾。こうした事情から、溶解性向上のための溶媒の設計²⁹⁾には、カップリングの反応性をはじめ、保護基や担持用樹脂なども含めた総合的な最適化の検討を行う必要がある。

ペプチド鎖の β -シート構造形成を妨害する溶媒としては、水素結合形成に関してドナー性やアクセプター性³⁰⁾が高い溶媒であることが必要であると考

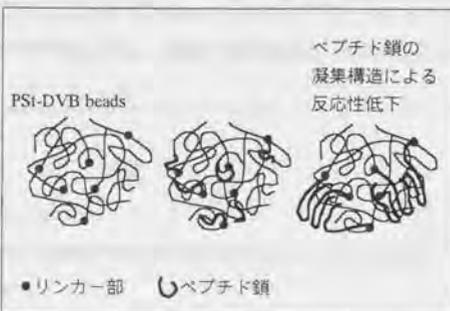


図2.1 固相合成法における問題点

えられる。このような溶媒はペプチド結合のN-H基あるいはC=O基と相互作用し、ペプチド同士の構造形成を阻害する。DMF, DMSO, NMPなどが代表的な高極性溶媒である。また、カオトロピックイオンとして、 SCN^- , I^- , ClO_4^- , NO_3^- , Br^- , Cl^- , ... の系列が知られている。これらは水和構造を破壊し、結果として水溶液中の疎水結合を弱めるのでオリゴマータンパク質の解離などに用いられている。KSCNやLiClは極性の有機溶媒であるDMFに溶解し、ポリアミドなどの良い溶媒になる。高極性溶媒についてはDMF-DMSOのような混合溶媒が比較的高い合成収率を与えることが報告されている³¹⁾。ここでは、このような高極性溶媒およびカオトロピック溶媒の固相ペプチド合成法への適用を、カップリング反応速度と保護基を有するペプチド鎖の溶解性の面から検討し、最適な溶媒系を見いだすことを目的に研究した。特に保護ペプチド鎖の有機溶媒への溶解性は、多くは定性的にしか文献に記載されておらず、保護ペプチドに対する溶媒系の検討は前述のNaritaらの研究を除いてはほとんどなされていない。

2.2 実験：ペプチドの溶解性とカップリング反応性

ペプチド分析

薄層クロマトグラフィー(TLC)は、シリカゲルプレート (Kieselgel 60F254, Merck)を使用した。展開溶媒として、酢酸エチル/メタノール(5:1, v/v)、ジオキサン/メタノール(1:1)、1-ブタノール/酢酸/水(4:1:1)、クロロホルム/メタノール(9:1)を使用した。

ペプチド溶液の旋光度は、Horiba-SEPA-200 旋光度計を使用し、24℃で測定した。また、元素分析はYanaco-MT-3-CHN-Corderを用い、2mgの乾燥ペプチドを試料として3回測定して炭素、水素、窒素含量の各平均値を求めた。

ペプチド合成

用いたペプチドは、側鎖に無保護の $-\text{CONH}_2$ 基を有するAsnに富むペプチド (Ia, Ib)、側鎖に通常のベンジル系保護基を持つペプチド (IIa, IIb)、側鎖に保護基のない疎水性アミ

- | |
|--|
| Ia Boc-Asn-Asn-Phe-OBzl |
| Ib Boc-Asn-Asn-Phe-Ala-Asn-Asn-Phe-OBzl |
| IIa Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Ala-Glu(OBzl)-Ala-Phe-Gly-OBzl |
| IIb Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Ala-Glu(OBzl)-Ala-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Ala-Glu(OBzl)-Ala-Phe-Gly-OBzl |
| III Boc-Phe-Phe-Leu-Leu-Phe-Phe-Leu-Leu-Ala-OBzl |

図 2.2 評価対象のモデルペプチドのアミノ酸配列

ペプチド	分子式	元素分析 (上:実測, 下:理論値)	旋光度 ($[\alpha]_D^{25}$, 濃度, 溶媒)	融点 / °C
Ia	----	----	-11.3° (c 1.0, DMSO)	----
Ib	$C_{49}H_{63}N_{11}O_{14} \cdot H_2O$	C, 56.0; H, 6.3; N, 15.1 (C, 56.2; H, 6.3; N, 14.7)	-20.6° (c 1.0, DMSO)	260-261 (分解)
IIa	$C_{74}H_{80}N_8O_{17} \cdot H_2O$	C, 64.5; H, 6.5; N, 8.1 (C, 64.5; H, 6.4; N, 8.1)	----	184-187 (分解)
IIb	$C_{134}H_{153}N_{15}O_{30} \cdot 3H_2O$	C, 64.4; H, 6.5; N, 8.8 (C, 64.2; H, 6.4; N, 8.4)	-5.0° (c 1.0, DMSO)	254-257 (分解)
III	$C_{25}H_{30}N_9O_{12} \cdot H_2O$	C, 67.6; H, 8.0; N, 9.5 (C, 67.3; H, 7.8; N, 9.4)	-23.2° (c 1.0, DMSO)	299-302 (分解)

表 2.1 合成ペプチドの分析結果

ノ酸のみからなるペプチド(III)である。これらの構造式は図 2.2 に示した。

ペプチド Ia は、まず Phe から benzyl alcohol (HOBzl) と *p*-toluenesulfonic acid (TsOH) により TsOH·H-Phe-OBzl を合成し、別途 BocON 試薬で合成した Boc-Asn-OH と DMF 中 NMM を中和塩基として DCC-HOBt を用いてカップリングさせて Boc-Asn-Phe-OBzl を得た。次に Boc 基を 4M の HCl/EtOAc で除去し、同様のサイクルでカップリングを行い、tripeptide, Ia を合成した。生成物の分析結果を表 2.1 に他の peptide とともにまとめた。

ペプチド Ib は、Ia と同様に液相法³²⁾で合成した。Ia を Pd/C 触媒とともに DMF 中で水素ガスを導入して OBzl 基を除去し、Boc-Asn-Asn-Phe-OH とした。Ia と同じ手法で合成した Boc-Ala-Asn-Asn-Phe-OBzl から同様に Boc 基を除去し、H-Ala-Asn-Asn-Phe-OBzl を合成した。Boc-Asn-Asn-Phe-OH と H-Ala-Asn-Asn-Phe-OBzl のフラグメント縮合は EDC-HOBt 法により、DMF-DMSO 混合溶媒中で行った。生成物は水に沈殿させて精製し、heptapeptide, Ib を得た。¹H-NMR による分析ではフラグメント縮合の C 成分のラセミ化は検出されなかった。

ペプチド IIa は、Boc アミノ酸を用いた固相法により合成した。Kaiser らの方法³³⁾で oxime-resin を調製し、Boc-Phe-OH のカップリングから始めて逐次伸長させて heptapeptide を樹脂上に形成した。この peptide-oxime-resin に H-Gly-OBzl を反応させてペプチドを樹脂から切断し、octapeptide, IIa を得た。

ペプチド IIb は、固相法で合成したフラグメントのカップリングにより次のように合成した。IIa と同様に oxime-resin 上で伸長させた heptapeptide を hydrazine で樹脂から

切断³³⁾して、Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Phe-Ala-Glu(OBzl)-Ala-Phe-N₂H₃を合成した。一方アミン成分としてのフラグメントはIIaからBoc基を除去して合成した。フラグメント縮合はアジド法³⁴⁾を用いて行い、pentadecapeptide, IIbを得た。

ペプチドIIIは、IIaと同様にoxime-resin上に伸長させたC端1残基を欠くペプチドを、H-Ala-OBzlによりカップリングと同時に切断して得た。

溶解性試験

溶解性は、合成したペプチドの乾燥粉末を計量し、1～数滴の溶媒を添加して1分間攪拌した後、不溶物の残存を肉眼で観察して判定した。添加溶媒量は重量から求め、完全に溶解するまで、このサイクルを繰り返した。溶媒として、DMF, HMPA-DMF(50:50), HMPA-DMF(80:20), HMPA, DMSO-DMF(50:50), DMSO-DMF(80:20), DMSO, DMF-LiCl(4%), DMF-LiCl(7%)を用いた。

カップリング反応速度

カップリング反応は、DCC, HOBt-DCC, DEPC, DEPC-TEAの4種類のカップリング試薬を用いた方法と、Bocアミノ酸の対称酸無水物(symmetrical anhydride(SA))を用いた方法(SA法)で行った。アミノ基をフリーにしたGly残基を持つPSt-DVB樹脂([4-(glycyloxymethyl)phenylacetamide]-methyl-resin)³⁵⁾を200mg試験管にとり、溶媒に分散させ、Glyに対して2当量のBoc-Phe-OHを加えた。ここへDCCあるいはDEPCのカップリング試薬溶液を2当量添加してカップリングを開始させた。溶媒の総量は2.0gに合わせた。HOBt-DCC法では、先にHOBt(4当量)を添加後DCCを添加した。また、DEPC-TEA法ではDEPC添加後1分後にtriethylamine(TEA)を添加した。SA法においては、4当量のBoc-Phe-OHと2当量のDCCからdichloromethane中で(Boc-Phe)₂Oを合成した。このときDCCから生成するDCUを濾過除去して、溶液を減圧乾固し、得られた(Boc-Phe)₂OをDMFに溶かして用いた。カップリング開始後適当な時間に、反応系からごく少量をサンプリングし、その樹脂ビーズをethanol洗浄し、Gisin法³⁶⁾により、未反応のアミノ基をpicric acid塩とした後、そのpicric acid量を吸光度から定量し、未反応アミノ基量を求めた。微量の樹脂は乾燥後、重量を計量し、反応率を求めた。

2.3 結果と考察：溶媒系による伸長ペプチド鎖の溶解性改善

Boc法によるペプチド固相合成法の途中段階では、アミノ酸残基は一般に3種類に分類できる。実験項に記したようにそれらは、(i)水素結合性がある無保護のアミノ酸、(ii)疎水性保護基を有する親水性アミノ酸、(iii)極性基を持たない疎水性アミノ酸、である。ペプチドIa～IIIはそれぞれがほぼこれらのアミノ酸に富むように設計した。極性有機溶媒と

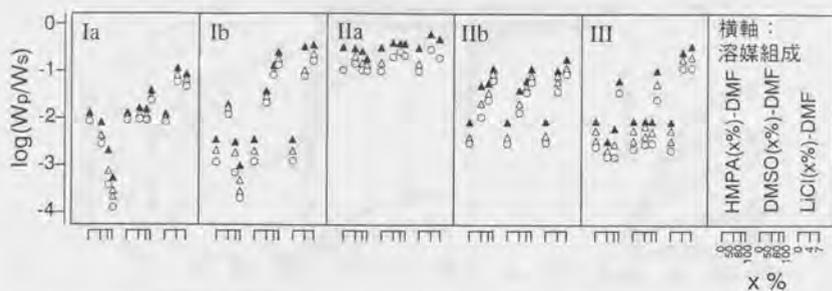


図2.3 各ペプチドの高極性溶媒に対する溶解性 (横軸はDMFに対する各添加成分の%で示した。溶解性判定は、○, 可溶; △, わずかに不溶分あり; ▲, 不溶性)

しては、DMF, HMPA, DMSO, NMP, DMAなどが知られている。これらは電子ドナー性と電子アクセプター性がともに高いが、電子ドナー性が最も高いHMPAと、電子アクセプター性が最も高いDMSO、および汎用されているDMFの系を溶解性試験に使用した。カオトロピック溶媒としては、 I^- , ClO_4^- , Br^- では酸化等の副反応が考えられるので、LiClを溶解させたDMFを用いた。図2.3には各溶媒系ごとの溶解性の判定結果をまとめた。溶解性はペプチドと溶媒の重量比の対数 $\log(W_p/W_s)$ で表した。DMFはペプチドIa, Ib, IIb, IIIに対して、あまり溶解力は高くなかった。溶解度は $\log(W_p/W_s)$ 値で $-3 \sim -2$ であった。一方HMPAはIIa, IIb, IIIに対して良い溶解性を示した。ただし、Asnに富むIaやIbに対しては溶解性がDMFよりも劣っていた。このことはHMPAの高い電子ドナー性と関係していると思われる。DMSOはいずれのペプチドに対しても良い溶媒であった。溶解度の $\log(W_p/W_s)$ 値はいずれも -1.5 以上であった。DMSO中では、Iaよりもより長鎖のIbの溶解性が高かった。このことはIbにおいて分子内の水素結合が形成されているためと考えられる。

LiClのDMF溶液もDMSO同様に高い溶解力を示した。特に、IaとIIIに対してはDMSOよりも優れていた。LiClの濃度は4~7%の範囲で溶解力にあまり差はなかった。高極性溶媒の混合系では、その組成と溶解度の関係はかならずしも単純ではなかった。例えば、IIIはHMPA-DMF系でHMPA含量0~80%でほとんど溶解性に差がなく、HMPAのみの時に高い溶解性を示した。また、混合溶媒系では、混合済み溶媒を使用する場合に比べて、まず溶解性の高い溶媒に溶かしたのち第二の溶媒で希釈するという方法のほうが、同一溶媒組成でも溶解性は高かった。例えば、IIIはDMSOとDMFにより、この方法で溶解度の $\log(W_p/W_s)$ 値が -2 以上にすることができた。このような順次添加法は、実際の

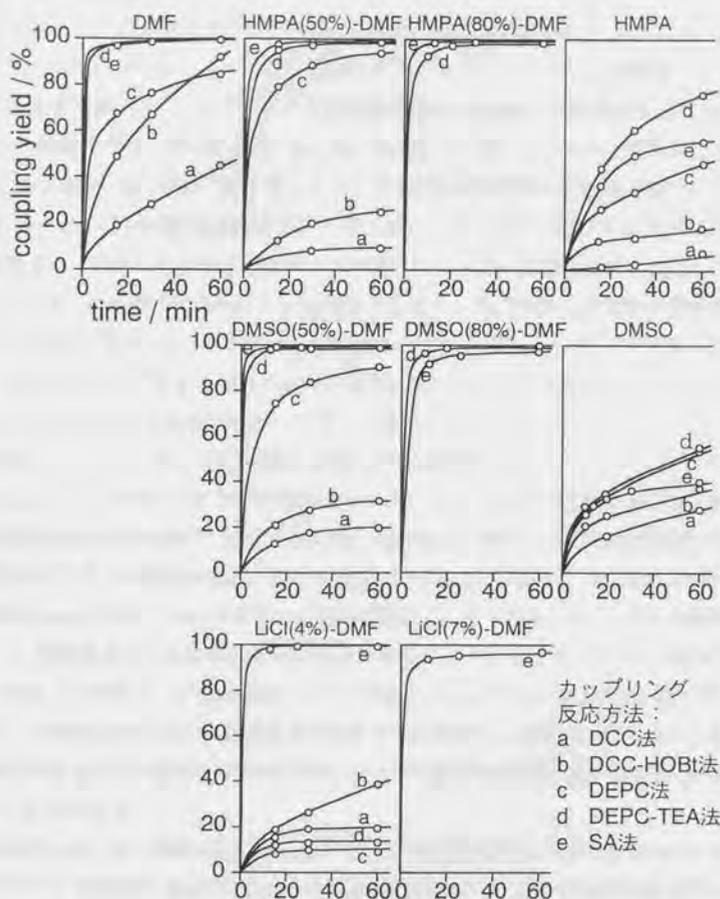


図2.4 カップリング反応の進行曲線

適用において有用な保護ペプチドの溶解方法であると考えられる。

ペプチド毎に見てみると、ペプチドIIaは用いた溶媒系のいずれにも容易に溶解した。同程度の鎖長のIb, IIa, IIIを比較すると、(ii)のタイプのアミノ酸を含むIIaの溶解性が優れていた。IbやIIIは疎水性の高い残基を含み、そのためペプチド結合の水素結合による凝集が起きやすいために溶解性に劣っていると解釈できる。

ペプチド合成においては、速いカップリング反応が高精度の合成を実現するのに必要

である。HOSuやHONpなどの活性エステル法は一般に速度が遅く、また、DPPAを用いるアジド法もDEPCより遅いことが報告されている^{28,34)}。ここでは実験項に記した5種類の方法を試験した。カップリングの進行度を60分間追跡した結果を図2.4にまとめた。DMF溶媒中では、DEPC-TEA法とSA法が著しく速いカップリングを示した。一方DCC法はあまり速くなかった。カップリング速度は5種類のいずれの方法でも、DMFにHMPAあるいはDMSOを添加するにつれて減少した。特に、HMPAあるいはDMSOの単独系では、前述したように保護ペプチド鎖に対して高い溶解性を示すにもかかわらず、カップリング速度は実用的に十分な速度ではなかった。DMFを含む混合溶媒系においても、DEPC-TEA法とSA法は十分高速なカップリングを示した。DMFはこれらの反応において不可欠であると考えられる。次に、カオトロピック溶媒DMF-LiClについてみると、SA法のみが高効率のカップリングを示した。DMF-LiCl(7%)でいくらか到達収率が低下したので、高いLiCl濃度はかえって不適当である。

以上のように、保護ペプチドの溶解性とカップリング反応性の検討から、DMFを含むDMSO混合溶媒中でのDEPC-TEA法とSA法、適度なLiCl濃度のDMF-LiCl溶媒中でのSA法が、長鎖ペプチドの固相合成法において適当であることを見いだした。また、DMF-LiCl系溶媒はFmoc法合成における脱Fmoc反応の溶媒としても使用でき、ペプチド鎖間でのβ-シート構造形成による溶媒和の低下を回避させることができる。さらに、最もDMF-LiCl系の適した反応として側鎖保護ペプチドの反応をあげることができる。例えば、側鎖保護アミノ酸のC端のOPac保護基をZn-AcOHで脱保護する場合、DMFを加えた場合でも溶解度が低く反応が進行しないが、DMF-LiCl系溶媒を使用することで容易に反応を遂行することができる。

ここに記した一連の実験以降に普及したBOPやPyBOPなどのphosphonium系OBt試薬やTBTUやHBTUなどのuronium系OBt試薬については、完全な比較実験は実施していないが、DMFを含むDMSO混合溶媒中やDMF-LiCl溶媒中で、高速なカップリングが可能なが確認できた。ただし、これらについてもSA法などと同様に、DMF単独よりも反応速度はいくらか低下した。phosphonium系OBt試薬については、溶液での保存性がuronium系OBt試薬よりも劣っていることが知られている。カップリング溶液中での試薬の失活の問題も、最適な溶媒系と試薬系を選択する場合に重要な点になると考えられる。

本研究の最大の成果として、従来はペプチド合成系に適用されなかったDMF-LiCl溶媒の有効性を初めて示すことができた³⁷⁾。

引用文献

1. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149 (1963)
2. R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol.*, 32, 221 (1969)
3. B. Gutte, R. B. Merrifield, *J. Biol. Chem.*, 246, 1922 (1971)
4. 日本生化学会 編, 生化学実験講座 タンパク質の化学 IV, 東京化学同人 (1977)
5. 日本生化学会 編, 新生化学実験講座 タンパク質 VI, 東京化学同人 (1992)
6. R. Epton, G. Marr, B. J. McGinn, P. W. Small, D. A. Wellings, A. Williams, *Int. J. Biol. Macromol.*, 7, 289 (1985)
7. J. T. Sparrow, *J. Org. Chem.*, 41, 1350 (1976)
8. P. W. Small, D. C. Sherrington, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1989, 1589 (1989)
9. V. K. Sarin, S. B. H. Kent, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5463 (1980)
10. E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6584 (1975)
11. H. Koster, W. Heidmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 15, 546 (1976)
12. P. Goddard, J. S. McMurray, R. C. Sheppard, P. Emson, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1988, 1025 (1988)
13. K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 37, 513 (1991)
14. B. W. Erickson, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 3750 (1973)
15. R. Colombo, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 19, 71 (1982)
16. L. A. Carpinò, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5748 (1970)
17. A. Fournier, C.-T. Wang, A. M. Felix, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 31, 86 (1988)
18. C. G. Fields, D. H. Lloyd, R. L. Macdonald, K. M. Otteson, R. L. Noble, *Pept. Research*, 4, 95 (1991)
19. J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5242 (1986)
20. J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregear, *Pept. Research*, 4, 194 (1991)
21. G. Barany, R. B. Merrifield, *The Peptides*, Ed. by E. Gross & J. Meienhofer, Academic Press, New York (1980), Vol. 2, Chap. 1
22. G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35, 161 (1990)
23. R. Epton (Ed.), *Solid Phase Synthesis 1990*, SPCC(UK) Ltd, Birmingham (1990)
24. G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 30, 705 (1987)
25. M. Narita, K. Ishikawa, J.-Y. Chen, Y. Kim, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 24, 580 (1984)
26. M. Narita, T. Fukunaga, A. Wakabayashi, K. Ishikawa, H. Nakano, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 23, 306 (1984)
27. 成田光章, 高分子(*Kobunshū*), 35, 1026 (1986)
28. S. Yamada, N. Ikota, T. Shioiri, S. Tachibana, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 7174 (1975)
29. J. Kovacs, *The Peptides*, Ed. by E. Gross & J. Meienhofer, Academic Press, New York (1980), Vol. 2, pp. 485-539
30. V. Gutmann, *The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interactions*, Plenum Press, New York (1978)
31. S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 6751 (1987)
32. O. Keller, J. Rudinger, *Herv. Chim. Acta*, 57, 1253 (1974)

33. W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.*, 45, 1295 (1980)
 34. 泉屋, 加藤, 青柳, 脇 (著), ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (1985)
 35. A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, M. Engelhard, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, 43, 2845 (1978)
 36. B. F. Gisin, *Anal. Chim. Acta*, 58, 248 (1972)
 37. H. Morii, K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62, 2730-2732 (1989)
- * (化合物略称は186ページ参照)

第3章 高溶解性のペプチド担持ビーズの開発

3.1 序論

人工タンパク質の化学合成においては、長鎖ペプチドを高純度でしかも高収率で得るために、保護基、試薬、溶媒の選択とともに、固相ペプチド合成法に使用する樹脂担体の選択も重要である¹⁻³⁾。樹脂担体に要求される機能は、(i)樹脂の分子鎖上にペプチド鎖を安定に結合保持する、(ii)合成溶媒中で樹脂が膨潤しペプチドの伸長末端が溶媒和される、(iii)合成溶媒中の保護アミノ酸や試薬が樹脂の分子鎖ネットワークを透過して容易に拡散できる、(iv)樹脂の粒子の凝集によって溶媒や試薬の拡散を阻害したり反応容器中における不均一性もたらしたりすることがない、(v)樹脂中で伸長中のペプチド鎖の凝集を引き起こさない、ことである。これらはカップリング反応の効率を高めたり、中途脱離(premature)や副反応を防止して高純度を達成するのに重要である。さらに、(vi)樹脂粒子が機械的に丈夫で極度の変形や破砕が起きないこと、(vii)樹脂から樹脂の一部の分子鎖が溶出ししないこと、(viii)長鎖ペプチドを樹脂内に保持でき、また最終脱保護により生成物を脱着できること、(ix)合成操作の化学工学的な側面から要求される樹脂粒子の形状やサイズの均一性が実現可能なこと、なども収率や操作性の向上のために重要である。例えば、樹脂担体は一般にペプチドの伸長とともに巨大化し、その結果機械的強度が低下して亀裂や破砕に至る可能性がある。こうして変形や微粒子化した樹脂は反応容器のフィルターが目づまりの原因にもなる。これは、(ix)の条件とともに、高速な溶媒交換や洗浄工程のために考慮する必要がある。

固相ペプチド合成法において、歴史的には poly(styrene-co-divinylbenzene)(PSt-DVB)樹脂がよく用いられてきた¹⁾。この樹脂は1%のDVBで架橋されたゲル型の樹脂で、懸濁重合により容易に微小な球状ビーズとして得られる。ゲル型であるために上記の(ii)(iii)(ix)の条件を満たす。しかし、(i)または(vii)によると思われる長鎖ペプチド合成時の収率低下^{1,4)}が指摘されており、poly(ethylene glycol)をグラフトしたPSt-DVB樹脂が開発され^{5,6)}、収率低下のある程度解決した。一方、(ii)の膨潤性の良い樹脂として開発された poly(*N,N*-dimethylacrylamide)系の樹脂⁷⁻⁹⁾は、ペプチドとの相溶性も良いが、溶液重合となるために、架橋点が少なく、(vi)(ix)の条件に対してやや不十分である。こうした経験から、長鎖ペプチド合成に適した、あるいは、さらに付加価値を持った新規な樹脂担体を開発することは非常に重要である¹⁰⁻¹⁶⁾。ここでは、poly(ethylene glycol)をグラフトしたPSt-DVB樹脂(PEG-PSt-DVBと略す)にならい、PEGに替わるペプチド性リンカーを用いた新規なビーズ状担体(ゲルタイプのPSt-DVB樹脂をペー

スにした)を開発して、その特徴を検討した。

3.2 実験：合成中間段階でのペプチド担持ビーズの組成分析

ペプチド担持ビーズのリンカー部の設計と合成

ペプチド担持ビーズ(以下PLINKと称する)のリンカー部分の構造を図3.1に示した。設計は、Boc法での合成に適した担体となるように、hydroxymethylphenylacetamide基^{17,18)}(図では-O-Mpa-で表した)を切断(cleavage)部分に置いた。PLINK-2, 3, 4, 6では、aminomethyl化したPSt-DVB樹脂にスパーサーともなるリンカー用のペプチド鎖を接続した後、-O-Mpa-を結合させた。リンカー部ペプチド鎖は、PLINK-3, 4では親水性となるLys残基を1残基置きに配し、他の位置はProとβ-アラニンを用いた。Proは、リンカー部分がβ-シート構造形成に関わらないイミノ酸であること、β-アラニンは、αアミノ酸の水素結合の周期性とずれるβアミノ酸であることから、これらを使用した。リンカーのC端側部分は柔軟性を考えてε-aminocaproic acidを用いた。PLINK-2も同様に設計したがLysに替えて疎水性のLeuを使用した。PLINK-1は通常のPam-resinと呼ばれる担体で、PLINK-5はその官能基量を高くしたものである。PLINK-6はPLINK-5に親水性のLys残基を2残基挿入したものである。

合成はまず、poly(styrene-co-divinylbenzene(1%))ビーズ(Bio-Beads S-X1, Bio-Rad製, 200-400 mesh)にdichloromethane-TFA中で、N-hydroxyphthalimideをSnCl₄を触媒として導入し、N₂H₄/ethanolによってphthalimide部分はずしてaminomethyl化PSt-DVBビーズを得た^{17,18)}。このときの試薬量を調整することにより、異なる官能基量(capacity)のものを得た。スパーサーのペプチド鎖は、Boc-アミノ酸をBOP-HOBt-DIEA/DMFによりカップリングして順次伸長させた。ペプチド鎖形成後、同様にacetyloxymethylphenylacetic acid (Ac-O-Mpa-OH)をカップリングさせた。Ac-

PLINK-1	-O-Mpa-NHCH ₂ -(PSt
PLINK-2	-O-Mpa-Ala-Leu-Bal-Leu-Pro-Leu-Bal-Leu-Eac-NHCH ₂ -(PSt
PLINK-3	-O-Mpa-Ala-Lys-Bal-Lys-Pro-Lys-Bal-Lys-Eac-NHCH ₂ -(PSt
PLINK-4	-O-Mpa-Ala-Lys-Bal-Lys-Pro-Lys-Bal-Lys-Pro-Lys-Bal-Lys-Eac-NHCH ₂ -(PSt
PLINK-5	-O-Mpa-NHCH ₂ -(PSt, high-load
PLINK-6	-O-Mpa-Lys-Lys-NHCH ₂ -(PSt, high-load
Test-peptide	SELLKALLSLLKCLLOLLSALLDKDANGQVSAKELG

(Mpa, -CH₂-C₆H₄-CH₂-CO-; Bal, β-alanine residue; Eac, ε-aminocaproic acid residue)

図3.1 設計合成したペプチド担持ビーズのリンカー部の構造とテスト用ペプチドの配列

O-Mpa-OHは、Br-Mpa-OHを大過剰の酢酸ナトリウムと加熱反応させて合成した。末端の acetyl 基は、目的ペプチドの合成用には N_2H_4 ではずして水酸基とした。また、脱保護後のペプチド担体ビーズの性質を調べる目的では TFMSA により cleavage 反応を行い、末端の acetyl 基をリンカーの Lys 残基の Clz 保護基とともに除去した。

目的ペプチドとして、図3.1に示した36残基のペプチドを上記の各リンカーを持つペプチド担持ビーズ上で固相法により手動操作で合成した。C端の Gly 残基は DMAP-DIC 法¹⁹⁾でエステル化により導入し、この時未反応の水酸基は acetylimidazole によりブロック (capping) した。以降のアミノ酸は通常の Boc 法により、BOP-HOBT-DIEA/DMF によりカップリングさせた²⁰⁾。最終脱保護は、TFMSA-TFA-DMS-EDT-*m*-cresol (20:100:60:5:20) と TFMSA-TFA-thioanisole-EDT (2:20:2:1) の2段階法 (low-high TFMSA method)²¹⁾ によった。

アミノ酸分析

使用前のペプチド担持ビーズ、目的ペプチド鎖を伸長した段階でのペプチド担持ビーズ、cleavage後のペプチド担持ビーズ、cleavage反応により回収した目的ペプチドを含む溶液、のそれぞれについて一定量をサンプリングし、酸加水分解 (5%の TFMSA を含む 6M の HCl 中で 24 時間) 後、Hitachi-835 アミノ酸分析計でアミノ酸組成およびペプチドの定量を行った。樹脂の末端アミノ基含量は picric acid を用いた Gisin らの方法²²⁾ によった。

膨潤度

ペプチド担持ビーズ PLINK について、保護基のある場合 (末端が AcO- でリンカー一部ペプチドの Lys 側鎖が Clz- 基で保護されている) と、保護基のない場合 (末端は HO- 基で Lys 側鎖はフリーのアミノ基) の膨潤度を体積目盛りのあるフィルター付き容器で測定した。前者については DMF と dichloromethane、後者については TFA, AcOH, 1M AcOH 水溶液, H_2O を溶媒に用いた。膨潤度は乾燥させた担体ビーズ 1g が溶媒により膨潤した時の gel-bed の容積 (ビーズ間の隙間体積を含む) で表した。

3.3.1 結果と考察：ジクロロメタン中における非凝集性

Boc 法が Fmoc 法と異なる点は溶媒の面では、これらの一時的保護基をはずす段階で、Boc 法は TFA/dichloromethane を用い、Fmoc 法は piperidine/DMF を用いる点である²³⁾。Fmoc 法では常に DMF をベースにした合成サイクルが行われるのに対して、Boc 法では脱 Boc 後の洗浄過程で dichloromethane を使用し、その後 DMF 系溶媒に転換される。実際の合成時には、dichloromethane の段階で樹脂担体ビーズが凝集することがよ

くある(前章の図2.1参照)。この原因はフリーになったアミノ基とTFAが塩を形成して無極性溶媒中に置かれたこととも関係すると思われるが、凝集によってビーズ内の溶媒交換が遅れ、洗浄と中和の過程の効率が低下する可能性がある。また、こうしたビーズの凝集は、伸長中の保護ペプチド鎖をその貧溶媒である dichloromethane 中に長く置き、続くカップリング過程でペプチド鎖の溶媒和を十分行えないおそれもある。

図3.2にはペプチド担持ビー

ズのリンカー部の合成と目的ペプチドの合成の2つの過程で、ビーズ全体の中でPSt-DVB以外の構造部分が占める重量%(Non-PSt%と表す)を、それぞれ矢印で示した。これらは、ビーズ担体の官能基含量(capacity)やリンカー部分の構造によって、さまざまなパターンを示す。しかしながら、実際に観測されるビーズ間の凝集は、Non-PSt%の0~10%で始まり、30~45%までの領域でのみ起こる。すなわち、ビーズの凝集は、担体ビーズの性質に依存して起きていることを意味する。dichloromethane 中ではPSt鎖は良く溶媒和され、逆にペプチド鎖は溶媒和されにくい。PSt鎖とペプチド鎖は相溶性が低いと予想されるので、おそらくビーズ中でマイクロなドメイン構造を形成して相分離していると考えられる。従って、dichloromethane 中で、ペプチド鎖領域はビーズ間でも凝集し、その結果としてビーズの粒子間の凝集が起きていると予想される。

このようなビーズ間の凝集を回避して目的ペプチドの合成を進めるには、図3.2の目的ペプチド合成の領域がNon-PSt%値で45%以上であれば良い。このような条件を満たすペプチド担持ビーズはPLINK-3, 4, 6である。すなわち、リンカー部に、短くても高capacityでペプチド鎖を導入するか、やや長いペプチド鎖を中程度のcapacityで導入するか、によってNon-PSt%値を高めることで、担体ビーズの非凝集性を実現することができる。

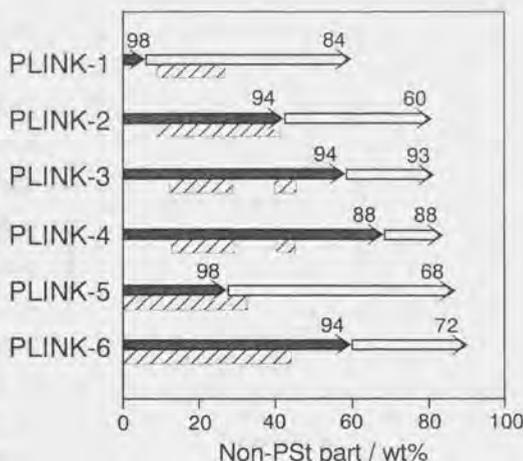


図3.2 各ペプチド担持ビーズ上での合成経過(灰色と白の矢印は、それぞれリンカー部とテストペプチドの合成に対応。ハッチングは凝集の観測された領域)

図3.2にはまた、ペプチド合成過程においてビーズの全体重量が、化学量論的に収率100%で反応が進行したときの重量に比較して、どれだけ減少しているかを、各矢印の上欄に数値で示した。Non-PSt%が低い領域では一般に減少はわずかであるが、目的ペプチドとして同じアミノ酸配列を合成しているにもかかわらず、疎水性のリンカー (PLINK-2) や高capacity (PLINK-5, 6) の場合に減少が著しい。リンカー中の官能基である-O-Mpa-は合成条件でほとんど切断されないことが示されており、また、生成ペプチドのHPLCにおい

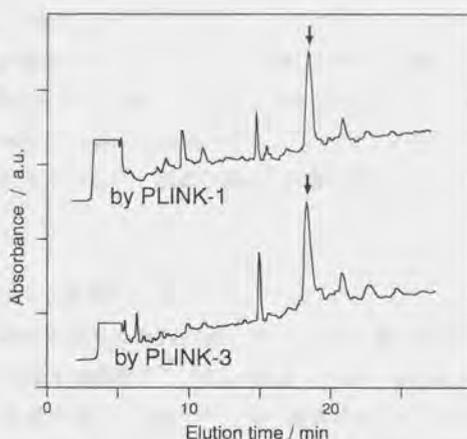


図3.3 異なるペプチド担持ビーズにより合成したテストペプチド粗生成物のHPLC (Nucleosil-5C18カラム, ホアセトニトリルのグラジエント溶出。矢印は目的ペプチド)

てはリンカー部の差異はほとんど見られない (図3.3) ことから、カップリング効率に起因するものでもない。従って、全体重量の減少は、伸長したペプチド鎖がそのつながっているPSt鎖とともにペプチド担持ビーズから溶出したためではないかと考えられる。この溶出量 (伸長時のもれ%) を表3.1にまとめた。

リンカー部、目的ペプチドの合成、最終脱保護の各段階でペプチド含量を定量した結果を同じく表3.1にまとめた。樹脂内残存率%の欄は最終脱保護後洗浄した樹脂になおも残存した目的ペプチド量を、リンカー部の初期量を基準にして示した。樹脂内残存率%

ペプチド担持ビーズ	伸長時のもれ %	樹脂上収率 %	樹脂内残存率 %	沈殿物収率 %
PLINK-1	16	84	1	45
PLINK-2	41	59	7	53
PLINK-3	7	93	14	53
PLINK-4	12	88	26	34
PLINK-5	32	68	1	54
PLINK-6	28	72	7	53

表3.1 各ペプチド担持ビーズによる同一テストペプチド合成の収率および回収率

についてはリンカーの差異が反映され、特に cleavage 反応によってカチオン性となる PLINK-3, 4 において生成ペプチドの残存が見られた。また、沈殿物収率%の欄には diethyl ether により沈殿して回収されたペプチド量を示した。この値は PLINK-2, 3, 5, 6 において良い値を示した。以上の結果から、本研究で検討した6つのペプチド担持ビーズのうちでは PLINK-3 が伸長時のもれ%が少なく、収率の点からも優れているといえる。

3.3.2 結果と考察：高親水性化ペプチド担持ビーズ

樹脂担体ビーズの膨潤度について検討した結果を表3.2に示した。リンカー部のLys残基が保護されている場合には、ペプチド鎖伸長段階で用いる DMF と dichloromethane 中で膨潤度を測定した。Non-PSt%が高い場合に DMF 中で高い膨潤度を示したが、PLINK-2, 3, 4 の同じ capacity のものを比較すると、Non-PSt%が増加すると逆に膨潤度は少し低下した。同様に PLINK-5, 6 についても Non-PSt%が増加すると膨潤度が低下した。このことは、リンカー部の鎖長が長く、またその存在量 (capacity によって決まる) が多い時に、担体の分子鎖が長いあるいは多数の分岐分子鎖を持つことになり、絡み合いの効果で膨潤性が低下したものと理解できる。リンカー部の鎖長が長くなるにつれて膨潤度が低下したことは、目的ペプチドの伸長時にも同じ効果が働くことを意味する。すなわち、伸長によりビーズの乾燥重量は増加するが、その単位重量あたりの膨潤度は絡み合い効果で低下するので、その結果反応容器中の gel-bed 体積を一定に保つ方向

ペプチド 担持ビーズ	保護基	Capacity /mmol g ⁻¹ (PSt)	Non-PSt% /%	膨潤比 / ml g ⁻¹ (dry)					
				DMF	CH ₂ Cl ₂	TFA	AcOH	1M AcOH	H ₂ O
PLINK-1	保護	0.31	4.9	3.4	5.2				
PLINK-2	保護	0.74	43.5	4.9	4.5				
PLINK-3	保護	0.74	57.1	4.7	3.3				
PLINK-4	保護	0.74	71.1	4.5	3.3				
PLINK-5	保護	2.00	24.5	5.2					
PLINK-6	保護	2.00	61.0	4.7					
PLINK-1	脱保護	0.31	4.9			<1.8	<1.8	<1.8	<1.8
PLINK-2	脱保護	0.74	43.5			3.5	2.7	1.8	1.6
PLINK-3	脱保護	0.74	44.9			3.3	2.8	2.7	2.7
PLINK-4	脱保護	0.74	59.0			3.7	2.8	3.1	3.1
PLINK-5	脱保護	2.00	24.5			3.5	2.1	2.0	1.5
PLINK-6	脱保護	2.00	45.6			3.7	2.6	2.7	2.5

表3.2 保護基の脱離前後における各ペプチド担持ビーズの種々の溶媒中での膨潤度

に作用する。このことは実際の使用において化学工学的な面からも重要な性質である。dichloromethane 中では、ペプチド性部分が増加すると、膨潤度は低下した。これは dichloromethane がペプチドの貧溶媒であるためである。

脱保護したリンカー部を持つペプチド担持ビーズについては、TFA 中で PLINK-2, 3, 4, 5, 6 とも良い膨潤を示した。酢酸中においても TFA よりは劣るものの、Non-PSt% の高いものは良く膨潤した。TFA や酢酸中での高い膨潤性は、目的ペプチドを側鎖保護のまま担体から切り離すような時に有用な性質である。溶媒を 1M の酢酸にすると、良く膨潤するものはリンカーに Lys を含むペプチド担持ビーズのみとなった。すなわち、Lys 側鎖のイオン化によりこの部分の溶解性が高まったためと考えられる。溶媒を水にした場合も同様に Lys 側鎖はイオン化していると思われ、同様の膨潤性を示した。特に PLINK-3, 4 は、水中で膨潤度 3 前後の高い値を示し、例えば、目的ペプチドをペプチド担持ビーズから切り離さずに水溶液系で試験するような用途に用いることができる。このように PLINK-3, 4, 6 のような高親水性化ペプチド担持ビーズは前項で述べた合成上の特色だけでなく、合成後の用途においても有用な性質を示すことができた。さらにこれらのペプチド担持ビーズ PLINK は、ペプチド合成だけでなく、新規な機能性の高親水性ビーズとして種々の応用展開が考えられる。

引用文献

1. G. Barany, R. B. Merrifield, *The Peptides*, Ed. by E. Gross & J. Meienhofer, Academic Press, New York (1980), Vol. 2, Chap. 1, IIC
2. G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 30, 705 (1987)
3. D. C. Sherrington, *Solid Phase Synthesis 1990*, Ed. by R. Epton, SPCC(UK) Ltd, Birmingham (1990), pp.71-86
4. K. Nokihara, T. Semba, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 7847 (1988)
5. S. L. Regan, L. Dulak, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 623 (1977)
6. W. Rapp, L. Zang, E. Bayer, *Solid Phase Synthesis 1990*, Ed. by R. Epton, SPCC(UK) Ltd, Birmingham (1990), pp.205-210
7. P. W. Small, D. C. Sherrington, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1989, 1589 (1989)
8. E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6584 (1975)
9. C. W. Smith, G. L. Stahl, R. Walter, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 13, 109 (1979)
10. R. Epton, G. Marr, B. J. McGinn, P. W. Small, D. A. Wellings, A. Williams, *Int. J. Biol. Macromol.*, 7, 289 (1985)
11. J. T. Sparrow, *J. Org. Chem.*, 41, 1350 (1976)
12. H. Koster, W. Heidmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 15, 546 (1976)
13. K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 37, 513 (1991)

14. V. K. Sarin, S. B. H. Kent, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5463 (1980)
 15. P. Goddard, J. S. McMurray, R. C. Sheppard, P. Emson, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1988, 1025 (1988)
 16. A. Dryland, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 11, 125 (1986)
 17. A. R. Mitchell, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7357 (1976)
 18. A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, M. Engelhard, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, 43, 2845 (1978)
 19. S. S. Wang, *J. Org. Chem.*, 40, 1235 (1975)
 20. B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.*, 14, 1219 (1975)
 21. J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5242 (1986)
 22. B. F. Gisin, *Anal. Chim. Acta*, 58, 248 (1972)
 23. 泉屋, 加藤, 青柳, 脇 (著), ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (1985)
- * (化合物略称は186ページ参照)

第3編

両親媒性ヘリックスタンパク質の二次立体構造形成

第4章 超二次構造の形成

4.1 序論

人工的なタンパク質の創生において、まず一次構造から二次構造をいかに設計するかが出発点である。天然のタンパク質において理解されているように、タンパク質中の二次構造単位である α -ヘリックスや β -シートは、それら単独では特定の二次構造を形成することはほとんどない。すなわち二次構造はより高次の構造の下で、はじめて二次構造として形成されるのである。従って最初のステップはむしろ、二次構造の集積体である超二次構造をいかにして設計するかにある。

こうしたターゲットとしてもっともシンプルなのが、天然のコイルドコイル¹⁾やヘリックスバンドル²⁾などの両親媒性ヘリックスの集合体である(図1.4参照)。すでにNishinoらは、21残基の両親媒性ヘリックスを形成しうるペプチドを設計合成して、サイズ排除クロマトグラフィーなどにより、ミセル状の会合体の形成を報告している³⁾。また疎水性部と親水性部の残基をいくつか変えて、最適化を図っている。DeGradoらは、やはり両親媒性ヘリックスを設計し、CD強度の濃度依存性の解析からヘリックスの会合数と会合エネルギーを見積もっている⁴⁾。すなわち単一ヘリックスの系では、濃度依存的にrandom-coil構造のモノマーが集合してヘリックスバンドル構造の4量体を形成することを示している⁵⁾。

単一のヘリックスで超二次構造形成がこのように濃度依存的であることは、それを連結すれば構造形成はより容易になると考えられる。従ってここでは、複数の両親媒性ヘリックスを連結して、その連結数や連結様式を変えた人工タンパク質を設計合成し、超二次構造の形成能および形成される超二次構造の熱力学的性質などを明確にすることを目的に、詳細な検討を加えた。連結部分としては、その部分が構造形成に関わるようにあるいは構造形成をリードするように、特定のターン構造ユニットを用いる場合⁴⁾と、逆に柔軟性を有する鎖を用いることで、ヘリックス部分が自在に構造形成できるようにする場合が考えられる。本研究では、後者の考え方で、柔軟性を重視した連結部の設計を行い、ヘリックス数2~6からなる分子を合成し、フォールディング構造の解析と温度やpHなどの構造に及ぼす影響について検討した。

4.2 両親媒性ヘリックスの設計

ここで扱う両親媒性は、親水性部と疎水性部が一分子中に存在するという意味(amphiphilicity)だけでなく、ヘリックスを円柱形として見た時、側面の片側が親水性

で反対側の側面が疎水性であるような両親媒性 (amphipathy) をさす。このような両親媒性ヘリックスの設計は、車輪表示およびhelical-network表示によって直接的に実行しやすい⁶⁾。タンパク質の構造論から、一般に α -ヘリックスの直径は、van der Waals 半径表面でみると約 1.0 nm 程度ある。また α -ヘリックスは3.6残基でヘリックス1回転、すなわち1残基あたり軸方向から見た中心角にして100 deg 回転する。同時に1残基あたり螺旋はヘリックスの軸方向に0.15nm進む。よって、1残基あたりのヘリックス表面でのスペースを計算すると、円周方向に0.87nm、軸方向に0.54nmとなる。これらの数値を用いて、より実際のイメージに近い車輪表示およびhelical-network表示が可能になる。

図4.1に、ここで設計した分子の典型的な両親媒性ヘリックスのhelical-network表示を示す。ここでは疎水性のLeu残基を全体の3/7、すなわち中心角にして平均155 degが疎水性になるようにした。これはちょうど4-ヘリックスバンドルの形成時にヘリックス相互間が十分に疎水性表面となるような角度である。残る4/7は親水性残基とし、配列を単純化するためにLysとGluのみで構成した。LysとGluの配置は、天然物で知ら

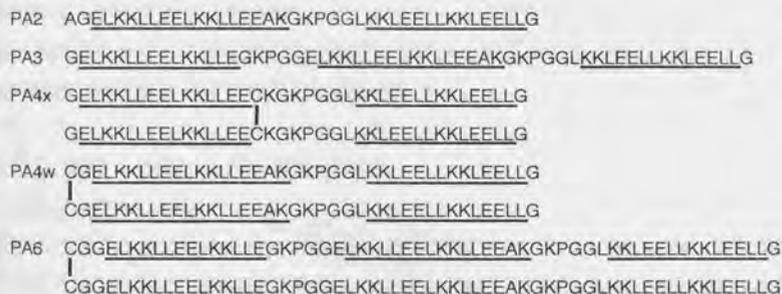


図4.1 設計ペプチドの一次構造²⁹⁾ (上図、下線はChou-Fasman法で予測される両親媒性ヘリックス部分を示す) とヘリックス部分のhelical-network表示 (下図、点線は塩結合)

れている(i+3), (i+4) 番目残基とi番目残基の間で塩結合 (salt-bridge)⁷⁾が多数形成されるように、-Lys-Lys-および-Glu-Glu-を交互に配置した。図に可能な塩結合を示した。この塩結合によって、ヘリックス構造が安定化されると期待できる。1本のヘリックスは疎水性部が4-5周回形成される14-17残基の長さにした。

ヘリックスを連結するループ部分は、ペプチド鎖によるものは-Gly-Lys-Pro-Gly-Glyの配列を用いた。2つのヘリックスの自由な配置にはヘリックス間の連結に4-5残基の長さが必要であることが、分子モデリングから予想されたため、変形自由度の高いGlyに富む5残基の配列を用いた。またProは、そのヘリックスを継続させない性質とターン構造になりやすい性質から選択した⁸⁾。別のループ部分としてはCys残基間のジスルフィド結合を利用した。Cys残基は、-Cys-Lys-, Cys-Gly-, Cys-Gly-Gly-などの自由度と親水性が高くなるような配列として用いた。

設計した分子のアミノ酸配列を図4.1に示した。各ペプチドは共通コード名PAを使用し、連結しているヘリックス数を付して図のように命名した。PA4は、分子鎖の中間でジスルフィド架橋したPA4xと、N端で架橋したPA4wを作成した。これらのペプチドのアミノ酸配列は、Chou-Fasmanの二次構造予測法⁹⁾により、設計部分がヘリックスおよびループになることを確認し、またコンピュータグラフィックスにより、ループ部分の主鎖結合の ϕ , ψ 回転角が安定な許容領域内の角度をとるときに、ヘリックスバンドル構造が支障なく形成できることを確認した。

4.3 実験：合成および物理化学測定

ペプチド合成

各ペプチドの合成はBoc法による固相合成法で行った。divinylbenzene(1%)で架橋したポリスチレン樹脂 (Bio-Rad 製, Bio-beads S-X1) に4-(hydroxymethyl) phenyl-acetamido methyl基を導入し、ここへC末端残基となるBoc-Gly-OHをMitchellらの方法¹⁰⁾で結合させた。ペプチド鎖伸長時にC端が環状ジペプチド(2,5-piperazinedione)として脱離¹¹⁾するのを避けるために、第2,3番目のアミノ酸残基は別途ジペプチドとして合成して、diethyl phosphorocyanidate (DEPC)-triethylamine法¹²⁾でカップリングさせた。このジペプチドはBocアミノ酸と、カルボキシル基をphenacyl ester (OPac)化したアミノ酸とを1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)でカップリング後、Znと酢酸によりPac基を除去して合成した。以降のペプチド鎖伸長は、Leu, Lys(CIz), Glu(OBzl), Gly, Pro, Ala, Cys(Acm)¹³⁾の各Boc保護アミノ酸を用い、ステップワイズにカップリングを行った。各サイクルのカップリングは、1回

目 DEPC-triethylamine 法、2 回目 pre-formed SA 法 (dichloromethane 中、dicyclohexylcarbodiimide (DCC) により Boc アミノ酸の対称酸無水物(SA)を作成して使用)、のダブルカップリングで行った¹⁴⁾。また脱 Boc 反応ステップでは 100% trifluoroacetic acid (TFA)を用いることで反応効率を高め、続く中和サイクルでは triethylamine-DMF-LiCl(6%)を使用した。カップリングは DMF-DMSO 系、TFA 処理前後の洗浄には dichloromethane、他の洗浄サイクルは DMF を、それぞれ溶媒として使用した。すべての反応はガラスフィルターを付けたガラス容器中で、手動操作により行った。アミノ酸配列完成後、最終脱保護反応は TFA - trifluoromethane sulfonic acid (TFMSA) - dimethyl sulfide - *m*-cresol 系試薬を用い¹⁵⁾、0°C、28 時間反応させた。ペプチドは氷冷 diethyl ether に沈殿させ、0.1M 酢酸に溶かして Sephadex G15 カラムでゲル濾過脱塩した。粗生成物の収率は、PA2, PA3, PA4x, PA4w, PA6 について、24, 17, 29, 30, 17% であった。disulfide 結合による架橋は、Cys(Acm)残基を含むペプチドに水-酢酸(1:4)混合液中、0.01M のヨウ素を作用させて行った。disulfide 結合の形成は di-(2-pyridyl)disulfide およびヨウ素滴定により確認した^{16,17)}。

精製は CM-Sephadex C-25 (17 mm x 700 mm) を使い、酢酸アンモニウム (pH6.5) の直線グラジエント (0.01 → 0.60 M) により行った。逆相 HPLC による精製を試みたが、カラム充填剤へ著しく吸着し、溶出させることはできなかった。C18 の他、C8、cyanoethyl 型の逆相カラムも同様であった。イオン交換カラムで精製したペプチドは再度ゲル濾過カラムで脱塩精製し、凍結乾燥によりペプチドの白色粉末を得た。精製ペプチドは少量を酸加水分解¹⁸⁾ (10M HCl-TFA (2:1)混合液, 165°C, 50min)し、Hitachi-835 アミノ酸分析計により、定量とアミノ酸組成分析を行った。

物理化学測定

円偏光二色性スペクトル(CD)は Jasco-J600 により測定した。10mm あるいは 1mm の光路長の角セルを使用し、0.6mM(residue)の濃度で 150mM の NaCl を含む 10mM の 3-morpholino-1-propanesulfonic acid (MOPS) バッファー(pH7.0)中で、195 ~ 260nm のスペクトルを測定した。CD の pH 依存性は、基本的な溶媒として 150mM の NaCl を含む 15mM リン酸ナトリウムバッファーを使用し、HCl あるいは NaOH で pH を調整した。pH1.3 および pH1.5 などの酸性あるいはアルカリ性は HCl-NaCl および NaOH-NaCl 溶液で代用した。また、guanidine hydrochloride (GuaHCl) による変性実験では、1.2mM(residue)の溶液とし、1mm のセルを使用した。各種濃度の GuaHCl 溶液は、15mM の MOPS バッファー(pH7.0)を含む 8M の GuaHCl 溶液を同バッファーで希釈して調製した。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Nicolet-NT360 (360MHz) により D_2O 溶液中で 20°C で測定した。測定においては溶液中に残存する軽水 (HOD) を presaturation 法により消去した。

Amino acid	PA2	PA3	PA4x (half)	PA4w (half)	PA6 (half)
Glu	8.91 (9)	13.34 (13)	8.97 (9)	9.03 (9)	13.38 (13)
Gly	5.09 (5)	7.35 (8)	4.71 (5)	4.82 (5)	8.29 (9)
Ala	1.75 (2)	1.21 (1)	0 (0)	1.00 (1)	1.13 (1)
Leu	13.26 (13)	19.10 (19)	13.31 (13)	13.16 (13)	19.20 (19)
Lys	9.80 (10)	14.32 (15)	9.00 (10)	9.33 (10)	14.36 (15)
Pro	0.93 (1)	1.69 (2)	0.86 (1)	0.90 (1)	1.81 (2)

表 4.1 合成ペプチドのアミノ酸分析結果 (括弧内は理論値)

4.4 結果と考察：ヘリックスバンドル構造の形成

合成結果

アミノ酸分析結果は表 4.1 に示したように、理論値とよく一致した。特に、PA3 と PA6 における Gly や、PA2, PA4x, PA4w における Ala で分析値が明確に区別でき、確実に合成されていることが示された。CM-Sephadex C-25 を用いたイオン交換クロマトグラフィーでは、いずれのペプチドもシャープなピークを与えた (図 4.2)。ここで PA2 のみは主ピークの後に副ピークが出現したが、アミノ酸組成はまったく同一で、それぞれのピークはモノマーとダイマーによるものと考えられた。すなわちこの条件下で PA2 は会合体を形成し、その平衡は交換が遅い過程であることを示している。

円偏光二色性スペクトル

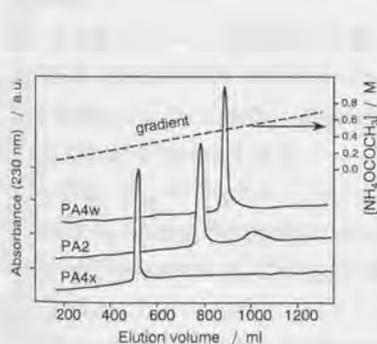


図 4.2 ペプチド粗生成物のイオン交換クロマトグラム (いずれも同一のカラムおよび溶出流速による実験)

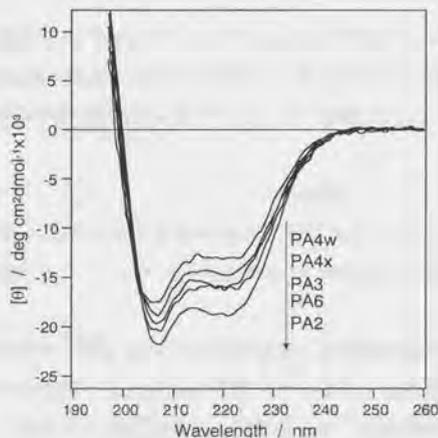


図 4.3 ペプチド PA の CD スペクトル (pH7.0 リン酸バッファー中、 20°C)

20°CにおけるCDスペクトルを図4.3に示した。いずれのペプチドも α -ヘリックスに富むスペクトルパターンを示した。CDスペクトルから二次構造含量を評価する方法はいくつか提案されている。一般には α -ヘリックス、 β -シート、その他の3つに分類する方法が簡便に利用されてきた。しかしながら、 β -シートをさらに並行と逆並行に分類したりするなど、より詳細な分類が正確な二次構造含量評価には必要であると主張されるようになっている¹⁹⁾。ただし、これは二次構造がすでにわかっているタンパク質からの議論で、全く未知のタンパク質については、パラメータを増やすことが必ずしも正確な結果を導くという保障はない²⁰⁾。二次構造のうちで、 α -ヘリックスはそのCDパターンが他と異なって特徴的であることと、その特性バンドである222nm付近で他の二次構造のCD強度があまり高くないことから、 α -ヘリックスに富むタンパク質についての解析は、単純な方法でも比較的信頼できると考えられる。ここでは、Chenらによって考案された方法²¹⁾と、筆者によるその改良法、そしてCONTIN法²²⁾の3つの方法で二次構造含量を評価した。

Chenらの方法はX線構造解析がなされている球状タンパク質について、測定したCDから各二次構造の標準的なスペクトルを割り出すというもので、特に、 α -ヘリックスについてヘリックス鎖長依存性の項を導入している点に特徴がある。これは鎖長 n の式として、

$$[\theta]_H = [\theta]_H^0 (1 - k/n) \quad (\text{eq.4.1})$$

で表され、

$[\theta]_H^0$ と k のパラメータは波長毎に文献に与えられている²¹⁾。一般に222nmでのヘリックス以外の構造は $[\theta]$ が3000 deg cm²dmol⁻¹程度(1000~5000)であるので²³⁾、先にこの値を $[\theta]_R$ として仮定し、鎖長 L のタンパク質中に m 本のヘリックスが鎖長 n_1, n_2, \dots, n_m に含まれているとすると、

$$[\theta]_H = [\theta]_H^0 (f_H - mk/L) + [\theta]_R (1 - f_H) \quad (\text{eq.4.2})$$

が成立する。222nmでの実測の $[\theta]$ 値を用い、設計した L と m の値を代入すると、ヘリックス含量 f_H を算出できる。この方法で求めた α -ヘリックス含量を表4.2のMethod-A欄に示した。

Provencherらにより考案されたCONTIN法²²⁾は、スペクトル波形を二次構造含量が既知であるタンパク質の多数のスペクトルの加重平均で完全に再現できるような加重係数を最適化計算で求めるもので、こうして得られた加重係数に、対応するタンパク質の二次構造含量率を掛けて総和を求めると、未知タンパク質の二次構造含量が計算できる。この方法で得たヘリックス含量を同じく表4.2に示した。

上記の2つの方法で得たヘリックス含量はほぼ一致したが、設計した配列をChou-Fasman法⁹⁾でヘリックス予測した結果(表4.2のC.&F.欄)に比べて、いくらか小さい値であった。そこで先の(eq.4.2)を、代表的なヘリックスタンパク質であるト

method	PA2	PA3	PA4x	PA4w	PA6
C. & F.	78	78	74	78	75
CONTIN	60	48	50	56	38
Method-A	63	54	56	57	49
Method-B	82	69	73	74	63

表4.2 4種類の方法によるヘリックス含量の比較

ロポミオシンとそのモデル化合物²⁴⁾に適用した。これらは完全なコイルドコイルとして知られているので、 f_H を100%と仮定して、逆に $[\theta]_{H^0}$ のパラメータ値を決定した。 $[\theta]_{H^0}$ 値は204~243nm域で3nm毎に、-1.52, -2.45, -2.57, -2.46, -2.54, -2.67, -2.77, -2.68, -2.11, -1.38, -0.93, -0.56, -0.29, $-0.09 \times 10^4 \text{ deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$ となった。球状タンパク質とコイルドコイルとの $[\theta]_{H^0}$ 値の差異は、両者のヘリックスが ϕ 角において若干異なっていることが原因と思われる。これらのパラメータ値を使用してペプチドPAのヘリックス含量を計算すると、表4.2のMethod-B欄のような結果になる。この値はヘリックス含量の設計値により近く、このことからPAがほぼ設計通りの二次構造をとっていると推定される。また、PAのヘリックスは球状タンパク質中のヘリックスよりも、むしろコイルドコイルに近い特徴をもっていること、すなわち両親媒性ヘリックスの会合体であることが示唆される。PAのうちではPA3とPA6のヘリックス含量が、他と比べて設計よりやや低かった。

ペプチドPAの α -ヘリックス以外の部分の二次構造を調べるために、PAの実測CDスペクトルから、改良Chen法(Method-B)で予測されるヘリックス部分のみのスペクトルを差し引き、残基あたりのモル楕円率に換算して示した(図4.4)。このCDスペクトルは、ランダムコイル構造のポリアミノ酸について報告されているスペクトルに類似していた。ポリアミノ酸では196~202nmに $-5.0 \sim -2.5 \times 10^4 \text{ deg cm}^2\text{dmol}^{-1}$ のマイナスピークを示す²⁵⁾。この領域に β -シート構造は正の楕円

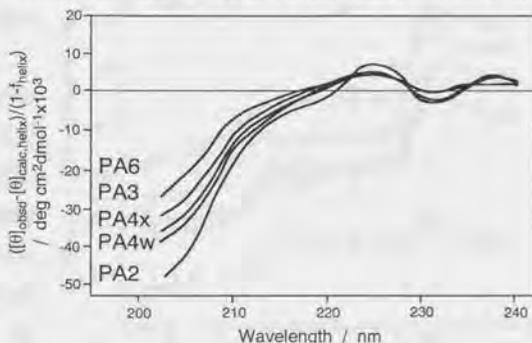


図4.4 ペプチドPAの非ヘリックス領域の換算CDスペクトル

率を持つので²³⁾、ヘリックス部以外の構造は β -シートではなく、比較的鎖の広がったランダムコイル的な構造であると予想される。

温度依存性

ヘリックス構造に特異的な $[\theta]_{222\text{nm}}$ の温度依存性を図4.5に示した。各ペプチドは緩やかな熱転移を示し、Hodgesらのペプチド²⁴⁾の熱転移挙動に似ていた。90℃においても $[\theta]_{222\text{nm}}$ は4℃の時の60～70%程度あり、熱的にかかなり安定であった。特に、PA2は $[\theta]_{222\text{nm}}$ の強度減少率が小さく安定であった。このことはPA2のフォールディングの特徴が他と少し異なっていることを示唆している。全体的な転移のブロードさはヘリックスの会合体が多安定状態であることを意味している。このことはペプチドPAが両親媒性ヘリックスの比較的自由度の高い連結による会合体であることに起因していると思われる。熱安定性に関して、disulfide結合による架橋の効果は見られなかった。

pH依存性

同様に $[\theta]_{222\text{nm}}$ のpH依存性を測定した結果を図4.6にプロットした。pH6～10の領域で $[\theta]_{222\text{nm}}$ は、いずれもほぼ一定値を示し、より酸性側では強度が増加、アルカリ性側では減少した。しかしながら変化量はあまり大きくなかった。酸性側でのpH3～6、アルカリ性側でのpH10.5～12の転移域はGluおよびLysの側鎖の解離 pK_a と関連していると考えられる。アルカリ性側で $[\theta]_{222\text{nm}}$ の強度減少は、Lys側鎖が非イオン化し、そのためヘリックス部分の両親媒性が低下して部分的にヘリックスがほど

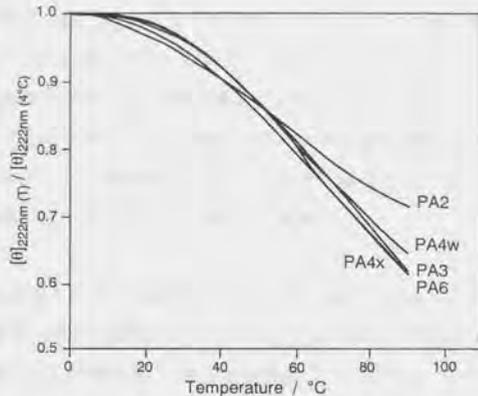


図4.5 ペプチドのモル楕円率の温度依存性 (222nmの強度を4℃の時の値で規格化)

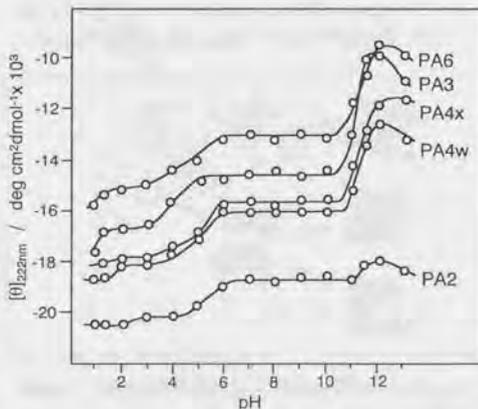


図4.6 222nmのモル楕円率のpH依存性

けたためと推定される。一方、酸性側での $[\theta]_{222nm}$ の強度増大は、ヘリックス含量の増加は設計構造から考えにくいので、 ϕ 角の微妙な変化によるものと思われる。Eisenbergらは、親水性残基の非極性部分がタンパク質の構造安定化に大きく寄与していることを報告している²⁶⁾。ペプチドPAの場合、Lys側鎖のmethylene基が構造安定化に寄与しているため、酸性側でもヘリックスが安定で、逆にアルカリ性でLysの非イオン化により親水性側面が一部疎水化して不安定化したと考えられる。

Guanidine 変性

PAの $[\theta]_{222nm}$ は、GuaHCl濃度の増加とともに強度が小さくなり、8MのGuaHCl中で約1000 deg cm²dmol⁻¹になり完全な変性状態となった。 $[\theta]_{222nm}$ の相対的な変化を図4.7に示す。全体的な転移の中心はPA2が最も高いGuaHCl濃度で、PA3とPA6が低かった。いずれの変性曲線も、2M

付近と5.5M付近の2箇所での転移からなっている。PA2は5.5M付近で、5種類のうちで最も急なすなわち協同性の高い転移を示した。一般に両親媒性ヘリックスはヘリックス間で会合することで安定化しており、単一のヘリックスで存在することは困難である。従って2M付近での第一段階の転移では会合状態が変化して、一部のヘリックス間会合にあずからないヘリックスが壊れたためと考えられる。次に5.5Mでは、残っていたヘリックス会合体も壊れてすべてランダム構造になったと解釈できる。

このような2段階転移は図4.8のようなモデル図で、次のように説明することができる。すなわち、ヘリックス間を会合させている相互作用に、強いもの(=で図示)と弱いもの(・で図示)が存在すると考える。図の

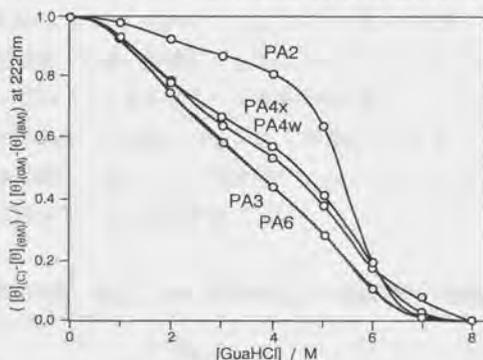


図4.7 グアニジン塩酸塩による変性曲線 (CDの222nmの強度を0Mと8Mでの値で規格化した)

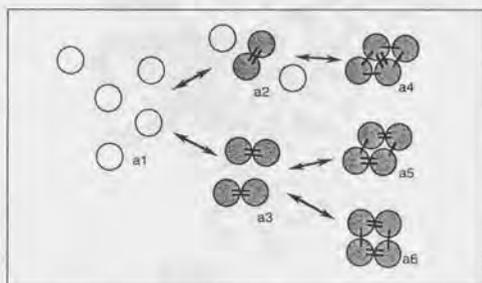


図4.8 変性過程の模式図 (○は分子内のヘリックスになりうる単位、グレイはヘリックスを形成した領域を示す)

a4, a5, a6 では4-ヘリックスバンドルを示すが、熱転移挙動から予想される多安定構造は、強弱の相互作用のパターンの違いにも因っていると思われる。まず、第一段階の変性は相互作用のうち弱い部分が切れることによって、a2やa3のような形態に変化する。このとき、PA2ではa3タイプのものがより多く形成されるためにヘリックス含量の低下はほとんどない。PA2以外ではa2ができやすいために、ヘリックス含量は大きく低下する。さらに、第二段階の変性では強い相互作用部分も切れるのですべてのヘリックスは孤立ランダム構造になる。こうして2段階の転移が説明できる。PA3とPA6の第一段階での変性の程度が、PA4xやPA4wより大きいのは、4-ヘリックス以外のバンドル構造では多形性がより著しいためと推定される。天然においても6本のヘリックスがバンドル構造にきちんと整列したものは例がなく、ねじれたり、かなり変形したフォールディング構造をとっている。変性実験結果から、PA3やPA6も、バンドルからかなり変形したフォールディング構造ではないかと推定される。前述したように、ヘリックス間の接触的相互作用は構造データ²⁷⁾から、ヘリックス1周回あたり1残基程度が寄与しているのみである。ここで設計したペプチドは-Leu-の周期と-Leu-Leu-の周期が交互にあり、従って2つのヘリックス間の相互作用に関してはLeuが1個余分になる。このことが他のヘリックスとの間の弱い相互作用になっていると思われる。

ヘリックス連結体の構造

以上、CDスペクトルの二次構造解析の他、温度、pH、変性剤による構造変化の実験

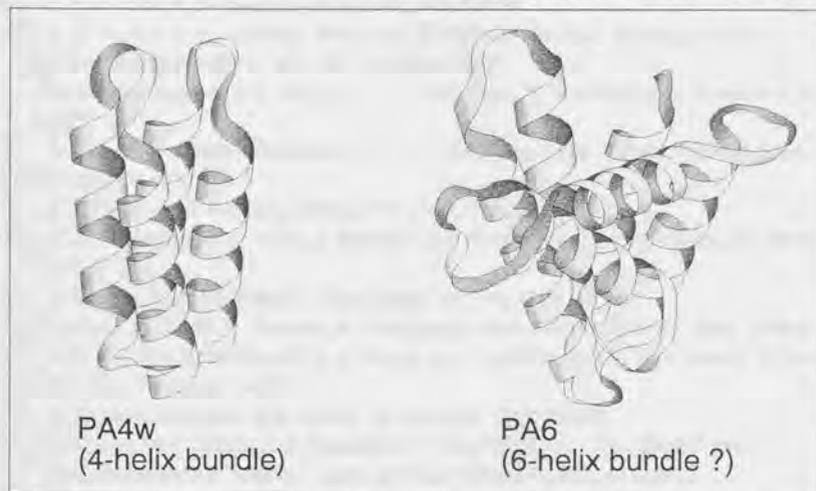


図 4.9 人工タンパク質 PA の推定構造 (構造は多安定で種々の構造を取りうる)

結果から、 α -ヘリックスの連結体である各種PAの水溶液中での構造として、両親媒性ヘリックスの会合体であると結論できる(予想構造の一例を図4.9に示す)。このヘリックス会合体は柔軟な連結部でつながれているため、多安定構造で、明らかに天然タンパク質のような一義的に規定されたフォールディング構造とは異なっていた。このことは $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、ピークのプロード化が観測されたことから推定される。2-ヘリックス体のPA2については、架橋の効果がないために、他のPAよりも変性剤による転移は協同的であった。架橋位置の異なるPA4xとPA4wについては、ここでの実験結果において、あまり違いは見いだせなかった。しかしながら、同様のDeGradoらの4-ヘリックス体と比較するとGuaHCl変性挙動がかなり異なっている。これらの結果は、ヘリックスをつないでいるループ部分の長さや構造がヘリックス会合体のフォールディングに重要な寄与をしていることを意味している。機能性の人工タンパク質の設計において、連結部分の設計もまたヘリックス部分と同様に重要と考えられる²⁸⁾。

引用文献

1. F. H. C. Crick, *Acta Crystallogr.*, 6, 689 (1953)
2. P. C. Weber, F. R. Salemme, *Nature*, 287, 82 (1980)
3. N. Nishino, Y. Sugita, T. Yamamoto, T. Fujimoto, *Rep. Asahi Glass Found. Ind. Technol.*, 48, 149 (1986)
4. S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 6751 (1987)
5. L. Regan, W. F. DeGrado, *Science*, 241, 976 (1988)
6. G. E. Schulz, R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979) / 大井龍夫 監訳, タンパク質, 化学同人(1980)
7. M. Sundaralingam, Y. C. Sekharudu, N. Yathindra, V. Ravichandran, *Proteins*, 2, 64 (1987)
8. P. J. Flory, *Statistical Mechanics of Chain Molecules*, Chap. 7, John Wiley & Sons, New York (1969)
9. P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry*, 13, 222 (1974)
10. A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, M. Engelhard, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.*, 43, 2845 (1978)
11. B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 3102 (1972)
12. N. Ikota, T. Shioiri, S. Yamada, S. Tachibana, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 3347 (1980)
13. D. F. Veber, J. D. Milkowski, S. L. Varga, R. G. Denkwalter, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 5456 (1972)
14. H. Morii, K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62, 2730 (1989)
15. J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5242 (1986)
16. D. R. Grasseti, J. F. Murray, *Arch. Biochem. Biophys.*, 119, 41 (1967)
17. M. J. F. Diez, D. T. Osuga, R. E. Feenay, *Arch. Biochem. Biophys.*, 107, 449 (1964)
18. A. Tsugita, J.-J. Scheffler, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 58, 1 (1982)

19. I. A. Bolotina, V. O. Chekhov, V. Y. Lugauskas, *Int. J. Quantum Chem.*, 16, 819 (1979).
20. P. K. Sarkar, P. Doty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 55, 981 (1966)
21. Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350 (1974)
22. S. W. Provencher, J. Glockner, *Biochemistry*, 20, 33 (1981)
23. 浜口浩三, 武貞啓子 著, 蛋白質の旋光性, Chap. 3, 学会出版センター (1971)
24. R. S. Hodges, A. K. Saund, P. C. S. Chong, S. A. St-Oierre, R. E. Reid, *J. Biol. Chem.*, 10, 1214 (1981)
25. A. J. Adler, R. Hoving, J. Potter, M. Wells, C. D. Fasman, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 4736 (1968)
26. D. Eisenberg, A. D. McLachlan, *Nature*, 319, 199 (1986)
27. T. J. Richmond, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.*, 119, 537 (1978)
28. H. Morii, S. Honda, K. Ichimura, H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, 396-402 (1991)
29. (アミノ酸の略称については、)
IUPAC-IUB Comm. Biochem. Nomencl. *Arch. Bio-chem. Biophys.*, 125, i-v (1968)
- * (アミノ酸保護基および試薬の略称については、)
泉屋信夫, 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典 著, ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (1985)
- * (本文中の化合物略称等は 186 ページ参照)

第5章 両親媒性ヘリックスの予測法の開発と適用例

5.1 序論

前章においては、両親媒性ヘリックスが形成されるようなアミノ酸配列を設計することにより、実際に両親媒性ヘリックスの集合構造が形成されることを示した。本章では、両親媒性ヘリックスによる構造形成部位を、天然タンパク質において見いだすための評価予測方法を開発し、モータータンパク質を例として、実際にタンパク質を合成し characterization することで、その有効性を評価した。設計と予測は原理的には同一のものであるが、例えば、両親媒性の原理に基づくペプチドの設計においては、構造形成を実現するために、過剰の安定性を付与しがちである。しかしながら、天然タンパク質においては、過剰な安定性を進化において獲得していることはあまりなく、機能発現のためには、ある程度以上の安定性は必要でなく、むしろ安定性よりも別の要因が重要であると考えられる。端的には、好熱菌等由来でない一般の機能タンパク質の多くは 100°C 以下の温度で熱変性をすることからも、人工設計と自然界の設計の本質的な違いが考えられよう。基質を要求する酵素では基質を取り込んで構造変化した状態での安定性が重要となるため、取り込み前の極度な安定性は酵素機能に障害となるのではないかと考えられる。このような、より生物学的な機能を構造面から考察するには、構造を熱力学的観点で評価する必要がある。実験的に安定性を評価することはできるが、その場合には平衡論的にはドメイン全体であったり、速度論的にはフォールディングの経路に沿った安定性を評価することになる。一方、設計において必要なのは、これらのみでなく、局所的な安定性の評価である。安定性を評価し予測することができれば、生物学的な適度な安定性を有するタンパク質の設計が可能になる。またこのような評価法によって、未知の立体構造をアミノ酸配列から予測することも可能である。例えば本研究の主題である、代表的な構造である両親媒性ヘリックスのつくる coiled-coil 構造^{1,2)}は、globular な部分から孤立して形成される構造であるため、long-range の構造の影響が少なく、globular な部分の構造予測よりも確実性が高いと期待される。

ここで取り上げるキネーシン(human kinesin heavy chain, 一次構造を図5.1に示す)は、myosin や ncd などと構造的にも類似の駆動部分を有するモータータンパク質で tubulin の集合構造体である微小管上を運動する(図5.2)。これらのタンパク質のヘッド部分(motor domain)は ATPase 活性を有し³⁾、運動は ATP 分解エネルギーと共役している^{4,5)}。電子顕微鏡等によりキネーシンは図5.2の模式図に示すような、stalk 部分で二

	+10	+20	+30	+40	+50	+60
0	MADLAECNIK	VMCRFRPLNE	SEVNRGDKYI	AKFQGEDTVV	IASKPPYAFDR	VFQSSSTSQEQ
60	VYNDCAKKIV	KDVLGEGYNGT	IFAYGQTSBG	KTHMTEGKLS	DPEGMGIPR	IVQDIFPNYIY
120	SMDENLEPHI	KVSYFEIYLD	KIRDLLDVEK	TNLSVHEDKN	RVPYVKGCTE	RFVCSPEDEVM
180	DTIDEGKSNR	HVAVTNMNER	SSRSHSIFLI	NVKQENTQTE	QKLSGKLYLV	DLAGSEKVSX
240	TGAEGAVLDE	AKNINKSLSA	LGNVISALAE	GSTYVPPYRS	KMTRILQDSL	GGNCRTTIVI
300	CCSPSSYNES	ETKSTLLFGQ	RAKTIKNTVC	VNVELTAEQW	KKRYEKEKEX	NKILRNTIQW
360	LENELNRWRN	GETVPIDEQF	DKEKANLEAF	TVDKDITLTN	DKPATAIGVI	GNFTDAERRK
420	CEEEIARLYR	QLDDKDEEIN	QQSQLVEKXK	TQMLDQEBLL	ASTRRDQDMN	QARLNRLQAE
480	NDASKEEVKE	VLQALEELAV	NYDQKSQEVE	DKTKEYVELLS	DELNQKSATL	ASIDAELOKRL
540	KEMTNHKKKR	AAEMMASLLK	DLAEGIAVNG	NNDVKQPEGT	GMIDEETVA	RLVISKMKSE
600	VKTMVFRCKQ	LESTQTESNK	KMEENEKELA	ACQLRISOHE	AKIKSLTEYL	QNVEQKKRQL
660	EESVDALSEE	LVQLRAQEKV	BEMEKEHLNK	VQTANEVQQA	VEQQIQSHRE	THQKQISSLR
720	DEVEAKAKLI	TDLQDQNKM	MLEQERLRVE	HEKLLATDQE	KSRKLEHETV	MQDRREQARQ
780	DLKGLEETVA	RELQTLHLNR	KLFVQDLATR	VKKSAEIDSD	DTGGSAAQKQ	KISFLENNLE
840	QLTKVHRQLV	RDNADLRCEL	PKLEKRLRAT	AERVKALESA	LKEAKENASR	DRKRYQQEVD
900	RIKEAVRSKM	MARRGSHAQI	AKPIRPGQHP	AASPTHPSAI	RGGGAFVQNS	QPVAVRGGGG
960	KQV					

図5.1 キネーシンのアミノ酸配列 (PIR: A41919 より)

量体化した形で機能することが推定されている^{6,7)}。キネーシンのmotorドメインはアミノ酸配列上40%のホモロジーを有しているが、motorドメインがキネーシンではstalkよりN端側にあるのに対して、ncdはC端側にある。最も興味深い点は、キネーシンとncdでは方向性のある

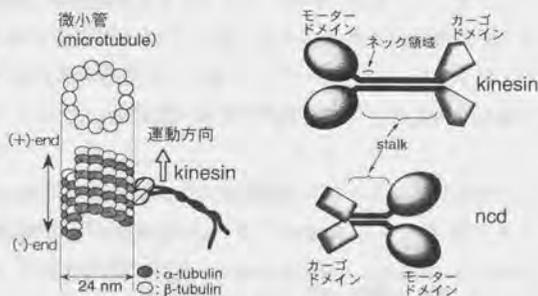


図5.2 キネーシンの微小管上での運動と、ncdとの構造比較

微小管の上を運動する方向が逆転していることである^{8,9)}。運動性については、motorドメイン単独では遅く、二量体化してはじめて速い方向性のある運動をする。motorドメインのN端とC端は近接しているため、motorドメインとstalkの接続部分(ネック領域)に、2つのタンパク質において運動性の差を引き起こす微妙な差があるのではないかと予想される。本研究ではこの領域の構造を明らかにするために、合成的手法と合わせて検討を行った。また、両者のmotorドメイン^{10,11)}の差異についても分光学的検討を行った。

5.2 両親媒性ヘリックスの予測

両親媒性ヘリックスはEdmundson wheelと呼ばれる車輪表示¹²⁾やhelical network

と呼ばれる円筒表示によって、視覚的にその特徴を容易に把握することができる。円筒表示をベクトル化して数値的に評価する方法として、Berzofskyらにより AMPHI が提案されている^{13,14}。これは抗原性部位の抽出同定に有効であったが、ベクトル化により両親媒性の情報を限定しすぎているため詳細な議論には適していない。一方近年、両親媒性ヘリックスのうちで2量体化してcoiled-coilを形成するものについて、Lupasらは統計的な存在確率をベースにした予測法を開発した¹⁵。さらにこれを改良したBergerらの方法(PAIRCOIL)も提案されている¹⁶。どちらの方法もモータータンパク質などの長いcoiled-coil鎖のheptad周期での各アミノ酸残基の出現頻度を、coiled-coilでないglobularなタンパク質のそれと比較してこれをスコア化したものである。例えば、Leuは疎水性コアのa,d位置にはよく出現するので高いスコアが与えられ、他のb,c,e,f,g位置にはあまり存在しないので低いスコアとなる。この方法は、一種のホモロジー手法であるために既知のcoiled-coilに類似した配列を効率よく抽出できる。またこのことは欠点でもあり、coiled-coil形成能はあってもホモロジーが低いために検出もれの可能性もある。別の問題点は、poly(Glu)のような親水性アミノ酸ポリマーでは、b,c,e,f,g位置のみでも高いスコアを獲得してしまうために、a,d位置に疎水性残基がなくても全体では高スコアを得てしまう危険性がある。

このような問題点の克服と、coiled-coilに限定しない両親媒性ヘリックスの予測を行う目的で、本研究では熱力学的パラメーターをベースにした新しいアルゴリズム(AMPHISEARCH)を開発した。この方法は以下の手順からなる(図5.3)。

[1] アミノ酸配列をheptad repeat frameへ割り当てる: heptad repeat frameはa, b, c, d, e, f, gの7残基周期の繰り返し^{17,18}で、a, d位置をここではcoreと呼び、残りの位置をoutfieldと呼ぶことにする。frameの割り当ては7種類可能で、それぞれをa位置の残基番号を7の倍数表現(7N-i)することで区別する。例えば、残基番号348, 349, ..., 354をa, b, ..., gに割り当てた場合には、348=7*50-2であるからこの割り当て方を7N-2と呼ぶ。

[2] 各残基へ基本スコア G_i (kcal/mol) を

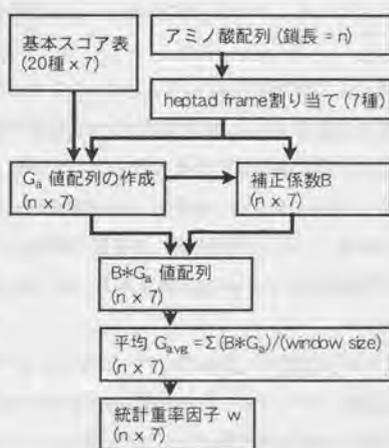


図5.3 AMPHISEARCHの計算フロー図
(計算プログラムは章末³⁴)を参照)

与える: 7種類のframeの割り当て方*i*のそれぞれについて、各残基*j*毎にcore位置かoutfield位置かに応じて基本スコア G_a を与える。基本スコアは $G_a(i,j)$ のmatrixとなる。この基本スコアには、Leu(-1.72, 0), Ile (-1.86, 0), Val (-1.36, 0), Met (-1.38, 0), Phe (-1.36, 0), Tyr (-1.01, 0), Gly (0, 0), Ala (-0.42, 0), Lys (0, -1.95), Arg (0, -1.77), His (-0.18, 0), Glu (0, -1.07), Asp (0, -1.05), Gln (0, -0.50), Asn (0, -0.82), Ser (0, -0.05), Thr (-0.35, 0), Cys (-0.48, 0), Trp (-1.01, 0), Pro (-0.98, 0)の値を採用した(括弧内はcore, outfieldの順にスコア値を示す)。基本スコアは、Fauchereら¹⁹⁾の報告しているアミノ酸側鎖のoctanolから水への相間移行エネルギー ΔG_{obs} をもとにしている。疎水性アミノ酸がcore位置の時、 $G_a = -\Delta G_{obs}$ また親水性アミノ酸がoutfield位置の時、 $G_a = \Delta G_{obs}$ とし、ともに両親媒性ヘリックスの安定化に寄与するので G_a は負の値になるようにした。また、それぞれ逆の位置にある時には基準状態として $G_a = 0$ とした。 ΔG_{obs} に関しては、ヘリックス構造においてはアミノ酸側鎖は完全に溶媒に露出していないので、LeuとIleについて、 ΔG_{obs} をそのmethylene基相当分(0.6kcal/mol)減じた。同様の理由でVal, Met, Tyr, Lys, Arg, Glu, Gln に対して疎水性部分の長さに応じて、 G_a のもととなる ΔG_{obs} に0.3, 0.3, 0.3, 0.6, 0.4, 0.2, 0.2 kcal/molを減じる補正を加えた。Cysに対しては、Metより炭素数が2個少ないので、1.2 kcal/molを減じた。第7章の実験結果では、芳香族アミノ酸はその高い疎水性にもかかわらず、両親媒性ヘリックスの安定化への寄与が低いことから、PheはValと同じ、またTrpはTyrと同じ値を採用して、実験的な安定性の差を反映するようにした²⁰⁾。なお、Glyはcore, outfieldとも0にし、Proについては特別な補正を加えなかった。

[3] outfieldにおけるスコア G_a に補正係数Bを乗じる: 前述したように親水性アミノ酸ポリマーが高いスコアを獲得しないように、その残基の両側の最も近いcore位置の疎水性に応じてoutfield位置のスコアを補正した。例えば、g位置のスコアは、d位置および次のa'位置のスコアから、 $B = (G_a(d) + G_a(a')) / (-4 \text{ kcal/mol})$ を求め、Bを無次元数として、基本スコア G_a に乗じた。core位置については $B=1$ である。実例で示すと、dがLeuでa'がAlaなら、 $B = ((-1.72) + (-0.42)) / (-4) = 0.535$ を、dとa'の間のe, f, g位置の基本スコアに乗じる。

[4] 一定範囲において BG_a を平均化: ここではwindowサイズmを15残基として、 $G_{avg} = \Sigma(BG_a) / m$ により計算した。この長さは球状タンパク質中の α -ヘリックス鎖長5~20程度に比べてやや長めであるが、両親媒性ヘリックスがバンドル構造を形成するには3~4回転分は最低必要であることからこのサイズを選択した。

[5] エネルギー値 G_{avg} を統計重率因子wに変換: エネルギーの単位で表されたスコア

G_{avg} を $w = \exp(-G_{avg}/RT)$ により統計重率因子 w に変換する。ここでは温度は 20°C として計算した。最終的に両親媒性ヘリックス形成能のスコアは $w(i,j)$ の matrix で与えられる。ここで i は heptad repeat frame の種類、 j は残基番号を表す。 w 値が大きいほど両親媒性ヘリックスを形成する可能性が高いことを意味する。

以上の手順で計算されたスコアの妥当性を見るために、典型的なアミノ酸配列について計算を行った。そ

の結果を表 5.1 にまとめた。Leu と Glu からなる 7 残基周期の配列では、両親媒性といえるのは #3 ~ #6 のモデルで、#2 と #7 は境界領域である。これらの最大値を与える heptad repeat frame についての平均値、ピーク値は約 3 で、 $w=3$ が両親媒性を判定する基準値と考えることができる。#9 と #10 では 2 と 3 残基周期についての結果を示したが、明らかにスコアは低い。この方法で得られる情報は優位な heptad repeat frame のスコア値の大小だけでなく、優位な heptad repeat frame の多重度から疎水性面が角度にしてどの程度の広がりを持っているかを判別できる。例えば、疎水性面の広い #3 では 4 種類の heptad repeat frame が高い値を与える。これに対して、#6 は優位なものは 1 種類のみであり、このように多重度と疎水性面の広がりに相関がある。

構造の明らかにされているタンパク質へ適用した結果は、tropomyosin α では (20-30) 領域を除いて高い coiled-coil 性を示した。しかも全長にわたって heptad repeat frame は 1 種類、すなわち単一ドメインであった。また、meromyosin はほぼ全長が coiled-coil と予想されたが、heptad repeat frame の種類としては 4 つのドメインからなっていた。myohemerythrin や cytochrome b_{562} では 4-ヘリックスバンドルのうち 3 本の両親媒性ヘリックスを予測できた。一方、bacteriorhodopsin はスコアは低く、多重度が大きかった。すなわち疎水性のヘリックスであることを意味している。このように本法 AMPHISEARCH においては、両親媒性ヘリックスの分類やドメインの領域決定も含めた予測が可能である。さらにつけ加えると、本法は基本スコアに熱力学的なパラメーターを採用しており、そのため非天然アミノ酸に対してもスコアを与えることができるとい

モデル	アミノ酸配列	優位な heptad frame		第二優位 frame
		平均値	ピーク値	平均値
1	(LLLLLLL) _n	2.34(7)	2.68	
2	(LLLLLEL) _n	2.93(5)	3.30	1.53(2)
3	(LLELLEL) _n	3.66(4)	4.08	1.71(2)
4	(LEELLEL) _n	4.59(3)	5.03	1.92(2)
5	(LEELLE) _n	5.74(2)	6.21	2.14(2)
6	(LEEELEE) _n	7.19(1)	7.67	2.40(2)
7	(LEEEEE) _n	2.68(2)	3.06	1.00(5)
8	(EEEEEEE) _n	1.00(7)	1.00	
9	(LE) _n	2.14(7)	2.48	
10	(LEE) _n	1.85(7)	4.36	

表 5.1 モデルアミノ酸配列への AMPHISEARCH の適用 (括弧内は 7 つの frame shift のうちの多重度を示す)

う長所がある。

5.3 実験：キナーシンのネック領域の合成と解析

合成

図5.4に示した5種類のフラグメントペプチドを、Fmoc固相合成法により、Shimadzu-PSSM8 合成機で合成した。合成用樹脂単体には、C 端アミドを与える TGS-CHA (Shimadzu)レジンを使用し、合成試薬には0.2MのTBTU-HOBT-NMM(1:1:2)を用い、各サイクル25分間のカップリングを行った。脱Fmocにはpiperidine-DBU、溶媒にはDMF-DMSO(80:20)を使用した。最終脱保護はTFA-EDT-water-phenol(90:6:3:1)を使用し100分反応後、冷diethyl etherに沈殿させて粗ペプチドを回収した。遠心機にかけ上層除去、diethyl ether洗浄を繰り返し、乾燥後10%酢酸に溶かしてRP-HPLCで分取精

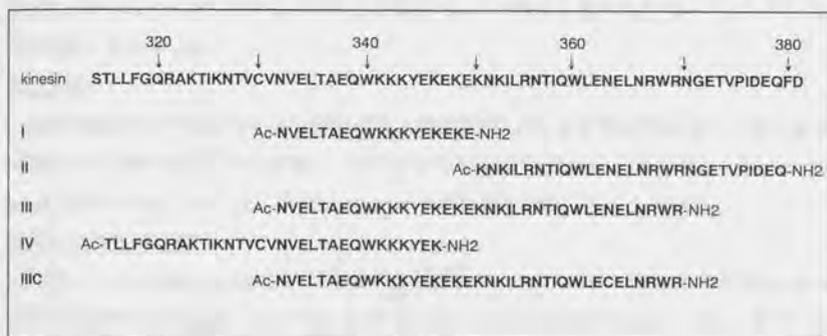


図5.4 キナーシンの予想されるネック領域と合成したペプチドのアミノ酸配列

製し、凍結乾燥により目的ペプチドを得た (HPLC分析純度は97-99%)。ペプチド濃度は280nmの吸光度²¹⁾から決定した。

各ペプチドはelectrosprayed ionization mass spectroscopy (ESI-MS)測定により同定した。測定はAPI-III(Perkin Elmer Sciex Instr.)により行った。各ペプチドの分子量は、I, 2321.5, 2321.5; II, 3749.2, 3749.2; III, 4926.7, 4928.4; IV, 3809.0, 3809.3 (ペプチド名、実測値、理論値の順)であった。

ペプチドIIICは、IIIの363位をCys置換したもので、精製後このCysをN-(9-acridinyl) maleimide (NAM) (Dojin 製)あるいはN-[p-(2-benzimidazolyl)phenyl]maleimide (BIPM) (Teika 製)で蛍光ラベルした。合成は、1.5 μ molのペプチドIIICを20mMのリン酸buffer (1.7m l)に溶かし、pH7に調整したのち、2 μ molのNAMあるいはBIPM

の acetone 溶液を添加、20°C で 2.5 時間反応させた。反応は 2-mercaptoethanol (30 μ l) 添加で止め、続いて 1M の NaOH を 0.5 ml 加えて 2.5 時間 maleimide 環の開環反応を行った。その後 AcOH を添加して pH3 程度にし、RP-HPLC で精製した。得られたペプチドは ESI-MS により同定した。分子量は、IIIC-NAM, 5208.2, 5209.7; IIIC-BIPM, 5225.0, 5224.7 であった。ラベルしたペプチドの濃度は、CD 強度がペプチド III と同じであるとして決定した。

キネーシン (human kinesin) のフラグメント K349(1-349), K379(1-349) および *Drosophila ncd* のモータードメインは大腸菌で発現させたものを用いた^{11,22)}。

円偏光二色性

CD スペクトルは Jasco-J600 により測定した。濃度変化に対応して 0.2 ~ 10 mm の光路長のキュベットを使用した。スペクトルは 20°C で測定し、buffer には 500 mM の NaCl を含む 20 mM の MOPS-NaOH (pH7.0) を用いた。二次構造含量予測には CONTIN²³⁾ (第 4 章参照) を使用した。

沈降平衡

沈降平衡は Beckman-XL-A 分析型超遠心機を使用した。分子量計算のための部分比容は構成アミノ酸の値²⁴⁾ から計算し、ペプチド II および III についてそれぞれ 0.715 ml/g, 0.722 ml/g であった。溶液の buffer は CD 測定と同じものを用いた。

蛍光エネルギー移動

蛍光スペクトルは Shimadzu-RF5000 を使用して、20°C で測定した。溶媒には 50 mM のリン酸カリウム buffer (pH7.0) を使用した。この buffer について、CD スペクトル上は先の buffer との差は認められないことを確認した。蛍光スペクトルは BIPM の吸収バンドのある 310 nm で励起し、320 ~ 500 nm のスペクトルを記録した。

測定試料の調製は、IIIC-NAM および IIIC-BIPM を微量の水に溶かして 20 分 incubate 後、50 mM のリン酸カリウム buffer で希釈した。IIIC-BIPM 単独の蛍光スペクトルと比較して 362 nm の BIPM 由来基の蛍光強度から、エネルギー移動効率 E_T を算出し、Förster の式²⁵⁾、

$$R_0 = (\kappa^2 \beta n^{-4} \phi_D J)^{1/6} \quad (\text{eq.5.1})$$

から、エネルギー移動効率 50% の時のドナーアクセプター間距離 R_0 を算出した。ここで、 κ^2 は双極子間相互作用の配向因子 (ランダムな配向を仮定して 2/3)、 β は定数 (8.785 $\times 10^{-25}$ M cm²)、 n は媒体の屈折率²⁶⁾ (1.4)、 ϕ_D はアクセプターがない時のドナー (IIIC-BIPM) の蛍光量子収率 (tryptophane を基準にしての実測値 0.037)、 J はドナーの蛍光とアクセプターの吸収スペクトルの重なり積分である。

変性実験

変性実験はCDおよび蛍光スペクトルにより20°Cで行った。一定濃度のペプチドIIIを、500mMのNaClを含む20mMのMOPS-NaOH buffer(pH7.0)中、種々の濃度の尿素(urea)溶液に溶かして、222nmにおけるモル楕円率あるいは275nm励起の蛍光スペクトルを記録した。また、熱変性実験は $[\theta]_{222\text{nm}}$ をモニターしつつ、0.8K/minで昇温して測定した。

5.4 結果と考察：コイルドコイル構造の同定と機能上の意味

コイルドコイル領域の予測

両親媒性ヘリックス予測法AMPHISEARCHを、キネーシンの全領域に適用した結果を図5.5に示す。ここからピークのスコアが3.0以上で、スコア値2.0以上の連続した同じheptad repeat frameを持つ14残基以上の長さのドメインを抽出して表5.2にまとめた。このうち30残基以上の長さのドメインは6個で、すべて335位よりC端側に存在していた。また、表5.2のR1～R6はいずれもcoiled-coilと予想されるスコア多重度を示した。Lupasらの方法によっても同様の領域がcoiled-coilであると予測されたが、R4と

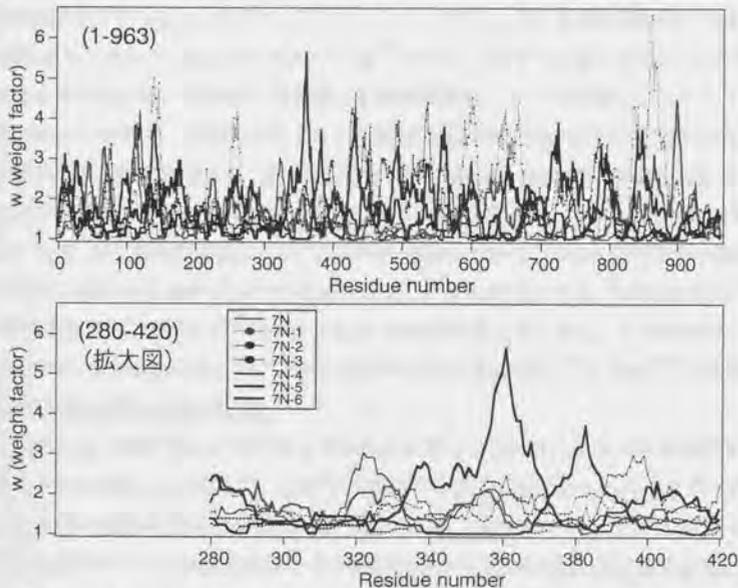


図5.5 キネーシンの両親媒性ヘリックス性プロフィール（上図：全長，下図：予想ネック領域周辺）

領域名	残基番号	残基長	heptad-frame
R1	335-372	38	7N-6
R2	420-547	128	7N-2
R3	580-677	98	7N-1
R4	709-762	54	7N-5
R5	772-806	35	7N-2
R6	829-908	98	7N-1
R7	105-129	25	7N
R8	129-151	23	7N-1
R9	247-270	24	7N-1
R10	374-389	16	7N-5
R11	553-569	17	7N-5
R12	893-909	17	7N-4

表5.2 キネーシンの両親媒性ヘリックス性の高い領域 (R1～R6に30残基以上のドメインをリストした)

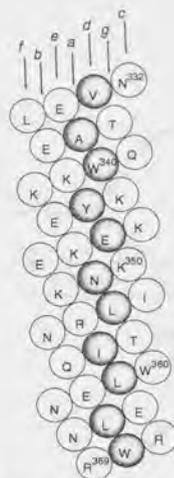


図5.6 ネック領域のhelical-network表示 (コア領域を灰色で示した)

R5は区別されていない。キネーシンのモータードメインは、X線や運動性の実験から、(1-330(あるいは～340))と考えられている²⁷⁾ので、この6つの部分はほぼstalk領域に属すると考えられる。本研究で特に関心を持つ領域は、そのうち最もモータードメインに近いネック領域で、予測法からはネック領域はR1領域(335-372)と推定される。この領域の拡大図を図5.5に示す。R1領域は7N-6のheptad repeat frameを有するが、スコアがあまり高くない前半部とピーク値で5を越える後半部からなっているのが特徴である。また、R1領域の前後には異なる型のheptad repeat frameがやや短い配列で存在するが、長さからcoiled-coilの形成は無理であると考えられる。helical network表示(図5.6)では、7N-6のheptad repeat frameを割り当てると、この領域のcore位置の途中にcore形成には不利になるとされる親水性のGlu³⁴⁷とAsn³⁵¹が存在する。

円偏光二色性スペクトルの比較

N端からR1領域(335-372)付近までの長さを持つフラグメントK349とK379のCDスペクトルを比較した(図5.7)。CONTIN解析により、K349は α -ヘリックス、 β -シート、その他の構造が30%、35%、35%と予想された。一方K379は、34%、33%、33%とわずかに高いヘリックス含量を示した。両者の差スペクトルは図5.7に示すように、非常に高い α -ヘリックスであることを示し、Chenらの解析法²⁸⁾を用いると、ヘリックス鎖長は30残基のうち 29 ± 5 残基と推定される(誤差表示は濃度の誤差2%に対応する)。

このことは(350-379)の全長がヘリックスであるか、あるいはこの部分の存在によりK349のC端部にヘリックス構造が誘起されたか、であることを意味する。Kullらによって、K349はモノマー、K379はdimerであることが報告されており¹¹⁾、ここでの結果は二量体化がヘリックス構造形成によっていることを示している。

ペプチドの自己会合

α -ヘリックス形成領域を特定するために、ペプチド合成を行った。K349とK379の差に相当するペプチドII(350-379)、R1領域の疎水性コア残基をすべて含む領域のペプチドIII(332-369)、IIとIIIの差に相当するペプチドI(332-349)、ペプチドIをC端側に延長したペプチドIV(315-346)、についてCDを測定したところ、高濃度ではIVを除いて α -ヘリックス構造であることを示した。

IVは20mM付近以上でゲル化し、この領域に β -シート構造性の部分が含まれていることが推定される。IVはそのC端側半分がペプチドIに相当しているため、 β -シート構造性はIVのN端側半分によるものと考えられる。ペプチドI~IIIについて $[\theta]_{222nm}$ の濃度依存性を測定した結果を図5.8に示す。いずれも高濃度側で $[\theta]_{222nm}$ が大きくなり、

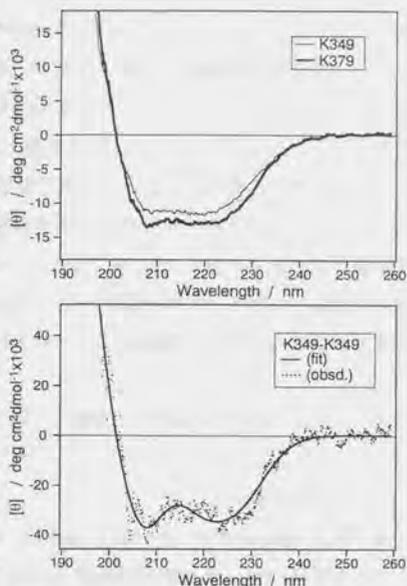


図5.7 キナーゼの部分タンパク質のCDスペクトル(上図: K349, K379; 下図: 両者の差スペクトル)

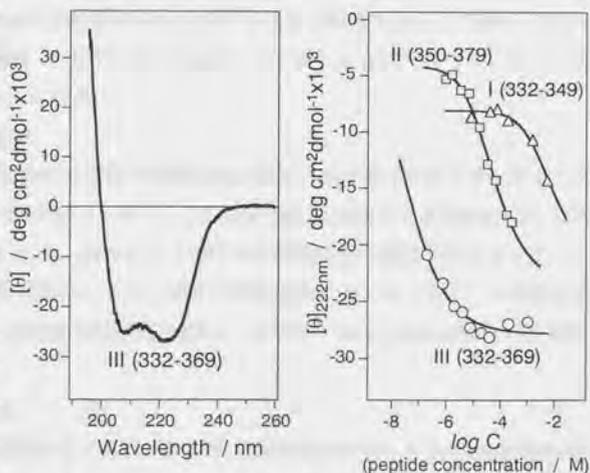


図5.8 合成したペプチドのCDスペクトルおよび222nmでのモル楕円率のペプチド濃度依存性(20°C, pH7.0緩衝液中)

この変化は3量体以上ではなく、dimer-monomerの平衡式(ここで、 $[\theta]_d$ 、 $[\theta]_m$ 、C、Kはそれぞれdimer、monomerのモル楕円率、ペプチド濃度、解離定数を表す):

$$[\theta] = [\theta]_d + ([\theta]_m - [\theta]_d) \{ (1 + 8C/K)^{1/2} - 1 \} \{ K/(4C) \} \quad (\text{eq.5.2})$$

でよくフィットする。すなわち濃度依存的な二量体形成にともなう α -ヘリックスが形成されており、おそらくcoiled-coilが高濃度域で形成されていると考えられる。(eq.5.2)によるカーブフィッティングの結果、解離定数Kが求まり、ペプチドI, II, IIIについて、それぞれ 9.6 ± 2.8 mM, 60 ± 31 μ M, 62 ± 31 nMであった。IとIIを合わせた領域を持つIIIでは協同効果による高い会合性を示した。IIIの解離定数は、K379の運動性や酵素学的研究に使用される μ M程度の濃度より小さく、この濃度でK379を二量体化するのに十分であった。

222nmのモル楕円率 $[\theta]$ から、 α -ヘリックスの鎖長nを求めるために、Chenら²⁸⁾の式:

$$[\theta]_{\text{H}_2\text{O}} = [\theta]_{\text{H}_2\text{O}} \{ 1 - (k/n) \} \quad (\text{eq.5.3})$$

を用いた。ここで $[\theta]_{\text{H}_2\text{O}}$ とkは実験的な定数で、222nmにおいて、 $-39500 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ および2.57である。ペプチドI, II, IIIに β -シート構造が含まれていないとすると、ペプチドII, IIIのヘリックス部分はそれぞれ21, 30残基と推定される。前述したようにIIIには(345-352)領域に親水性の高い配列が存在しており、もしここでヘリックスの連鎖がとぎれていれば、IIIのヘリックス部分は34残基と推定される。これらの結果からひとつのモデルとして、(332-345)と(350-369)の部分がヘリックス構造であると予想される。すなわち、二量体化にはK349とK379の差の部分、ペプチドIIだけではなく、ペプチドI部分も寄与していると考えられる。

沈降平衡による分子量測定

ペプチドIIIの50 μ Mにおける沈降平衡実験の結果は、分子量9613であった。これはmonomer分子量の4922のほぼ2倍で、この濃度ではIIIはほとんどdimerとして存在していると考えられる。また、dimerより大きい分子量成分は観測されなかった。一方、ペプチドIIは450 μ Mにおいても単一成分の理論曲線にフィットせず、平均分子量として6426が得られた。これは1.7merに相当し、おそらくmonomer-dimerの平衡混合物であると考えられる。

コイルドコイルの配向様式

ここまでの実験結果を総合すると、ペプチドIIIの領域が α -ヘリックスのcoiled-coil構造を形成していると考えられる。次に、IIIのcoiled-coilの配向様式が平行か逆平行かを調べるために、蛍光ラベルしたペプチドIIC-BIPMとIIC-NAMを用いて、蛍光エネルギー

ギー移動の実験をおこなった。ラベルを導入した363位はheptad repeat frameのf位にあり、ちょうどヘリックスの疎水性面と180度反対側に存在する。IIIC-BIPMとIIIC-NAMの混合系の蛍光スペクトルを測定すると、図5.9のようにBIPM基(蛍光極大波長362nm)からNAM基(吸収極大波長358nm)への蛍光エネルギー移動によ

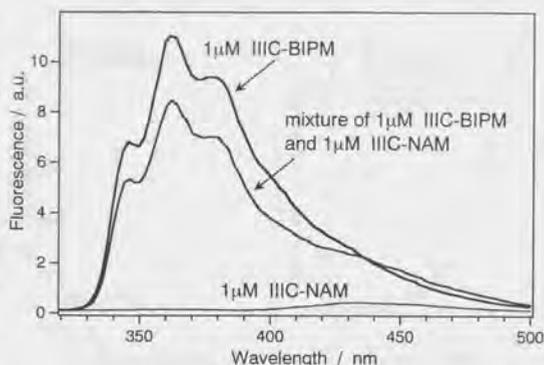


図5.9 蛍光ラベルしたペプチドの蛍光スペクトル(励起波長は310nm, 温度20°C)

て、BIPMの発光位置の蛍光強度がIIIC-BIPM単独時よりも77%に減少する。IIIC-BIPMとIIIC-NAMのランダムな混合によりcoiled-coilが形成されているとすると、50%のcoiled-coil分子がIIIC-BIPMとIIIC-NAMからなるヘテロなdimerである。従ってここからエネルギー移動効率 E_T は $(100-77)/(100-50)=0.46$ と求まる。Försterの取り扱いによれば、

$$r^6 = R_0^6 \{ (1 - E_T) / E_T \} \quad (\text{eq.5.4})$$

において、 $E_T=0.46$ 、(eq.5.1)より $R_0=1.89\text{nm}$ 、であるので、BIPM基とNAM基の距離 r は 1.94nm となる。X線構造が明らかにされている平行coiled-coil分子であるGCN4のf位の側鎖第3原子間の距離は、 $1.91 \pm 0.08\text{nm}$ であるので、エネルギー移動から推定された距離は、ペプチドIIIがほぼ平行に配向していることを意味している。もし、逆平行に配向していれば $r=4.2\text{nm}$ 、 $E_T=0.008$ であることから、平行配向の割合は非常に高いと考えられる。まとめると、ペプチドIIIの領域のみで、モータードメインを同じ側に保持する機能を有しているといえる。平行配向が安定である理由は、逆平行では疎水性のcore残基が親水性のGlu³⁴⁷やAsn³⁵¹と分子間でペアを形成し、疎水性相互作用による安定化エネルギーの利得が少なくなるためと考えられる。

コイルドコイルの安定性

IIIC-BIPMとIIIC-NAMを実験項の方法ではなく、それぞれを $1\mu\text{M}$ のbuffer溶液にしてから混合した場合には24時間後も、上記のような蛍光エネルギー移動は観測されなかった。また、濃度を 0.3mM に高くしても同様であった。このことは、一度形成されたcoiled-coil分子は溶液中で非常に安定に存在し、このような濃度とイオン強度のもとで

は、ヘリックスの交換はほとんど起きていないことを示している。

変性実験

尿素によるペプチドIIIの変性実験の結果を図5.10に示す。 $[\theta]_{222\text{nm}}$ でモニターした滴定曲線は尿素濃度8.1Mでシャープな転移を示す。この転移は二量体のcoiled-coilから

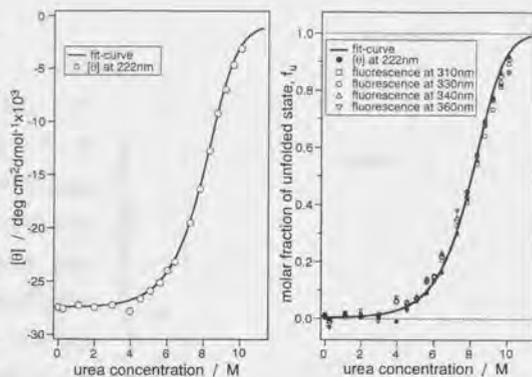


図5.10 CDスペクトルおよび蛍光スペクトルでモニターした尿素変性曲線 (20°C)

random構造のmonomerへの変性と考えられ、次式^{29,30)}

(Pはペプチド濃度, f_u は変性状態の分率, f_f はfolded状態の分率, $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ は変性剤を含まない状態での ΔG , m は ΔG の変性剤濃度依存性, C_{urea} は変性剤濃度を示す),

$$\Delta G = -RT \ln(2P f_u^2 / f_f) = \Delta G_{\text{H}_2\text{O}} - mC_{\text{urea}} \quad (\text{eq.5.5})$$

でフィッティング計算すると、 $P=22 \mu\text{M}$ の濃度において、 $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}=57.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $m=3.9 \text{ kJ mol}^{-1}\text{M}^{-1}$ が得られる。この値は、coiled-coilの1分子あたりの ΔG に換算すると、 $9.5 \times 10^{-20} \text{ J/molecule}$ となる。ATPの加水分解により発生する自由エネルギーは、 $5.1 \times 10^{-20} \text{ J/molecule}$ であり、またキナーシンの運動を1分子計測したデータ³¹⁾は4 pNの力で8nmの運動、すなわちエネルギーとして $3.2 \times 10^{-20} \text{ J/molecule}$ となる。ここでの結果は、これらの値より、いくらか大きく、運動によってcoiled-coilが半分程度解離する可能性も考えられる。もしそうであるなら、疎水性coreが(345-352)領域で途切れていることがタンパク質の機能においても重要な意義をもつことを意味する。

図5.10では、同じ尿素による変性を、蛍光強度でモニターした結果も示した。ペプチドIIIはTrpを3個、Tyrを1個含有しているため、もし変性過程が局所的に異なっていたら、観測波長によって異なる変性点を示す可能性もある。しかし、実験結果は、いずれの波長においてもCDの転移曲線と合致し、変性が全体的に同時に起きていることを示している。

$[\theta]_{222\text{nm}}$ でモニターして、熱転移を測定した結果は、図5.11のようにシャープな転移を与え、monomer-dimerの平衡式から得られる次式 (K は平衡定数, P はペプチド濃度, f_u と f_f はeq.5.5と同様, ΔH_v は転移のvan't Hoff enthalpy, T_d は転移温度),

$$K = 2P f_u^2 / f_f \quad (\text{eq.5.6})$$

$$\partial(\ln K) / \partial T = \Delta H_v / (RT^2)$$

(eq.5.7)

$$K = (\Delta H_v / R) \{ (1/T_0) - (1/T) \} + \ln P$$

(eq.5.8)

により、実験値はよくフィットする。ペプチド濃度 $22 \mu\text{M}$ で、転移温度は 71°C 、転移の van't Hoff enthalpy は 329 kJ/mol であった。熱転移においてもペプチド III は 2 状態転移を示し、平衡論的には、III の親水性の高い (345-352) 領域で隔てられている可能性もある 2 つのヘリックス性部分は協同的に変性する³²⁾。ただしこのことは、局所的な coiled-coil の、速度論的な (一時的な) 解離を否定するものではない。

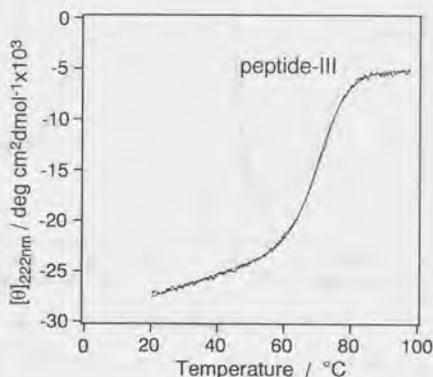


図 5.11 ペプチド III の熱転移曲線
(昇温速度は 0.8K/min)

モータードメインの構造比較

ここまでの、キネーシンのネック領域が安定な平行 coiled-coil 構造を有することを予測法に基づいて、実験的に示してきた。このことによって、これまで未解明であった 2 つのキネーシンのモータードメインをつなぐ領域を、かなり正確に同定し、その構造特性を明らかにすることができた。序論で述べたキネーシンと ncd の運動特性の比較のためには、ncd についてもそのネック領域を解明する必要がある。

また、モータードメイン部分の特徴の違いも重要であって、ここでは分光学的な

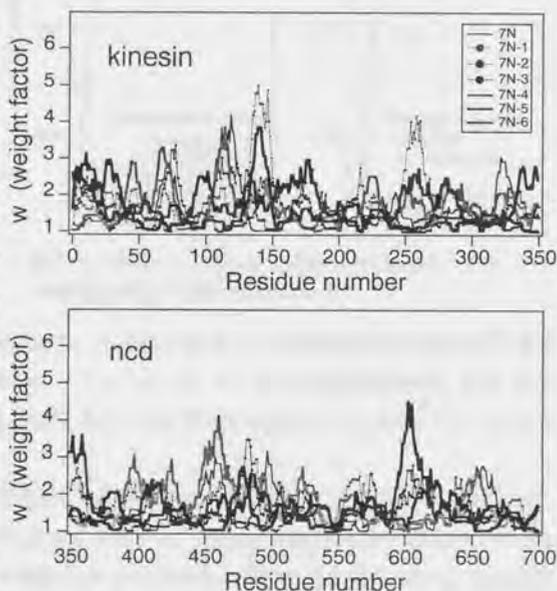


図 5.12 キネーシンと ncd の各モータードメインの AMPHISEARCH による比較

両者の比較検討を行った。

図5.12にモータードメイン部分のアミノ酸配列上の特徴を両親媒性ヘリックス予測評価ソフト AMPHI-SEARCHにより、グラフ化した結果を示した。図示したキネーシン(1-350)とncd(351-700)でパターンはかなりよく一致しており、X線構造解析で類似構造を与えたこととも対応している

(10,11)。しかし、キネーシンの(130-150)付近などはいくらかncdとはw値の大きさが異なっている。遠紫外領域のCDスペクトルで見ると、キネーシンとncdは、208nm付近のバンドにおいて差がみられる(図5.13)。それぞれのスペクトルは

ADPの有無によらず、ほぼ同じスペクトルを与え、二

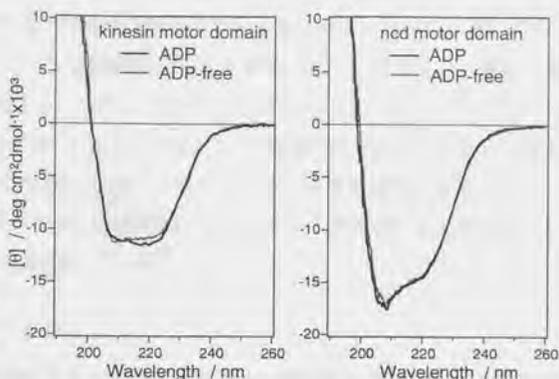


図5.13 モータードメインの遠紫外域CDスペクトル

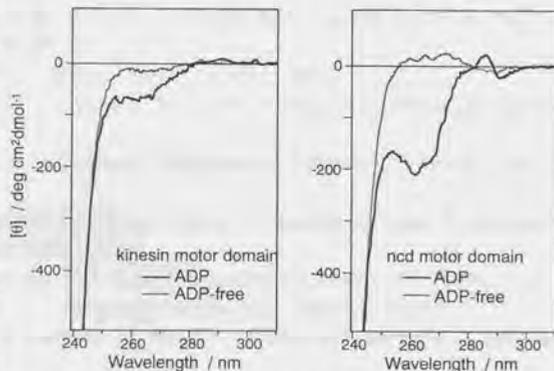


図5.14 キネーシンとncdの近紫外域CDスペクトル
(実線黒と灰色でADPの有無を示す)

次構造上はADPによる構造変化はないと考えられる。二次構造含量をCONTIN²³⁾で推定した結果は、キネーシンでは α -ヘリックス、 β -シート、その他の割合が、30%、35%、35%であった。一方ncdでは、43%、32%、25%でncdの方がいくらか α -ヘリックス含量が高いと推定される。

CDスペクトルを近紫外域で測定した結果を図5.14に示す。二次構造領域と異なって、ADPの有無はCDスペクトルに大きく影響する。260nm付近はADPの吸収バンドでもあるため、この変化はADPの誘起CDによる寄与もかなりあると考えられる。しかしながらADPによるスペクトルの変化はキネーシンとncdで大きく異なっており、ADPの結合環境が両者でかなり違うのではないかと考えられる。特にncdのADP結合サイトに

存在して、核酸塩基と直接の相互作用が考えられるTyr残基の寄与は大きいと思われる。ADPの有無による変化は、ncdでは290nm付近にも観測され、この差はTrp残基の構造変化に対応していると思われる。ただし、キネーシンではモータードメインにTrp残基がないために変化はほとんどない。ncdではATP結合領域の近くに存在するTrp残基がADPから少し離れているにもかかわらず、ADPの有無による構造変化を反映しているのは、ADPがモータードメインの二次構造はそのままに、中遠距離の3次構造変化を引き起こしていることを強く示唆している³³⁾。

引用文献

1. J. G. Adamson, N. E. Zhou, R. S. Hodges, *Current Opinion in Biotech.*, 4, 428-437 (1993)
2. R. S. Hodges, *Current Biology*, 2, 122-124 (1992)
3. T. Shimizu, E. Sablin, R. D. Vale, R. Fletterick, E. Pechatnikova, E. W. Taylor, *Biochemistry*, 34, 13259-13266 (1995)
4. R. D. Vale, T. S. Reese, M. P. Sheetz, *Cell*, 42, 39-50 (1985)
5. R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yanagida, *Nature*, 380, 451-453 (1996)
6. N. Hirokawa, K. K. Pfister, H. Yorifuji, M. C. Wagner, S. T. Brady, G. S. Bloom, *Cell*, 56, 867-878 (1989)
7. S. Hisanaga, H. Murofushí, K. Okuhara, R. Sato, Y. Masuda, H. Sakai, N. Hirokawa, *Cell Motil. Cytoskel.*, 12, 264-272 (1989)
8. H. B. McDonald, R. J. Stewart, L. S. B. Goldstein, *Cell*, 63, 1159-1165 (1990)
9. R. A. Walker, E. D. Salmon, S. A. Endow, *Nature*, 347, 780-787 (1990)
10. E. P. Sablin, F. J. Kull, R. Cooke, R. D. Vale, R. J. Fletterick, *Nature*, 380, 555-559 (1996)
11. F. J. Kull, E. P. Sablin, R. Lau, R. J. Fletterick, R. D. Vale, *Nature*, 380, 550-555 (1996)
12. G. E. Schulz, R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)
/ 大井龍夫 監訳, タンパク質, 化学同人(1980)
13. C. Delisi, J. A. Berzofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 7048-7052 (1985)
14. K. P. Cease, H. Margalit, J. L. Cornette, S. D. Putney, W. G. Robey, C. Ouyang, H. Z. Streicher, P. J. Fischinger, R. C. Gallo, C. Delisi, J. A. Berzofsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 4249-4253 (1987)
15. A. Lupas, M. V. Dyke, J. Stock, *Science*, 252, 1162-1164 (1991)
16. B. Berger, D. B. Wilson, E. Wolf, T. Tonc, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 8259-8263 (1995)
17. A. D. McLachlan, M. Stewart, *J. Mol. Biol.*, 98, 293-304 (1975)
18. J. W. Bryson, S. F. Betz, H. S. Lu, D. J. Suich, H. X. Zhou, K. T. O'Neil, W. F. DeGrado, *Science*, 270, 935-941 (1995)
19. J.-L. Fauchere, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, 18, 369-375 (1983)

20. H. Morii, M. Ishimura, S. Honda, H. Uedaira, *Peptide Chemistry*, 1994, 445-448 (1995)
21. N. J. Solli, T. T. Herskovits, *Anal. Biochem.*, 54, 370-378 (1973)
22. Y.-Z. Ma, E. W. Taylor, *Biochemistry*, 34, 13233-13241 (1995)
23. S. W. Provencher, *Comput. Phys. Commun.*, 27, 213-227 (1982)
24. T. H. Lilley, *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*, Ed. by G. C. Barrett, Chapman & Hall, UK (1985), Chap. 21
25. T. Förster, *Ann. Phys. (Leipzig)*, 6(2), 55-75 (1948)
26. L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 819-846 (1978)
27. J. T. Yang, R. A. Laymon, L. S. B. Goldstein, *Cell*, 56, 879-889 (1989)
28. Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350-3359 (1974)
29. C. N. Pace, *Methods Enzymol.*, 131, 266-280 (1986)
30. R. DeFrancesco, A. Pastore, G. Vecchio, R. Cortese, *Biochemistry*, 30, 143-147 (1991)
31. H. Kojima, E. Muto, H. Higuchi, T. Yanagida, *Biophys. J.*, 70, A36 (1996)
32. H. Morii, T. Takenawa, F. Arisaka, T. Shimizu, *Biochemistry*, 36, 1933-1942 (1997)
33. T. Shimizu, H. Morii, *J. Biochem.*, 120, 1176-1181 (1996)
34. AMPHISEARCH のプログラムについては、第5章-補遺1を参照のこと

5.5 補遺 1: AMPHISEARCH 法のプログラム

両親媒性ヘリックス傾向性評価法のAMPHISEARCH法のコンピュータプログラムを以下に掲載した。本プログラムはパーソナルコンピュータ用ソフトウェアLotus1-2-3上で作成したもので、計算は通常のスプレッドシートソフトの操作により次のようにして実行できる(ソフトウェアExcelにも対応可能)。最終の計算結果は、(残基数)×8の行列データで得られ、text形式でファイル保存の後、適当なグラフ作図用ソフトにより図示できる。

1. Make up the essential part of the program AMPHISEARCH in the spread-sheet.
(cell address) (contents)
L 29-R 29 : Input i-value (from 0 to 6) for heptad assignment code 7N-i (e.g., L29=0, M29=1,...)
C 39-C **: Input residue number
B 39-B **: Input amino acid sequence with single letter code
B 1-J 20 : Input the Table of elemental score, G, as follows,

[amino-acid, space, G(a), G(b), G(c), G(d), G(e), G(f), G(g)]

L	-1.72	0	0	-1.72	0	0	0
I	-1.86	0	0	-1.86	0	0	0
V	-1.36	0	0	-1.36	0	0	0
M	-1.38	0	0	-1.38	0	0	0
F	-1.36	0	0	-1.36	0	0	0
Y	-1.01	0	0	-1.01	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0
A	-0.42	0	0	-0.42	0	0	0
K	0	-1.95	-1.95	0	-1.95	-1.95	-1.95
R	0	-1.77	-1.77	0	-1.77	-1.77	-1.77
H	-0.18	0	0	-0.18	0	0	0
E	0	-1.07	-1.07	0	-1.07	-1.07	-1.07
D	0	-1.05	-1.05	0	-1.05	-1.05	-1.05
Q	0	-0.50	-0.50	0	-0.50	-0.50	-0.50
N	0	-0.82	-0.82	0	-0.82	-0.82	-0.82
S	0	-0.05	-0.05	0	-0.05	-0.05	-0.05
T	-0.35	0	0	-0.35	0	0	0
C	-0.48	0	0	-0.48	0	0	0
W	-1.01	0	0	-1.01	0	0	0
P	-0.98	0	0	-0.98	0	0	0

2. Calculation of B*G.
2.1. Input the formulas into the region L39-R45 as shown below
2.2. Copy 7x7 matrix (L39-R45) to the next every 7 lines

(cell address)	(formula)
L 39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A39+L\$29-1,7)+2)*(L38+L41)/(-4)
L 40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A40+L\$29-1,7)+2)*(L38+L41)/(-4)
L 41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A41+L\$29-1,7)+2)
L 42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A42+L\$29-1,7)+2)*(L41+L45)/(-4)
L 43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A43+L\$29-1,7)+2)*(L41+L45)/(-4)
L 44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A44+L\$29-1,7)+2)*(L41+L45)/(-4)
L 45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A45+L\$29-1,7)+2)
M 39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A39+M\$29-1,7)+2)*(M37+M40)/(-4)
M 40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A40+M\$29-1,7)+2)
M 41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A41+M\$29-1,7)+2)*(M40+M44)/(-4)
M 42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A42+M\$29-1,7)+2)*(M40+M44)/(-4)
M 43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1..\$J\$20,@MOD(\$A43+M\$29-1,7)+2)*(M40+M44)/(-4)

M	44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A44+\$M\$29-1,7)+2)
M	45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A45+\$M\$29-1,7)+2)*(M44+M47)/(-4)
N	39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A39+\$L\$29-1,7)+2)
N	40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A40+\$N\$29-1,7)+2)*(N39+N43)/(-4)
N	41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A41+\$N\$29-1,7)+2)*(N39+N43)/(-4)
N	42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A42+\$N\$29-1,7)+2)*(N39+N43)/(-4)
N	43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A43+\$N\$29-1,7)+2)
N	44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A44+\$N\$29-1,7)+2)*(N43+N46)/(-4)
N	45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A45+\$N\$29-1,7)+2)*(N43+N46)/(-4)
O	39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A39+\$O\$29-1,7)+2)*(O38+O42)/(-4)
O	40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A40+\$O\$29-1,7)+2)*(O38+O42)/(-4)
O	41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A41+\$O\$29-1,7)+2)*(O38+O42)/(-4)
O	42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A42+\$O\$29-1,7)+2)
O	43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A43+\$O\$29-1,7)+2)*(O42+O45)/(-4)
O	44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A44+\$O\$29-1,7)+2)*(O42+O45)/(-4)
O	45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A45+\$O\$29-1,7)+2)
P	39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A39+\$P\$29-1,7)+2)*(P37+P41)/(-4)
P	40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A40+\$P\$29-1,7)+2)*(P37+P41)/(-4)
P	41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A41+\$P\$29-1,7)+2)
P	42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A42+\$P\$29-1,7)+2)*(P41+P44)/(-4)
P	43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A43+\$P\$29-1,7)+2)*(P41+P44)/(-4)
P	44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A44+\$P\$29-1,7)+2)
P	45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A45+\$P\$29-1,7)+2)*(P44+P48)/(-4)
Q	39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A39+\$Q\$29-1,7)+2)*(Q36+Q40)/(-4)
Q	40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A40+\$Q\$29-1,7)+2)
Q	41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A41+\$Q\$29-1,7)+2)*(Q40+Q43)/(-4)
Q	42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A42+\$Q\$29-1,7)+2)*(Q40+Q43)/(-4)
Q	43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A43+\$Q\$29-1,7)+2)
Q	44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A44+\$Q\$29-1,7)+2)*(Q43+Q47)/(-4)
Q	45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A45+\$Q\$29-1,7)+2)*(Q43+Q47)/(-4)
R	39	@VLOOKUP(\$B39,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A39+\$R\$29-1,7)+2)
R	40	@VLOOKUP(\$B40,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A40+\$R\$29-1,7)+2)*(R39+R42)/(-4)
R	41	@VLOOKUP(\$B41,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A41+\$R\$29-1,7)+2)*(R39+R42)/(-4)
R	42	@VLOOKUP(\$B42,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A42+\$R\$29-1,7)+2)
R	43	@VLOOKUP(\$B43,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A43+\$R\$29-1,7)+2)*(R42+R46)/(-4)
R	44	@VLOOKUP(\$B44,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A44+\$R\$29-1,7)+2)*(R42+R46)/(-4)
R	45	@VLOOKUP(\$B45,\$B\$1:.\$J\$20,@MOD(\$A45+\$R\$29-1,7)+2)*(R42+R46)/(-4)

3. Calculation of $w = \exp(-\Sigma(B^*G)/(window\ size)/RT)$; window size=15, R=1.987 cal K⁻¹mol⁻¹, T=293.15K

3.1. Input the formulas into the region D39-J39 as shown below

3.2. Copy 1x7 matrix (D39-J39) to every line else

3.3. Carry out 'Recalc.'

(cell address)	(formula)
D 39	@EXP(-@SUM(L32..L46)*1000/15/1.987/293.15)
E 39	@EXP(-@SUM(M32..M46)*1000/15/1.987/293.15)
F 39	@EXP(-@SUM(N32..N46)*1000/15/1.987/293.15)
G 39	@EXP(-@SUM(O32..O46)*1000/15/1.987/293.15)
H 39	@EXP(-@SUM(P32..P46)*1000/15/1.987/293.15)
I 39	@EXP(-@SUM(Q32..Q46)*1000/15/1.987/293.15)
J 39	@EXP(-@SUM(R32..R46)*1000/15/1.987/293.15)

4. Save the resulting matrix data C39-J** consisting of the residue number and the values of w as a text file.
(Matrix size of this data is (total residue number)x8.)

水性がやや高く、しかもこの両者が途中で切り替わっていることを意味している。言い換えると疎水性面のわずかなねじれが途中点で存在しており、これがDNAとの結合様式と関わっていることも推定される。

図5.16上右のhemerythrinは4-ヘリックスバンドル構造をとることがX線結晶構造解析で知られている(図中の矩形グラフで結晶構造解析から明らかとなったヘリックス部分を示した)。先のコイルドコイル構造のグラフパターンと比べて、高いピークの多重度は2程度であり、両親媒性の疎水性面がより広いことがわかる。この結果としてコイルドコイルではなく、ヘリックスバンドル構造となったことが理解できる。主要な4つのヘリックスのうち1本はピーク値が低く疎水性のやや高いヘリックスと考えられる。

myoglobinはさらに多くのヘリックス単位からなり、そのうち約4本のヘリックスが高い両親媒性傾向値を与える(図5.16下左)。先と同様に多重度から疎水性面が広く、このことが球状のfolding構造に寄与していると考えられる。apo体の熱力学的なfoldingにおいて各ヘリックスの折りたたみ速度は一定ではないことが知られているが、このような各ヘリックスの両親媒性の特徴の差がこのことに寄与していることが予想される。

colicin Aは水溶性のヘリックス会合体であるが、内2本のヘリックスが疎水性が高く、内部に埋もれて存在していると考えられている。AMPHISEARCH法の結果は図5.16下

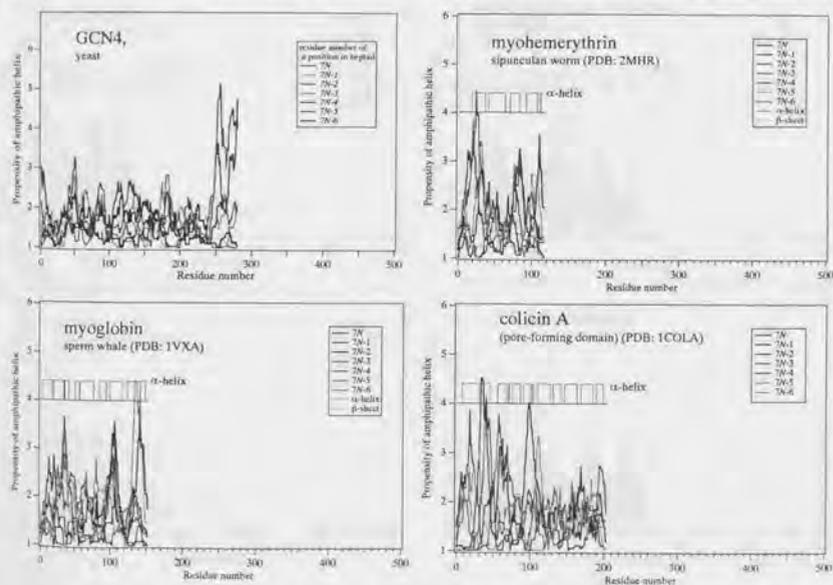


図5.16 AMPHISEARCH法による両親媒性ヘリックスの予測結果(II)

右のように、両親媒性の高いヘリックスと疎水性の高いヘリックス領域のそれぞれの存在を明白に示している。

calmodulinは両親媒性ヘリックスと相互作用することが知られているが、図5.17上左のように、このタンパク質中のヘリックスはいずれも高い両親媒性を有している。注目されるのは、亜鈴型をした分子の中央に存在する約70-100番残基付近の長いヘリックスで、AMPHISEARCH解析の結果は、このヘリックスが途中で異なるheptad repeat frameによるものに切り替わっていることを示している。すなわち構造的には1本のヘリックスでありながら、本法の解析によって2本の両親媒性ヘリックスであることが容易に見出された。この特徴がcalmodulinの機能時の分子変形と関係していることも考えられる。

次に、 β/α バレル構造のtriose phosphate isomeraseについて見てみると、分子の周囲を取り囲むように存在するヘリックスはほとんどが両親媒性ヘリックスであることがわかる(図5.17上右)。一方 β -sheet構造のみからなるplastocyaninは、図5.17下左のように、全く両親媒性は認められず、結晶構造解析結果と矛盾しなかった。さらに α -ヘリックスの会合体ではあるが、膜タンパク質であるbacteriorhodopsinは、すべて

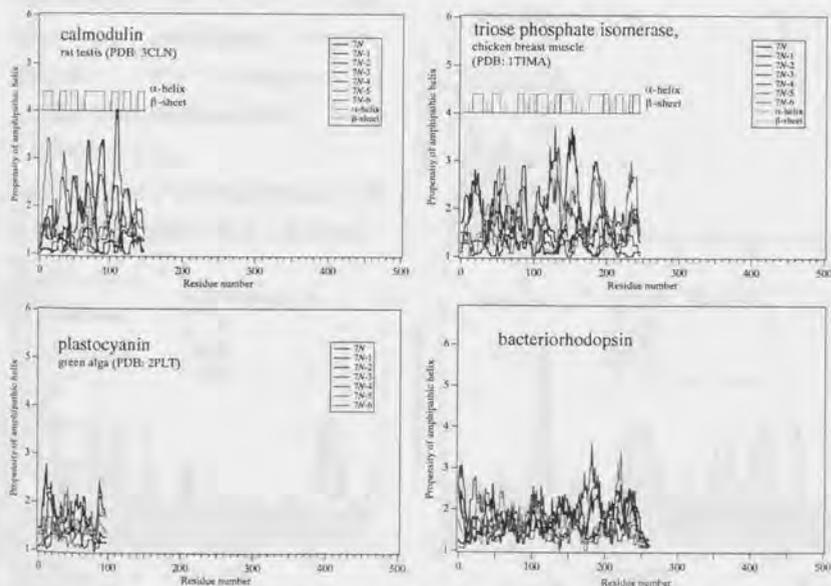


図5.17 AMPHISEARCH法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (III)

の heptad repeat frame に対する値がやや高いレベルにあり、全体に疎水性の高いタンパク質であることが理解できる。中にいくらか両親媒性のやや高いピークが存在するが、これらはヘリックス相互間の膜中での場合に関係していると考えられる。

ここまで述べてきたタンパク質のいくつかは結晶構造がわかっているものであった。しかし、タンパク質によっては結晶化する代わりに、繊維状の規則的集合体を形成するものが存在する。このような構造解析の困難なタンパク質に対しては、構造予測法を適用する意義はより高いと考えられる。図 5.18 には、繊維状の規則的集合体をつくる代表的なタンパク質への AMPHISEARCH の適用結果を示した。tabacco mosaic virus は X 線構造解析が行われているが、ヘリックス構造の多くは疎水性面の広い両親媒性ヘリックスであることが図から予想される。おそらくこの広い疎水性面が分子間および RNA との集合体構造の形成に寄与しているものと考えられる。flagellin や tubulin では、図から疎水性が高い構造あるいは β -sheet 構造が多く存在すると予想されるが、中に両親媒性ヘリックス性の高い領域がいくつか見出される。しかもいずれも 20 残基程度の長さである。flagellin の N 端部分は図のピーク多重度からヘリックスバンドルが存在していると推定される。tubulin にも両親媒性ヘリックスが複数連続して存在する領域があり、このような両親媒性ヘリックスが分子間集合体形成に関与していることも予想される。

また、タンパク質の構造変化が狂牛病等の感染発症の原因であると考えられて

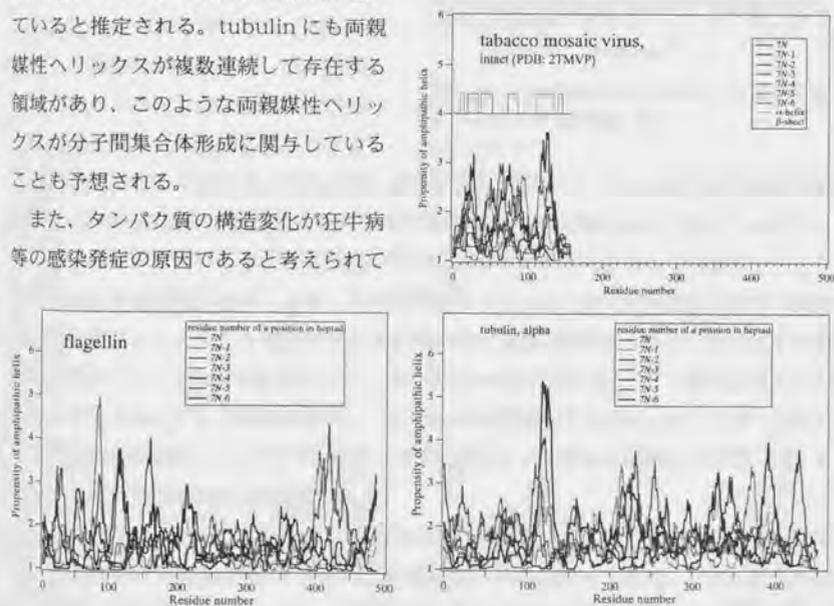


図 5.18 AMPHISEARCH 法による両親媒性ヘリックスの予測結果 (IV)

いるprionタンパク質について適用してみると、NMRで構造が解明されている一部分に存在するヘリックスは両親媒性が高いヘリックスであるが、周辺部も含め全体的な疎水性も高いため、 β -sheet構造や他の凝集構造へ転移する可能性も考えられる(図5.19上)。このような特徴が分子間の相互作用による α ヘリックスから β への構造変化の伝搬、すなわち分子感染の原因とも関連していることも推測される。

最後に、大腸菌の全タンパク質のアミノ酸組成をもとに、これを全くランダムに並べた架空の配列のタンパク質にAMPHISEARCH法を適用した。この例はある意味で原始地球において、低分子のアミノ酸が化学的に重合してポリペプチドを生成する時に、高次構造形成性の分子が果たしてどの程度生成しうるか、

を検討するモデルでもある。結果は図5.19下に示したように、千から数千残基の配列に対して1カ所程度、約20残基長の明確な両親媒性ヘリックス傾向の高い領域が生成する。この長さの両親媒性ヘリックス性領域は場合によって会合体を形成して実際にヘリックス構造をとる可能性がある。また、その両親媒性ヘリックスの疎水性領域は他の分子を取り込むポケットとしても機能しうると予想され、次の段階のより高度な分子進化を誘起するであろう。ここでの計算はすべて同一のchiralityを持ったアミノ酸の集合について行っているが、アミノ酸の起源としてD-とL-体が共存していれば、どちらか一方だけの20残基の両親媒性ヘリックスが生成する確率は $10^{-6} \times 10^{-3} = 10^{-9}$ 程度と予想される。これは十分実現可能な確率である。

以上のように、この節では種々の系にAMPHISEARCH法を適用して、そこから予想される現象等について議論し、いくつかの興味深い点を見出してきた。一般に評価予測法は研究の終着点ではなく、新しい知見を見い出すための出発点であり、本研究で開発したAMPHISEARCH法もそうした意義を十分有していると考えられる。

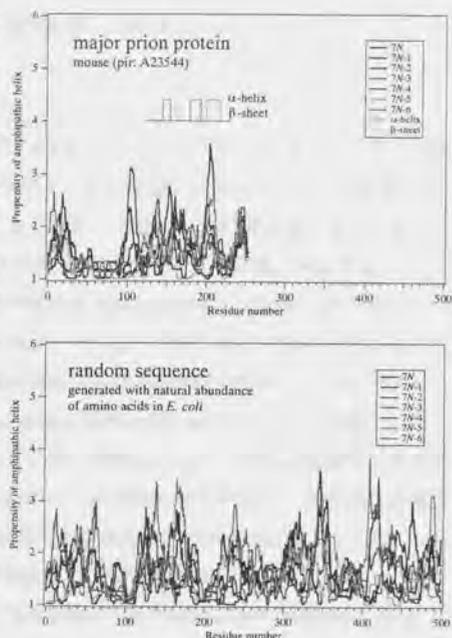


図5.19 AMPHISEARCH法による両親媒性ヘリックスの予測結果(V)

第6章 両親媒性ヘリックス会合体の特殊な形成過程

6.1 序論

両親媒性ヘリックス構造を有するペプチドがcoiled-coilやヘリックスバンドルなどの α -ヘリックス会合体を形成することについて、第4章および第5章において議論した。分子中に単一のヘリックス性領域を有するペプチドでは、一般に第5章に示したように濃度依存的に会合体を形成する¹⁾。このとき例えば α -ヘリックス含量に対応する222nmのモル楕円率をプロットすると、濃度依存性の変化は monomer-dimer (第5章のデータ) や monomer-tetramer (DeGradoらのデータ) など単純な会合平衡の式で記述できる^{2,3)} (図6.1)。こうした結果は、特定の会合数以外の会合体が相対的に不安定であることを意味する。また場合によっては、monomer-dimer-tetramerなどの2段階での会合もありうると考えられる。両親媒性物質として一般的にみると、例えば長鎖アルキル系界面活性剤については、会合数が大きいために、会合数に分布があり、また濃度依存性は臨界ミセル濃度(cmc)と呼ばれる特定濃度で急激な会合体形成を起こす。いずれにしても、集合体構造における会合数は、その構造上の特徴によって決定される。

両親媒性物質の会合体の示すもうひとつの特徴は、会合状態における相転移である。この相転移は脂質においてはゲル液晶転移であり、タンパク質においてはnative-like foldingと molten globule の状態転移である。これらの転移は、すべてのものに観測されるものではなく、また温度やpHなどの条件にも依存する⁴⁾。

本章では、会合と相転移の二つの現象が関わりあった特殊な構造形成過程を示すペプチドを見いだしたので、これについて熱力学的に詳細な検討を加えた。このペプチドはovine由来のcorticotropin-releasing factor (CRF)で、41アミノ酸残基よりなる⁵⁻⁸⁾。CRFは視床下部より分泌され、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)や β -endorphinの分泌制御に関わっている。ovine CRFはValeらによって単離され、そのアミノ酸配列が決定された⁹⁾。アミノ酸配列上は両親媒性ヘリックス領域を有しているが、水溶液中での構造は主にランダムコイル構造でヘリックスは10~20%程度の低い含有率である¹⁰⁻¹¹⁾。一方CRFは気液界面や脂質膜の存在によって二次構造を形成する¹⁰⁾。Chou-Fasman法¹²⁾による二次構造予測では、(8-32)¹¹⁾

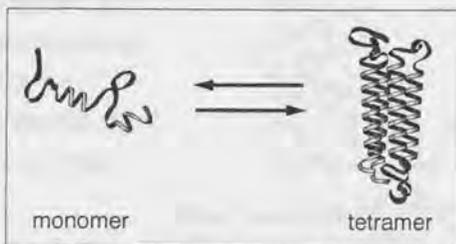


図6.1 一般のペプチドの典型的な会合平衡

あるいは(14-31)¹³⁾の領域が α -ヘリックスと推定されている。またヘリックスを形成しやすいTFE水溶液中での構造はNMRで決定されており¹⁴⁾、(10-32)が α -ヘリックスであった。

CRFの会合特性についてはゲル濾過カラムにおいて2つのACTH放出活性のある溶出バンドの存在が知られている^{6,7,9,15)}。このうち、高分子量のものの活性がより高いことが報告されている⁹⁾。超遠心法によって会合体の分子量を測定した結果¹⁰⁾では、tetramerとそれに連続したより高分子量の会合体の存在が示されている。光散乱のデータでも1mM以上の濃度で会合体は2量体相当のStokes半径を有している¹³⁾。いずれの報告も会合体形成を示しているにもかかわらず、会合挙動は濃度依存的な平衡式で解釈されるに至っていない(図6.1では説明できない)。ここでは、このような一見奇妙な会合体形成をするCRFについて、SECにより各分子量成分を単離して、それぞれをCD、蛍光、ITC、DSCなどにより解析した。また希釈や濃縮による会合体形成の変化についても検討した。

6.2 実験：合成、分子量分割、温度スキャン測定

ペプチド

CRFはovine由来のアミノ酸配列(図6.2, 両親媒性領域は5章のAMPHISEARCHによる)のものを用いた。CRFはABI-430A合成機によりFmoc法で固相化学合成した¹⁶⁾。C端アミド型ペプチドを与える樹脂を使用し、ペプチド鎖伸長後TFA-EDT-water(92:4:4)により最終脱保護を行った。逆相HPLCで精製し、API-IIIマスマスペクトロメーター(Perkin Elmer Sciex Instr.製)により、分子量は4670.0(理論値4670.4)であった。ペプチド濃度は定量的アミノ酸分析により決定し、この値を基に以降の実験では220nmにおける吸光係数 $1050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ により濃度を決めた。CRFは気液界面等に分配されやすい¹⁰⁾ので使用直前に10mMのリン酸ナトリウムbuffer(pH7.5)に溶かした。

分子量分割

会合体を分画するためにサイズ排除クロマトグラ



図6.2 ovine CRFのアミノ酸配列(helical-network表示。両親媒性のコアを灰色で示す)

フィー (SEC) を、Superdex 200 prep. grade (Pharmacia, 1.5x70 cm), Sephadex G50 fine grade (Pharmacia, 1.5x110 cm), TSKgel G3000PW HPLC カラム(Toso, 0.75x60 cm) により行った。溶出液には上記の buffer 液を使用し、220nm でモニターした。分子量標準には、lactate dehydrogenase, albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A, trypsin inhibitor, ribonuclease を用いた。

また、SEC より簡便に分子量分割を行うために、限外濾過法を用いた。分子量分割には、濾過膜として Centricon 30 (Amicon; cut-off, 30kDa) を使い、0.01 mM CRF 溶液で開始して 95% の液量を透過させた。CRF の濃縮目的には Centri/Por (Spectrum Medical Ind; cut-off, 3.5 kDa) を使用した。

円偏光二色性

CD スペクトルは Jasco J-600 旋光分散計により測定した。測定セルは、各種光路長 (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mm) の石英製で循環恒温水ジャケット付のものを用いた。温度スキャン測定は、1.0 K/min で昇温し、222nm でモニターした。また、TFE による滴定実験は 20°C において、手動で添加して行った。混合による体積変化は別に補正した。

熱測定

DSC 測定は MCS microcalorimeter (MicroCal 社) により行った。昇温速度は 1.0 K/min とし、解析は Kidokoro らの方法^{17,18)} をもとに行った。希釈熱の測定には同装置の ITC ユニットを使用した。測定は 25°C で、buffer 液に対して微量の CRF 溶液を順次添加して行った。熱量の解析は ORIGIN ソフトウェア上の付属ソフトにより行った。

蛍光スペクトル

蛍光スペクトルは Shimadzu-RF5000 蛍光光度計を用い、種々の濃度の CRF と 10 μ M の 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) を含む溶液を試料として、20°C で測定した。入射光方向のセル厚を 1mm とし、内部露光効果を回避した。励起波長は ANS の吸収帯の 350nm とし、蛍光側のバンド幅は 5nm とした。

6.3.1 結果と考察：モノマー、テトラマー、ミセル状態の同定

分子量分割実験

SEC による分子量分割の結果を図 6.3 に示す。Superdex 200 を用いた結果では、標準タンパク質の検量線に直接あてはめると、分子量 6kDa と 50kDa の 2 成分が存在した。低分子量成分は monomer の CRF によるものと考えられる。一方、高分子量成分は 11 量体の Stokes 半径に相当するが、沈降平衡法で示されている tetramer の形状¹⁰⁾ が球形ではなく棒状であるために SEC 上は大きな分子量として観測されたものと考えられる。

このような傾向はcoiled-coil分子について報告¹⁹⁾されているものと同様である。2つの溶出ピークは同じピーク半値幅をもっており、高分子量成分は会合数の異なるものの混合物ではなくtetramerのみであると考えられる。

tetramerのCRFの含有率はピーク面積から20～35%と見積もられる。SEC実験でカラムに添加したCRF溶液の濃度とCRF tetramerの含量にはあまり相関はなく、試料溶液添加までの保存状態により差がみられた。また、異なる充填剤のSECカラムでの結果も同様であった。tetramer含量は上記%以上のものは観測されなかった。

SEC実験において分画したmonomerとtetramerの溶液は、放置

してもmonomer-tetramerの転換は起こらず、両者の平衡が無視できる程度に非常に遅いことを意味している。また、monomerとtetramerの他にSuperdex 200では排除体積である0.39の溶出位置に微小なピークが観測されたが、これは以下で述べる臨界ミセル濃度以下であるため、不純物を含んだミセル様の成分であると推定される。

tetramerの分子量がSECでは見かけ上50kDaであるので、cut-off分子量30kDaの限外濾過フィルターの使用は、効率的にmonomerとtetramerを分画することができた。このことはSECと限外濾過によって分画した成分のCDスペクトルの比較によって確認できた。限外濾過においてもmonomer-tetramerの平衡は実際上認められなかった。

円偏光二色性スペクトル

分子量分割したCRFのmonomerとtetramerについて、それぞれのCDスペクトルを図6.4に示す。monomerの222nmのモル楕円率はあまり大きくなく ($-7000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$)、Chenらの方法²⁰⁾で推定すると、ヘリックス含量は20%程度と考えられ、主にrandom coil構造であると考えられる。一方、tetramerは典型的な α -ヘリックスに富む構造のCDスペクトルを与え、222nmのモル楕円率は $-20000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ であった。 β 構造を含まないとすると、ヘリックス含量は60%と推定される。高い α -ヘ

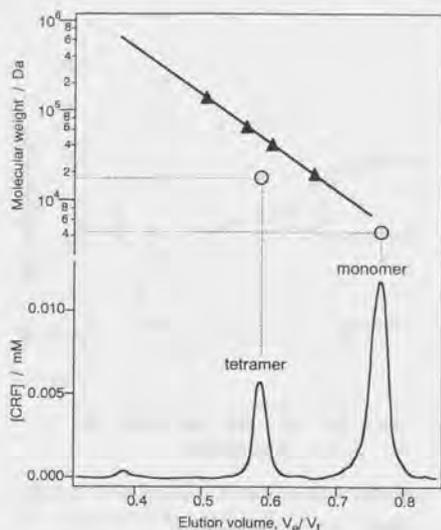


図6.3 サイズ排除クロマトグラム (Superdex 200 カラムによる。上段に標準タンパク質による検量線を示す)

リックス性は、すでに予想されているように両親媒性ヘリックス構造に基づいている。この領域は、第5章で述べたAMPHISEARCH法により、図6.2に示すように(5-23)と推定される。しかしながら、ヘリックス含量60%は25残基に相当し、この領域の他に、Chou-Fasman法¹²⁾で予測される32番残基までの領域がヘリックスを形成している可能性も考えられる。

CRFのペプチド粉末を0.01 mMに溶解した試料のCDスペクトルは、上記のmonomerとtetramerの中間的なパターンを示し、両者の混合物として計算されるスペクトルとよく一致する。すなわち、固体のCRFを溶解した試料はmonomerとtetramerからなっている。

蛍光プローブ実験

疎水性場に取り込まれて著しい蛍光変化を示すANSを、種々の濃度のCRFに対して添加してその蛍光強度を調べた。464nmの蛍光強度を濃度に対してプロットすると、図6.5右のようになる。CRFが0.03 mM以下の時は蛍光強度はペプチドの存在しない場合と変わらず、0.1mM以上の濃度で急激に蛍光強度が増大する。また同時に

蛍光極大波長も0.28 mMの時、464nmにまで短波長シフトする。Handelらによれば、molten globule状態のタンパク質がANSを取り込んだ時、極大波長が470~492nmと報告されている²¹⁾。従って、こ

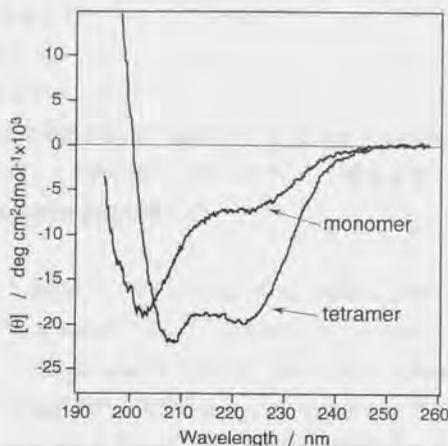


図6.4 分子量分割したmonomerとtetramerのCDスペクトル (濃度は各々7 μ M, 1.3 μ M)

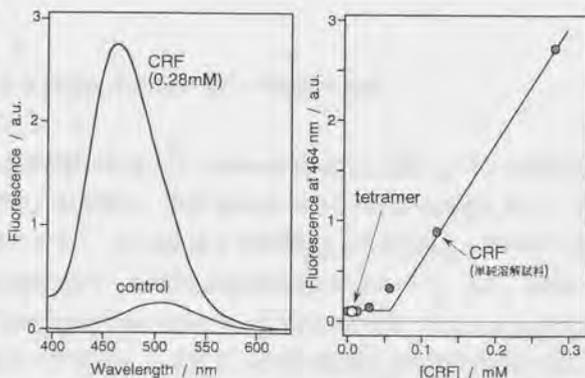


図6.5 CRF溶液に添加したANSの蛍光スペクトル(左図)と蛍光強度のCRF濃度依存性(右図)

の系は molten globule 状態の会合体であると考えられる。分子量分割した tetramer 単独の場合も、全く蛍光強度の増大を示さず、monomer と tetramer からなると考えられる低濃度領域の低い蛍光強度レベルのままであった。すなわち、monomer、tetramer とともに ANS を取り込まず、これらとは別の会合体が高濃度域で形成されていると考えられる。臨界濃度は蛍光強度が増大する部分を外挿して 0.05mM と考えられる。この値は後述するように CD から求められた値 0.1mM とほぼ同程度であった。

希釈熱測定

ITC より希釈熱を測定した結果は、1.3mM から 0.01 ~ 0.04mM に希釈した時の enthalpy 変化は吸熱 ($\Delta H = 10 \text{ kJ mol}^{-1}$) であるのに対して、0.04mM から 0.0005 ~ 0.002mM への希釈は発熱 ($\Delta H = -40 \sim -25 \text{ kJ mol}^{-1}$) であった。蛍光プローブ実験の結果と合わせて考えると、前半の 0.1mM を通過する希釈においては、会合体の疎水性領域が希釈により水和され吸熱変化となったと考えられる。また、後半の希釈では会合状態の変化はなく、単なる溶質の希釈過程と同様で発熱変化になったと考えられる。まとめると、0.1mM 以上の濃度においては tetramer ではない会合体が形成されている。Dathe らの動的光散乱の結果¹³⁾によれば、論文に示された図において 15 ~ 30nm のサイズの集合体の存在が認められる (ただし Dathe らはこの領域を CRF によるものと考えていない)。従って、これはおそらくミセルであると思われる。ミセル中の分子数はサイズから 1000 ~ 10000 と推定される。

以上のように、CRF においては 0.1mM 以下では monomer と tetramer が平衡ではなく存在し、0.1mM 以上では、これらの他に数千分子が会合したミセルが共存していると考えられる。

6.3.2 結果と考察：ミセル状態を経る唯一のテトラマー形成

会合体形成の濃度依存性

CRF の凍結乾燥粉末を各種濃度になるように buffer に溶解した試料 (以下、単純溶解試料と呼ぶ) の CD スペクトルを測定し、その 222nm のモル楕円率を濃度に対してプロットした。結果は図 6.6 のように、0.1mM 以上では希釈とともに $[\theta]_{222\text{nm}}$ は減少するが、0.1mM 以下ではその値は一定で $-12000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ となった。また、限外濾過で分画した CRF 溶液は monomer も tetramer も、0.02mM 以下で一定の $[\theta]_{222\text{nm}}$ を与えた。tetramer は希釈によっても $[\theta]_{222\text{nm}}$ は変化しなかったが、これは前述のように、tetramer が平衡によって形成されていないことを意味している。また、monomer は 0.05mM 以上に濃縮すると次第に $[\theta]_{222\text{nm}}$ の強度は増大し、単純溶解試料の濃度依存性変

化と一致した。この結果は高濃度域におけるミセル形成によって説明できる。次に、monomerを濃縮後、再度0.1mM以下に希釈すると単純溶解試料と同じ挙動を示した。すなわちこれらの変化は monomer → (monomerとミセルの平衡) → (monomerとtetramerの混合系) と考えられる。

図6.6においては、monomer溶液から濃縮した場合に $[\theta]_{222\text{nm}}$ 強度が増大しはじめる濃度が希釈時の0.1mMよりいくらか低い濃度になっている。これは濃縮操作において、平均濃度が0.1mM以下で

も限外濾過フィルター近傍で0.1mM以上となつてミセルが形成され、操作終了後の均一化でミセルからtetramerが生成したためであると考えられる。

まとめると、ミセル状態のCRFはtetramer同様の高い α -ヘリックス含量を有し、希釈によってミセルが解離して、monomerとtetramerの混合物を与えると考えられる。また、monomerとtetramerはさらに希釈しても構造変化しない。ミセル形成は可逆的で、臨界ミセル濃度は0.1mMと考えられる。

会合体構造の温度依存性

二次構造の温度変化を種々の濃度のCRFについて、温度スキャンCD法で測定した。 α -ヘリックス構造に対応する $[\theta]_{222\text{nm}}$ でモニターした結果を図6.7に示す。0.005mMの低濃度の単純溶解試料では、55°C付近に転移を持つ構造変化が観測された。低温側のfolded構造においては、温度上昇につれて $[\theta]_{222\text{nm}}$ 強度が徐々に減少し、高温側の変性状態では-6000 deg cm²dmol⁻¹でほぼ一定値を与えた。このような変化は、第7章や第11

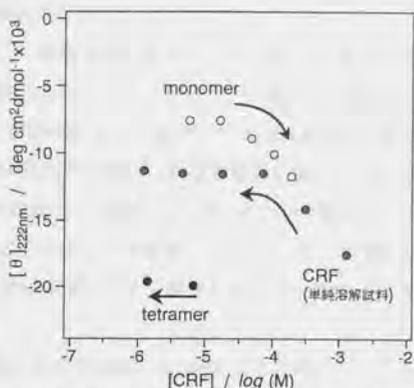


図6.6 濃縮および希釈によるヘリックス含量の変化 (矢印は濃度変化方向を示す)

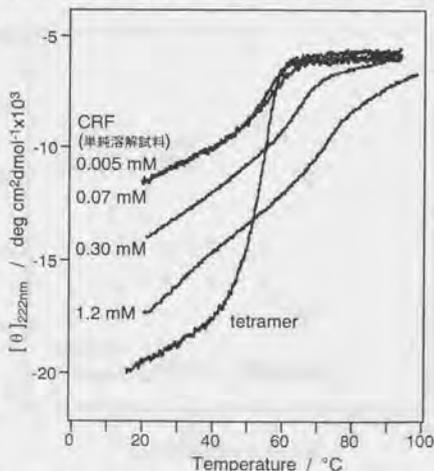


図6.7 温度スキャンCD法による各種濃度試料溶液の熱転移挙動

章で記述する α -ヘリックスの会合体の温度変化と類似している。

monomerのみの試料を測定した場合、二次構造は熱転移を示さず、 $[\theta]_{222nm}$ 値は一定のままであった。一方、tetramerのみの試料は55°C付近にシャープな熱転移を与えた。従って、0.1mM以下での単純溶解試料の示す熱転移は、含まれているtetramerの熱転移であると考えられる。0.1mM以下では熱転移は不可逆で、変性後室温に戻しても二次構造は回復しなかった。これらの現象は、すなわちmonomerとtetramerの混合系の熱転移においては、それぞれが独立の挙動をしていることを意味している。もし可逆的な解離を伴う転移であれば、転移温度は第11章に示すように、濃度依存性を示すはずであるがそうではなかった。

一方、CRF濃度を臨界ミセル濃度0.1mM以上にすると、0.1mM以下の場合と明らかに異なり、転移温度以上の変性状態においても $[\theta]_{222nm}$ の絶対値はゆるやかに減少した。温度上昇とともに $[\theta]_{222nm}$ が減少するのは、ミセルからモノマーが解離していくためと考えられる。昇温後の冷却によって $[\theta]_{222nm}$ はもとの値に回復し、ミセルの平衡が可逆であることを示している。ミセル存在系でもシャープな転移部分が見られるが、これは系中に存在するtetramerによるものと考えられる。ただし転移温度は孤立したtetramerの場合より高くなっており、tetramerとミセルとの間に相互作用があると考えられる。

ミセル状態のCRFの $[\theta]_{222nm}$ がtetramerのものと同じであると仮定すると、ミセルとtetramerの合計量が推定できる。この仮定はヘリックス形成を誘起しやすい50%TFE溶液中の $[\theta]_{222nm}$ 値が $-25000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ であることから、ほぼ妥当なものと考えられる。図6.8にこうして算出したミセルとtetramerの20°Cにおける合計含量をプロットした。0.1mM以下では合計含量は40%程度で一定であるが、0.1mM以上で上昇し、1mM付近で系中の分子の約90%がミセルとtetramerになる。前述のように、図6.7に示した $[\theta]_{222nm}$ の温度変化におけるシャープな転移部分はtetramerによるものと考えられるので、転移におけるステップ高さ

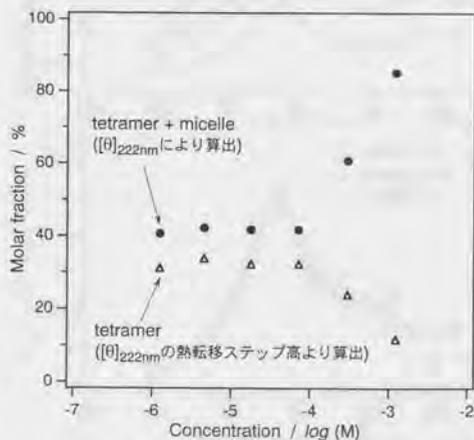


図6.8 tetramerおよびミセルの推定含有率の濃度依存性 (monomer単位のモル分率で示す)

を、tetramerのみの転移曲線のfoldedおよびunfoldedの状態の外挿直線間の開きを基準にしてその割合を計算した。この割合が転移温度におけるtetramer含量になる(図6.8の三角マーク)。0.1mM以下ではtetramerは約30%で一定であるが0.1mM以上ではtetramer含量が減少する。温度が異なるので、この値とミセルとtetramerの合計量とを完全には比較できないが、0.1mM以下ではtetramer含量は2つの計算方法において一致していると考えられる。また、0.1mM以上においてはミセル含量が増大し、monomer含量とtetramer含量はともに、濃度につれて減少する。しかしながら、monomerとtetramerの量比はあまり変化していないと思われる。

熱転移における熱量変化を調べるためにDSCを測定した結果を図6.9に示す。CRF濃度が0.1mM以上では全体にブロードな転移を示すが、0.1mM以下ではいくらかシャープである。転移温度(見かけのピーク温度)は温度スキャンCD法の結果とほぼ同様に0.1mMより高濃度になるにつれて上昇した。おそらくミセルの解離に伴うと思われる熱量が転移曲線に重なっているために、folded状態をDSC曲線上で特定するのは困難であった。しかしながら、粗い近似で転移enthalpyを求めると、 $20 \sim 40 \text{ kJ} (\text{monomer mol})^{-1}$ と推定される。この値は温度スキャンCDの結果から算出されるvan't Hoff enthalpyが $310 \sim 390 \text{ kJ mol}^{-1}$ であることと比較すると、かなり小さい。このことは、DSCの測定条件が主に0.1mM以上であったためにtetramer含量が低いことと、分子間の協同性があるためと解釈される。そこで、より詳しくDSCデータを解析するために、CRF濃度0.08mMのDSC曲線について、2状態転移の理論式^{17,18)}を用いてフィッティングを行った(図6.9下図)。この濃度では転移の熱量に関係するのはtetramerのみであるから、その含量を図6.8より40%と仮定し、

また可逆性が保障されていないため

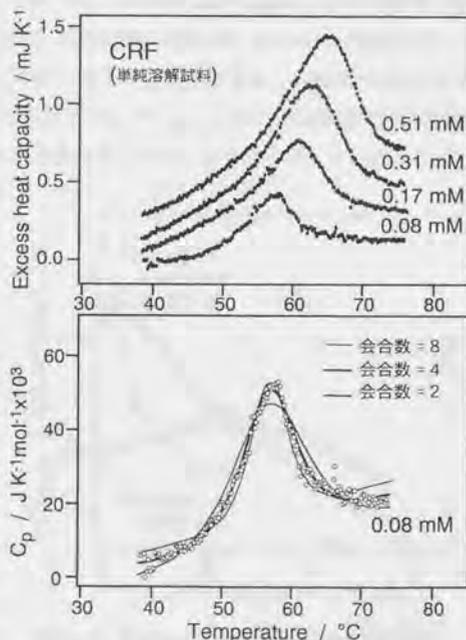


図6.9 各種濃度のCRF水溶液のDSC曲線(上図)と0.08mMにおける理論曲線との比較(下図)

に変性後も同じ会合数であるとして、dimerからdimer, tetramerからtetramer, octamerからoctamerの3つの場合について計算した。図6.9に示すように、実測値はtetramerからtetramerへの変性モデルに比較的好く一致し、転移enthalpy (calorimetric enthalpy) は $360 \text{ kJ (net tetramer mol)}^{-1}$ であった。この値はCDの結果とよく合っており、tetramerが2状態転移をすることを裏付けている。また、 0.1 mM 以上におけるDSC転移曲線のブロードさは、tetramerとミセルとの非協同的な分子間相互作用によるものと考えられる。

トリフルオロエタノールによる会合状態変化

会合状態間の変化をより明確に理解するために、2,2,2-trifluoroethanol (TFE) によるCDスペクトルの変化を測定した。図6.10に示すように、分子量分割したCRFのmonomerはTFE%の増加とともに $[\theta]_{222\text{nm}}$ 強度が増大した。この変化は濃度を 0.006 mM から 0.057 mM へと高くすると、より低いTFE%において起きた。すなわち、この濃度依存性はmonomerの会合によって起きていると考えられる。一方、一般にTFEはヘリックス誘起性のある溶媒と考えられ、高いTFE%においてはペプチドは会合していない単一のヘリックス構造をとる。30%TFE溶媒中でのCRF-monomer溶液のCDスペクトルを、buffer中のtetramerのCDスペクトルと比較すると、222nmのバンドに対する208nmのバンドの強度比がより大きくなっている。このことは30%TFE溶媒中でCRFは孤立した(非会合の)ヘリックス構造をとっていることを示している。これらの結果を総合すると、CRFのmonomer溶液に対するTFEの添加は、例えば 0.006 mM においては、TFE濃度8%においてミセルを形成する転移が起き、さらに20%TFEにおいてミセル共存系から非会合ヘリックスに変化したと解釈できる。最初のmonomerからミセル共存系への変化は、臨界ミセル濃度がTFEにより低下したため、TFE%が $0 \rightarrow 2.5 \rightarrow 8\%$ と上昇するにつれて、臨界ミセル濃度は $0.1 \rightarrow 0.05 \rightarrow 0.005 \text{ mM}$ と変化した。この傾向は一般の界面活性剤において臨界ミセル濃度がアルコール添加とともに

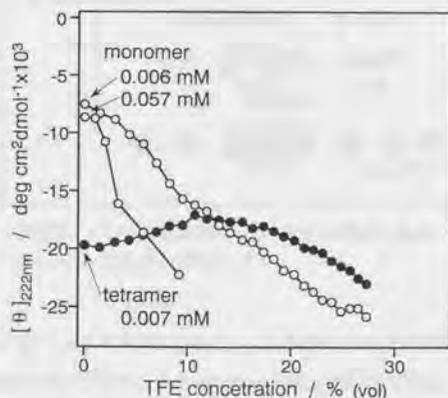


図6.10 monomerおよびtetramer試料液のTFE滴定によるヘリックス含量変化 (CRF濃度は初期値)

に減少すること²²⁾と同じである。

また、分子量分割した tetramer 溶液 (0.007mM) に対する TFE の添加は、TFE 濃度が 0→10% の領域で $[\theta]_{222nm}$ がわずかに減少する。この変化は、先の monomer の転移から考えると、tetramer からミセルが形成された転移と考えられる。この転移ではミセルの形成とともに平衡過程で monomer が生じるために $[\theta]_{222nm}$ 強度の減少がおきたのではないかと考えられる。TFE% を 30% まで増加させると、monomer の場合と同様に非会合ヘリックスへと変化したものと予想される。

特定会合体を形成する統計モデル

以上のように、実験結果から、CRF においては低濃度では平衡状態にない monomer と tetramer が存在し、それらは 0.1mM 以上の高濃度においてはミセル状態と平衡で存在することが明らかとなった。濃度依存性の他、温度依存性や TFE 滴定実験においてもこの 3 元系の会合状態の変化モデルは現象をよく説明した。tetramer に着目すると、tetramer はミセル状態からのみ、濃度変化によって生成している。しかも tetramer 形成はある比率で monomer 形成を伴っている点が興味深い。そこで、このような tetramer 形成を統計モデルで説明できないかを以下で検討した。

まず仮定として次のように考える (図 6.11 にモデルを示す)。(i) monomer の集合体であるミセルがランダムに解離する。(ii) ミセル中の monomer は便宜的に可付番である、すなわち数学的に 1 次元とみなせる。(iii) ランダムな解離によって特定の会合数 k になった場合は安定に存在してさらに解離することはないが、 k -mer 以外はさらに解離が進行する。 n 個の分子が集まったミセルから生成する k -mer のモル分率 (monomer 単位) を $P_{n,k}$ とする。例えば簡単な例で考えると、 $n=6, k=4$ の場

合は、最初の解離で 6-mer は 1+5, 2+4, 3+3, 4+2, 5+1 となる。この時 4-mer の生成率は $4 \cdot 2 / (6 \cdot 5)$ で、5-mer の生成率は $5 \cdot 2 / (6 \cdot 5)$ である。5-mer からは $P_{5,4}$ の率で 4-mer が生成するので、 $P_{6,4}$ は次式で表される。

$$P_{6,4} = \frac{4 \cdot 2}{6 \cdot 5} + \frac{5 \cdot 2}{6 \cdot 5} \cdot P_{5,4} \quad (\text{eq.6.1})$$

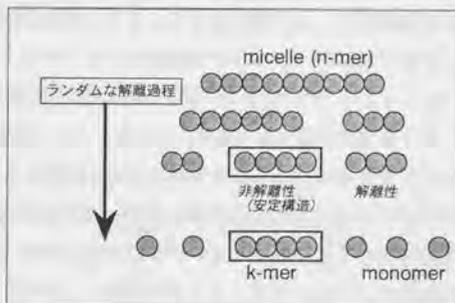


図 6.11 ミセル状会合体から特定の安定 k 量体を与えるランダム解離モデル

この式を一般化すると、

$$P_{n,k} = \frac{k+2}{n \cdot (n-1)} + \sum_{j=k+1}^{n-1} \left(\frac{j+2}{n \cdot (n-1)} \cdot P_{j,k} \right) \quad (\text{eq.6.2})$$

が得られる。これはさらに簡略化できて、

$$P_{n,k} = P_{n-1,k} = P_{n-2,k} = \dots = P_{k+1,k} \quad (\text{eq.6.3})$$

となる。最右辺は(eq.6.1)の第一項の考察と同様にして

$$P_{k+1,k} = \frac{k+2}{(k+1) \cdot k} \quad (\text{eq.6.4})$$

であるので、最終的に、

$$P_{n,k} = \frac{2}{k+1} \quad (\text{eq.6.5})$$

が得られる。すなわちこの式は、k-merの生成率はミセルの会合数に依存しないことを意味している。CRFの場合にはtetramerが形成されたので、(eq.6.5)を適用すると、 $P_{n,4}$ は0.4となる。この値は図6.8に示したtetramerの含有率とよい一致を示し、tetramer形成がランダムな解離過程であることを支持している。

結論

以上のように、CRFのtetramerはミセル状態からランダムな解離によって形成されることが推定された。タンパク質のフォールディングの観点から見ると、熱転移で示されたように、tetramerは天然のタンパク質と同様に固いフォールディング (native-like folding) をしており、その結果ANSを結合しない。おそらくtetramerは三次構造を伴っていると予想される。一方CRFのミセル状態はANSを結合することから疎水性コアはかなり自由度のある状態、おそらくmolten-globule状態と推定される。このようなCRFのtetramerの会合特性は、従来知られているcoiled-coilやヘリックスバンドル形成性のペプチドの挙動^{1,3,23}とは非常に異なっている。この違いはフォールディングした構造がnative-likeかmolten-globuleかの違いによっているのではないかと考えられる。

さらにフォールディング過程として見ると、熱力学的フォールディング過程として、これまでジグソーパズルモデル、diffusion-collisionモデル、nucleationモデル、frameworkモデル、hydrophobic collapse (疎水性凝集)モデルなどが提唱されている²⁴。ここでのCRFのtetramer形成は、これらのうちのcollapseモデル^{25,26}と類似している。また、molten-globule状態のミセルの存在によってtetramerがnative-likeにフォールディングすることは、生体系においてタンパク質がchaperonの作用によってmolten-globule状態で結合したのち、native-likeなフォールディング構造に至ること

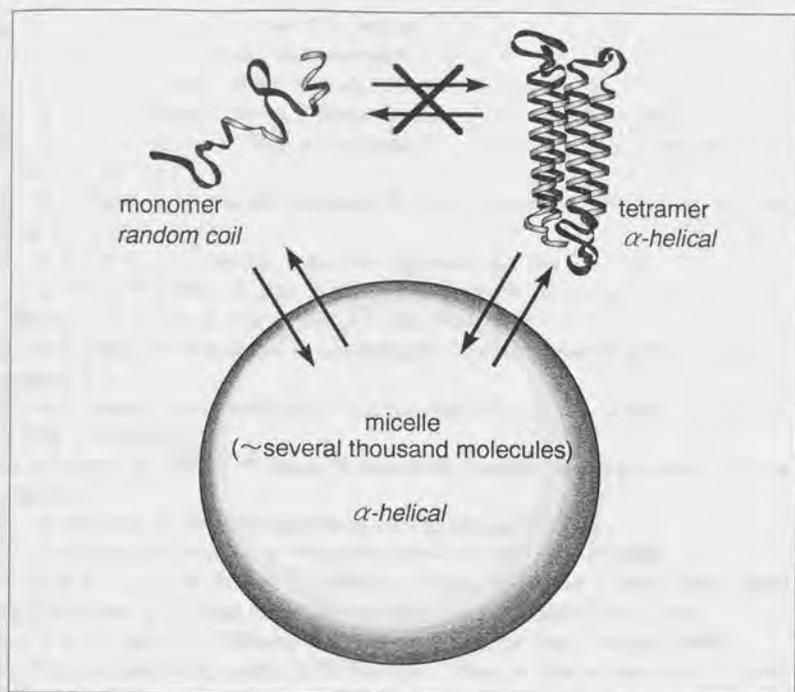


図 6.12 CRF の 0.1mM 以上の濃度における 3 状態間の構造変換過程

27,28) とある意味で類似性を見いだすことができる。

図 6.12 に CRF の 3 つの異なる状態 (分子種) 間の 0.1mM 以上の濃度における平衡関係を模式図で示した。0.1mM 以下ではこのうちミセル状態が消失し、monomer と tetramer は平衡論的にはそれぞれ孤立する。本章で述べた CRF の tetramer 形成は全く新しい発見であると同時に、将来人工タンパク質の創成において重要となるフォールディングのための技術的基盤のヒントを与えるものと思われる²⁹⁾。

引用文献

1. H. Morii, T. Takenawa, F. Arisaka, T. Shimizu, *Biochemistry*, 36, 1933-1942 (1997)
2. S. F. Betz, W. F. DeGrado, *Biochemistry*, 35, 6955-6962 (1996)
3. S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 6751-6758 (1987)
4. R. H. Pain, *Mechanisms of Protein Folding*, Oxford University Press, (1994); 崎山 監訳, 後藤, 河田 訳, *タンパク質のフォールディング*, シュプリンガーフェアラーク東京 (1995)
5. R. Guillemin, B. Rosenberg, *Endocrinology*, 57, 599-607 (1955)

6. G. Gillies, P. Lowry, *Nature*, 278, 463-464 (1979)
7. G. Sayers, E. Hanzmann, M. Bodanszky, *FEBS Lett.*, 116, 236-238 (1980)
8. J. Spiess, J. Rivier, C. Rivier, W. Vale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6517-6521 (1981)
9. W. Vale, J. Spiess, C. Rivier, J. Rivier, *Science*, 213, 1394-1397 (1981)
10. S. H. Lau, J. Rivier, W. Vale, E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7070-7074 (1983)
11. P. V. Pallai, M. Mabilia, M. Goodman, W. Vale, J. Rivier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6770-6774 (1983)
12. P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 251-276 (1978)
13. M. Dathe, H. Fabian, K. Gast, D. Zirwer, R. Winter, M. Beyermann, M. Schumann, M. Bienert, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 47, 383-393 (1996)
14. C. Romier, J.-M. Bernassau, C. Cambillau, H. Darbon, *Protein Engineering*, 6, 149-156 (1993)
15. A. V. Schally, R. N. Andersen, H. S. Lipscomb, J. M. Long, R. Guillemin, *Nature*, 88, 1192-1193 (1960)
16. S. Ohashi, M. Shiraki, M. Okada, E. Munekata, *Peptide Chemistry*, 1982, 143-148 (1983)
17. S. Kidokoro, A. Wada, *Biopolymers*, 26, 213-229 (1987)
18. S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, *Biopolymers*, 27, 271-297 (1988)
19. S. Y. M. Lau, A. K. Taneja, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.*, 259, 13253-13261 (1984)
20. Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350-3359 (1974)
21. T. M. Handel, S. A. Williams, W. F. DeGrado, *Science*, 261, 879-885 (1993)
22. S. H. Herzfeld, M. L. Corrin, W. D. Harkins, *J. Phys. & Colloid Chem.*, 54, 271-283 (1950)
23. S. Kojima, Y. Kuriki, Y. Sato, F. Arisaka, I. Kumagai, S. Takahashi, K. Miura, *Biochim. Biophys. Acta*, 1294, 129-137 (1996)
24. M. Karplus, E. Shakhnovich, *Protein Folding*, Chap. 4, ed. by T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1992)
25. K. Dill, *Biochemistry*, 24, 1501-1509 (1985)
26. K. Dill, *Biochemistry*, 29, 7133-7155 (1990)
27. J. Buchner, M. Schmidt, M. Fuchs, R. Jaenicke, R. Rudolph, F. X. Schmid, T. Kiefhaber, *Biochemistry*, 30, 1586-1591 (1991)
28. J. Martin, T. Langer, R. Boteva, A. Schramel, A. L. Horwich, F.-U. Hartl, *Nature*, 352, 36-42 (1991)
29. H. Morii, H. Uedaira, M. Ishimura, S. Kidokoro, T. Kokubu, S. Ohashi, *Biochemistry*, 36, 15538-15545 (1997)

第7章 2および4ヘリックス系における疎水性内部残基の役割

7.1 序論

α -ヘリックスのみで形成される超二次構造には、2本のヘリックスからなるコイルドコイルや4本のヘリックスからなる4-ヘリックスバンドルなど典型的な構造体が天然では知られている¹⁻⁷⁾。これらの α -ヘリックスの集合体のうち水に可溶性であるものは、ヘリックス部分が両親媒性の配列を有している^{1,2)}。構造形成の第一要因は水中における疎水性残基の集合である。このような疎水性内部残基は、天然タンパク質においては、単に全体的な集合体形成を引き起こすという必要性だけでなく、ミクロな構造的特徴にも関与している。たとえば、酵素における分子認識、補酵素群を正確な位置で内部に保持すること、などは機能に密接に関わっている²⁾。また、熱力学的あるいは物性的な視点から見ると、タンパク質の熱的安定性やフォールディングの特徴^{8,9)} (native-likeな一義的なフォールディングか、molten-globule的な多安定構造か)、あるいは構造の動的変形性などにも、疎水性内部残基が関与していると思われる。これらの性質もまた機能上重要なものである。従って、機能の発現をめざした人工的なタンパク質の創出においては、ミクロな構造と分子レベルでの物性をいかにして設計するかがポイントとなる。一言で述べれば、フォールディングという現象をいかにして制御し設計するかが問題である。

ここでは、フォールディングにおける疎水性内部残基の役割¹⁰⁻¹⁴⁾に注目して、上述のような目的に叶った設計指針を見いだすことを目的として、2-および4-ヘリックス系の小型タンパク質をモデルとして検討を行った。2-および4-ヘリックスの両親媒性ペプチドを人工的に設計し、疎水性内部残基を各種置換して、熱的安定性を含めてフォールディングの特徴にどのように影響するかを熱力学的手法を中心に研究した。

7.2 実験：合成と測定

設計

設計したタンパク質 (ペプチド) の構造を図7.1に示した。名称は、図7.1の2-ヘリックス型のものを“タンパク質DB” (図7.1左)、4-ヘリックス型のものを“タンパク質FB” (図7.1右) と命名し、それぞれ置換残基名を添えて示した。ヘリックス部分はheptadの両親媒性構造を基本として設計し、基本配列のa, d位置にはすべてLeuを置いた。Leu残基はいずれのヘリックスにも5周回しか出現しないため、安定なバンドル構造が形成されやすくするように、コアに隣接するg位置にやや疎水性のAla残基を置いた。ヘリックスの他の位置の残基は、親水性残基を多用し、イオン性と非イオン性のバランスや配

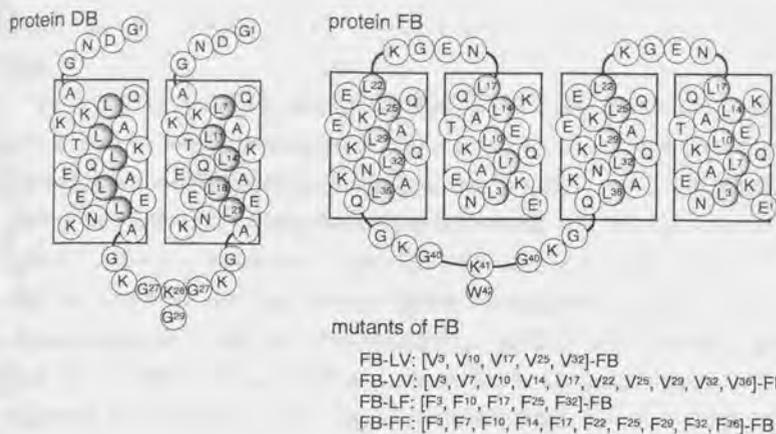


図7.1 設計したヘリックスバンドルタンパク質のアミノ酸配列とヘリックス性部分のネットワーク表示（ヘリックス性部分をボックスで示す。DBはLeu-DB、FBはFB-LLの基本配列を示した。灰色はコア領域の残基）

置は天然物を参考に適度に分散させて配した。またループ部分は、FBではターンを形成しやすい配列をデータベースから選び、-Asn-Glu-Gly-Lys-を用いた。長鎖ペプチドの合成上の困難を軽減するために、C端部分は合成2残基目にFmoc-Lys(Fmoc)-OHを使用して、3残基目以降が同一の配列を持つ分岐構造にした（音叉型）。この分岐部分には親水性のLysとGlyを置きループ構造に適するようにした。DBのN端部分は最初、4ヘリックス体を合成する目的でGly-Asp-Asn-Glyのターン構造性の配列を設計したが、合成結果は、1位のGlyのアミノ基が2位のAspの側鎖カルボキシル基と高い収率で脱水カップリングしてしまい、末端に7員環を有する構造を与えたため、2ヘリックス体として使用した。ヘリックス部分はChou-Fasmanの予測法¹⁵⁾により(5-24)領域と推定され設計の妥当性を支持した。また、G.O.R.の予測法¹⁶⁾では(3-25)領域がヘリックス性と予測された。

DBでは疎水性コアの中心の14位をIle, Val, Phe, Trp, Ala, Gln, Lysに置換したものと、11位をIle, Val, Trp, Glnおよび18位をIleに置換したものを設計した。これらは同一配列の分岐構造のため、2置換体である。他に、11位と14位を同時に置換した4置換体、[Ala¹¹, Asn¹⁴], [Ala¹¹, Ala¹⁴], [Ala¹¹, Trp¹⁴], [Phe¹¹, Phe¹⁴]を設計した。またFBでは4本のヘリックスのすべてのa位置あるいはd位置を同一の残基にした。a位置をLeuにしd位置をValにしたFB-LVの他、同様にa位置とd位置をLeuとPhe, ValとVal,

Phe と Phe にした FB-LF, FB-VV, FB-FF をそれぞれ設計した。

合成

合成は通常の Fmoc 法による固相合成法を用い、Fmoc-Gly (または Trp) が導入されている TGS-PHB 樹脂 (Shimadzu 製、poly ethylene glycol 修飾 poly styrene-divinyl benzene 樹脂に hydroxymethylphenoxy 基を付けたもの) を末端基量として約 16 μ mol を使用して、Shimadzu-PSSM8 自動合成機により伸長反応を行った。使用したアミノ酸は Ala, Asp(OtBu), Glu(OtBu), Phe, Gly, Ile, Lys(Boc), Leu, Asn(Trt), Gln(Trt), Thr(tBu), Val, Trp の各 Fmoc-誘導体 (Watanabe Chem. 製) である。各 100 μ mol の Fmoc-アミノ酸とカップリング試薬としては TBTU-HOBt-NMM(1:1:2)系を用いて、各 25 分間カップリングを行った。Fmoc 基の除去には piperidine (20%) と 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (4%) の DMF 溶液を用い、6 分 x 2 回反応処理した。C 端の 2 残基が一般に環化して脱離欠損しやすいため、第 2,3 番目のサイクルでは Fmoc 基除去反応を 90 秒に短縮した。伸長終了後、トリフルオロ酢酸 (TFA) (90%), 1,2-ethanedithiol (6%), 水 (4%) の混合液により、全保護基を除去 (cleavage) した。生成物は水冷 diethyl ether に沈殿後、乾燥させた後、20% 酢酸に溶かして、逆相 HPLC (カラムサイズ 4.6x250mm) で分析した。セミ分取用カラム (20 x 250mm) を用いて 0.08% の TFA を含む水とアセトニトリルのグラジエント溶出により、主ピークのみを分取し、凍結乾燥して各ペプチドを得た (収量約 5mg)。同定は ESI-MS による分子量測定と酸加水分解アミノ酸分析により行った。また、ペプチド量の定量はアミノ酸分析あるいは Trp の 280nm の吸光度をもとに行った。

円偏光二色性

CD スペクトルは Jasco-J600 スペクトロポラリメーターを用いて測定した。濃度変化には 0.2~10mm の光路長のキュベットを使用し、温度変化の測定には 1mm のキュベットを使用した。ペプチドは、濃度定量したストック液から一定量を取り出し、100mM の KCl を含む 20mM リン酸カリウムバッファー (pH7.0) に溶かして使用した。測定温度はキュベットと一体となっている循環恒温水ジャケットの測定溶液の近傍で熱伝対により計測した。温度変化の測定は、0.8K/min の一定速度で循環恒温水槽の温度を昇温制御することによって行い、222nm の楕円率と温度を同時にパーソナルコンピューターに 1 秒毎に取り込んで記録した。

昇温測定で得た温度スキャンデータは、2 状態転移のモデルで解析した^{17,18)}。DSC の解析に使用される熱力学の近似式、

$$\Delta G_{01} = -\Delta a_{01} T^2 - \Delta b_{01} T \ln(T) + \Delta c_{01} + \Delta d_{01} T \quad (\text{eq.7.1})$$

$$\Delta H_{01} = \Delta a_{01} T^2 + \Delta b_{01} T + \Delta c_{01} \quad (\text{eq.7.2})$$

において、一般のタンパク質で示されているように $\Delta a_{01}=0$ と仮定し、転移温度 T_d の時に $\Delta G_{01}=0$, $\Delta H_{01} = \Delta H_v$ (T_d における van't Hoff enthalpy) であることを用いて、

$$\Delta c_{01} = \Delta H_v - \Delta b_{01} T_d \quad (\text{eq.7.3})$$

$$\Delta d_{01} = \Delta b_{01} \ln(T_d) - \Delta c_{01}/T_d \quad (\text{eq.7.4})$$

が成り立つ。また、folded 状態のモル分率 f_0 は一般に、

$$f_0 = \{1 + \exp(-\Delta G_{01}/RT)\}^{-1} \quad (\text{eq.7.5})$$

で表される。CDの楕円率(一般式を導出するため仮に y とする)の温度変化が、folded 状態とunfolded 状態それぞれ温度 T に対して直線的であると仮定すると、各直線 y_0 , y_1 は、

$$y_0 = p_0 (T - T_d) + q_0 \quad (\text{eq.7.6})$$

$$y_1 = p_1 (T - T_d) + q_1 \quad (\text{eq.7.7})$$

のように表現できる。ここで p_0 , p_1 , q_0 , q_1 は直線の傾きと T_d における切片値である。実測されるモニター量 y は、

$$y = f_0 y_0 + (1 - f_0) y_1 \quad (\text{eq.7.8})$$

であるので、ここへ(eq.7.5), (eq.7.6), (eq.7.7)を代入し、さらに ΔG_{01} に(eq.7.1)を代入、(eq.7.3), (eq.7.4)によって Δc_{01} , Δd_{01} のパラメータを消去すると、最終的に y は p_0 , p_1 , q_0 , q_1 , T_d , ΔH_v , Δb_{01} の7つのパラメータを持つ T の関数として表現できる。

$$y = y(T; p_0, p_1, q_0, q_1, T_d, \Delta H_v, \Delta b_{01}) \quad (\text{eq.7.9})$$

この式(eq.7.9)を用いて、実測の熱転移曲線と多変数のフィッティングを行うことにより、これらのパラメータの組が求められる。実際上は、 Δb_{01} (folded 状態とunfolded 状態の熱容量変化 ΔC_p に相当する)は、sigmoid 型曲線からは低い精度でしか算出できず、数 $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ の許容域があったので、 $\Delta b_{01}=0$ と仮定して、6パラメータ系でカーブフィッティングを行った。

尿素による変性実験は、各種濃度の尿素溶液を調製し、凍結乾燥したペプチドをこれに溶かして、CDを測定して行った。測定結果の解析は、変性の自由エネルギー変化 ΔG が変性剤濃度の一次式

$$\Delta G = \Delta G_w - m C_d \quad (\text{eq.7.10})$$

で表現できるとして行った^{19,20}。 ΔG_w は変性剤の存在しない時の変性の自由エネルギー変化、 m は転移の協同性に関係するパラメータ、 C_d は変性剤濃度である。温度変化の場合と同様にfolded 状態とunfolded 状態を直線 y_0 , y_1 で近似し、(eq.7.8)に平衡の式、

$$\Delta G = -RT \ln(K_d) \quad (\text{eq.7.11})$$

$$K_d = (1 - f_0)/f_0 \quad (\text{eq.7.12})$$

を組み込むことで、 y を2本の直線の傾きと切片値、 ΔG_w , m の合計6パラメータを含む C_d の関数として表現できる。上記と同様にしてカーブフィッティングを行い、これらのパラメータを求めた。

示差走査熱量計

DSC測定はMicrocal-MCS示差走査熱量計により行った。昇温速度とバッファーはCD測定と同様の条件を用いた。ペプチド濃度は2-3mg/mlとし、測定溶液は透析膜(Spectra Por CE, 分子量5000)により透析したものをを用いた。データ解析はパーソナルコンピューター(Macintosh)上でIgorおよびLotus123のソフトを使用して行った。解析はKidokoroらの式^{19,20}を用いて行った。

NMR測定

Brucker-AMX500 (¹H, 500MHz) を使用して測定した。凍結乾燥したペプチドを90% H_2O /10% D_2O に溶かし、試料濃度約2mMで、20°Cで測定した。軽水のピークはpresaturation法で消去した。

7.3 結果と考察：パッキングの重要性

2-ヘリックス型タンパク質DBの基本配列(Leu-DB)のCDスペクトルは、208nmと222nmに負のピークを与え、 α -ヘリックスに富む構造であることを示した。 $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値が $-21000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ であることより、ほぼ設計通りの部分が α -ヘリックス構造をとっていると推定される²¹。疎水性コアの中心にある2個の Leu^{14} を置換した各種 $[Xaa^{14}]$ -DBについて、222nmにおけるモル楕円率 $[\theta]_{222\text{nm}}$ でモニターした昇温測定結果を図7.2に示す。 Leu^{14} , Val^{14} , Ile^{14} で置換したDBはいずれも協同的な熱転移を示し、 $[\theta]_{222\text{nm}}$ は高温側の変性状態で約 $-5000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ になった。転移温度は $Leu \sim Ile$,

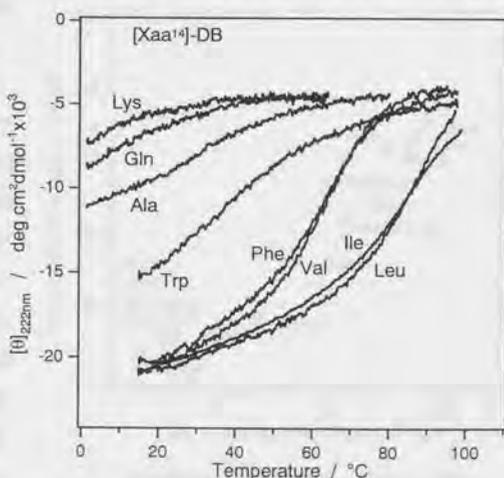


図7.2 タンパク質DBの14位置置換体の熱転移曲線

Val~Phe, Trp, Ala, Gln, Lys の各[Xaa¹⁴]-DBの順に低下した。[Ile¹⁴]-DBと[Val¹⁴]-DBを比較すると、わずか1個のメチル基のペアの削除によって約20Kの転移温度の低下が起きている。親水性残基に置換した[Gln¹⁴]-DBや[Lys¹⁴]-DBは測定可能な温度範囲ではほとんど変性しており、5組のLeuペアからなる疎水性コアへの1組の親水性残基の導入はコイルドコイル構造をほとんど破壊してしまうことがわかる。芳香族の残基を導入した[Phe¹⁴]-DBと[Trp¹⁴]-DBは、PheやTrpは疎水性の点ではLeuよりも疎水的であるにもかかわらず、転移温度はかなり低下した。特にTrpはPheより疎水性であるがPheよりも転移温度が下がった。このことはコイルドコイルの疎水性コアの形成には、疎水性（アミノ酸側鎖を水から有機溶媒に移す時の自由エネルギー変化で見積もられる）よりも、疎水性コアにおける側鎖間のパッキングおよび相溶性が、構造の安定化には重要であることを示している。

次に、疎水性コアの残基置換をした位置の効果をみるために、[Xaa¹⁴]-DBと[Xaa¹¹]-DBおよび[Xaa¹⁸]-DBを比較した。CDによる熱転移曲線を図7.3に示した。Ileでは11位と18位の置換体がより熱的に安定であった。Val, Trp, Glnのいずれもが同様に[Xaa¹¹]-DBが[Xaa¹⁴]-DBよりもかなり安定であった。この結果は、[Xaa¹¹]-DBにおいては11位がコアの中心からずれるため、Leuが3周回連続した疎水性コアをつく

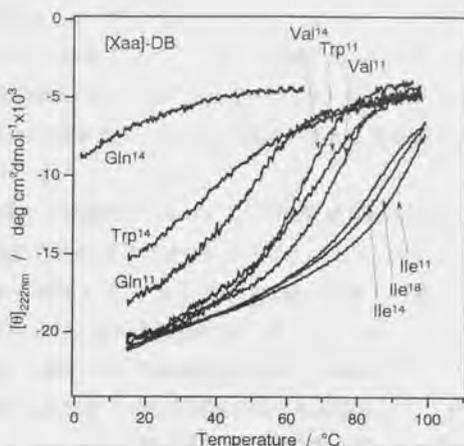


図7.3 タンパク質DBの11位および14位置換体の熱転移挙動の比較

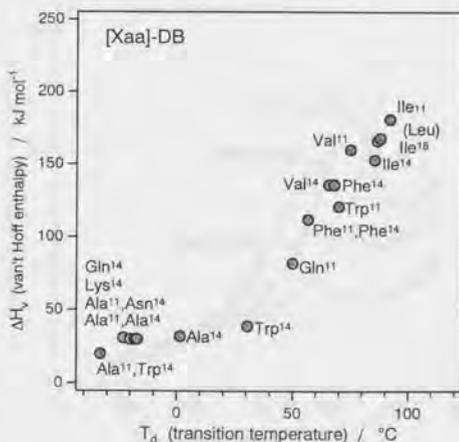


図7.4 各種置換体の熱転移温度と転移エンタルピー

ることによって、[Xaa¹⁴]-DBよりも安定化したと考えられる。しかしながら、ロイシンジッパーについて検討されているような、heptadのa位とd位の性質の違いによる可能性もある²²⁾。すなわち、d位（この場合は14位）のほうがa位（11位）よりも、コイルドコイルのヘリックス間接触面の内側に側鎖が向くために、構造形成上より重要であると考えることもできる。

以上述べたタンパク質DBの2置換体と4置換体について、CDの転移曲線からカーブフィッティングにより算出した転移温度 T_d と転移エンタルピー (van't Hoff enthalpy) ΔH_d をプロットした(図7.4)。50°Cから90°Cに T_d がある置換体はほぼ直線上に乗っており、その傾きは約 $2 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ であった。また全体的にはこのプロットは下に凸の右上がり曲線に乗っているともいえる。一般に ΔH_d の温度微分は ΔC_p に相当するので、図7.4はこの曲線の接線の傾き ΔC_p が T_d の上昇につれて増加することを意味している。タンパク質の熱変性の ΔC_p は、一般にfolded状態における非極性基の対の数(単位重量あたり)と比例することが知られており、ここでDBについて得られた結果は、疎水性コアの残基置換により、有効な非極性基の対の数が減少することによって転移温度 T_d が低下したと理解できる。このことから、熱安定性を向上させるためには、疎水性コアにおけるパッキングをうまく設計して、有効な非極性基の対の数を増加させることが必要であると考えられる。

熱転移挙動をより明確にするために、タンパク質DBの基本配列(Leu-DBと表示)。

[Val¹¹]-DB, [Val¹⁴]-DB, [Gln¹⁴]-DBの4種についてDSCを測定した(図7.5)。転移温度の傾向は温度スキャンCDの結果と一致したが、見かけの転移温度はCDの結果よりいずれも高かった。4種のDSC曲線を比較すると、folded状態とunfolded状態の直線部分の切片値の差 ΔC_p がLeu-DB, [Val¹¹]-DB, [Val¹⁴]-DB, [Gln¹⁴]-DBの順に小さくなっていく。この結果図7.4で議論した結果と一致する。すなわち、疎水性コアに保持されている疎水性面積が、この順に減少していると考えられる。

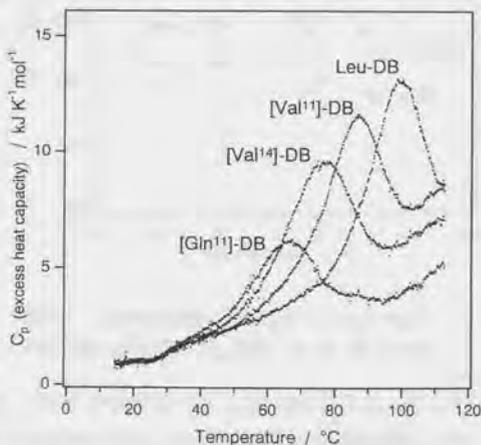


図7.5 タンパク質DBの各置換体のDSC曲線 (CD測定よりも高濃度で測定)

注目されるのは[Val¹⁴]-DB と [Gln¹⁴]-DB で、 ΔC_p 値はそれぞれゼロと負の値を示した。この両者の値は先の図7.4の値とは異なっており、unfolded 状態で疎水性基の凝集が起きていることも考えられる。このようにDSC結果はCD結果と、傾向等は概ね一致しているが、細かい点では違いがある。2つの測定法で濃度が異なることが、この原因ではないかと考え、温度スキャンCD法で濃度の効果を調べた。Leu-DB において0.2 mM, 0.02 mM, 0.002 mMのペプチド濃度で測定したところ、この順に熱転移温度は低下した。[Val¹⁴]-DB についても、0.02 mMでのCDで観測した転移曲線と、0.4 mMで観測したDSCの転移曲線を比較すると、図7.6のようにやはり高濃度で T_d が上昇している。さらに転移曲線を2状態転移モデルの式でフィッティングしてみると、0.02 mMのデータでは理論曲線とほぼ一致したが、0.4 mMのデータは特に転移の高温域で大きくずれ、実測データは急激に unfolded 状態に推移していることを示した。DSC データから得られる

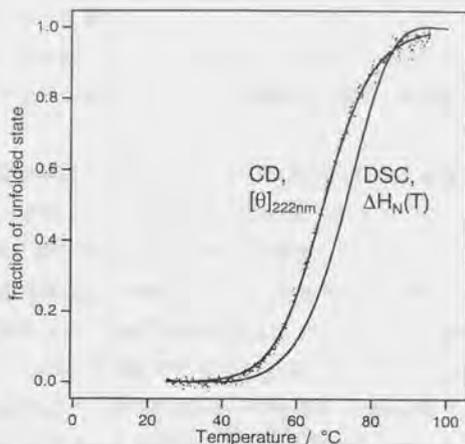


図7.6 0.02mMでのCD測定および0.4mMでのDSC測定結果の比較(変性状態の分率で示した)

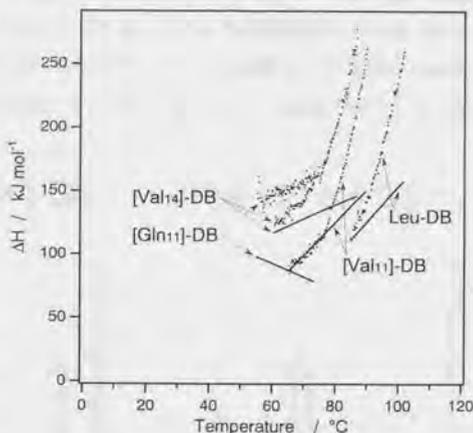


図7.7 calorimetric enthalpy と van't Hoff enthalpy の比較(ΔH_c 直線; ΔH_v 点で示す)

calorimetric enthalpy (ΔH_c) と van't Hoff enthalpy (ΔH_v) を比較すると、図7.7のように、 ΔH_c に比べて、 ΔH_v は転移の高温域で ΔH_c の2倍程度にまで増大する。すなわち、このことは転移の協同性の単位が0.4 mMの場合にはより大きいことを意味している。CDから得られる T_d の温度依存性と合わせて考えると、ペプチドDBは低濃度では

コイルドコイル構造のモノマーであるが、高濃度になるとモノマーが会合して、おそらく4-ヘリックスバンドル型のダイマーを形成していると考えられる。従って、DSCで見られた転移曲線の特徴はダイマーがランダム構造のモノマーに解離する転移であるとして解釈できる。

フォールディングの特徴を構造の面から調べるために、タンパク質DBのNMRを測定した。NMR測定はかなり高濃度で行ったので、この条件でDBはおそらく4-ヘリックスバンドルを形成していると考えられる。図7.8に示すように、3種類のDB、Leu-DB、[Gln¹¹]-DB、[Phe¹¹,Phe¹⁴]-DBはそれぞれ異なった特徴のスペクトルを与えた。約1ppm付近のLeuのメチル基のピークに着目すると、Leu-DBではまとまったブロードな単一ピークであるが、[Gln¹¹]-DBと[Phe¹¹,Phe¹⁴]-DBでは2本に分裂したピークとなる(methyl-methine間のspin-couplingによるものではない)。すなわち、Leu-DBではLeu側鎖は自由度が大きく多安定な構造、おそらくmolten-globule構造をとっていると考えられる。一方、他の2種ではLeu側鎖の構造がある程度束縛され、メチル基が非等価になったと解釈できる。注目されるのは、[Phe¹¹,Phe¹⁴]-DBの場合で、0~1ppmの領域において微小なピークが多数出現することである。このような高磁場シフトはPheのフェニル基の環電流の効果で引き起こされたもので、フェニル環面の上下位置にLeuのメチル基が存在しているためと考えられる。すなわちPheとLeuの側鎖の両方がその位

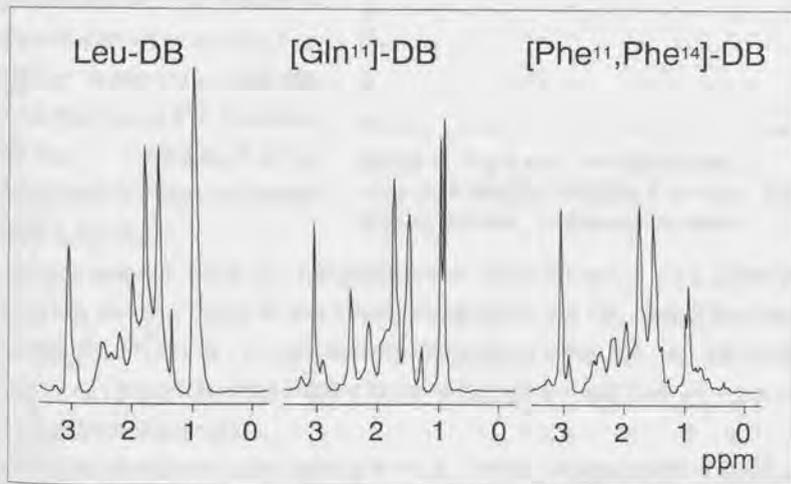


図7.8 タンパク質DBとその置換体の¹H-NMRスペクトル(500MHz)

置を規制されていることを意味している。このことは疎水性コアへの芳香族残基の導入がprotein-likeな一義的なフォールディング構造を実現するのに有効な手段であることを示している。

次に、4-ヘリックス型タンパク質FBの疎水性コア残基の役割について検討した。タンパク質FBのコアにある29位の残基をLeuからVal, Phe, Glnに置換して熱変性を温度スキャンCDで測定した。図7.9のように、タンパク質DBと同様の転移温度の低下傾向が見られた。しかし、転移の協同性の面では、DBに比べて転移曲線はなだらかで協同性は低かった。多数のLeu残基が集めた結果、疎水性コアの自由度がかなり大きくなっていると考えられる。また、4本のヘリックスの連結により、図7.10に示すような多数のコンフォーマーの混合物、すなわち多安定状態として存在している可能性が考えられる。

そこでLeuのみからなるFB-LLの疎水性コアを、図7.1右に示したような多数のPheで置換したFB-LFとFB-FFについて熱転移挙動を調べた(図7.9)。転移温度はPhe含量が増加するにつれて低下したが、転移の協同性は逆にいくらか上昇した。FB-FFは室温付近でもヘリックス性が高く、初めてPheのみの疎水性コアを持つ4ヘリックスバンドルを実現できたことになる。

転移の協同性の違いをさらに明確にするために、FB-LL, FB-LF, FB-FF, FB-LV, FB-VVの変性剤による変性をCDで検討した(図7.11)。Valを含むFBはもともとヘリックス含量が低かったが他は室温ではほぼ同程度のヘリックス含量を示した。変性剤として

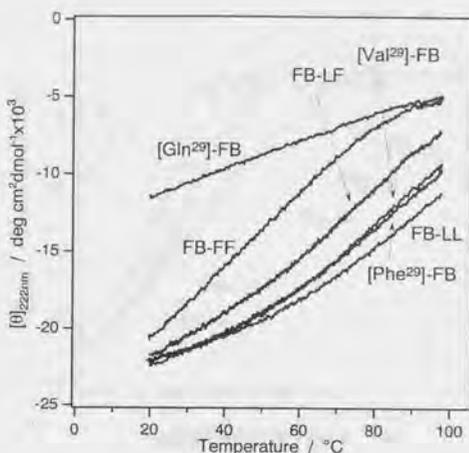


図7.9 4ヘリックス型タンパク質FBの熱転移挙動

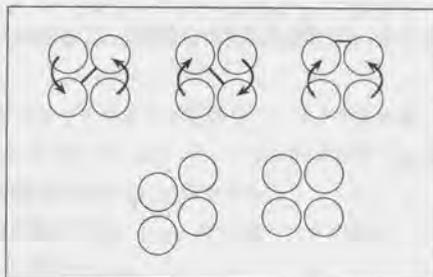


図7.10 ヘリックスバンドル構造の多形性
(ヘリックス単位を軸方向投影して円で示す。上段は連結様式の多形、下段は集合様式の多形)

尿素の濃度を高くしていくと、FB-LL, FB-LF, FB-FF は 2~3M 付近で変性した。実験項に記した方法で、転移曲線を解析した結果、 ΔG_w の値として、FB-LL, FB-LF, FB-FF ではそれぞれ、3.5, 6.3, 6.3 kJ mol^{-1} が得られた。また、 $\Delta G_w/m$ で表される変性の中間濃度は、この順に 2.6, 2.4, 2.0 M (urea) であった。変性の中間濃度がほぼ同じであるのに対して、変性の自由エネルギー変化は、Phe を含有する FB-LF, FB-FF で非常に高かった。この結果は熱転移において観測された結果と一致し

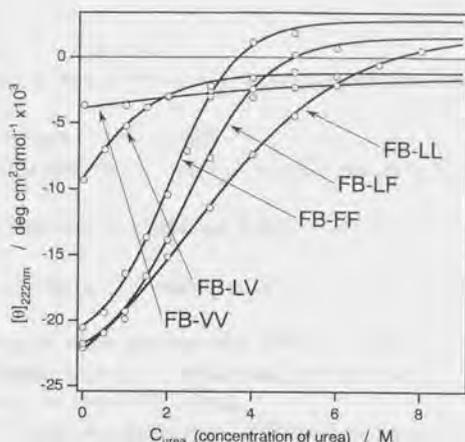


図 7.11 タンパク質 FB の尿素変性曲線
(実測を白丸で、フィッティングを曲線で示す)

ており、Phe が構造を規制して熱および変性剤による転移の協同性を高めていること示している。

以上の結果をまとめると、2-および4-ヘリックス系の両親媒性ヘリックス集合体 (コイルドコイルおよびヘリックスバンドル) において、Leu のような脂肪族の疎水性残基は疎水性コアの形成を容易にして熱転移温度を高めるのに寄与する。しかしながら Leu 側鎖は自由度が高いため転移の協同性はあまり高くない。脂肪族の疎水性残基を Val, Ala と小さくしていくと、疎水性の低下と周囲の Leu とのパッキングの低下によって転移温度が低下する。疎水性コアにおける親水性残基の導入は、特に荷電性残基は、わずかでも転移温度を著しく低下させ、構造形成を困難にする。この影響はコアの中心部分ほど著しい。芳香族の疎水性残基は疎水性の高さにもかかわらず、転移温度を低下させるが、Phe を多く導入することで、側鎖構造が Phe のみでなく周囲の Leu についても規制され、天然タンパク質に類似したフォールディング構造をとるようになる。この構造は転移の協同性も高い。

従って、人工的にタンパク質を設計する場合、水溶性タンパク質ではその疎水性コアには、(1)疎水性、(2)パッキング性、(3)芳香族側鎖、を考慮した残基の選択が重要である。特に、天然タンパク質のように一義的な構造を実現するには芳香族性残基の導入が不可欠であると考えられる²³⁾。

引用文献

1. C. Cohen, D. A. D. Parry, *Proteins*, 7, 1-15 (1990)
2. C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York (1991)
3. T. Dankekar, M. Leippe, *Folding Design*, 2, 47-52 (1997)
4. R. A. Kammerer, P. Antonsson, T. Schulthess, C. Fauser, J. Engel, *J. Mol. Biol.*, 250, 64-73 (1995)
5. P. C. Weber, F. R. Salemme, F. S. Mathews, P. H. Bethge, *J. Biol. Chem.*, 256, 7702 (1981)
6. Y. Yan, E. Winograd, A. Viel, T. Cronin, S. C. Harrison, D. Branton, *Science*, 262, 2027-2030 (1993)
7. E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Alber, *Science*, 254, 539-544 (1991)
8. S. F. Betz, D. P. Raleigh, W. F. DeGrado, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 601 (1993)
9. D. K. Woolfson, T. Alber, *Protein Sci.*, 4, 1596-1607 (1995)
10. M. Munson, S. Balasubramanian, K. G. Fleming, A. D. Nagi, R. O'Brien, J. M. Sturtevant, L. Regan, *Protein Sci.*, 5, 1584-1593 (1996)
11. M. Munson, R. O'Brien, J. M. Sturtevant, L. Regan, *Protein Sci.*, 3, 2015-2022 (1994)
12. W. L. DeLano, A. T. Brunger, *Proteins*, 20, 105-123 (1994)
13. J. W. Bryson, S. F. Betz, H. S. Lu, D. J. Suich, H. X. Zhou, K. T. O'Neil, W. F. DeGrado, *Science*, 270, 935-941 (1995)
14. S. L. Lin, C.-J. Tsai, R. Nussinov, *J. Mol. Biol.*, 248, 151-161 (1995)
15. P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry*, 13, 222 (1974)
16. D. Garnier, S. Osguthorpe, M. Robson, *J. Mol. Biol.*, 120, 97-120 (1978)
17. S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, *Biopolymers*, 27, 271-297 (1988)
18. 城所俊一, 熱測定(*Netsu Sokutei*), 14, 143-153 (1987)
19. 油谷克英, 中村春木 著, 蛋白質工学, 朝倉書店 (1991)
20. N. C. Pace, *Methods Enzymol.*, 131, 266-280 (1986)
21. Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350 (1974)
22. B.-Y. Zhu, N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Protein Sci.*, 2, 383-394 (1993)
23. H. Morii, M. Ishimura, S. Honda, H. Uedaira, *Pept. Chem.*, 1994, 445-448 (1995)

第8章 内部にキャピティを有するヘリックス会合体

8.1 序論

両親媒性ヘリックスのつくる構造体は、第4,5章で述べたような、あるいは leucine zipper や cytochrome b_{562} などで見られる α -ヘリックスバンドル構造¹⁻³⁾だけではなく、hemoglobin などに見られるかなり変形したヘリックス集合構造も存在する⁴⁾。このような変形は集合体を形成するヘリックス数が5本以上になっていること、ヘリックスの長さが揃っていないこと、両親媒性が完全な規則性を持っていないこと、などが原因であると考えられる。ここで取り上げる DNA 結合タンパク質 Myb⁵⁻¹⁰⁾ の R2 ドメインは、わずか 52 残基であるが特定の立体構造¹¹⁾にフォールディングすることが知られている(図8.1)。このドメインは3本のヘリックスを含み、N 端から2つのヘリックスが両親媒性である。両親媒性が完全に規則的でないことと、ヘリックス部分の長さが短いことのために、3本のヘリックスはバンドル構造からかなり変形している。低分子量にもかかわらず安定にフォールディングすることは、内部に疎水性残基、特に芳香族性の Trp

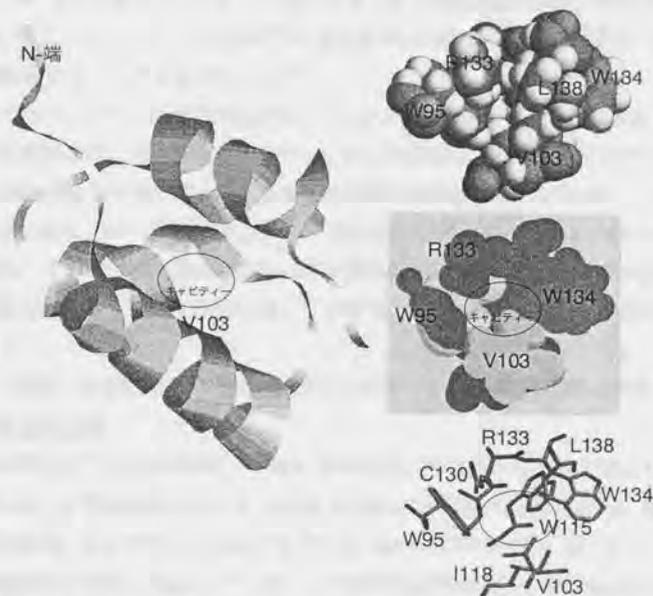


図8.1 Mybタンパク質のR2ドメインの溶液中での立体構造(左:R2ドメイン全体, 右上中下:コア領域の残基のみ, 右中は断面図; 全図とも同一の視点からの図)

を多く含むこと¹²⁻¹⁴⁾とも関係している。

Myb-R2の構造形成に関する研究は2つの意味で重要である。ひとつはMyb-R2がcompact proteinとして機能性人工タンパク質の設計原型として使える可能性があることである。もうひとつは、Myb-R2の特殊事情として分子内部にキャビティ(cavity, 空洞領域)が存在する¹⁵⁾ために、それがフォールディングや分子認識機能にともなう構造変化に関与していることが予想されている点である。一般にタンパク質の分子設計においてはpackingが重要視されるが、逆にこれまであまり認識されることのなかったcavityを分子設計に組み込むことも、構造変化を伴う機能の実現には重要であると考えられる。

c-Myb(ここでは単にMyb)はガン遺伝子*c-myb*の産物で、未分化造血系細胞などの増殖制御に関与している転写制御タンパク質⁵⁻⁹⁾である。マウスの場合には636残基からなり、N端部分(38-193)がDNA結合性領域で、ここに52残基の相同配列が3回存在している¹⁶⁾。この3つのリピートR1,R2,R3について、熱的安定性の点ではR2(90-141)が他よりも不安定であること¹⁷⁾が明らかとなっており、NMRによる構造解析^{15,18,19)}からR2内部にキャビティが存在することが報告されている。また、DNAとの結合に伴い、このキャビティに近傍のTrp残基が挿入される構造変化が起き、DNAとの結合が安定化することが示されている¹⁵⁾。

本章ではキャビティを含む両親媒性ヘリックスのフォールディングに焦点をあてて、タンパク質設計の新しい概念としてのキャビティの構造的、機能的役割を明らかにするために、Myb-R2のキャビティ領域の変異体を多数合成して、熱力学的にその構造特性を検討した。特に、同一残基位置において、脂肪族の側鎖を有するアミノ酸のみ10種類を比較した。この中には非天然のアミノ酸6種を用いており、人工タンパク質の設計におけるそれらの利用可能性や特性に関しても有用な情報を与えることが期待される。

8.2 実験：非天然アミノ酸含有DNA結合タンパク質の合成と熱力学的解析 タンパク質の合成

Myb-R2(マウスc-Myb(90-141))の合成は、非天然アミノ酸を導入する必要があることから、化学合成法によった。図8.2上に示したアミノ酸一次配列を、通常のFmoc法²⁰⁾により、カップリングにはTBTU-HOBt-NMM(1:1:2)、脱FmocにはDBU-piperidine(4%,20%)、溶媒としてDMF-DMSO(90:10)を使用し、Shimadzu-PSSM8合成機で合成した。また、最終脱保護にはTFA-EDT-TIPS-phenol-water(88:3:2:2:5)を用い、常法に従い、RP-HPLCで精製した。Fmocアミノ酸は市販品(Watanabe Chem.)を使

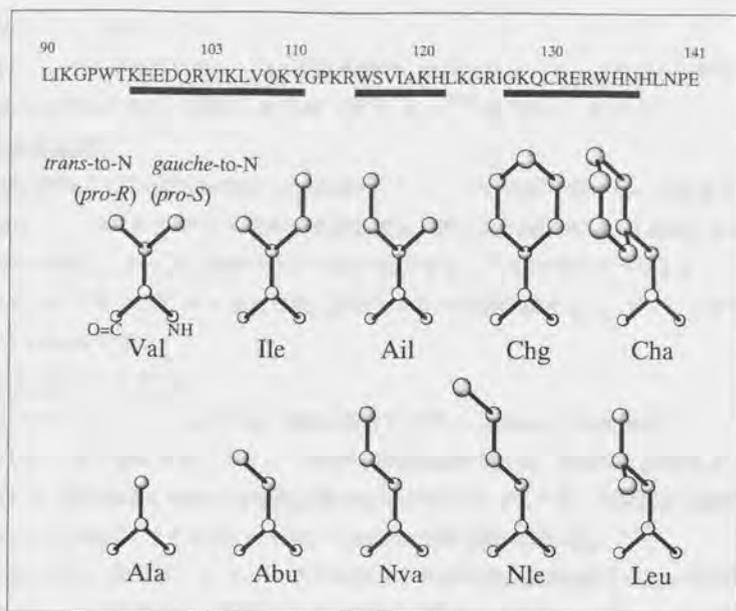


図 8.2 Myb-R2 の一次構造 (下線はヘリックス部分を示す) と合成した 103 位置換体のアミノ酸側鎖構造 (C 骨格のみ、立体的な配置を考慮して示す)

用し、側鎖保護基は Thr(tBu), Lys(Boc), Glu(OtBu), Asp(OtBu), Gln(Trt), Arg(Pbf), Tyr(tBu), Ser(tBu), His(Trt), Asn(Trt) のものを用いた。N 端の Leu は Boc-Leu-OH により導入した。合成用樹脂担体は C 端アミド用の TGS-CHA (Shimadzu) を使用した。合成スケールは樹脂上官能基 20 μ mol に対して、Fmoc アミノ酸 100 μ mol を用い、精製後の収量は約 5mg 程度であった。

各種置換体は 103 位の Val を、Ile, Ail, Chg, Cha, Ala, Abu, Nva, Nle, Leu (図 8.2) にしたもので、それぞれ対応する Fmoc アミノ酸市販品を使用した。

凍結乾燥粉末として得た Myb-R2 タンパク質は、20mM DTT を含む 50mM KCl 含有リン酸カリウム buffer (pH7.5) 約 2ml に溶かし、1mM の DTT を含むあるいは含まない同 buffer 溶液に対して透析した。透析には Spectra-Por-CE (mw:3500) を使用した。また透析液は、前もっておよび実行中も窒素ガスでバブリングし、タンパク質中の Cys 残基のフリーの SH 基の酸化を防止した。透析外液は約 0.8 l を途中 2 回交換した。回収したタンパク質溶液はアルゴンガス下でマイクロチューブに封入し、使用直前まで凍結保存した。この試料原液の濃度は、280nm の吸光係数から、Trp = 5550, Tyr = 1250

$M^{-1}cm^{-1}$ として算出した。

また、103位置換体の他に、Cys残基の酸化に影響されないデータを得る目的で、130位のCys残基をAbuに置換したもの（以下、[Abu¹³⁰]体と呼ぶ）を合成した。

示差走査熱量計

DSC測定は主にCalorimetry Sciences Corp. N-DSC装置を用いた。昇温速度は1.0 K/minとし、0°Cから95°Cまでの昇温を2回以上行った。対照セルには最終の透析外液を用いて測定し、データは試料セルにも同一液を使用した時のDSCカーブを差し引いて、試料タンパク質のDSCデータとした。測定は上記の試料原液を用い、タンパク質濃度は0.1～0.7mMであった。

円偏光二色性スペクトル

CDスペクトルは、Jasco-J630旋光分散計を使用し、0.2mmの光路長のキュベットで測定した。測定温度はキュベット一体型の循環水部分で計測、制御し、定常温および昇温時とも、試料溶液と循環水流の温度差が0.5K以内であることを、予備実験で確認した。スペクトル測定は、7°Cにおいて196～260nmの波長域で行った。

温度スキャン測定は、 α -ヘリックスの特性吸収帯である222nmでのモル楕円率をモニターした。昇温速度は、すでにこの系で昇温速度依存性がほとんどないことが示されているので、DSCとは若干異なる0.75K/minで実行した。楕円率と温度のデータは同時に、パソコンソフトSuper Scope IIにより取り込み、データ処理した。測定溶液は試料原液を10mM DTTを含む同buffer溶液になるように希釈調整した。タンパク質濃度は0.1mMとした。

蛍光スペクトル

蛍光スペクトル測定は、Shimadzu-RF5000を使用した。10mmの角セルを用い、セルホルダーの温度を12°Cで一定に制御して測定した。タンパク質中のTrp残基のみを観測するために、Tyrの吸収がない295nm（バンド幅3nm）で励起し、310～450nm（バンド幅3nm）の蛍光スペクトルを測定した。スペクトル中のRaman散乱に由来するピークはデータ処理時に差し引いた。タンパク質濃度は、10mMのDTTを含む上記リン酸bufferで希釈し、1～2 μ Mにおいて測定した。

解析

熱転移データの解析は熱力学の表式²¹⁾を使用して、コンピューターによるcurve fittingでパラメーターを決定した。また、得られたパラメーターから ΔG_{01} 、 ΔH_{01} 、 ΔS_{01} を計算するために、以下の式変形を行った。

変性の自由エネルギー変化 ΔG_{01} は、温度の関数として、一般に次の近似式で表現され

る。

$$\Delta G_{01} = -\Delta a_{01}T^2 - \Delta b_{01}T \ln(T) + \Delta c_{01} + \Delta d_{01}T \quad (\text{eq.8.1})$$

ここで添字01はfolded(0)からunfolded(1)への転移を示す。また転移のエンタルピー変化 ΔH_{01} は、

$$\Delta H_{01} = \Delta a_{01}T^2 + \Delta b_{01}T + \Delta c_{01} \quad (\text{eq.8.2})$$

で表され、これらの式に、転移温度 T_d において、 $\Delta G_{01}=0$ 、 $\Delta H_{01}=\Delta H_v$ であることと、通常 $\Delta a_{01}=0$ の仮定が近似的に可能²²⁾で、また $\Delta b_{01}=\Delta C_p$ であることを用いると、 ΔG_{01} 、 ΔH_{01} 、 ΔS_{01} を温度の関数として、 T_d 、 ΔH_v 、 ΔC_p をパラメーターとする式で表すことができる。

$$\Delta G_{01}(T) = -\Delta C_p T \cdot \ln \frac{T}{T_d} + \left(\Delta C_p - \frac{\Delta H_v}{T_d} \right) \cdot (T - T_d) \quad (\text{eq.8.3})$$

$$\Delta H_{01}(T) = \Delta C_p (T - T_d) + \Delta H_v \quad (\text{eq.8.4})$$

$$\Delta S_{01}(T) = \left\{ \Delta H_{01}(T) - \Delta G_{01}(T) \right\} \cdot \frac{1}{T} \quad (\text{eq.8.5})$$

8.3 結果と考察：キャピティの存在と役割

Myb-R2の立体構造

CDスペクトル(図8.3)においては、[Ala¹⁰³]-Myb-R2(以下、単にAla体と呼ぶ。他の103位置換体も同様)以外はすべて非常に類似したスペクトルパターンを与え、強度もほぼ等しいことから、7°Cにおいては、

103位の置換によってもタンパク質の二次構造はほとんど変化していないことがわかる。Ala体のみは、ヘリックス含量が低下し、置換により一部変性していると考えられる。Trp残基に由来する蛍光スペクトルを測定した結果は、図8.4のように得られ、やはり、一部変性したAla体のみは蛍光極大波長が長波長側にある。Ala体以外のものは蛍光極大波長が短波長シフトしており、特にLeu体とNva体で著しい。これらは、タンパク質中におけるTrp残基が、

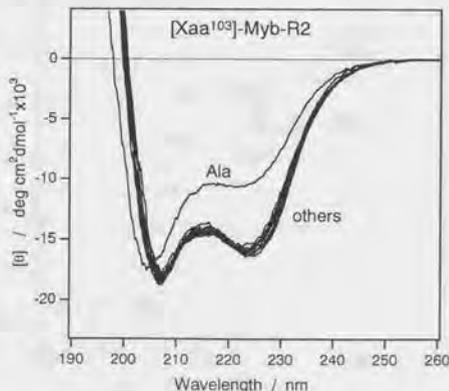


図8.3 103位置換体のCDスペクトル (7°C, Ala以外はほぼ同じ形)

Val体におけるよりも、より構造的に束縛を受けていることを示している。蛍光強度の点では、Cha体とChg体で蛍光強度が増大しており、大きさサイズを持つcyclohexyl基がTrp残基の溶媒からの遮蔽に寄与していることを示している。

遠紫外域のCDスペクトルにおいては、一般にTrp残基の三次構造に関係するバンドが230nm付近に観測される。Mybタンパク質のR1, R2, R3においては230nmのバンドがそれぞれ特徴的に変化している

ことが報告されている¹⁷⁾。従ってここでも230nmのモル楕円率がTrpの三次構造を反映する有用な指標であると考えられる。図8.3に示したCDスペクトルには、濃度の決定誤差を含んでいると考えられるため、この誤差を相殺する目的で、モル楕円率の230nmと220nmの比、 $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ を指標に選んだ。一方蛍光スペクトルの形や蛍光極大波長もまた、Trpの束縛度やさまざまな分子環境を反映していると考えられ、このスペクトル形をひとつのパラメーターで表現

するために、ピークの両側の波長での蛍光強度比、 F_{335}/F_{360} を指標に選んだ。ここでも濃度決定の誤差や繰り返し測定時の分光計の変動などの影響を相殺できる。これら2つのパラメーター、 $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ と F_{335}/F_{360} をプロットしたのが、図8.5である。

Myb-R2が変性した場合にはAla体のように、両パラメーターとも小さい値になる。逆に、Leu体やNva体では両方の値とも大きく、 F_{335}/F_{360} からは構造の束縛度が上昇した

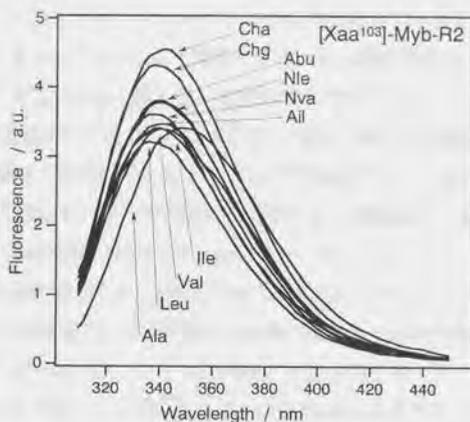


図8.4 Myb-R2の蛍光スペクトル

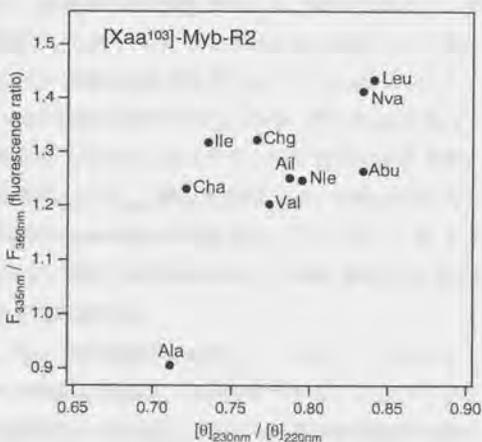


図8.5 CDと蛍光の特性値による各置換体のマッピング

こと、 $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ からはVal体に比べてLeu体やNva体のTrp側鎖の回転角などがある一定の方向に影響を受けていることを示している。より側鎖の小さいAbu体の場合も、束縛度はあまり上昇しないが、 $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ はLeu体と同じ方向の変化を示した。

Myb-R2の野生型、Val体の構造座標はNMRにより決定されているが、Val¹⁰³の側鎖末端のメチル基は(pro-R)のもの(図8.2参照)が、Trp¹¹⁵、Trp¹³⁴の側に向き、(pro-S)のものがTrp⁹⁵の側に存在している(図8.1)。Val¹⁰³の側鎖の χ 1角(C α と側鎖methineの結合回転角)は、(pro-R)のメチル基が主鎖のNHとtrans位置に、また(pro-S)のメチル基が主鎖のCOとtrans位置になる角度をとる。このような平面的なconformationは、 χ 1の回転potentialから予想される結果で、Val側鎖のconformationが周囲の影響をあまり受けていないことを意味している。従って、Valと同様の β 位分岐を持つアミノ酸Ile、Ail、Chgも、図8.2に示したようなValと同じ χ 1のconformationを有していることが推定される(すなわち、 γ 位の2個の炭素C γ がともに図の紙面から手前側に存在する)。

図8.5に戻って、Val体とAil体とIle体を比べると、Val体とAil体は近いプロットを与えるが、Ile体はこれらから離れた点にプロットされる。このことは、Ailのようにtrans-to-N側(図8.2参照)にValの側鎖を炭素1個分伸ばすことは、あまりフォールディング構造に影響を与えず、一方、Ileのようにgauche-to-N側に伸ばすことは、Trpにおいて観測されるフォールディング構造に影響を与えていることを意味する。すなわちMyb-R2のcavityは、trans-to-N側に広く、gauche-to-N側に狭いことが推定される。このことは、Leu体のNMRによる構造解析で、Leu¹⁰³のC γ がtrans-to-N側に存在するという結果と合致している。従って、cavity空間の形状が上記のように対称的でないことと、また、 $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ がLeu、Nva、Abuで近い値であることから、NvaやAbuの χ 1のconformationもLeuと同様であると考えられる。すなわち、いずれもC γ はtrans-to-N側であろう。もしそうであるなら、 $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ 値はIle < Val, Ail < Abu, Nva, Leuのように3グループに大別でき、この順がgauche-to-N側の基が、C₂H₅、CH₃、Hであることとよく対応することになる。さらにこのことからgauche-to-N側に存在するTrp⁹⁵が $[\theta]_{230}/[\theta]_{220}$ 値に寄与していることが推定される。

各置換体のうちでかさ高いChaやChg、Nleは図8.5において、必ずしも上記のルールで説明できない。このことはこれらの残基の側鎖が、cavityのサイズよりも大きいために、タンパク質のより広い領域の構造変化を引き起こしているためであると推定される。

熱変性挙動

222nmのモル楕円率でモニターして熱変性挙動を測定した結果を図8.6に示す。いずれの置換体も熱変性状態において $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値が $-6000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ 程度になる。このことは変性状態でもヘリックス的な構造が残存していることを示し、先の第7章のヘリックスバンドルの結果と類似している。CDの熱転移曲線を第7章と同じ方法でcurve fittingすることにより、転移の midpoint 温度 T_d と2状態転移と仮定した時の転移点における転移エンタルピー (van't Hoff enthalpy, ΔH_v) が求まる。

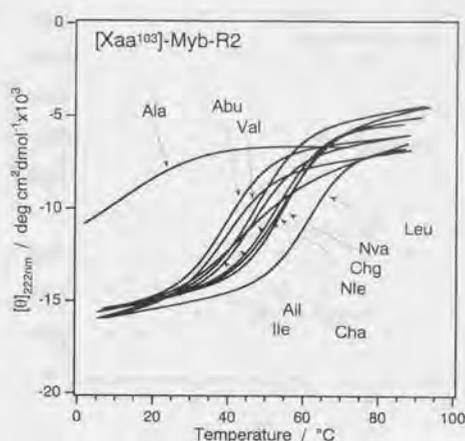


図8.6 円偏光二色性でモニターした熱転移曲線 (実測値はノイズのため煩雑となるのでフィッティング曲線を示す)

転移に伴う熱量変化を調べるために、DSCの測定を行った。DSCにおいては、Myb-R2に存在するフリーのSH基が測定セル中に存在する酸素等により酸化されたためと思われる、発熱ピークが、タンパク質の熱転移による吸熱ピークと重なって観測された。この場合SH基の酸化ピークはブロードで、またタンパク質自身も酸化により化学的变化を受けるため、その真の熱転移による吸熱ピークを正確に求めるのは困難であった。そこでタンパク質中のSH基が酸化されないように、1 mMのDTTを含む系でDSCを測定した。DTTのSH基は酸化されやすいためDSC上では、明確な発熱ピークを与えた。いずれの試料も2回目の昇温測定においては、SH基の酸化によると考えられるピークは出現せず、SH基を全く含まない[Abu¹⁰³]置換体のくりかえし昇温の結果と合わせて、ここから1回目の昇温測定における真のタンパク質変性によるDSCピークを決定することが可能となった。しかしながら、未変性域、変性域の直線的な変化部分の傾きを正確には決定することができず、そのため、ここから得られる ΔC_p 値を決定できなかった。 ΔC_p は変性の自由エネルギー変化 ΔG の温度依存性を求めるのに必要である。

変性による熱容量変化 ΔC_p 値の算出

ΔC_p を求めするために、CDにより熱転移をさまざまなpH (5.0~8.5)で測定し、前述と同様にして、転移温度 T_d と転移エンタルピー ΔH_v を算出した。結果を図8.7に示した。pH 7~8では T_d と ΔH_v はVal体Leu体ともに、一定値を示したが、酸性側のpH5.5

にかけて転移温度、エンタルピーともに低下減少した。pH5.5よりさらに酸性側では、エンタルピー値は逆に上昇し、別の構造変化が起きていることが推定された。おそらくこれはHis残基のプロトン化によるものと考えられる。転移温度 T_d と転移エンタルピー ΔH_v をプロットしたのが、図8.8である。 ΔH_v の T_d 依存性の傾きが、 ΔC_p の近似値を与えることが示されているので、pH 5.5~7.0のデータ点からその傾きを最小自乗法で求めた。結果はVal体、Leu体についてそれぞれ $1.35 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ 、 $1.34 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ となり、転移温度が 20°C も異なるにもかかわらず、よい一致を示した。このことから、ここで合成した10種の置換体について、 $\Delta C_p = 1.35 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ を近似的に共通の値として用いることが妥当であると考えられる。この ΔC_p 値を用いて、SH基を含まない[Abu¹³⁰]置換体のDSC曲線(図8.9)は2状態転移の理論曲線とよくフィットし、また他の103位置換体の $[\theta]_{222\text{nm}}$ の温度変化曲線も理論曲線とよい一致を与える。

一般に ΔC_p 値はタンパク質内部の無極性基の対の数と相関していることが知られている。タンパク質1分子中の無極性基の対の数を N_{np} (mol/mol) とすると、 ΔC_p ($\text{kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$) は、

$$\Delta C_p = k_c N_{np} \quad (\text{eq.8.6})$$

の関係がいくつかの球状タンパク質について成立する²³⁻²⁵。ここで比例係数 k_c は約0.06

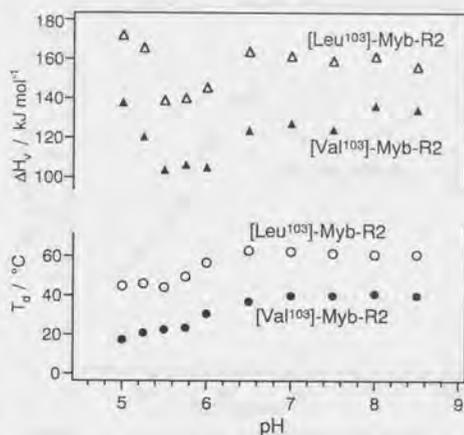


図8.7 CDによる転移パラメータのpH依存性

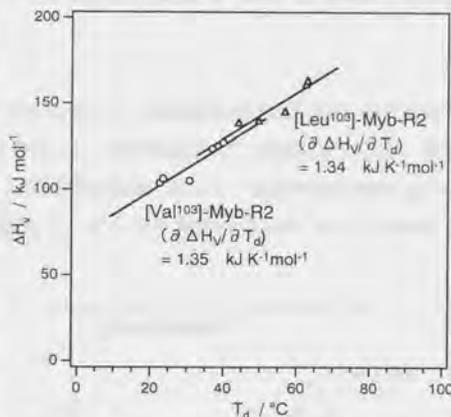


図8.8 転移エンタルピーの転移温度依存性 (pH 5.5~7.0の領域のデータ)

である(原報の表現や単位を改めて示している)。またタンパク質分子量を M_w (kDa) とすると、 N_{np} 値は分子量 11kDa 以上のものについての平均で、6.2 M_w 、小さいタンパク質では 4.3 M_w と報告されている。従って Myb-R2 に適用すると、 N_{np} 値は 20~25 程度で、 ΔC_p は 1.2~1.5 $\text{kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ となる。103 位の各種置換の N_{np} 値への寄与は、分子のコアの疎水性基の数から考えて、 N_{np} 値の 10% 程度以下と考えられ、従って、各種置換体に共通の ΔC_p 値として実験値 1.35 $\text{kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ を用いることは妥当であると考えられる。

熱転移の解析

一般に、DSC によって van't Hoff enthalpy と calorimetric enthalpy の双方を得ることができる。またこの両者が等しい時には、その熱転移は二状態転移である。前述の $\Delta C_p = 1.35 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ 値を用いて、先の DSC 曲線において、未変性域と変性域のそれぞれ直線的な部分を仮定する補正を加えて、タンパク質のみの DSC カーブを得た(図 8.10)。これらの DSC 曲線は 2 状態転移の理論式でほぼ fitting し、いずれの置換体も 2 状態転移であることが結論される。DSC 曲線にいくつかの仮定が加えられていることから、より厳密な解析は困難であるが、 ΔH_v および T_d 値は、 $[\theta]_{222\text{nm}}$ の温度変化曲線から求めた値とほぼ一致した。

$[\theta]_{222\text{nm}}$ の温度変化曲線を $\Delta C_p = 1.35 \text{ kJ K}^{-1}\text{mol}^{-1}$ として解析して得た ΔH_v および T_d 値を図 8.11 にプロットした。CD および蛍光スペ

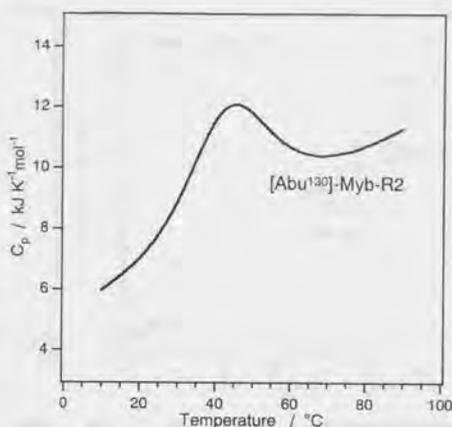


図 8.9 Cys を含まない 130 位置換体の DSC

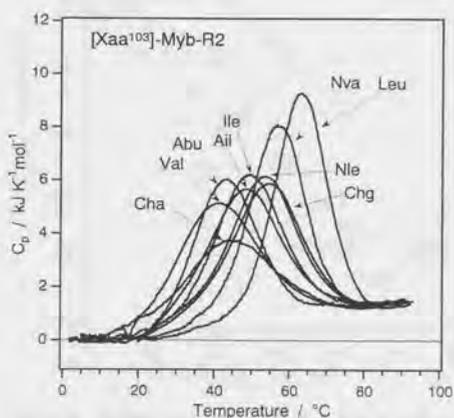


図 8.10 各 103 位置換体の補正した DSC 曲線

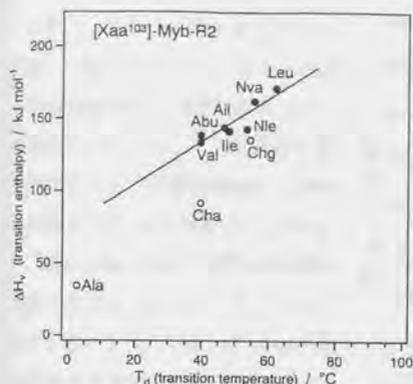


図 8.11 転移温度と転移エンタルピーの相関

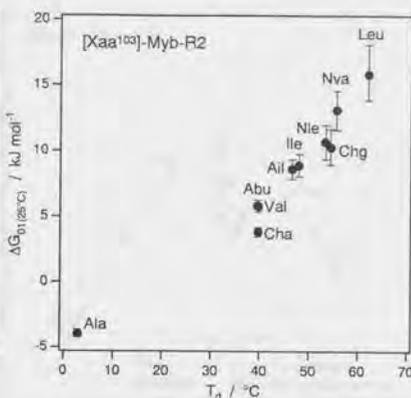


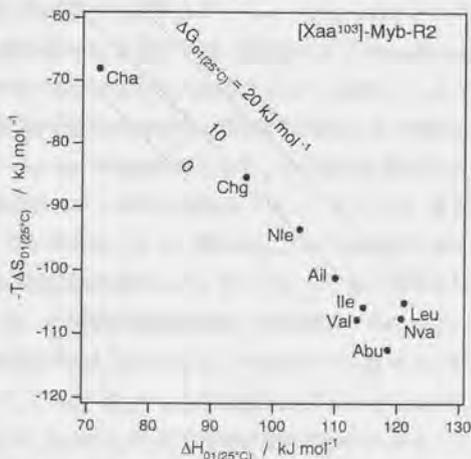
図 8.12 転移エネルギーと転移温度の関係

クトルの結果からキャピティサイズより大きいためにフォールディング構造が Val 体とは異なっていると推定した Nle 体、Chg 体、Cha 体を除いて、他の置換体のプロット点は直線上に並んだ。このことはキャピティ内に納まっている限りでは転移点での転移エンタルピー ΔH_{\ddagger} と転移温度 T_d が一次式で相関していることを意味している。

実験項の式(eq.8.3)~(eq.8.5)から計算した、25°Cにおける ΔG_{01} の値と転移温度 T_d の関係を図 8.12 に示した。Chg 体と Cha 体を除いて、 ΔG_{01} は T_d と直線関係にある。Nle、

Chg、Cha 以外では、 ΔG_{01} は側鎖の van der Waals 体積と一応の対応関係を示すが、水相から有機溶媒への移行エネルギーと比較すると、移行エネルギーは Ala、Val、Leu で 2.2、6.3、7.5 kJ mol^{-1} であるが、 ΔG_{01} は -3.9、5.8、16.0 kJ mol^{-1} と、それぞれの間の差は後者の ΔG_{01} で約 2~4 倍に拡大している。これは ΔG_{01} が単に相間移行エネルギーによるのではなく、packing すなわち van der Waals エネルギーの寄与が主であることを意味している。

側鎖構造とキャピティの形状

図 8.13 転移のエントロピーとエンタルピー値における各置換体の特徴 (斜め線は ΔG_{01} の等高線)

ΔH_{01} と ΔS_{01} の関係をプロットすると、図8.13のようになり、103位の各置換体の特徴が明白になる。すなわちValに対して炭素数が1程度増減するような置換体は、Val体の周囲にプロットが集まっているが、Nle, Chg, Chaと側鎖の体積が大きくなると、 ΔH_{01} 、 ΔS_{01} ともに減少する。 ΔH_{01} の減少はfolded状態がより不安定化されていること、一方 ΔS_{01} の減少はエントロピー的にfolded状態がより安定化されていることを意味する。すなわちこれらのサイズの大きい側鎖は、キャピ

ティ内でpackingされずに一部分は露出していると考えられる。またこれらのフォールディングした状態は側鎖自由度が相対的に大きく、分子全体の变形を伴っていることも、図8.5の結果と合わせて推測される。

図8.13においては β 分岐アミノ酸Val, Ile, Ailと β 非分岐アミノ酸Abu, Nva, Leuが別々のクラスターを形成している。同一炭素数で比較すると、エントロピー項よりもエンタルピー項において、わずかに差が認められる。 β 位の分岐、非分岐によってunfolded状態の側鎖の自由度すなわちエントロピーに差があることが推定されているが、ここでの結果はあまり差がなく、熱変性状態が完全なrandom coil状態ではないことと関係していると考えられる。103位の側鎖のvan der Waals体積と ΔG_{01} との関係を図8.14に示した。NMR解析による構造から予想されるキャピティ容積より少し小さい所で、各変異体のプロットは極大を示す。また、個々のプロットは、図中の上に凸の曲線の下側に分布しており、キャピティ空間と103位側鎖の原子レベルでのフィット性の差がこのような分布に反映していると考えられる。10種類の置換体の熱力学的解析から推定されるキャピティ空間のサイズと形状の模式図を図8.15に示した。円形はメチル基あるいはメチレン基1個の直鎖状の伸長に対応している(ただし正確な座標位置を示すものではない)。前述したようにgauche-to-N側とtrans-to-N側で空間の制約がかなり異なっている。

以上をまとめると、Myb-R2においてキャピティは構造的には比較的稳定に保持され

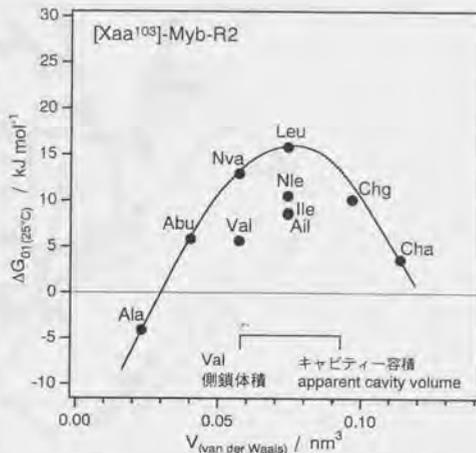


図8.14 103位の側鎖体積およびキャピティ容積と熱転移エネルギーの関係 (v.d.W.体積は文献²⁶⁾)

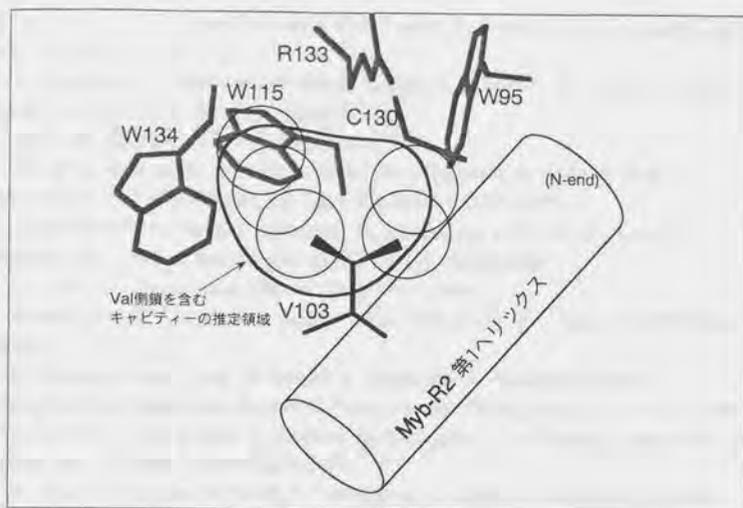


図8.15 キャビティ周辺の空間的制約の模式図
(Valの2つのmethyl基は紙面手前側。図8.2と同じ視点。図8.1とは180度逆方向から見ている。)

ており、キャビティを埋めるようなわずかな変異に対しては、分子のフォールディング構造は大きくは変化しない。しかしながらキャビティからはみ出すような変異によっては、二次構造は保たれるものの、三次構造がかなり変化する。キャビティを埋めることによって安定化するエネルギーは、疎水性側鎖の相間移行エネルギーよりもかなり大きく²⁷⁾、このエネルギーが機能(DNA結合に伴う分子変形の緩和としてのTrp⁹⁵のsliding移動)のためにキャビティに蓄えられている仮想的なエネルギーであると考えられる²⁸⁾。

引用文献

1. P. C. Weber, F. R. Salemme, F. S. Mathews, P. H. Bethge, *J. Biol. Chem.*, 256, 7702 (1981)
2. W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, *Science*, 240, 1759-1764 (1988)
3. C. Cohen, D. A. D. Parry, *Proteins*, 7, 1-15 (1990)
4. C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York (1991)
5. A. L. Katzen, T. Kornberg, J. M. Bishop, *Cell*, 41, 449-456 (1985)
6. O. S. Gabrielsen, A. Sentenac, P. Fromageot, *Science*, 253, 1140-1143 (1991)
7. T. Graf, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2, 249-255 (1992)

8. A. H. Myrset, A. Bostad, N. Jamin, P.-N. Lirsac, F. Toma, O. S. Gabrielsen, *EMBO J.*, 12, 4625-4633 (1993)
9. J. Tanikawa, T. Yasukawa, M. Enari, K. Ogata, Y. Nishimura, S. Ishii, A. Sarai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 9320-9324 (1993)
10. 緒方一博, 細胞工学, 15, 610-624 (1996)
11. K. Ogata, H. Hojo, S. Aimoto, T. Nakai, H. Nakamura, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6428-6432 (1992)
12. C. Kanei-Ishii, A. Sarai, T. Sawazaki, H. Nakagoshi, D.-N. He, K. Ogata, Y. Nishimura, S. Ishii, *J. Biol. Chem.*, 265, 19990-19995 (1990)
13. I. A. Anton, J. Frampton, *Nature*, 336, 719 (1988)
14. P. Saikumar, R. Murali, E. P. Reddy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8452-8456 (1990)
15. K. Ogata, C. Kanei-Ishii, M. Sasaki, H. Hatanaka, A. Nagadoi, M. Enari, H. Nakamura, Y. Nishimura, S. Ishii, A. Sarai, *Nature Struct. Biol.*, 3, 178-187 (1996)
16. H. Sakura, C. Kanei-Ishii, T. Nagase, H. Nakagoshi, T. J. Gonda, S. Ishii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5758-5762 (1989)
17. A. Sarai, H. Uedaira, H. Morii, T. Yasukawa, K. Ogata, Y. Nishimura, S. Ishii, *Biochemistry*, 32, 7759-7764 (1993)
18. K. Ogata, S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, *Cell*, 79, 639-648 (1994)
19. K. Ogata, S. Morikawa, H. Nakamura, H. Hojo, S. Yoshimura, R. Zhang, S. Aimoto, Y. Ametani, Z. Hirata, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura, *Nature Struct. Biol.*, 2, 309-320 (1995)
20. G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35, 161-214 (1990)
21. S. Kidokoro, H. Uedaira, A. Wada, *Biopolymers*, 27, 271-297 (1988)
22. 城所俊一, 熱測定(*Netsu Sokutei*), 14, 143-153 (1987)
23. P. L. Privalov, *Biofizika*, 32, 742 (1987)
24. P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.*, 33, 167 (1979)
25. 上平初徳, 熱測定(*Netsu Sokutei*), 15, 130-142 (1988)
26. J. T. Edward, *J. Chem. Edu.*, 47, 261-270 (1970)
27. H. Uedaira, H. Morii, K. Ogata, S. Ishii, A. Sarai, *Pure Appl. Chem.*, 70, 671-676 (1998)
28. H. Morii, H. Uedaira, K. Ogata, S. Ishii, A. Sarai, to be submitted

第4編

三次構造を制御した機能性人工タンパク質の基本設計

第9章 ヘリックスバンドル形成による包接機能の発現

9.1 序論

タンパク質の機能発現を考えてみると、2つの特徴が挙げられる。一つは、機能性の原子団や基が特定の位置および方向性を有していること、もう一つは、分子認識に関わる特定の形状や構造可変性と相互作用分布を持った分子表面が存在することである。両者はともに、多くのタンパク質の有している一義的な立体構造形成性によってもたらされているものである。しかしながら、その逆に、すなわち機能発現には一義的な構造形成が不可欠である、ということにはかならずしも成立しない。機能のレベルは構造のレベルに起因し相関するので、人工タンパク質においては、目的とする機能の厳密さに応じたレベルでの構造が実現できればよいという考え方ができる。

ホスト-ゲストケミストリーの視点から見ると、すでに多くのホスト分子が設計開発されている。代表的なものには、crown ether, cyclodextrin¹⁾, cyclophane²⁾ などがある。これらに共通するのは内部に疎水性のポケットが存在し、外面は親水性である点である。ヘリックスバンドルも同様の疎水性内部と親水性表面を有するが、形態的に上記のものとは、環状と非環状の違いがある。この点に以下に述べる新規なホスト分子としてのヘリックスバンドルの第一の特徴がある。天然においては、 α -ヘリックスの集積構造を含むタンパク質として、tropomyosin, cytochrome *c*'₂, myohemerythrin, tobacco mosaic virus³⁾, bacteriorhodopsin⁴⁾ などがある。これらのうちのあるものは、ヘリックスバンドルの内部に、金属イオンの配位子やポルフィリンなどの補欠分子族を有している⁵⁾。このことはヘリックスバンドル構造が、これら機能性原子団の配置場所になるというだけでなく、基質などの他分子を取り込むホストになりうることを示している。

人工的にディノープ設計されたタンパク質⁶⁻¹²⁾として、特に4-ヘリックスバンドル¹³⁾がよく研究されている。Nishinoら⁹⁾や、Sasaki¹⁰⁾らによってこれを機能性分子として展開した例が報告されている。先に(第4章)、柔軟なループ部分を持ち、ヘリックス部分に-Leu-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Glu-の基本配列を持つヘリックスバンドル性ペプチドについてそのフォールディングの特徴について検討したが、ここではこのヘリックスバンドル構造によって、どの程度の分子認識機能、あるいはその原型である包接機能が実現できるかを検討した。Leu残基を疎水性コアとする両親媒性ヘリックスからなるバンドル構造は、Leu残基側鎖の柔軟性とその表面の均質性から、一義的なフォールディング構造よりむしろ、molten-globule的な特徴を示した。すなわち、疎水性コアの性質として、疎水性側鎖の流動性や多状態安定性を指摘することができる。一方この性質は、分

子認識において、特異的な認識能は期待できないかわりに、適応性の高い包接能が期待できると予想される。

9.2 実験：合成と蛍光プローブを用いるキャラクタリゼーション ペプチド合成

両親媒性ヘリックスを複数、2~6本連結したペプチドPA2, PA3, PA4x, PA4w, PA6 (図9.1上)を用いた。これらは図9.1下のように会合により疎水性のポケットを形成すると期待される。アミノ酸配列の設計と合成については前述した(第4章)。

蛍光プローブ

蛍光プローブとして、acridine orange-10-dodecyl bromide (AODB, Dojindo Lab. 製), ammonium 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS, Wako Pure Chem. Ind. 製), 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH, Tokyo Kasei Kogyo Co. 製) を市販品のまま使用した。蛍光プローブの濃度は固体重量をもとに算出した。AODBとDPHは水溶性が低いので、それぞれ ethanol および tetrahydrofuran 溶液とした後、バッファーで希釈した。測定時の有機溶媒濃度は 0.015% (ethanol) および 0.10% (tetrahydrofuran) であっ

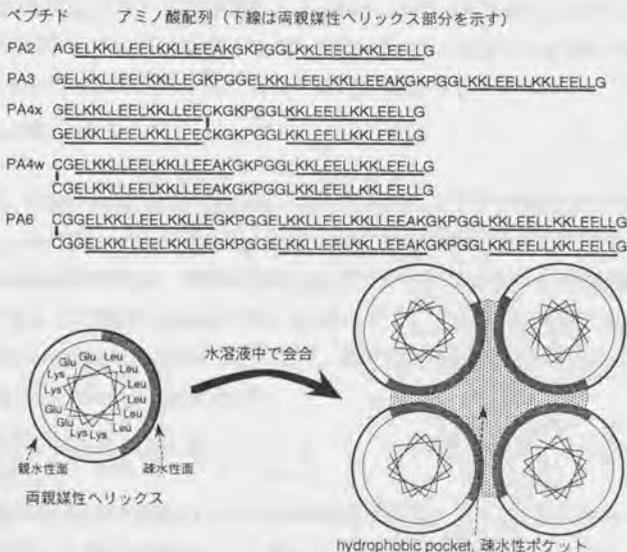


図9.1 人工設計ペプチドのアミノ酸配列と包接機能の発現原理

た。

蛍光および円偏光二色性測定

すべての分光測定は 150mM の NaCl を含む 15mM のリン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 中、20°C で行った。円偏光二色性(CD)は Jasco-J600 旋光分散計を使用し、蛍光スペクトルは Hitachi-MPF-4 蛍光分光光度計によって測定した。この蛍光光度計には Rhodamine-B を補償セルに使用した。発光側のスリット幅は 4nm に設定した。

蛍光寿命と蛍光偏光解消の測定は Horiba-NAES-1100 時間分解蛍光光度計を使用した。光源には水素放電ランプを使用し、約 6000Hz のパルス発光を用いた。パルス光の半値幅は 2.5nsec であった。AODB 系の測定には励起光 470nm を用い、発光側にカットオフフィルター (Corning 社 3-70, 波長 510nm で透過率 40%) を使用した。ANS 系では同様に、345nm で励起し、カットオフフィルター (Corning 社 L38, 波長 380nm で透過率 40%) を使用した。観測された時間分解蛍光データは、ペプチドと結合していない成分を差し引いた後、装置付属ソフトウェアにより deconvolution 法で解析した。

ナノ秒蛍光データの解析

時間分解蛍光光度計の励起側、蛍光側には偏光板(Gran-Taylor prism)を設置し、VH (励起側の偏光面を垂直に、蛍光側の偏光面を水平に)の位置にこれらを配置した時の時間分解蛍光強度 I_{VH} と VV の時の強度 I_{VV} を求めた。装置の補正係数 c を用いて $(I_{VV} + 2cI_{VH})$ が全蛍光時間変化 $I(t)$ に相当する。ここから次式により、光源ランプ強度の時間変化 $P(t)$ を deconvolution により取り除くことにより蛍光減衰 $S(t)$ を得た。

$$I(t) = \int_0^t P(u) S(t-u) du \quad (\text{eq.9.1})$$

計算では、 $S(t)$ を指数関数型に仮定し、最小自乗法によりその係数を決定した。同様に $(I_{VV} - cI_{VH})$ から deconvolution により蛍光差偏光度の時間変化 $D(t)$ を求めた¹⁴⁾。

蛍光偏光解消の解析は、回転楕円体近似で行った。この時の各種表式は Tao¹⁵⁾ と Perrin¹⁶⁾ によって詳細に与えられている。従ってここでは実際の解析に適した形にこれらの式を改良した結果について以下に記す。まず蛍光異方性 $R(t)$ は Perrin の流体力学式による近似により (eq.9.2) で表される。

$$R(t) = \frac{D(t)}{S(t)} = R(0) \sum_{l=1}^3 A_l(\theta) \exp\left(-\frac{t}{\tau_l(\rho)}\right) \quad (\text{eq.9.2})$$

ここで θ は回転楕円体近似をした時の対称軸と遷移モーメントのなす角度で、 ρ はその長軸 (回転軸) と短軸 (赤道面) の半径比である。また A_l と τ_l は分子形状に依存して近似的に表現された式 (詳細は文献参照^{15,16)}) である。実際に得られる実験データでは、

deconvolutionにより求められる $S(t)$ と $D(t)$ は1~3個の指数関数の和として表され、後者のほうが強度が小さいために $D(t)$ では指数関数の項の数も少なくなる。その結果、 $R(t)$ を3項の指数関数として各パラメータを決めることは非常に困難である。そこで異なる蛍光寿命に対応する $S(t)$ の各項ごとに、次のように $R(t)$ を単一指数関数型で近似した。

$$R(t) = R(0) \exp(-t/\tau_R) \quad (\text{eq.9.3})$$

一般に回転運動の時定数 τ_0 は拡散係数 D_c と

$$\tau_0 = 1/(6D_c) \quad (\text{eq.9.4})$$

の関係があり、 τ_0 と τ_R は回転楕円体の体積 V あるいは流体力学的等価球の体積 V_e と次式で関係づけられる。

$$\tau_0 = V \eta / (kT) \quad (\text{eq.9.5})$$

$$\tau_R = V_e \eta / (kT) \quad (\text{eq.9.6})$$

$$V \equiv (4/3)\pi r^3 \rho \quad (\text{eq.9.7})$$

$$V_e \equiv (4/3)\pi r_e^3 \quad (\text{eq.9.8})$$

ここで η は媒体の粘度、 k はBoltzmann定数、 T は温度、 r は赤道面半径、 r_e は流体力学的等価球半径である。ここで形状因子 f を次式で定義すると、(eq.9.10)が導かれる。

$$f \equiv r/r_e \quad (\text{eq.9.9})$$

$$(\tau_0/\tau_R) = f^3 \rho \quad (\text{eq.9.10})$$

先に示した(eq.9.2)と(eq.9.3)より (τ_0/τ_R) と θ と ρ の関係を数値計算的に求めることができる。従って、(eq.9.10)により、 f を θ と ρ の関数 $f(\theta, \rho)$ として数値計算可能である。

θ と ρ の種々の値の組に対して $f(\theta, \rho)$ を計算した結果を図9.2に示した。この計算においては $R(t)/R(0)$ が1から0.001の範囲の時間領域で近似計算した。また(eq.9.3)のような単一指数近似が成立しない領域においては図9.2のプロットを点線で表した。(eq.9.6)と(eq.9.8)に(eq.9.9)を代入すると、次の r と τ_R の関係式(eq.9.11)を得ることができる。

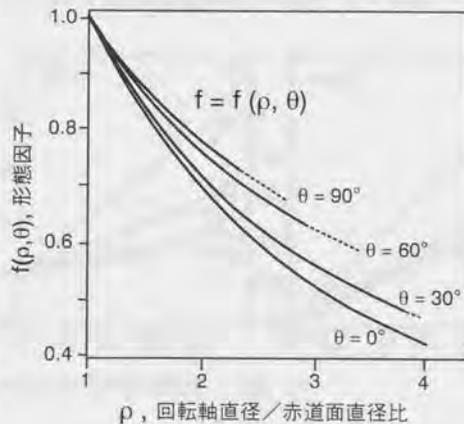


図9.2 回転楕円体近似における形態因子の数値計算結果

$$r = \sqrt[3]{\frac{3kT\tau_R}{4\pi\eta}} f(\theta, \rho) \quad (\text{eq.9.11})$$

(eq.9.11)式を用いれば、適当な θ と ρ の仮定のもとに、実測値の τ_R から半径 r を算出できる。また軸比 ρ が未知である場合には、 ρ の値毎に r を計算することで回転楕円体の赤道面半径(r)と回転軸半径($r\rho$)の関係をプロットすることができる。ここでは後者の方法で測定結果を表した。

9.3.1 結果と考察：柔軟なホスト分子としてのヘリックスバンドル

蛍光プローブに対する結合能

ペプチド濃度を変えて、各種蛍光プローブの蛍光強度を測定した結果を図9.3に示した。比較のために、図の横軸は α -ヘリックスの濃度、すなわちペプチド濃度にヘリックスの連結本数を掛けた値、を用いた。ここで使用した蛍光プローブは分子形状や荷電についてさまざまであったが、いずれに対してもペプチドPA6は蛍光強度の著しい増強効果を示した。他のヘリックス数2~4のペプチドはほぼ同程度の蛍光強度を与え、PA4xはこのなかで若干蛍光強度が劣っていた。あとでAODBの系で示されるように、他の系でも蛍光強度が蛍光プローブの取り込み量に比例すると仮定すると、6本のヘリックスを連結したPA6が包接能に優れているといえる。逆に4本のヘリックスを一方の端でつないだ構造のPA4xは包接時の柔軟性が不十分であったために包接能が低かったと考えられる。また、PA2はANSやAODBの系でPA4wと同程度の蛍光強度を与えたが、このことはPA2が4-ヘリックスバンドルとして包接能を発揮していることを示唆している。

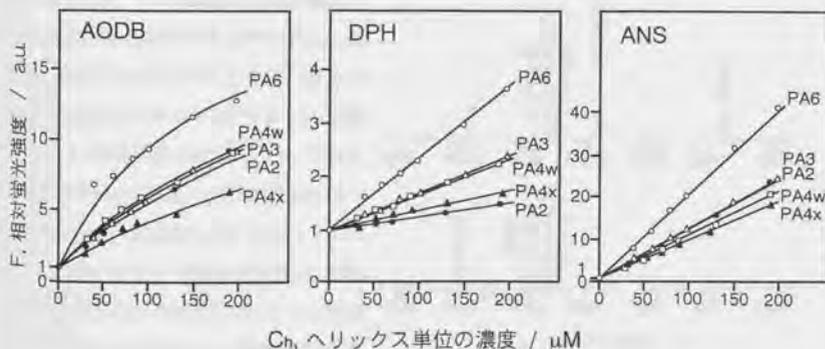


図9.3 各種プローブの蛍光強度のペプチド濃度依存性
(蛍光プローブ濃度は2 μ M、励起波長は順に480nm, 350nm, 345nm)

AODBの系では蛍光強度の増加は濃度に対して直線ではなく、飽和傾向を示した。そこで非線形最小乗法により、Hillプロット¹⁷⁾を行うと、図9.4のように、いずれも傾き1の直線を与えた。このことは複数のPA分子による包接ではなく、1:1の包接であることを示している。ただし、PA2についてはもともと2量体として機能していると考えられる。無限濃度における蛍光の極限值 F_{∞} はPA4xを除き25程度であった。1:1複合体として、Scatchardプロット¹⁷⁾を行うと、会合の自由エネルギー ($\Delta G = -RT \ln K_d$)が計算できる。AODBに対しては、PA2, PA3, PA4x, PA4w, PA6の ΔG は、-4.8, -5.2, -5.8, -5.5, -6.2 kcal mol⁻¹であった。一方、ANSやDPHについては図9.3のプロットが直線的であったため、 ΔG は約-4 kcal mol⁻¹以内と推定された。ANSに対しては、 ΔG の値として-5.4 kcal mol⁻¹(phospholipase A2)¹⁸⁾、-6.8 kcal mol⁻¹(apomyoglobin)¹⁹⁾が報告されている。PAの包接能がこれよりも低いのは、PAの疎水性サイトが小さいか、包接における分子サイズの不一致 (PAのヘリックス長はANS分子の2倍程度ある (あとの図9.6, 9.8を参照)) によるものと推測される。

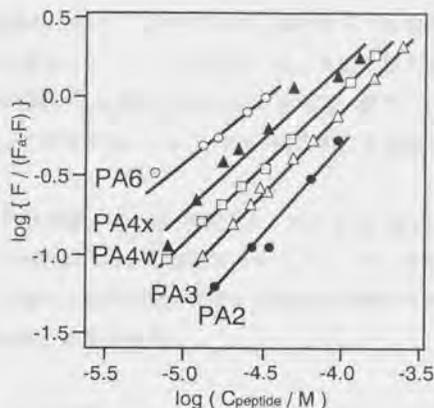


図9.4 AODB-ペプチド系のHillプロット

蛍光プローブの包接能は蛍光強度の他に、蛍光極大波長にも反映される。特にANS系では図9.5のように、水中での極大波長524nmに比べ著しい短波長シフトが観測された。PA2, PA3, PA4x, PA4wでは、470-460nmにシフトし、ほぼethanolからoctanol中における蛍光プローブの極大位置に相当した²⁰⁾。すなわち長鎖アルコール溶媒と同程度の疎水性あるいは束縛性を有する包接場が形成されているものと考えられる。さらにPA6については、極

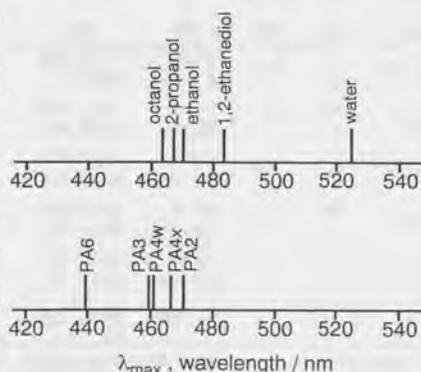


図9.5 各種溶媒中²⁰⁾ (上図) およびペプチド共存時 (下図) のANSの蛍光極大波長

大波長は439nmにも達した。このことは疎水性だけでは説明できず、蛍光分子が溶媒の水から非常に遮蔽された環境にあることを意味していると思われる。モデル的に考えると、4本までのヘリックスではバンドル内に隙間しか形成されないが、6本では最大でヘリックスと同じサイズの空洞を形成することができる。ここでの結果はこのような構造によるものかもしれない。

ANSなどの蛍光プローブを包接しうる性質は、これらのペプチドPAが molten-globule 的な包接サイトを有していることを意味する。すなわちフォールディングの特徴が、天然タンパク質のように堅く一義的でないことが、種々のサイズや性質の疎水性ゲストに対する取り込み能となって表れていると考えられる。

蛍光寿命

蛍光寿命をナノ秒時間分解蛍光光度計により測定し、deconvolution法で解析した結果を、AODB系については表9.1に、ANS系については表9.2にまとめた。ここで τ_s は蛍光寿命を、Qはその蛍光寿命に対応する相対蛍光量子収率を表す。AODB系では、ペプチドの存在しない系では、蛍光寿命は1.6nsecの単一成分であったが、ペプチドPAが共存すると蛍光寿命は2成分になり、2.6~3.0nsec(Q=92~94%)と8.6~13.9nsec(Q=6~8%)とに分かれる。主成分である短寿命成分はいずれのペプチドでもほぼ同程度の寿命の長さであることから、類似した包接体を形成していると考えられる。AODBにおいては吸収スペクトルにおいてそのmonomerと芳香環がstackingしたdimerが識別できるが、この測定条件においてはmonomerが大部分であったことから、短寿命成分はmonomerであると思われる。

一方、長寿命成分はdimerであるか、強く包接されたmonomerであるかはここからは明確ではない。

ANS系では、蛍光寿命は3成分に分離する。これらは相対量子収率の多い順に、15.1~16.2nsec(Q=46~62%)、6.0~7.0nsec(Q=29~40%)、0.7~1.0nsec(Q=8~14%)であった。一番短い寿命種は水中での寿命0.6nsecにほぼ近い

peptide	τ_s (ns)	Q (%)	$\tau_D^{(nm)}$ (ns)	τ_D (ns)	τ_k (ns)
PA2	13.9 ± 0.7	7 ± 1	1.7	2.9	3.6 ± 0.1
	2.7 ± 0.02	93 ± 2		1.5	
PA3	10.6 ± 0.6	6 ± 1	1.6	2.6	3.5 ± 0.1
	2.6 ± 0.02	94 ± 2		1.5	
PA4x	8.8 ± 0.7	6 ± 1	1.7	2.5	3.4 ± 0.1
	3.0 ± 0.03	94 ± 2		1.6	
PA4w	11.6 ± 0.7	6 ± 1	1.7	3.0	4.1 ± 0.1
	2.6 ± 0.02	94 ± 2		1.6	
PA6	9.6 ± 0.5	8 ± 1	1.7	2.6	3.7 ± 0.1
	2.7 ± 0.02	92 ± 2		1.6	
none (control)	1.6 ± 0.02	100			

* 測定条件: AODB (3.8 μ M), ペプチド (200 μ M, ヘリックス単位の濃度), 温度20 $^{\circ}$ C

表9.1 AODB-ペプチド複合体の蛍光減衰パラメーター

め、ペプチド表面に結合した露出したANSによるものと思われる。二番目と一番長寿命の成分は、その平均がほぼ2-propanol中の寿命9.9nsecに近く²⁰⁾、ともに内部に包接されたANS分子によると考えられる。一般に蛍光寿命の解析においては、その寿命成分は実測とフィットする最小数の成分で表される¹⁴⁾。したがって、ここで得られた結果は、包接体は少なくとも2種類あることを意味している。このように複数の成分が存在する

peptide	τ_1 (ns)	Q (%)	$\tau_D^{(prim)}$ (ns)	τ_{21} (ns)	τ_n (ns)
PA2	15.1 ± 0.4	62 ± 6	} 3.9	4.2	} 5.8 ± 0.5
	6.4 ± 0.4	29 ± 3		3.1	
	0.8 ± 0.03	9 ± 1		0.2	
PA3	16.2 ± 0.6	58 ± 7	} 3.6	3.9	} 5.2 ± 0.3
	6.3 ± 0.4	33 ± 3		2.9	
	0.9 ± 0.04	9 ± 1		0.4	
PA4x	16.2 ± 1.0	56 ± 14	} 4.0	4.4	} 6.0 ± 0.5
	7.0 ± 0.7	35 ± 7		3.3	
	0.9 ± 0.13	9 ± 2		0.3	
PA4w	16.0 ± 0.5	61 ± 6	} 3.4	3.7	} 4.8 ± 0.3
	6.1 ± 0.3	31 ± 3		2.7	
	0.7 ± 0.05	8 ± 1		1.7	
PA6	15.9 ± 0.6	46 ± 6	} 2.9	3.3	} 4.1 ± 0.2
	6.0 ± 0.3	40 ± 3		2.4	
	1.0 ± 0.04	14 ± 1		0.4	
none (control)	0.6	100			
2-propanol	9.9	100			

* 測定条件: ANS (10 μM), ペプチド (200 μM, ヘリックス単位の濃度), 温度20°C

表 9.2 ANS-ペプチド複合体の蛍光減衰パラメーター

ことは、可能性として、包接されたANSが種々の配向をもっているか、あるいは複数のANSが一分子のPAに包接されていることが考えられる。長寿命成分の寿命約15nsecは bovine serum albumin²²⁾, apohorseradish peroxidase¹⁵⁾, apomyoglobin¹⁵⁾ などに取り込まれたANSの寿命とほぼ同程度であった。

AODBとANSについて、いずれもペプチドの種類による差異はあまり顕著ではなかった。すなわち全般的には包接体の構造はPA間で類似しており、包接構造は各PAに共通する両親媒性ヘリックスの会合部分によってできていると考えられる。

9.3.2 結果と考察: 不斉性包接場の発現

蛍光偏光解消法による分子形状の解析

蛍光差偏光度D(t)の減衰時定数 τ_D 値を、上記と同様にAODB系については表9.1に、ANS系については表9.2にまとめた。 $\tau_D^{(prim)}$ で表示したようにD(t)の成分数は予想通り少なく、AODBで1成分、ANSで2成分であった。実験項で述べたように、回転楕円体モデルにおいて一般に蛍光異方性R(t)は3成分の指数項で表される。しかしながら、このような少ないD(t)の成分数に対しては、S(t)の各成分毎について、改良法の1指数関数R(t)による解析(eq.9.3)が適当である。このような手法を用いてもなお、D(t)の成分数がS(t)の成分数よりも少ないので、蛍光プローブを包接したペプチドの分子サイズが τ_s によ

らずに同じであると仮定した。この仮定はたとえ成り立たない場合でも、得られる結果は平均的な分子サイズを意味する。このようにして、 τ_s と1:1に対応する τ_D を得た(表9.1, 表9.2)。さらに、 τ_s と τ_D から次式によって τ_R が求められる。

$$(1/\tau_R) = (1/\tau_D) - (1/\tau_s) \quad (\text{eq.9.12})$$

また未知パラメータのひとつである θ (分子軸と遷移モーメントのなす角度)は次のように仮定して求めた。AODBとANSには、観測して

いる蛍光に対応する遷移双極子モーメントが図9.6のように存在する。ヘリックスバンドルによる包接は、ヘリックスの軸方向と蛍光プローブの分子軸方向が一致すると予想され、このことから θ はAODBで60-90deg、ANSで0-40deg程度と考えられる。従って、AODBについて80deg、ANSについて20degとして計算に使用した。 τ_R と θ の値から(eq.9.11)を用いて、包接分子の長軸と短軸の長さの関係を示すことができる。結果を図9.7に実線で示した。この図で小

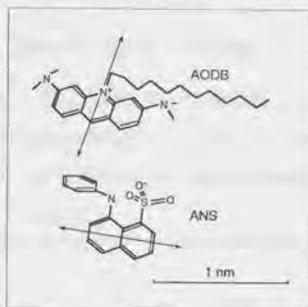


図9.6 蛍光プローブの遷移双極子モーメント

円はヘリックス数 N_h 本からなるバンドルの推定サイズで、Richmondらの構造パラメータ²³⁾や、分子モデリングによる蛍光プローブの分子サイズ(直方体として、0.6x0.4x1.8 nm (AODB)、0.6x0.4x0.8 nm (ANS))から、回転楕円体で近似^{15,24)}してその長軸と短軸の直径をプロットした。実測の実線と比較すると、AODB包接体は4-ヘリックスバンドル、ANS包接体は4-6-

ヘリックスバンドル程度のサイズと形状であると考えられる。包接体が単一のバンドル構造以外であるとする、モデリングからのサイズは実測と一致しない。従って、これらの包接体は回転軸直径3.0~3.5nmのバンドル構造であると結論できる。また包接に関わっているヘリックス数は4本から6本と考えられる。このことはPA2においても

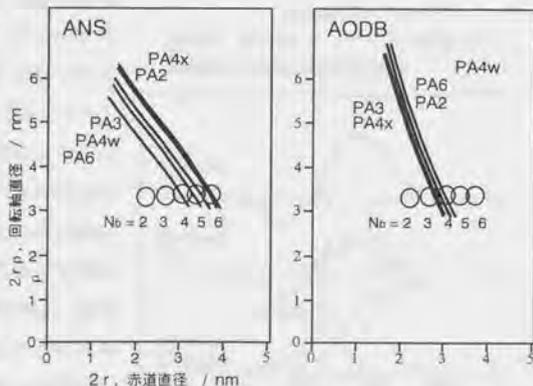


図9.7 蛍光偏光解消法による複合体サイズの推定(曲線は実測値、小円はモデリングによるバンドルのサイズ)

あてはまり、すなわちこのデータからも、PA2はdimerとして4-ヘリックスバンドルを形成していると考えられる。以上のように、包接体の形状とサイズの解析から、両親媒性ヘリックスの連結ペプチドと蛍光プローブの複合体はヘリックスバンドルを形成していると結論できる。包接は蛍光挙

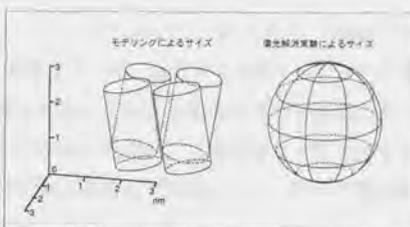


図9.8 複合体サイズのイメージ比較

動から疎水性相互作用によっていると考えられ、従って、もし蛍光プローブが存在しない場合でも、同様に、ペプチドは単独で疎水性相互作用によってヘリックスバンドルを形成していると考えことは十分妥当である²⁵⁾。4-ヘリックスバンドルについての実測分子サイズとモデリングによるサイズを図9.8に比較して示した。

不斉性包接場

AODBとペプチドの系においては図9.9のような誘起CD²⁶⁾が観測された。この波長領域はAODB分子の吸収スペクトル(図9.10下)と一致しており、AODB分子がペプチド包接体の中で不斉環境におかれたために生じたCDであると考えられる。AODBの吸収スペクトルは465nmと495nmにピークを持ち、465nmは芳香環がstackingしたdimer、495nmはmonomerによるものと考えられている²⁷⁾。吸収スペクトルをもとにCDスペクトルを解析すると、図9.10中段のようなになる。495nmのmonomerのバンドは正のCotten効果を与え、また465nmのdimerのバンドはDavydov分裂²⁸⁾により分散波形のCDを示していると考えられる。吸収スペクトルから再構成したCDスペクトルは実測スペクトルと比較的合っており、monomerとdimerがともに不斉環境下にあることが結論される。PA2、PA3、PA4w、

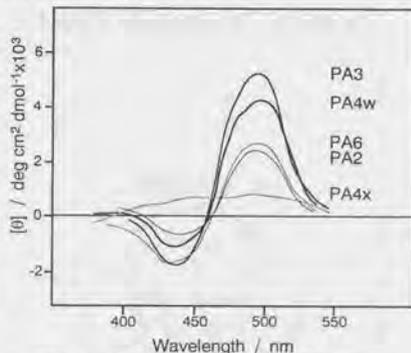


図9.9 AODB-ペプチド系の誘起CD (縦軸はAODB濃度で表示)

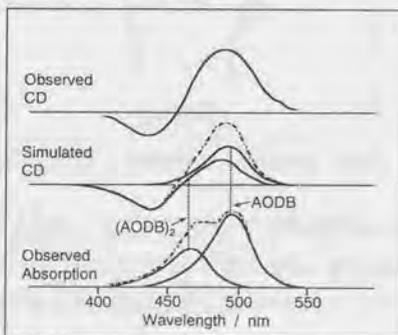


図9.10 誘起CDスペクトルのシミュレーション (破線は加算スペクトル)

PA6について、 $[\theta]_{435}/[\theta]_{495}$ を比較すると、-0.33、-0.36、-0.27、-0.68となり、PA6では他よりもAODB-dimer包接体が多いことを意味している。おそらく6本のヘリックスが大きい包接体を形成したのではないかと考えられる。このことは蛍光寿命の結果とも一致している。各ペプチドのうちで、PA4xのみは他と異なり、この領域にCDを示さなかった。すなわち、ヘリックス間の連結様式が他と異なっていることと、ループ部分の自由度がいくらか低いことが、この原因と思われる。

exciton chirality法²⁶⁾によれば、Davydov分裂したCDの波形パターンから、stackingした分子のねじれ様式が推定できる。AODBについては長波長側が正のCDパターンを示したので、stackingのねじれはプラス、すなわち手前から向こうの分子を見て右にねじれた形であると考えられる(図9.11右)。ヘリックスバンドルの単純系であるコイルドコイルでは、各 α -ヘリックスの軸は相手側がプラスに約20degねじれていることが知られている²⁹⁻³³⁾(図9.11左)。ここでの結果はstackingのねじれ方向がヘリッ

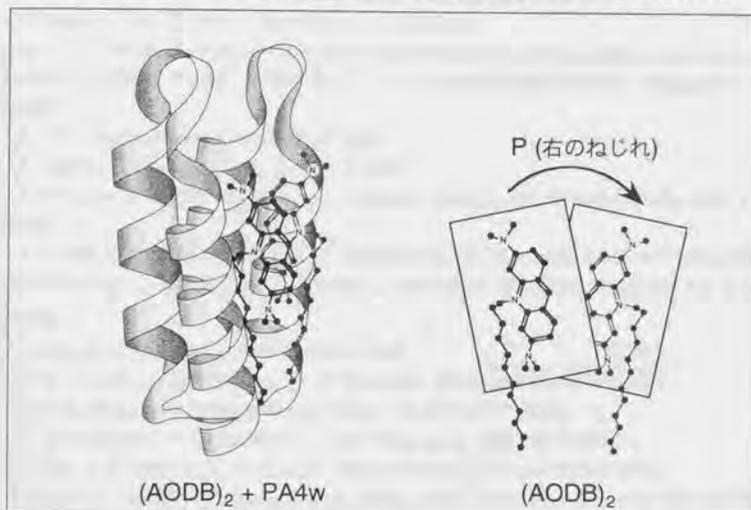


図9.11 包接されたAODBダイマーのねじれ(右図)と包接複合体の推定構造(左図)

クスのねじれに一致していることを示し、すなわち、ヘリックスバンドル構造のねじれによって、包接された分子が同じ方向のねじれを与えられた、と理解できる。言い換えると、不斉性を持たない分子に不斉性を誘起するような包接能をこれらヘリックスバンドルが有していると言える^{34,35)}。

引用文献

1. M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin (1978)
2. P. M. Keehn, S. M. Rosenfeld, Eds, *Cyclophanes*, Academic Press, New York (1983)
3. A. C. Bloomer, J. N. Champness, G. Bricogne, R. Staden, A. Klug, *Nature*, 276, 362-368 (1978)
4. D. M. Engelman, R. Henderson, A. D. McLachlan, B. A. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, 2023-2027 (1980)
5. C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing (1991)
6. E.T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Science*, 223, 249-255 (1984)
7. J. D. Lear, Z. R. Wasserman, W. F. DeGrado, *Science*, 240, 1177-1181 (1988)
8. L. Regan, W. F. DeGrado, *Science*, 241, 976-978 (1988)
9. N. Nishino, Y. Sugita, T. Yamamoto, T. Fujimoto, *Rep. Asahi Grass Found. Ind. Technol.*, 48, 149-155 (1986)
10. T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 380-381 (1989)
11. W. F. DeGrado, Z. R. Wasserman, J. D. Lear, *Science*, 243, 622-628 (1989)
12. M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.*, 28, 535-554 (1989)
13. C. Cohen, D. A. D. Parry, *Proteins*, 7, 1-15 (1990)
14. D. V. O'Conner, D. Phillips, *Time-Correlated Single-Photon Counting*, Academic Press, London (1985) / 平山鋭, 原清明 訳, ナノ・ピコ秒の蛍光測定と解析法, 学会出版センター (1988)
15. T. Tao, *Biopolymer*, 8, 609-632 (1969)
16. F. Perrin, *J. Phys. Radium*, 7, 1-11 (1936)
17. J. Wyman, S. J. Gill, *Binding and Linkage*, University Science Books, Mill Valley (1990)
18. J. H. van Eijk, H. M. Verheij, G. H. de Haas, *Eur. J. Biochem.*, 140, 407-413 (1984)
19. G. Colonna, C. Balestrieri, E. Bismoto, L. Servillo, G. Irace, *Biochemistry*, 21, 212-215 (1982)
20. L. Stryer, *J. Mol. Biol.* 13, 482-495 (1965)
21. T. M. Handel, S. A. Williams, W. F. DeGrado, *Science*, 261, 879 (1993)
22. S. R. Anderson, G. Weber, *Biochemistry*, 8, 371-377 (1969)
23. T. J. Richmond, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* 119, 537-555 (1978)
24. T. Tao, J. H. Nelson, C. R. Cantor, *Biochemistry*, 9, 3514-3524 (1970)
25. H. Morii, S. Honda, K. Ichimura, H. Uedaïra, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 64, 396-402 (1991)
26. N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroism Spectroscopy*, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo (1982)
27. V. Zanker, *Z. Phys. Chem.*, 199, 225-258 (1952)
28. A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons*, (M. Kasha, M. Oppenheimer, Jr., trans.) McGraw-Hill, New York (1962)
29. F. H. C. Crick, *Acta Crystallogr.*, 6, 689-697 (1953)
30. J. Seo, C. Cohen, *Proteins*, 15, 223-234 (1993)
31. C. Chothia, M. Levitt, D. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 4130-4134 (1977)

32. E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Alber, *Science*, 254, 539-544 (1991)
33. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry* Second Edition, John Wiley & Sons (1995)
34. H. Morii, K. Ichimura, H. Uedaira, *Chem. Lett.*, 1990, 1987-1990 (1990)
35. H. Morii, K. Ichimura, H. Uedaira, *Proteins*, 11, 133-141 (1991)

第10章 ヘリックスバンドルの構造誘起機能

10.1 序論

前章までに明らかにしてきたように、両親媒性ヘリックスは水中において、その疎水性面の露出が最小になるようにヘリックス間の会合を起こす。またこの性質によって、ヘリックス間の疎水性コアは疎水性の分子を取り込む機能を発現する。これらはいずれも、両親媒性の効果による構造形成が分子間の結合の原動力である、と解釈することができる。生体系においても同様に、両親媒性効果は重要な役割を果たしている。脂質分子がベシクルを形成したり、膜タンパク質が脂質膜上で特定の構造体として集積されたり、その例は多数見られる。ここでもやはり、各分子の構造形成と分子間の結合とが同時に起きている一つの現象である、という点が注目される。

生理活性ペプチド¹⁾は、各種のペプチドホルモンをはじめ、様々な機能を生体内で担っている。その作用機序はペプチドホルモンの場合、一般にはまずligandとして細胞膜のreceptorに結合し、続いてGTP結合タンパク質やprotein kinaseなどへと作用が及んでいく。また毒素タンパク質などでは、細胞膜に直接作用して細胞機能に変化をきたす例もある。特徴的なことは、これらの生理活性ペプチド自身は、多くは低分子であるために特定の立体構造を持たない場合が多く、receptorや生体膜と結合して構造が形成され、機能が発現する点である²⁾。また、このようなペプチドのアミノ酸配列には、両親媒性ヘリックス的な特徴があることが知られている^{2,3)}。いくつかの生理活性ペプチドについて、溶液中ではrandom-coil構造であるのに対して、脂質膜との相互作用によって両親媒性ヘリックス構造が形成されることが報告されている^{3,4)}。

これまで、いくつかのde novo設計による人工タンパク質が創られ、その酵素機能等が調べられているが、多くはヘリックスバンドル構造をguest分子の包接場としてののみ利用しているものである^{5,6)}。ここでは、人工的に設計した両親媒性ヘリックスバンドル分子について、単なるホスト分子としてだけでなく、上記のreceptorのような機能、すなわちligandあるいはguestとなる生理活性ペプチド分子に高次構造を誘起して複合体となる機能を見いだした。この機能は、ligand-receptor系のモデルとしてだけでなく、タンパク質のfoldingに関わっているシャペロンのような機能⁷⁾、あるいはカルシウムの存在下で両親媒性ヘリックスと相互作用するcalmodulinの機能^{8,9)}などとも、ある意味で関係していると考えられる。以下では、成長ホルモン放出因子¹⁰⁾とハチ毒melittin¹¹⁾の2つの生理活性ペプチドについて、4-ヘリックスバンドル型人工タンパク質との複合体形成能および複合体構造について検討した。

10.2 実験：生理活性ペプチドとの複合体形成の解析

人工タンパク質および生理活性ペプチド

ヘリックスバンドル型人工タンパク質としては、第4章で述べた4-ヘリックスバンドル分子PA4wを用いた。PA4wは凍結乾燥粉末からバッファー溶液に溶かして用いた。タンパク質の原濃度はアミノ酸分析によって決定し、各測定においては一定条件でCD測定を行い222nmのモル楕円率を二次基準として濃度を決めた。

生理活性ペプチドは、ハチ毒のmelittin (26残基)、およびヒト成長ホルモン放出因子 (human growth hormone releasing factor, hGRF) の活性領域である(1-29)領域 (hGRF(1-29)NH₂と表記)を用いた。ただしhGRF(1-29)NH₂の10位はTyrからTrpに置換したものの([Trp¹⁰]-hGRF(1-29)

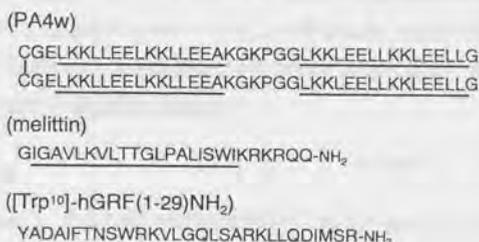


図10.1 人工タンパク質PA4wと生理活性ペプチドの一次構造 (下線は予想される両親媒性ヘリックス部分を示す)

NH₂)を使用した。これらの構造式を図10.1に示す。ともにC端はアミド型(-CONH₂)である。melittinはハチ毒 (bee venom) 由来のもの (Sigma Chem. 製) を逆相 HPLC により精製し凍結乾燥して用いた。[Trp¹⁰]-hGRF(1-29)NH₂は固相合成法により合成したものを同様に精製して用いた。これらペプチドの濃度は280nmの吸光度¹²⁾から、 $\epsilon(\text{Trp})=5550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、 $\epsilon(\text{Tyr})=1250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として決定した。すべての分光測定は25mM リン酸ナトリウムのバッファー溶液中 pH 7.0で行った。

円偏光二色性測定

円偏光二色性(CD)測定はJasco-J600分光計を用い、2mmの光路長の円筒型石英セル中で190-260nmのスペクトルを測定した。測定温度はセルジャケットの循環水温度を20℃あるいは昇温時は20~85℃ (昇温速度0.8 K min⁻¹)に制御した。昇温測定においては、温度計出力と楕円率出力をXYプロッターを介してアナログデジタル変換し、RS232C経由でパーソナルコンピューターに同時に1秒毎に取り込んだ。

蛍光測定

蛍光スペクトルはShimadzu-RF5000により測定した。励起波長はTrpの吸収極大波長280nmに設定した。バンド幅は励起側5nm、発光側3nmとし、20℃で測定した。

蛍光寿命および蛍光偏光解消実験は Horiba-NAES-1100 時間分解蛍光光度計により行った。光源は水素ガス封入放電管の約 5000Hz のパルス光を使用した。励起光は 280nm に設定し、発光側には cut-off フィルター (Corning O-53; 305nm で透過率 40%) を設置した。20°C において 0.2nsec の時間ドメイン毎のデータを収集した。また励起側には偏光子を垂直方向に置き、発光側には垂直および水平において、それぞれ対応する時間分解データ I_{VV} と I_{VH} を得た。

時間分解蛍光測定データのデータは、別途求めた PA4w との複合体形成の平衡定数をもとに、非複合体成分のデータを差し引いて複合体のみのデータにして解析した。時間分解データ I_{VV} と I_{VH} は、 $I_{VV} + 2cI_{VH}$ (c は装置特性と光源の時間変動に関する補正係数) として deconvolution することにより蛍光の減衰関数 $S(t)$ を得た。

$$\int_{t'=0}^t I_{ex}(t') S(t-t') dt' = I_{VV} + 2cI_{VH} \quad (\text{eq.10.1})$$

また、 $I_{VV} - cI_{VH}$ を deconvolution して $S(t)R(t)$ の関数形で得て、蛍光の偏光異方性 $R(t)$ を求めた。

$$\int_{t'=0}^t I_{ex}(t') S(t-t') R(t-t') dt' = I_{VV} - cI_{VH} \quad (\text{eq.10.2})$$

$S(t)$ および $R(t)$ は指数関数の和で表し、pre-exponential factor, A_i ; 相対量子収率, Q_i ; 時定数, τ_i 等のパラメーターは次式で定義した。

$$S(t) = \sum_i A_i \exp(-t/\tau_{Si}) \quad (\text{eq.10.3})$$

$$Q_i = \frac{A_i \tau_{Si}}{\sum_k A_k \tau_{Sk}} \quad (\text{eq.10.4})$$

$$R(t) = \sum_i B_i \exp(-t/\tau_{Ri}) \quad (\text{eq.10.5})$$

さらに deconvolution の正当性を判定するために、次式の χ^2 因子を計算した。ここで n, p, W はそれぞれデータポイント数、deconvolution 計算のパラメーター数、重み因子である。

$$\chi_v^2 = \frac{1}{n-p} \sum_{(n)} W (I_{obsd} - I_{calcd})^2 \quad (\text{eq.10.6})$$

deconvolution には、装置付属の Marquart 法に換えて、Gauss-Newton 法と最急降下法を組み合わせた収束性の良い最小自乗法を開発し、表計算ソフト上で使用した。 $R(t)$ の時定数から、第 9 章と同様に回転楕円体モデルにより、解析を行った。

10.3 結果と考察：両親媒性部位の分子認識と構造誘起

生理活性ペプチド、melittinおよび $[\text{Trp}^{10}]$ -hGRF(1-29) NH_2 のCDスペクトルを図10.2に示した。このうち、混合系のスペクトルは $10 \mu\text{M}$ の生理活性ペプチドと $40 \mu\text{M}$ のPA4wの混合系のスペクトルから、 $40 \mu\text{M}$ のPA4w単独のスペクトルを差し引いて生理活性ペプチドの濃度で換算したもの $([\theta]_{X+\text{PA4w}} - \theta_{\text{PA4w}})$ である。ペプチド単独の系のCDスペクトルは 222nm のモル楕円率が $-5000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ と小さく、これらのペプチドはほぼrandom coil構造であると考えられる。しかしながらPA4wが共存すると、 $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値の著しい増大が

観測された。PA4wは単独では、この条件で高いヘリックス含量を示し、また一般にヘリックス構造を誘起する溶媒とされる trifluoroethanol 中でもバッファー中より $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値が5%しか増大しない。すなわちPA4wのヘリックス形成可能な領域はほとんど α -ヘリックスをすでに形成しており、従って生理活性ペプチドとの混合系における $[\theta]_{222\text{nm}}$ の増大は、PA4wよりもむしろ大部分が生理活性ペプチドにおけるヘリックス含量の増加であると結論できる。すなわち、PA4wとの相互作用により、random coil 構造のペプチドに α -ヘリックス構造が誘起されたといえる。

生理活性ペプチドにおける α -ヘリックス含量の増大をタンパク質PA4wの添加量に対してプロットしてみると、図10.3ようになる。 $[\text{Trp}^{10}]$ -hGRF(1-29) NH_2 ではPA4wの量比が増加するにつれて

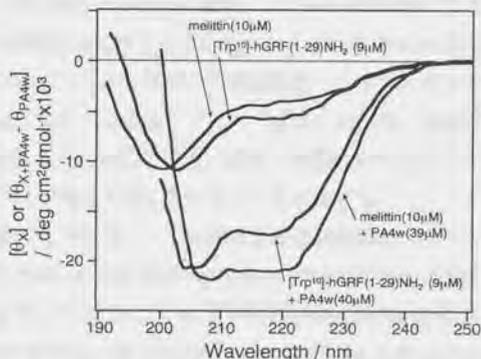


図10.2 生理活性ペプチドの単独およびPA4wとの複合体のCDスペクトル(20°C)

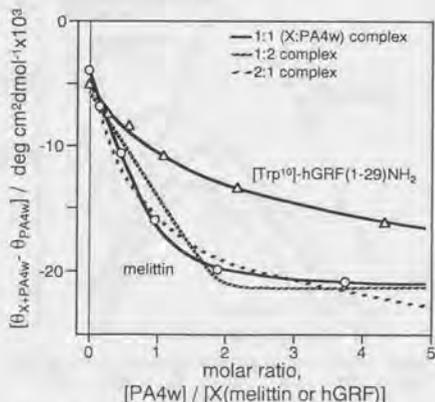


図10.3 複合体CD強度のPA4wモル比依存性(マークは実測値、曲線はフィッティング値)

飽和曲線を描いて222nmにおける $[\theta_{X+PA4w} - \theta_{PA4w}]$ の強度が大きくなる。melittinではさらに鋭敏な増大が観測されモル比 $[PA4w]/[X]$ が2以上ではほぼ $[\theta]_{222nm}$ は飽和した。この変化を複合体組成、1:1, 1:2, 2:1のモデルでfittingさせてみると、1:1の場合が最もよく実測と一致した。従って $[Trp^{10}]$ -hGRF(1-29)NH₂に対しても1:1複合体が形成されていると仮定して計算すると、得られた会合定数は、1.3および13 μ Mと比較的強い結合を示した。また、PA4w濃度無限に外挿した時の $[\theta_{X+PA4w} - \theta_{PA4w}]_{222nm}$ は、それぞれ-21900および-20400 deg cm² dmol⁻¹であった。この値はヘリックス以外の構造の $[\theta]_{222nm}$ 値が1000~5000 deg cm² dmol⁻¹であると仮定してChenらの方法¹³⁾で計算すると、melittinおよび $[Trp^{10}]$ -hGRF(1-29)NH₂ともにヘリックスの鎖長は18残基と推定された。この長さは図10.1に下線で示したそれぞれの両親媒性ヘリックス部分の長さともよく一致している。このことは、複合化によるヘリックス含量の増加は、両親媒性ヘリックスの形成によるものであることを支持しており、同時に両親媒性のPA4wと生理活性ペプチドの両親媒性ヘリックスが相互作用していることを示唆する。

melittinおよび $[Trp^{10}]$ -hGRF(1-29)NH₂はともに、Trp残基1個を両親媒性ヘリックス部分の疎水性コア領域に有しているため、その蛍光スペクトルのPA4w添加による変化をCDと同様に検討した。図10.4に示したように、ペプチド単独の時は極大蛍光波長が356nmで、水中のtryptophanのそれに近い値であった。ここへPA4wを添加すると、極大蛍光波長はそれぞれ339nm, 333nmに大きくシフトした。このことは複合体

形成により、Trp残基が束縛を受けたことを意味している。また、 $[Trp^{10}]$ -hGRF(1-29)NH₂では、蛍光強度も増大（蛍光量子収率は0.07から0.11へ増加）しており、Trpが溶媒から遮蔽されていることが推測される。一方melittinでは蛍光強度はやや減少した（蛍光量子収率は0.09から0.07へ減少）。このことは $[Trp^{10}]$ -hGRF(1-29)NH₂のTrpがヘリックス部分の中央寄りにあるのに対して、melittinではヘリックス部の端に位置しているため、より長さの短

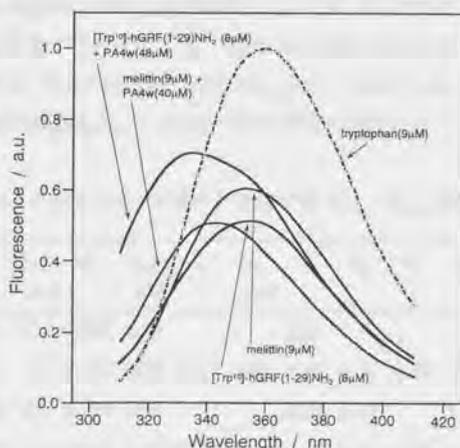


図10.4 生理活性ペプチドのTrp残基の蛍光スペクトル（励起波長は280nm, 温度20°C）

いPA4wのヘリックス部分からはみ出しているためと予想される。CDと同様に、PA4wを添加した時の330nmの蛍光強度でmonitorした滴定曲線を測定し、結果を図10.5に示した。ともに飽和曲線が得られ、fitting計算で、1:1複合体の形成が確認された。また会合定数もCDの結果にほぼ近い値が得られた。

時間分解蛍光測定は、melittin (9.9 μ M; 20.2 μ MのPA4w共存) および[Trp¹⁰]-hGRF(1-29)NH₂

(8.1 μ M; 96.1 μ MのPA4w共存)について行い、その結果をペプチド単独時の結果とともに表10.1にまとめた。PA4w共存下では、これらの濃度において、前述の会合定数からそれぞれ98%と93%のペプチドがPA4wと複合体形成していると考えられる。 χ^2 因子はいずれも1.00に近く、deconvolutionで得たパラメータの妥当性を示している。Trp残基の蛍光寿命については、一般に複数の成分が存在することが知られており、これらはquenching環境の異なるTrp側鎖のconformerに由来すると考えられている¹⁴⁾。ペプチド単独での蛍光寿命データは2成分で良く表され、一般のTrp残基の特徴を示す。一方、PA4wとの複合体ではmelittin、[Trp¹⁰]-hGRF(1-29)NH₂ともに寿命成分は3成分となり、10nsec程度の長寿命成分が出現した。この長寿命のものは束縛されたTrp残基によるものと考えられる。

蛍光偏光異方性の解析結果を表10.2にまとめた。ペプチド単独では、($I_{VV} - cI_{VH}$)強度が

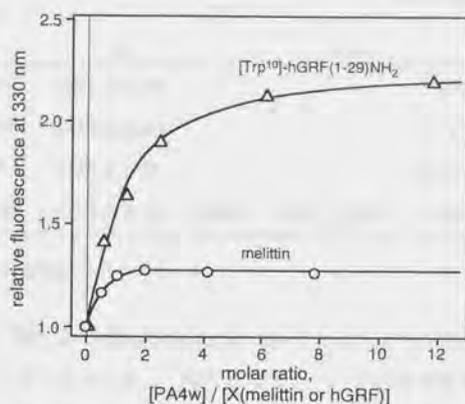


図10.5 複合体の蛍光強度のPA4wモル比依存性 (330nmでモニターした)

	A ₁	τ_{s1} (ns)	A ₂	τ_{s2} (ns)	A ₃	τ_{s3} (ns)	Q ₁	Q ₂	Q ₃	χ^2
melittin	0.304	1.88	0.360	4.13			0.28	0.72		1.11
melittin + PA4w (assembly)	0.353	1.10	0.344	3.66	0.027	8.6	0.20	0.67	0.13	1.39
[Trp ¹⁰]-hGRF(1-29)NH ₂	0.438	1.94	0.135	4.59			0.58	0.42		1.14
[Trp ¹⁰]-hGRF(1-29)NH ₂ + PA4w (assembly)	0.399	1.18	0.273	3.98	0.013	12.2	0.28	0.63	0.09	1.04

表10.1 生理活性ペプチドとPA4wの複合体の蛍光寿命データ

	B_1	τ_{R1} (ns)	B_2	τ_{R2} (ns)	χ^2
melittin	0.077	0.94 ± 0.23			0.84
melittin + PA4w	0.106	5.36 ± 0.35			1.17
[Trp ¹⁰]-hGRF(1-29)NH ₂	0.022	1.63 ± 1.71			0.87
[Trp ¹⁰]-hGRF(1-29)NH ₂ + PA4w	0.135	0.30 ± 0.14	0.090	7.80 ± 0.91	1.03

表 10.2 PA4w との複合体の蛍光偏光異方性減衰のデータ

低いために解析結果は誤差が多く、 χ^2 因子が低強度の場合によくみられる1以下の値になった¹⁵⁾。PA4w との複合体では χ^2 因子は1に近く、得られたパラメータの妥当性を示した。複合体ではR(t)の時定数 τ_R が5~8nsecとかなり長いものが含まれていた。このことはTrp残基の側鎖が局所的ではなく、より大きいサイズの単位で運動していることを意味している。第9章で述べた形状因子fを用いる単一指数近似の方法を用いると、この τ_R 値から、溶媒中での回転運動に対応する回転楕円体のサイズを見積もることができる。ここでは、遷移双極子モーメントと楕円体の対称軸のなす角度(θ_E)が推定できないため、長軸と短軸の軸比(ρ)の他に、この θ_E も未知数のまま残して、結果を赤道面直径と回転軸直径をXY軸として、図10.6に示した。軸比 ρ が2以上の場合は単一指

数近似ができなくなり、実験データとは合致しなくなるため、 $\rho = 0.8 \sim 1.8$ の領域のみを示した。第9章では、PA4wのヘリックスバンドルのサイズが回転軸直径3.0~3.5nm、赤道面直径3.0~4.0nmであることを示したが、ここでの結果は、それよりもいくらか大きいサイズであった。複合体が1:1の分子会合であることと、生理活性ペプチドが α -ヘリックス構造をとっていること、から考えて複合体はおそらく5本のヘリックスからなるバンドル構造であると推測されるが、図10.6の実験結果と合わせて

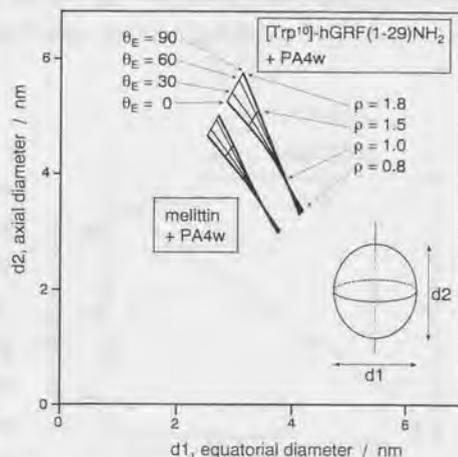
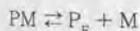


図 10.6 蛍光偏光解消法によって得られた複合体の流体力学的サイズ

考えると、5-ヘリックスバンドルであるという推定はほぼ妥当で、複合体の分子サイズとして、回転軸直径3.0~4.0nm、赤道面直径3.5~4.0nmであると考えられている¹⁶⁾。また、[Trp¹⁰]-hGRF(1-29)NH₂に関しては、R(t)において長い時定数の成分の他に、0.30nsecの成分が見いだされた。この成分はKinoshitaらの解析法¹⁷⁾によれば wobble angle が43degの局所的な揺動運動の結果であると考えられる。このことは複合体が一義的な構造を持った剛直な構造体ではないことを示唆している。

さらに、複合体の熱力学的な特徴を調べるためにCDの温度スキャン測定を行った。melittinとPA4wの混合系においては、PA4w単独時と同様に、ゆるやかな $[\theta]_{222\text{nm}}$ 強度の減少が観測された(図10.7上)。melittinとPA4wの複合体の変性は、その解離に引き続いて起きると仮定すると、次のような平衡のモデルを考えることができる。



PMは複合体、PはPA4w、Mはmelittinを表し、添字Fはfolded、Uはunfoldedを示す。eq.10.8の変性は、DSC測定の結果、360K付近にピークをもつ非常に幅広いピークを与えた。(eq.10.7)の解離定数を調べるために、種々の温度で図10.5と同様の蛍光測定による滴定実験を行った。その結果を、解離定数の対数を温度の逆数に対してプロットして示すと、図10.8が得られる。プロットは直線

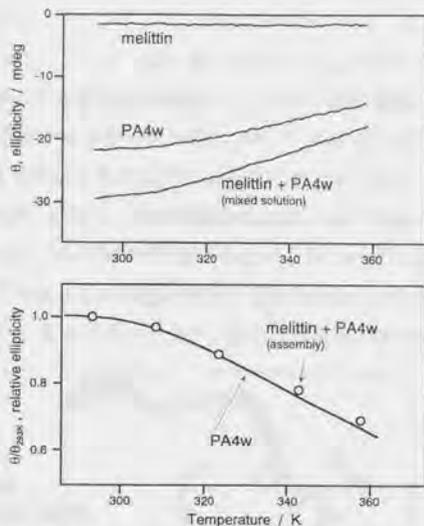


図10.7 melittin-PA4w 複合体混合液の熱転移 (上図はCD強度の変化, 下図は複合体のみとPA4wとの転移分率の比較)

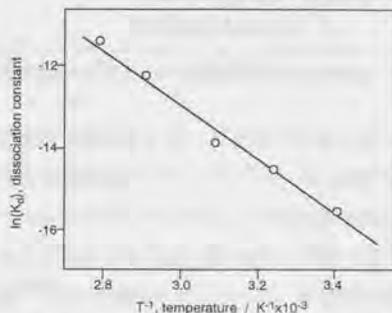


図10.8 melittin-PA4w 複合体の解離定数の温度依存性

を与え、その傾きと切片から解離のエントタルピーとして 57 kJ mol^{-1} が得られる。また、解離エントロピーは $60 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ であった。ここから複合体のみの $[\theta]_{222\text{nm}}$ の変化を計算すると、図 10.7 下のようになる。相対的な温度変化の挙動は、PA4w とほぼ類似していた。melittin と PA4w の複合体形成の自由エネルギーは 20°C において、 -38 kJ mol^{-1} で、これは melittin が 6 回転のヘリックスを形成することでもたらされていると考えられる。1 回転あたりに換算すると -6.4 kJ mol^{-1} となり、この値は DeGrado らが 4 回転のヘリックスからなる 4-ヘリックスバンドルについて報告¹⁸⁾している -5.9 kJ mol^{-1} (1 回転あたりに換算) と良い一致を示す。またこの値は Leu 残基の側鎖を水から ethanol に移す時の自由エネルギー変化¹⁹⁾ -7.5 kJ mol^{-1} とよく合っており、複合体形成が、両親媒

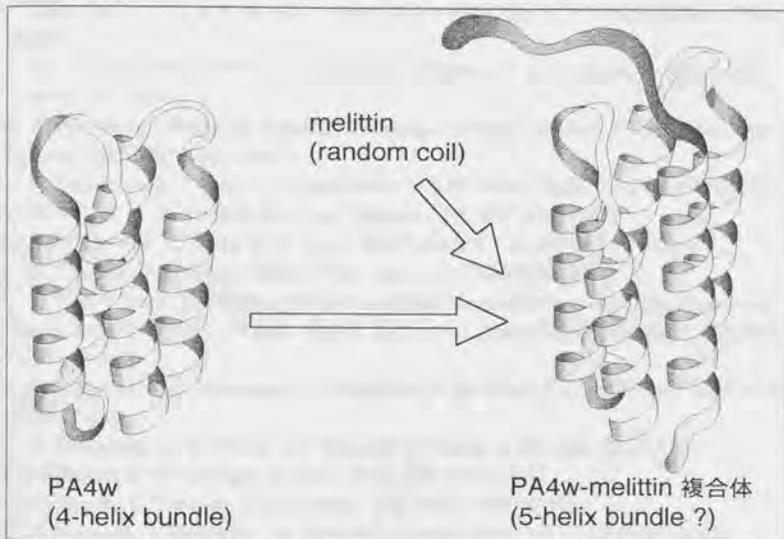


図 10.9 ヘリックスバンドルによる生理活性ペプチドへの構造誘起現象の模式図

性ヘリックスの形成とその疎水性面の会合によって起きていることを強く支持している。

結論として、水中ではランダムな構造である生理活性ペプチド²⁰⁻²²⁾が、人工的に設計した 4-ヘリックスバンドル分子と 4+1 のヘリックスバンドル型の 1:1 複合体を形成し、この時、両親媒性ヘリックス構造が誘起されることが示された (図 10.9)。序論で述べたように、この分子間結合による構造誘起機能²³⁾は、receptor やシャペロンの機能の原型とも考えられる。そしてまたこのことは、分子設計を加えることで、より高度な分子認識や機能を持ったタンパク質を人工的に創成しうる可能性を示しているということが

できる²⁴⁾。

引用文献

1. 藤野政彦 編, ペプチドと蛋白工学, 講談社サイエンティフィク (1991)
2. E. T. Kaiser, F. J. Kezdy, *Science*, 223, 249-255 (1984)
3. D. Fukushima, S. Yokoyama, F. J. Kezdy, E. T. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 2732-2736 (1981)
4. S. Honda, S. Ohashi, H. Morii, H. Uedaira, *Biopolymers*, 31, 869-876 (1991)
5. T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 380-381 (1989)
6. K. W. Hahn, W. A. Klis, J. M. Stewart, *Science*, 248, 1544-1547 (1990)
7. R. H. Pain (Ed.), *Mechanisms of Protein Folding*, Oxford University Press (1994)
8. 遠藤, 西塚, 八木, 宮本 編. カルシウムイオンと細胞機能, タンパク質核酸酵素 (PNE), 33 (1988)
9. K. T. O'Neil, H. R. Wolfe, Jr., S. Erickson-Viitanen, W. F. DeGrado, *Science*, 236, 1454-1456 (1987)
10. S. Ohashi, K. Ohtaka, M. Shiraki, S. Sawano, S. Ozaki, M. Mori, T. Takaoka, *Pept. Chem.*, 1983, 291-296 (1984)
11. E. Habermann, J. Jentsch, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 348, 37-50 (1967)
12. N. J. Solli, T. T. Herskovits, *Anal. Biochem.*, 54, 370-378 (1973)
13. Y.-H. Chen, J. T. Yang, K. H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350-3359 (1974)
14. F. Tanaka, N. Mataga, *Polym. Prep. Jpn.*, 40, 3092-3094 (1991)
15. D. V. O'Conner, D. Phillips, *Time-Correlated Single-Photon Counting*, Academic Press, London (1985) / 平山鋭, 原清明 訳. ナノ・ピコ秒の蛍光測定と解析法, 学会出版センター (1988)
16. P. C. Weber, F. R. Salemme, F. S. Mathews, P. H. Bethge, *J. Biol. Chem.*, 256, 7702-7704 (1981)
17. K. Kinoshita, Jr., S. Kawato, A. Ikegami, *Biophys. J.*, 20, 289-305 (1977)
18. L. Regan, W. F. DeGrado, *Science*, 241, 976-978 (1988)
19. Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.*, 246, 2211-2217 (1971)
20. E. Knoppel, D. Eisenberg, W. Wickner, *Biochemistry*, 18, 4177-4180 (1979)
21. J. Bello, H. R. Bello, E. Granados, *Biochemistry*, 21, 461-465 (1982)
22. A. S. Tatham, R. C. Hider, A. F. Drake, *Biochem. J.*, 211, 683-686 (1983)
23. L. Gonzalez, Jr., J. J. Plecs, T. Alber, *Nature Struct. Biol.*, 3, 510-515 (1996)
24. H. Morii, S. Honda, S. Ohashi, H. Uedaira, *Biopolymers*, 34, 481-488 (1994)

第11章 ヘリックス間の配向制御のための分子設計

11.1 序論

天然のタンパク質において、複数の α -ヘリックスの配向には、平行のものと逆平行のものが見られる。ロイシンジッパー^{1,2)}などでは、分子間で2本の α -ヘリックスがコイルドコイルを形成するが、平行に配向することが機能発現に不可欠な要素である^{3,4)}。同様に、キナーゼなどの2量体として機能するモータータンパク質においても平行なコイルドコイルの形成が重要である⁵⁾。人工的なタンパク質の創生を目指す場合、単にヘリックスバンドルというだけでなく、より高次な構造形成のためには、ヘリックス同士間の配向制御が重要となる。

両親媒性の α -ヘリックスが2本集合して形成されるコイルドコイル構造は、通常の α -ヘリックスが3.6残基周期でヘリックス1回転するのに対して、3.5残基周期すなわち7残基で2回転する。この特徴は両親媒性がa,b,c,d,e,f,gで記述される7残基周期を有することの結果である。この

heptad表記では、aとdの位置に疎水性コアを形成する残基が、また他の位置には親水的な残基がより高い頻度で出現する^{1,6)}。2本のヘリックス間の安定化相互作用は、a,d間の疎水性相互の他に、図11.1のようにe,g位置間での静電的相互作用すなわちイオンペア形成による安定化が考えられている^{7,8)}。

このようなコイルドコイルの構造的特徴をもとに、水溶液中で2本のヘリックスの分子間配

向を平行あるいは逆平行に制御するには次のようなデザインが考えられる。

(i) a,d位置の疎水性残基の列に立体的な凹凸を非対称に持たせる⁹⁾。例えばa,d位置を順にVal-Val-Ala-Val-Val-Leu-Val-Valとすれば、平行ならAlaとAla、LeuとLeuが向き合い全体のパッキングがうまくいかないが、逆平行ならAlaとLeuが向き合うのでうまくパッキングし、両方で安定性に差が生じ得ることが予想される。

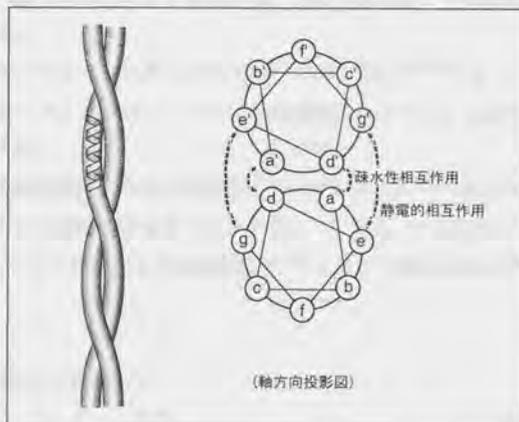


図11.1 コイルドコイル構造のモデル図と断面投影図

(ii) a,d 位置の残基の列に、親水性残基をいくつか非対称位置に導入する⁴⁾。平行の場合は親水性残基同士が向き合うが、逆平行の場合は親水性残基と疎水性残基が向き合うことになり、不安定化すると考えられる。

(iii) a 位置と d 位置は等価ではなく、平行なコイルドコイルでは a 位置に Ile が、また d 位置に Leu が存在するほうが熱的に安定であると報告されている¹⁰⁾。このことは a,d 位置の非等価性が安定性に関わっていることを示し、このこと利用した配向設計の可能性もある。

(iv) ヘリックス上で疎水性コアの a,d 位置に隣接する e,g 位置の荷電パターンを非対称にする。このことにより、平行と逆平行とでイオンペア形成 (図 11.1) の有利不利が生じ両者の安定性に差が生じる可能性が考えられる。

(v) 分子間での金属イオンの配位¹¹⁾が可能になるように配位性の基を導入する。平行では配位基が近接するために配位が可能になるが、逆平行では配位できなくなるため安定性が劣る。

(vi) ヘリックスの一端にかき高い基や荷電性の基を付加する。付加した基同士の相互作用により配向制御の可能性がある。

(vii) ペプチド結合の持つ双極子モーメントがヘリックスでは一方向に揃う^{12,15)}ため、ヘリックス全体では大きな双極子モーメントが生じ、この効果は逆平行のヘリックス間の配向を安定化すると考えられている。

これらの設計は同種ヘリックスの配向だけでなく、異種ヘリックスのペア^{14,15)}を優先的に形成させたりするような制御にも適用できると考えられる。ここでは、主に(ii)と(vi)と(vii)の設計の効果を、蛍光エネルギー移動による距離測定法¹⁶⁾に基づく配向方向の定量によって検討した。

11.2 実験：合成と蛍光エネルギー移動

ペプチド設計

アミノ酸残基数31のペプチドを、両親媒性ヘリックスが形成されるように疎水性コアの a,d 位置に Leu を配して、すべての配列を全くディノーマに設計した。(1-30)の配列は N 端と C 端を反転させても同一の配列となるように、すなわち回文形式の配列とした。N 端はアセチル化し、C 端は Gly とした。親水性残基については、天然のロイシンジッパーの荷電性残基の存在率を参考にして、その配置は適度に分散するように任意に決定した (図 11.2)。共通基本配列を LZ0 と名付け、4 あるいは 27 位に蛍光性の Trp および別の蛍光性基を導入するための Cys を配置した。序論で述べた(vii)を検証するために、LZ1 ~

LZ3を、(ii)についてはLZ4~LZ7を、(vi)についてはLZ8~LZ15を、図11.3のように設計した。LZ8~LZ15についてはかさ高い基をN端に持たせるために、アセチル化の代わりにFmoc-Lys(Fmoc)-OHをカップリングさせ、主鎖方向と側鎖方向に次のアミノ酸2個がカップリングするようにし、これをくりかえして図11.3のような二重に分岐した構造にした。

合成

ペプチド合成は通常のFmoc法による固相合成法¹⁷⁾を用い、Shimadzu-PSSM8自動合成機により合成した。hydroxymethylphenoxy基を持つcopoly styrene-divinylbenzeneビーズ(合成品, 0.68mmol/gあるいは市販品, TGS-PHB, 0.23mmol/g)上で、最初のC端31位のGly残基を4-dimethylaminopyridine (DMAP) - diisopropylcarbodiimide (DIC)法によるエステル化反応^{18,19)}で導入し、続いて、樹脂上の官能基量25-30 μmolに対して各100 μmolのFmoc-アミノ酸とカップリング試薬としてはTBTU-HOBT-NMM(1:1:2)系を用いて、各25分間カップリングを行った。分岐構造を持つLZ8~LZ15については分岐部分のカップリングには試薬、アミノ酸とも使用量を増やした。各サイクルでのFmoc基の除去には

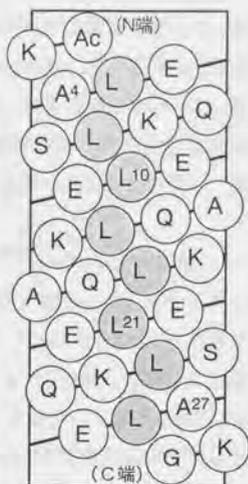


図11.2 基本配列LZ0のhelical-network表示

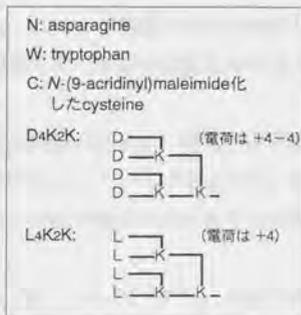
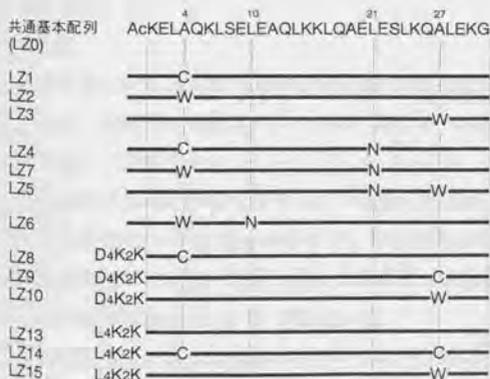


図11.3 設計した各種コイルドコイル性ペプチドのアミノ酸配列

piperidine (20%)と1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene (4%)のDMF溶液を用いた。伸長終了後、trifluoroacetic acid (TFA) (94%), 1,2-ethanedithiol(4%), 水(2%)の混合液により、全保護基を除去した。生成物はdiethyl etherに沈殿後、20%酢酸に溶かして、逆相HPLCで分析したところ、メインピークの他にC端の2残基が欠損したものが20%程度含まれていたが、その他の不純物は非常に微量であった。主ピークのみを分取し、凍結乾燥して各ペプチドを得た (収量10-18mg)。

Cys残基のN-acridinyl maleimide (NAM)によるラベル²⁰⁻²²⁾は次のように行った。フリーのSH基1.9 μ molを含有するペプチドを25mMリン酸バッファー(pH7.0) 450 μ lに溶かし、窒素ガス下で1MのNaOHを微量に添加してpHを6.8-7.1に調節する。ここへ、NAM (0.60mg, 2.2 μ Mol)をアセトン(150 μ l)に加温して溶かした液を添加し、25°Cで10分間反応させた。mercaptoethanolを9 μ l添加して未反応のNAMを処理し、5分後に1MのNaOH(120 μ l)を加えてpHを9.4-9.7程度にして付加したNAMのsuccinimide環の開環加水分解反応を120分間行い、酢酸270 μ lを添加してpHを3-4にした後、逆相HPLCで精製し、凍結乾燥して、目的とするNAM化ペプチドLZ1, LZ4, LZ8, LZ9, LZ13, LZ14を得た。

合成した各ペプチドは酸加水分解アミノ酸組成分析により同定し、またこの定量結果をもとにして以降の実験の濃度を決定した。Trpを含むペプチドについては280nmの吸光度から $\epsilon=5550\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ として定量したが、アミノ酸組成分析による値とはほぼ一致した。一部のペプチドについてはESI-MS測定により、NAMラベルが開環型で導入されていることを確認した。

分光測定

紫外可視スペクトルはJasco-UVIDEC-610を使用し、10mm光路長のセルで測定した。また、円偏光二色性スペクトルは、Jasco-J600を用いて、0.2mm光路長のセルで15°Cにおいて測定した。

蛍光量子収率および蛍光エネルギー移動の測定は、励起波長280nm、励起バンド幅5nm、発光側バンド幅3nmの条件で、Shimadzu-RF5000により15°Cで測定した。測定試料の内部フィルター効果を避けるために、励起波長での光学密度が0.06以下になるようにペプチド濃度10 μ Mで測定した。

すべての測定には100mMのKClを含む20mMのリン酸カリウムバッファー(pH7.0)を使用した。

蛍光エネルギー移動

Trp残基からCys残基側鎖のacridinyl基への蛍光エネルギー移動をFörsterの式²³⁾

により解析した。ドナー側の Trp 残基の蛍光量子収率は、tryptophan 水溶液の蛍光量子収率を文献値 0.14 (25°C)²⁴⁾ を基準として、また二次基準として 15°C での値 0.176 を用いて、濃度換算した実測スペクトルのピーク面積の相対値から算出した。蛍光スペクトル測定は 15°C で行った。測定は Trp を含むペプチドと acridinyl 基を含むペプチドの各水溶液を、(0.0:1.0), (0.1:0.9), (0.2:0.8), ..., (1.0:0.0) のモル比で混合し、バッファーで希釈して合計ペプチド濃度約 10 μM とした。

次の Förster の式:

$$R_0 = (\kappa^2 \beta n^{-4} \phi_D J)^{1/6} \quad (\text{eq.11.1})$$

において、 R_0 はエネルギー移動効率 50% の時のドナー-アクセプター間距離、 κ^2 は双極子間相互作用の配向因子、 β は定数、 n は媒体の屈折率、 ϕ_D はアクセプターがない時のドナーの蛍光量子収率、 J はドナーの蛍光とアクセプターの吸収スペクトルの重なり積分である。配向因子 κ^2 はランダムな配向を仮定して 2/3 を使い、 β は 8.785×10^{-25}

$$J = \int_{\lambda} \epsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int_{\lambda} F_D(\lambda) d\lambda \quad (\text{eq.11.2})$$

M cm^3 、 n は 1.4 の値を用いた¹⁴⁾。

熱測定

ペプチド LZ2 と LZ6 について DSC 測定を Microcal-MCS 示差走査熱量計を用いて行った。ペプチドを 20mM リン酸カリウムのバッファーに溶かし、同一のバッファーを対照セルに入れて、昇温速度 1.0K/min で測定した。測定データは、試料セルにバッファーを入れて同様に昇温したときのデータを差し引いて示した。測定セルの容量は 1.23m l。

11.3 結果と考察：疎水性パターンによる相補的配向と立体効果

各ペプチドの二次構造は、CD スペクトル(図 11.4)からいずれも α -ヘリックスに非常に富む構造であることが示された。222nm と 208nm における深いマイナスのピーク強度はほぼ等しく、この特徴からコイルドコイル構造であることが示唆される。LZ4~LZ7 の疎水性コア位置に Leu に代えて Asn を有するペプチドもほぼ同一の二次構造を示した(図 11.4)。 α -ヘリックス構造は μM 程度の濃度においても安定に形成

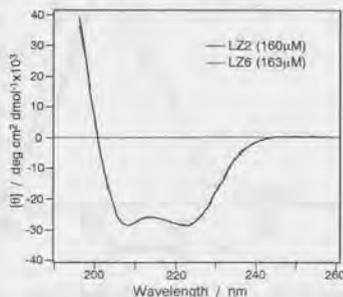


図 11.4 ペプチドの CD スペクトル

され、ペプチドあたり7~8個のLeu残基によって、このコイルドコイル構造は安定に保持されている。熱的な安定性をみるために、DSCを測定した結果、図11.5のような熱容量曲線が得られた。LZ6については、2量体当たりの転移エンタルピーは 170kJ mol^{-1} で、解離を伴う2状態転移としたときの理論転移曲線とよくフィットする(単量体や3量体以上のモデルではフィットしなかった)。またこのことは、形成された構造が3量体以上の会合体ではなく、設計通りの2

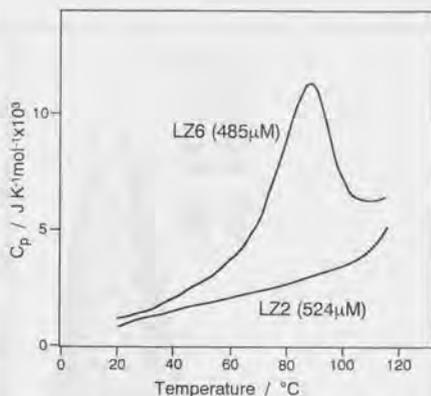


図11.5 ペプチドLZ2およびLZ6のDSC曲線

量体であることを示している。LZ2については、LZ6のコアのAsnがLeuに置換された構造を持つが、Leu間の相互作用によるエネルギー的利得によりLZ6よりも安定化し、ほぼ同じ濃度において転移温度は 120°C 以上になった(図11.5)。

一般に蛍光エネルギー移動の実験においては、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルが適度な重なりを持つことが必要である。図11.6にはペプチドLZ15中のTrp残基を励起したときの蛍光スペクトルとacridinyl基を有するLZ13の吸収スペクトルを示す。acridinyl基を持つペプチドはいずれも、強度に違いは見られるが同じ形の吸収スペクトルを与えた。一方、Trpを有するペプチドは、 $[\text{Trp}^e]$ (heptadのe位置)のもの $[\text{Trp}^g]$ (heptadのg位置)のもので蛍光スペクトルがわずかに異なり、 $[\text{Trp}^e]$ 体では蛍光極大波長が 349nm 付近に、 $[\text{Trp}^g]$ 体では 352nm 付近にあった。また、蛍光量子収率は後者のほうがいくらか大きかった。このことはeとgの位置が平面的には対称で等価であるが、実際には立体的な効果、おそらく α -ヘリックスの主鎖の螺旋に沿った側鎖の傾きによって非等価になっているためと考えられる。

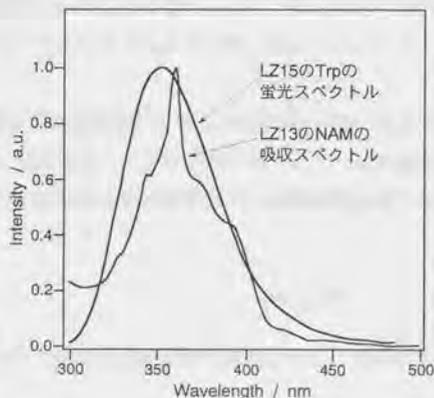


図11.6 LZ13の吸収スペクトルとLZ15の蛍光スペクトル(励起波長は 280nm 、温度 15°C)

Trp含有ペプチド(ドナー)と acridinyl基含有ペプチド(アクセプター)の混合系で、両者のモル比を変えて、280nmで励起した時の蛍光スペクトルを図11.7に示した。350nm付近のTrpの蛍光の他に、NAMのacridinyl基の蛍光も355nm, 370nm, 435nmに観測される。アクセプターのモル分率が増加するにつれて350nm付近の強度は減少し、435nm付近の強度は上昇する。しかしながら等強度点はかならずしも観測されず、この系が単なる混合系の現象ではなく、エネルギー移動による効果を含んでいることを示している。ドナーとアクセプ

ターが溶液中で全く独立に存在していれば、平均距離から考えてエネルギー移動はほとんど起こらないので、エネルギー移動が観測されることはドナーとアクセプターの分子が結合していることを意味する。ここではドナーとアクセプターの一部がヘテロなコイルドコイルを形成したと考えられる。

会合体系でのエネルギー移動についてはすでに報告されている。同様の取り扱いによって、次のようなモデル計算結果を示すことができる。アクセプターのモノマーモル分率を X とし、ドナーとアクセプターが共存する m 量体のモル分率を Y_k (k は m 個の中のドナーの個数を示す)とすると、

$$X = \sum_{k=0}^m \frac{m-k}{m} Y_k \quad (\text{eq.11.3})$$

と表され、さらにもし、ドナーとアクセプターが m 量体形成時に区別されずに挙動すると仮定すると、

$$Y_k = {}_m C_k (1-X)^k X^{m-k} \quad (\text{eq.11.4})$$

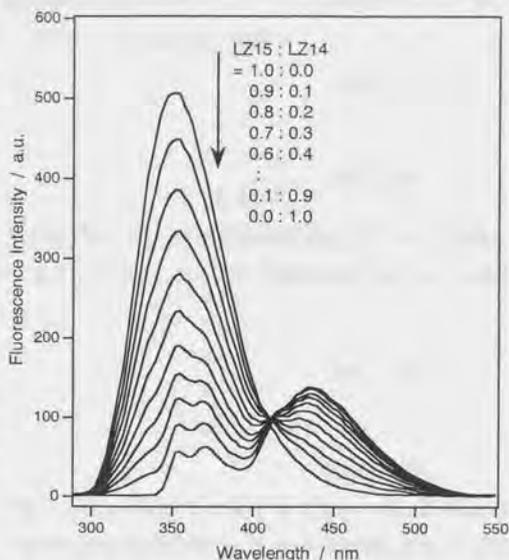


図11.7 ドナー-アクセプター系の混合溶液の蛍光スペクトル (両者のモル比を変化させた)

が成り立つ。実測されるドナーの蛍光強度 F をドナーのモノマーモル分率 $(1-X)$ で除して、さらに $X=0$ の時の蛍光強度 F_0 で規格化した相対蛍光強度を

$$Z \equiv \{F/(1-X)\}/F_0 \quad (\text{eq.11.5})$$

とすると、

$$Z = \{(1-E) \sum_{k=1}^{m-1} \left(\frac{kY_k}{m}\right) + Y_m\} / (1-X) \quad (\text{eq.11.6})$$

が成立する。すなわち、ドナーとアクセプターが共存する会合体ではエネルギー移動によって $(1-E)$ 倍に蛍光強度が減少するとしている。なおここでは平均のエネルギー移動効率 E を仮定している。ここで、

$$1-X = \sum_{k=1}^{m-1} \left(\frac{kY_k}{m}\right) + Y_m \quad (\text{eq.11.7})$$

であるので、上の2式から、

$$Z = 1 - E + E(1-X)^{m-1} \quad (\text{eq.11.8})$$

が得られる。 Z は $(m-1)$ 次関数となり、従って Z の X に対するプロットは、図11.8左のように $m=2$ では直線、 $m>2$ では下に凸の曲線になる。 $m=2$ の時には $Z=1-EX$ となるので、エネルギー移動効率が0から100%まで変化するのに対応して図11.8中のように傾きが変化する。このような場合ではプロットの傾きから移動効率 E を求めることができる。またさらに、ドナーとアクセプターが m 量体形成時に区別される時、すなわちヘテロ親和性とホモ親和性に差がある時には、(eq.11.4)は成立せず、複雑な平衡式

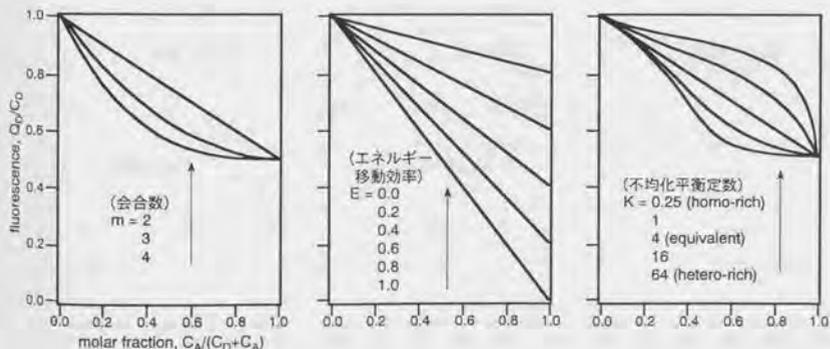


図11.8 蛍光エネルギー移動のモデル計算結果 (添字Dはドナーを、Aはアクセプターを示す。図左:会合数、図中:移動効率、図右:平衡定数による各変化)

の導入が必要になる。m = 2 の場合は、(AA) + (DD) \rightleftharpoons 2(AD)の平衡から、

$$K = \frac{[\text{AD}]^2}{[\text{AA}][\text{DD}]} = \frac{Y_1^2}{(X - Y_1/2)(1 - X - Y_1/2)} \quad (\text{eq.11.9})$$

となり、 $Y_1 =$ の式に変形して(eq.11.6)に代入すると、ZをEをパラメータとして含むXの式で表現できる。モデル計算例を図11.8右に示す。相対的にホモ2量体(AAとDD)が形成されやすい時には、上に凸、逆にヘテロ2量体(AD)が形成されやすい時には、下に凸の曲線となり、また等価な場合(K = 4)には、直線となる。

ドナーとしてLZ2あるいはLZ3、アクセプターとしてLZ1を用いた系でエネルギー移動を測定した結果を、図11.9左に示す。LZ1+LZ2の系とLZ1+LZ3の系はともにXに対するZのプロットがほぼ直線となり、上述のモデル計算の結果と合わせると、ドナーとアクセプターが区別されずに2量体が形成されていると考えられる。プロットの傾きあるいはX=1における切片値から求められるエネルギー移動効率は、これら2つの系であまり差は見られなかった。一方、21位をAsnに置換したペプチドの系では、LZ4+LZ5とLZ4+LZ7とでプロットは大きく異なった。LZ4+LZ5ではエネルギー移動はあまり起こらず、逆にLZ4+LZ7では著しいエネルギー移動が認められた。同様のプロットをLZ4+LZ6, LZ8+LZ10, LZ9+LZ10, LZ13+LZ15, LZ14+LZ15の各ドナーアクセプター系でも行い、エネルギー移動効率Eを算出した。結果を表11.1にまとめた。

実測のスペクトルから求められる ϕ_D とJの値から(eq.11.1)により算出されるパラメーター R_0 はE=0.5の時のドナーアクセプター間距離として定義されるが、実際のドナーア

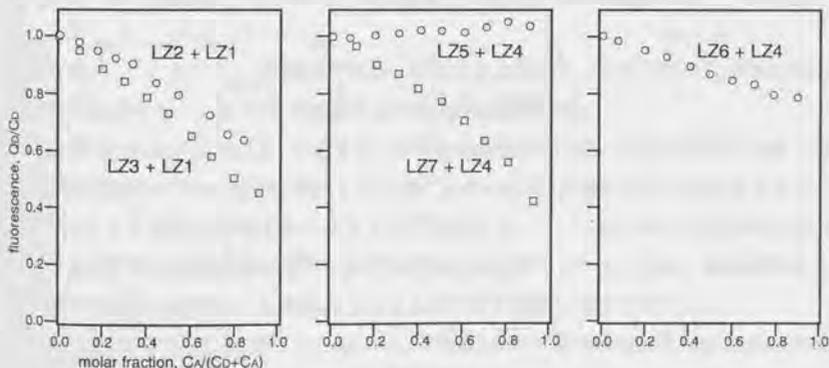


図11.9 ドナーアクセプター間の蛍光エネルギー移動
(LZ2+LZ1等はドナーアクセプターのパアを示す)

peptide		R ₀ nm	エネルギー移動効率			分率 f(1.0nm)	分率(paralel) f(p)
donor	acceptor		E(obsd)	E(1.0nm)	E(3.5nm)		
LZ2	LZ1	2.10	0.47	0.988	0.045	0.45	0.45 ± 0.02
LZ3	LZ1	2.19	0.60	0.991	0.057	0.58	0.42 ± 0.02
LZ5	LZ4	2.19	0.00	0.991	0.057	-0.06	1.06 ± 0.03
LZ7	LZ4	2.26	0.71	0.993	0.068	0.69	0.69 ± 0.02
LZ6	LZ4	2.20	0.21	0.991	0.058	0.16	0.16 ± 0.03
LZ10	LZ9	2.57	0.51	0.997	0.136	0.43	0.43 ± 0.04
LZ10	LZ8	2.61	0.69	0.997	0.147	0.64	0.36 ± 0.03
LZ15	LZ14	2.64	0.37	0.997	0.156	0.25	0.25 ± 0.06
LZ15	LZ13	2.55	0.82	0.996	0.130	0.80	0.20 ± 0.02

表 11.1 蛍光エネルギー移動の実測パラメータ

クセプター間距離 R とは

$$(R/R_0)^6 = (1/E) - 1 \quad (\text{eq.11.10})$$

で関係づけられる。4位と27位の分子間での残基間距離は一般的な α -ヘリックスの構造データをもとに、分子モデリングにより近接した場合には約1.0nm、遠位にある場合には約3.5nmと見積もられる。Rがこれらの値をとる時の計算上のEは、(eq.11.10)により表11.1に示すように $E_{1.0nm} = 0.98 \sim 1.00$ 、 $E_{3.5nm} = 0.04 \sim 0.16$ となる。ドナーとアクセプターの基が近接した配置になるようなコイルドコイルの存在分率を $f_{1.0nm}$ とすると、

$$E_{\text{obsd}} = E_{1.0nm} f_{1.0nm} + E_{3.5nm} (1 - f_{1.0nm}) \quad (\text{eq.11.11})$$

が成り立ち、ここから $f_{1.0nm}$ が算出できる。さらにこの値からコイルドコイルの平行型の存在分率を求めると、表11.1の右欄のような結果が得られた。

LZ2+LZ1 および LZ3+LZ1 の系では、平行型の存在率は45%、42%と両者ではほぼ一致し、逆平行型がわずかに過剰に存在していることがわかる。序論において(vii)項で述べたようにペプチド結合に由来するヘリックスの双極子モーメントはN端→C端の向きに存在し、双極子間の相互作用は逆平行型のを安定化すると考えられる。実験結果からは、逆平行の安定化はいくらか認められるもののその程度はあまり高くない。

[Asn²¹]置換体である LZ5+LZ4 および LZ7+LZ4 の系では平行型存在率は100%、69%と非常に高い値であった。このことは図11.10の模式図に示すように、Asn²¹がちょうど向き合った位置になる時に安定化していることを示す。Asn²¹は分子の中心よりややC端に偏って位置しているため、逆平行型ではAsn²¹とLeu¹⁰が向き合ったペアが2組できる

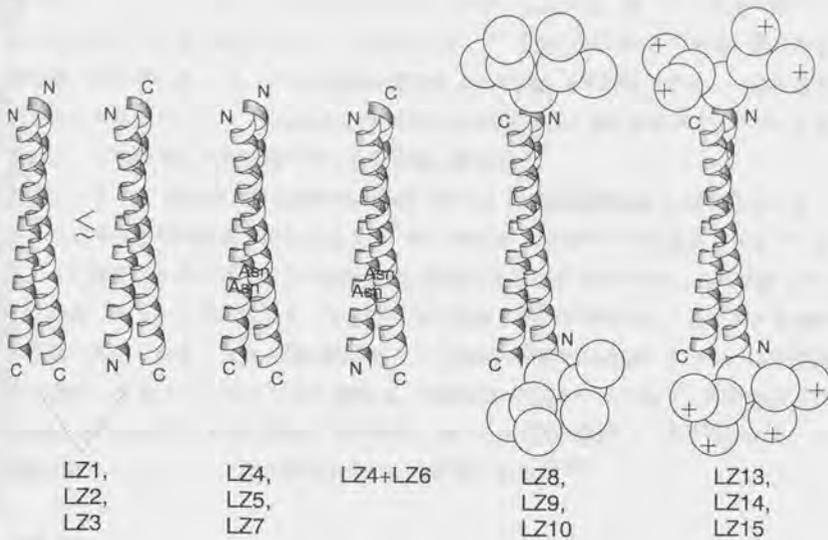


図 11.10 各コイルドコイルの優れたヘリックス間配向の模式図
(N,CはN端,C端を、また球形はN末端部分の分岐したアミノ酸残基群を示す。)

結果、安定化に寄与するコア位置の疎水性残基のペアが減少して、逆平行型が不安定化したと考えられる。換言すればコア領域の疎水性パターンによって、ヘリックス間の配向が相補的に決定されたといえる。このことを利用すれば、同一アミノ酸配列では平行型しかできないが、LZ6+LZ4の系のように異なるアミノ酸配列、すなわち[Asn²¹]体と[Asn¹⁰]体のような設計をすることで逆平行型を優先的に形成することが可能である。実際、LZ6+LZ4の系は逆平行型が84%と高率で、疎水性パターンによる構造形成が有効であることが示された。

次に、かさ高い末端基の効果として、デンドリマー型の末端基(図 11.3 参照)を有するペプチドについて検討した。LZ10+LZ9, LZ10+LZ8の系では、逆平行型が57%, 64%と、前述のLZ1~LZ3の系よりわずかに過剰にすぎなかった。すなわち、かさ高い末端基はごく弱い反発の効果しか示さず、おそらくこの末端基は水中で立体障害を生じない向きに広がることができるためであると理解できる。一方、LZ13~LZ15では、N端の4個のAsp(側鎖は-CH₂COOH)をLeu(側鎖は-CH₂CH(CH₃)₂)に置換した構造を持っているが、蛍光エネルギー移動の測定から、LZ15+LZ14, LZ15+LZ13の系で、逆平行

型含量は75%, 80%であった。LZ8~LZ10とLZ13~LZ15は、同じかさ高さを持っているが、電荷は前者では4(+)-4(-)であるのに対して、後者は4(+のみ)である。後者の逆平行型の存在率の高さは、プラス電荷の反発によるものとして理解できる。一般に静電的な相互作用エネルギーはCoulombの法則によれば距離の1次に反比例するので、この系のように数残基の長さを隔てていても有効に働き得る。

以上のように、疎水性コアにおける疎水性パターンの相補的安定化と、デンドリティックな末端基の静電的相互作用とによって、それぞれ α -ヘリックスの2量体であるコイルドコイル構造の配向を平行あるいは逆平行に制御することが可能であることを実証した。二次構造ユニットを集合させて、さらに高次の構造を構築するために、このような設計が有効に利用できる。また、疎水性パターンの相補的安定化の方法のような、立体構造を一義的に決定させるための分子設計は、両親媒性の効果のみに基づく構造形成では molten-globule 性の多安定構造になりやすいという欠点を克服して、より天然のタンパク質に近い人工タンパク質を創出するのにも重要である^{25,26)}。

引用文献

1. W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, *Science*, 240, 1759-1764 (1988)
2. E. K. O'Shea, R. Rutkowski, P. S. Kim, *Science*, 243, 538-542 (1989)
3. E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, T. Alber, *Science*, 254, 539-544 (1991)
4. E. K. O'Shea, R. Rutkowski, W. F. Stafford III, P. S. Kim, *Science*, 245, 646 (1989)
5. F. Kozielski, S. Sack, A. Marx, M. Thormahlen, E. Schonbrunn, V. Biou, A. Thompson, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Cell*, 91, 985-994 (1997)
6. R. S. Hodges, A. K. Saund, P. C. S. Chong, S. A. St-Pierre, R. E. Reid, *J. Biol. Chem.*, 256, 1214-1224 (1981)
7. N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J. Mol. Biol.*, 237, 500-512 (1994)
8. W. D. Kohn, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Protein Sci.*, 4, 237-250 (1995)
9. M. Munson, S. Balasubramanian, K. G. Fleming, A. D. Nagi, R. O'Brien, J. M. Sturtevant, L. Regan, *Protein Sci.*, 5, 1584-1593 (1996)
10. B.-Y. Zhu, N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *Protein Sci.*, 2, 383-394 (1993)
11. T. M. Handel, S. A. Williams, W. F. DeGrado, *Science*, 261, 879-885 (1993)
12. 木村俊作, 化学と工業, 44, 72-75 (1991)
13. K. R. Shoemaker, P. S. Kim, E. J. York, J. M. Stewart, R. L. Baldwin, *Nature*, 326, 563-567 (1987)
14. E. K. O'Shea, R. Rutkowski, P. S. Kim, *Cell*, 68, 699-708 (1992)
15. C. Muhle-Goll, M. Nilges, A. Pastore, *Biochemistry*, 34, 13554-13564 (1995)
16. L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 819-846 (1978)
17. G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 35, 161-214 (1990)
18. M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.*, 47, 1962-1965 (1982)

19. A. Hassner, L. R. Krepski, V. Alexanian, *Tetrahedron*, 34, 2069-2076 (1978)
20. 奈良安規, 辻村克良, *分析化学*, 22, 451 (1973)
21. 松本博, 国則登代, SH基の定量法, 学会出版センター(1978)
22. M. Machida, N. Ushijima, M. I. Machida, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 1385-1386 (1975)
23. T. Förster, *Ann. Phys. (Leipzig)*, 6(2), 55-75 (1948)
24. D. F. Eaton, *Pure Appl. Chem.*, 60, 1107-1114 (1988)
25. H. Morii, M. Ishimura, S. Honda, H. Uedaira, *Protein Engineering*, 8, 971 (1995)
26. H. Morii, M. Ishimura, S. Honda, H. Uedaira, to be submitted

第5編

新規機能を持つ人工タンパク質の合成

第12章 金属イオン結合部を有する人工膜タンパク質

12.1 序論

タンパク質のあるものは膜タンパク質として生体膜上あるいは膜中に特定の配向や集合状態で存在している¹⁻¹¹⁾。膜結合性タンパク質の多くは疎水性の膜とその内外の水相の存在する環境ではじめて機能を発揮する。膜の存在は、ひとつはタンパク質の配置・配向という点で重要であり、複数のタンパク質が集まって酵素系を形成したり、レセプターのドメインあるいはサブユニットが特定の場所に配置されるなど、構造形成面で不可欠な要素である。もう一点は、膜を介しての情報伝達やイオン・低分子物質の輸送およびそれらに共役する代謝などの酵素反応等に見られるように、膜は方向性のある機能を発現する場として重要である。さらに、膜融合¹²⁾のようなペプチドと脂質膜のダイナミックな関わりも重要な機能である。

このような膜タンパク質をモデルにした人工的な高次構造体の設計にあたっては、水溶性のペプチド・タンパク質の設計と同様に天然の膜タンパク質に関する構造データが有用である。膜結合性部位の構造としては α -ヘリックス構造がよく見いだされており、それらの多くは膜貫通ヘリックスであることが知られている¹⁻⁴⁾。この部分は疎水性パラメータをもとにしたhydrophathyの解析¹³⁾によって天然タンパク質から構造抽出することができる。すでにこうして人工的に設計したペプチドが膜貫通ヘリックスとなり、イオンチャネルとなることが報告されている¹⁴⁻¹⁸⁾。またmelittinやalamethicinなどのペプチドが膜中で集合してチャネル形成することも知られている¹⁹⁻²²⁾。

ここでは、チャネル分子の機能にそれを制御する機能を付与した人工膜タンパク質の創出を試みた。このような特定の分子種の有無によってイオンなどの膜透過をON/OFFする膜タンパク質は、リガンド作動性チャネルと呼ばれている²⁾。この人工膜タンパク質には、(i) 生体膜や脂質膜に結合する、(ii) 制御因子となるリガンド分子を結合できる、(iii) リガンド分子との結合によって構造変化が起きて膜透過性が変化する、の基本的な各機能を同時に実現する必要がある。ここで設計したペプチドは36アミノ酸残基から成り、うち約20残基は疎水性の高いアミノ酸を配置して脂質膜との結合性を持たせ、残りの12残基はカルシウムイオンの受容体となるような親水性の配列にした。1本のヘリックスが孤立して膜貫通体として存在する例は少なく、たいていは集合体として存在する。ここで設計したペプチドも集合体となるようにヘリックス部分に両親媒性構造を持たせた。本章においては、膜タンパク質の設計と、設計通りの構造や機能が実現したかについて検討し議論した。

12.2 実験：合成とリポソーム膜上での機能

ペプチド設計

膜貫通ヘリックスを設計するために、天然の膜タンパク質のアミノ酸配列についてまず解析を行なった。bacteriorhodopsin等のタンパク質の膜貫通ヘリックス^{6,8,15}合計38本の一次構造をデータベースとして解析した結果を図12.1に示した。ヘリックスの鎖長については20~25残基程度に分布しており、長さで3.0~3.8nmと脂質膜の疎水性領域の厚さと同程度あるいはやや長めである。このことはヘリックスのバンドル化とも関係していると思われる。1本のヘリックスに含まれる疎水性アミノ酸

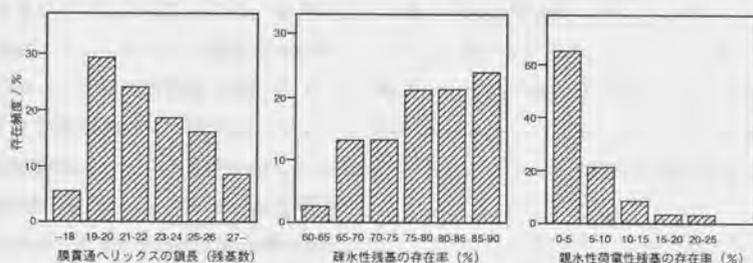


図12.1 膜貫通ヘリックスの特徴

(WFILMVYCPATH)

の割合は65~90%にやや幅広く分布し、機能に応じたヘリックスの個性が存在することをうかがわせる。解離性

親水性アミノ酸 (E,D,K,R) は含量が低く、たいていはヘリックス1本中に0~2個しか含まれていない。また、i残基離れた2個のアミノ酸ペアの種類の分布を見たのが表12.1である。非解離性親水性アミノ酸 (G,S,Q,N) については配置の特異性はあまり見られないが、一組の解離性親水性アミノ酸は (0,3) あるいは (0,4) 位置にやや特異的に存在する。むしろこれら親水性アミノ酸はヘリックス-ヘリックス間で相互作用

pair	random	(0, 1)	(0, 2)	(0, 3)	(0, 4)
group-a ~ group-a,b,c	0.960	0.966	0.966	0.957	0.956
group-b ~ group-b	0.021	0.016	0.025	0.017	0.026
group-b ~ group-c	0.014	0.016	0.009	0.017	0.012
group-c ~ group-c	0.002	0.001	0.000	0.010	0.006

表12.1 膜貫通ヘリックスにおける極性残基の周期性

疎水性	出現頻度 %	親水性 無電荷	出現頻度 %	親水性 荷電性	出現頻度 %
W	2.3	G	6.7	E	1.2
F	12.0	S	5.7	D	0.6
I	11.0	Q	0.6	K	1.5
L	16.3	N	1.8	R	1.7
M	3.9				
V	11.4				
Y	3.5				
C	2.4				
P	2.4				
A	9.2				
T	5.8				
H	0.1				

表12.2 各アミノ酸の出現頻度

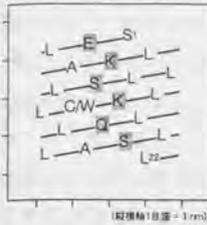


図12.2 ヘリックス部分の
アミノ酸配列

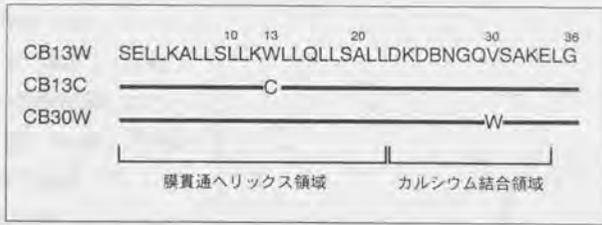


図12.3 合成した人工膜タンパク質の一次構造

用しあっていると考えられる。個々のアミノ酸の出現頻度は表12.2に示した。

次に、ヘリックスの二次構造の特徴について、一般に行われているように $\langle H_v \rangle$ (疎水性パラメータ値の残基数平均) と $\langle \mu_H \rangle$ (軸方向から見た時の疎水性モーメントの大きさ) を計算した^{23,24)}。膜貫通ヘリックスは均一ではなく、ヘリックスによってある程度の両親媒性ヘリックス構造を有している。このことはヘリックス同士の配向やチャンネル孔形成に役だっていることと推測される。

このようなデータベースから得られる情報をもとに、人工の膜貫通ヘリックスとして、SELLKALLSLLKLL-QLLSALL という配列を使用することにした。この特徴は、配列を単純にするために疎水性アミノ酸としてはLと若干のAを用い、K,S,Qの親水性アミノ酸を両親媒性ヘリックス構造を形成するように配置した点である(図12.2)。ペプチド分子全体は、phospholambanやalamethicinなどのような外部刺激に応じて構造変化¹⁷⁾して、脂質膜上でチャンネルなどの機能を発現するものとして設計した。ここでは、 Ca^{2+} の受容部となるカルシウム結合ループを膜貫通ヘリックスのC端側に接続したペプチドを設計した(図12.3)。カルシウム結合ループは

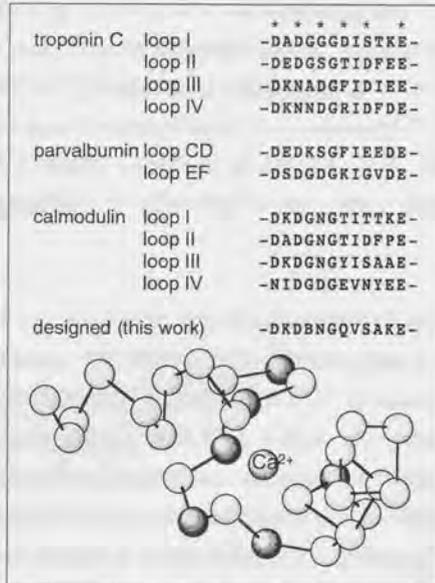


図12.4 カルシウム結合ループのアミノ酸配列
(上欄の*と下図の濃い色の球は配位性の残基を示す)

calmodulin等のアミノ酸配列のホモロジー(図12.4)を参考²⁵⁾に任意に決定した。分子全体のhydrophathy¹³⁾の特徴を図12.5にプロットした。また、13位と30位には構造形成をモニターするために蛍光プローブとしてTrpあるいはN-acridinyl maleimide (NAM)でラベルしたCysを置いた。

ペプチド合成

3種類のペプチド、CB13W、CB13C、CB30Wの合成はBoc法による固相合成法

によって行った。合成操作は手動法と自動合成機ABI-430Aの両方によった。合成用の樹脂はhydroxymethylphenylacetyl化したPST-DVBを使用し、C端のアミノ酸をN,N-dimethyl amino pyridine - diisopropyl carbodiimide (DMAP-DIC)法²⁶⁾で導入後、benzoic anhydrideで未反応基をcappingし、以降の伸長反応はDMFあるいはNMP溶媒中でBOP(あるいはHBTU)-HOBt-DIEA法で行った。アミノ酸の側鎖保護基は、Ser(Bzl)、Glu(OBzl)、Lys(CIz)、Trp(HCO)、Asp(OBzl)、Cys(Dmb)を用いた。合成の途中段階ではペプチド鎖の溶解性向上のためにDMF-KSCN(5%)による洗浄過程を組み入れた。最終脱保護はtrifluoromethanesulfonic acid (TFMSA)を使用するlow-high法²⁷⁾により行い、diethyl ether沈殿後、RP-HPLCで精製(ペプチドの疎水性が高いため、溶出液のacetonitrile含量は約85%)し、凍結乾燥によりペプチド粉末を得た。同定と濃度決定はアミノ酸分析によった。

分光測定

蛍光スペクトルおよび円偏光二色性スペクトル(CD)は、それぞれJasco-FP777およびJasco-J600を使用して測定した。測定温度は、脂質DMPCのゲル液晶転移温度が23°Cであるため、これより高い30°Cですべての測定を行った。緩衝溶液としては30mMのHEPES-NaOH(pH 8.0)を用いた。CD測定は、50%TFE水溶液、27 mMのoctylglucoside (OG)ミセル溶液、230 μ Mのdimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC)リポソーム溶液を用いた。蛍光測定には0.4 mM程度のDMPCリポソーム溶液²⁸⁾、17mMのsodium dodecylsulfate (SDS)ミセル溶液を使用した。リポソームはDMPC粉末をchloroformに溶解後、容器壁面に薄膜化乾固させ、水を少量加えつつ攪拌させて分散させた後、この液を35°Cにおいてextruderにかけて、粒径の揃ったsmall unilamellar vesicle (SUV)分散液(約8.6mM)を得て、使用時に適当な濃度に希釈し

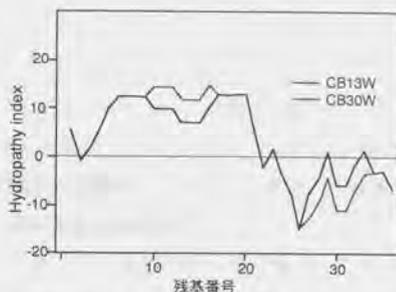


図12.5 合成ペプチドのhydrophathyプロット

た。CDによる昇温測定は、15 μ MのCB30Wと300 μ MのDMPCリボソームの系で、pH7.0にて0.75K/minの昇温速度で行った。

CB30WおよびCB13WのTrpの蛍光スペクトルは、280nmで励起して測定した。また、消光実験には消光剤としてacrylamideを用いた。ここでCB30Wは、固体、octylglucoside可溶化液、DMSO溶液、の3種類の状態から、DMPCリボソーム溶液に添加して膜上に構成した。固体からの場合は添加後超音波処理を行った。

蛍光エネルギー移動の実験は、CB13WとCB13Cを各種のモル比で混合してから、DMPCリボソーム上に構成した。ペプチド濃度は3.8 μ M、DMPC濃度は1.9mMで、280nmで励起して蛍光スペクトルを測定した。これらの濃度は、ペプチドが脂質膜中で十分に希釈された状態である。

Tb³⁺の蛍光²⁹⁾は、ペプチド濃度は14 μ M、DMPC濃度は0.4mM、Tb³⁺の濃度0~92 μ Mで測定した。2倍波長の散乱光の妨害を避けるために励起波長は285nmに設定した。金属イオン滴定実験には、Ca²⁺およびTb³⁺の酢酸塩をbuffer溶液に溶かして用いた。

膜電位プローブ³⁰⁾を用いた蛍光測定は、グルコン酸カリウム(200mM)、多価金属イオン(Tb³⁺(0.4mM)あるいはCa²⁺(2mM))を含む溶液中で、CB30Wを担持したDMPCリボソーム溶液を調製し、この溶液200 μ lを、グルコン酸ナトリウム(198mM)、グルコン酸カリウム(2mM)、多価金属イオン(上記濃度)、3,3'-dipentylloxadycarbocyanine iodide (DiOC₂(5)) (1 μ g/ μ lのDMSO溶液1 μ l)を含む溶液2500 μ lに高速添加し、0.1sec毎の蛍光強度変化をモニターした。カリウムイオンに替えてTris⁺を用いた実験も行った。蛍光は575nmで励起し、600nmの発光を観測した。

時間分解蛍光の測定はHamamatsu-C4334.01/C5094システムを使用し、光源にはN₂レーザー(337.1nm)を用いた。

12.3 結果と考察：リボソーム膜上の構造形成と金属イオンの結合

人工膜タンパク質の構造と配向

合成したペプチドCBは疎水性アミノ酸含量が高く、水には難溶性である。むしろリボソームや界面活性剤、両親媒性ペプチドPA4w(第4章参照)、有機溶媒などの存在によって可溶化できる。CDスペクトルを測定すると、図12.6のように、octylglucosideのミセル溶液、DMPCリボソーム溶液、50%TFE水溶液とも、 α -ヘリックスに富む構造であることを示した。CB13Wはその固体からも、またoctylglucosideに可溶化させた溶液からも、DMPCリボソームに対して可溶化させることができた。 $[\theta]_{222\text{nm}}$ より見積

もと、リポソーム系で他よりわずかに強度が小さいものの約20残基相当のヘリックスが形成されていることが示される。これは膜貫通ヘリックスとして設計した部分の長さに相当する。

次に、ヘリックス性の高いCBについて脂質膜中での存在状態を調べるために、ペプチドの13位にTrpを含むCB13Wと30位にTrpを含むCB30Wの蛍光スペクトルを比較した(図12.7)。SDS存在下およびDMPCリポソーム存在下ともCB13Wの方がより強い蛍光を示す。これは一次構造上13位周辺に

は疎水性残基が多いことにもよるが、極大蛍光波長がDMPC存在下のCB13Wで特に短波長シフトしていることから、13位付近は脂質膜の疎水性領域に存在して運動性の束縛を受けていると考えられる。後で述べるようにペプチドCBは設計通りに金属イオン結合能があることから、C端側ループ部はヘリックス構造をとらず、N端側約20残基がヘリックスでかつ膜の疎水性領域に存在すると推定される。

ペプチドCBのカルシウム結合ループは親水性であるため、膜表面の極性部あるいは水

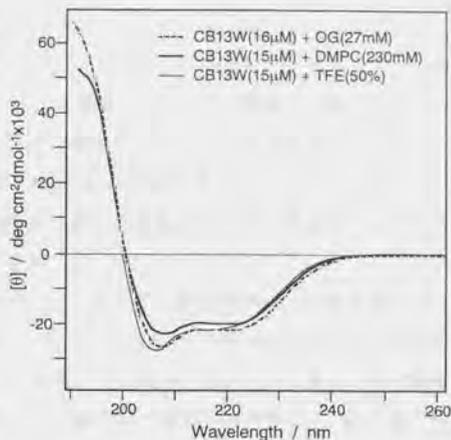


図12.6 各種媒体中でのCDスペクトル

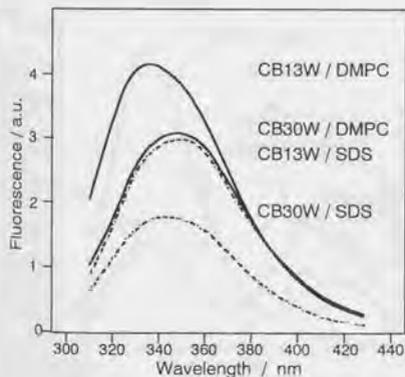


図12.7 リポソームおよびミセル系でのTrp残基の蛍光スペクトル

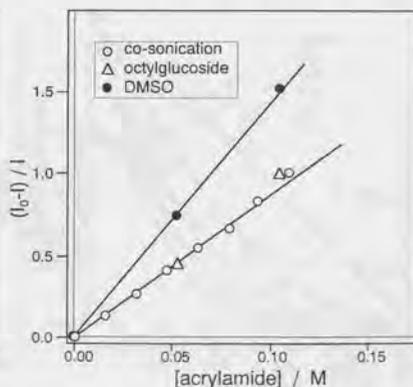


図12.8 異なる方法で調製したCB30W/リポソーム系の消光Stern-Volmerプロット

相中にあると予想されるが、リボソームの内・外のどちらの面に存在するかを調べるために、蛍光消光実験を行なった。ループ部分にWを含むCB30Wをリボソームの膜に担持させ、外部水相に消光剤としてacrylamideを添加していった。超音波処理によってペプチドを担持させる方法に比べ、微量のDMSO溶液をリボソーム液に添加インキュベートする方法で作成した試料でよりよくtryptophanの蛍光が消光された(図12.8)。このことは超音波法ではループ部の向きは内外ランダムになるが、DMSO展開法ではある程度ループ部を外側に配向制御できることを示している。

ペプチドCBの集合状態については、蛍光励起エネルギー移動を利用した解析を行なった。13位にWを有するCB13Wと、同じく13位のCysをN-acridinylmaleimide (NAM)でラベルしたCB13Cを用い、両者の混合比を変えてTrpからacridinyl基への蛍光励起エネルギー移動を測定した(図12.9)。donorの蛍光量子収率の相対値 Z_0 は第11章で述べたように、集合数 N と

$$Z_0 = 1 - E + E(1 - X_A)^{N-1} \quad (\text{eq.12.1})$$

の関係がある³¹⁾。ここで X_A はacceptorのモル分率、 E はエネルギー移動効率を示す。Förster型の励起エネルギー移動³²⁾では、エネルギー移動効率が50%となる距離 R_0 は、Försterの式:

$$R_0 = (\kappa^2 \beta n^{-4} \phi_D J)^{\frac{1}{6}} \quad (\text{eq.12.2})$$

で計算でき、第11章と同様の仮定を用いて、この系では R_0 は2.5nmと算出される。ペ

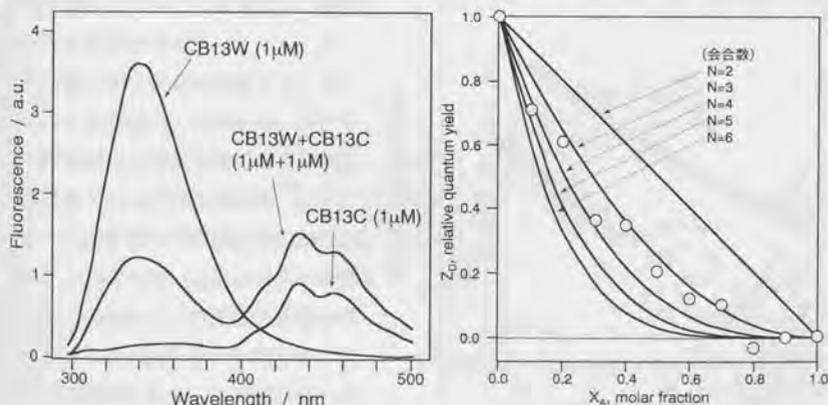


図12.9 リボソーム上でのドナー-アクセプター系の蛍光スペクトル(左図)とCB13Wの相対蛍光強度のモル分率依存性(右図、実線は各集合数の理論曲線、白丸は実測値を示す)

プチドCBがヘリックスバンドルを形成していると仮定した時の隣接するペプチドの蛍光性の残基間の距離約1~1.5nmではEは95~100%と計算され、すなわち、集合体のサイズが R_0 の値とあまりかけ離れない範囲においては、集合体内にacceptorが存在すれば大部分の蛍光が消光されることを意味する。またこのように、あまり大きくない集合体においてはエネルギー移動効率Eは共通の値として扱うことができ、上記の(eq.12.1)式を適用できる。実

測値のプロット(図12.9右)と対応させると、分子集合数Nは3~4と求まる。また逆にこのプロットは、E=100%の仮定が妥当であること、すなわち実験結果はヘリックスバンドルの形成と矛盾しないことを示している。先の結果と合わせて、ペプチドCBは脂質膜中でtrimerあるいはtetramerのヘリックスバンドルを形成していると考えられる。したがって、CBは人工膜タンパク質と呼ぶことができる。

構造安定性に関しては、CDスペクトルでヘリックス性をモニターしつつ昇温実験を行った。結果を図12.10に示す。DMPCリボソームのゲル液晶転移温度(T_c)は23°Cであるが、CBのヘリックス含量はこの温度付近では影響を受けず、約70°Cにおいて協同性の高い熱転移を起こし、ランダムコイル構造へと転移した。おそらくこの協同性は脂質中での会合体形成に関係していると考えられる。

さらに脂質膜中での運動性を調べるために、CB13Cのacridinyl基の時間分解蛍光を測定し、蛍光異方性減衰の解析を行った(式については第10章参照)。異方性項($I_{VV} - I_{VH}$)はかなりの長い時定数を有し、脂質膜中での運動が制限を受けていることを示している

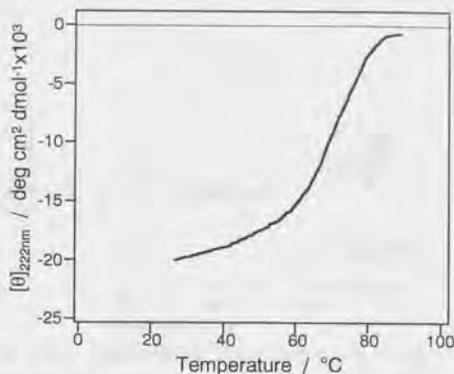


図12.10 DMPCリボソームに担持したCB30Wのヘリックス含量の熱転移曲線

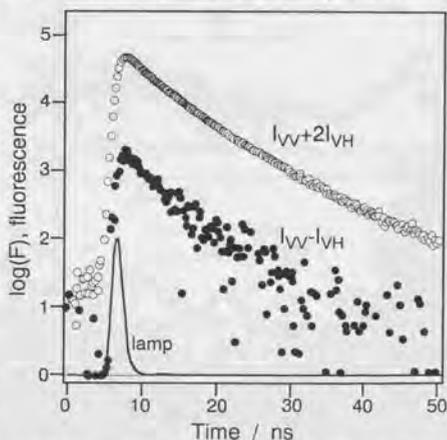


図12.11 CB13Cのacridinyl基の時間分解蛍光スペクトル(ランプ波形は非log軸)

(図12.11)。さらにKinoshitaの方法³³⁾で円錐内揺動運動のゆらぎ角を見積ると、図12.12のようにacridinyl基のゆらぎ角は T_c の前後であまり変化せず小さい値にとどまっている。異なる蛍光プローブであるdiphenyl hexatriene (DPH)を用いて、同じDMPCの系で得られている値³⁴⁾を同図にプロットすると、acridinyl基がタンパク質CB13Cによってその運動性が制限

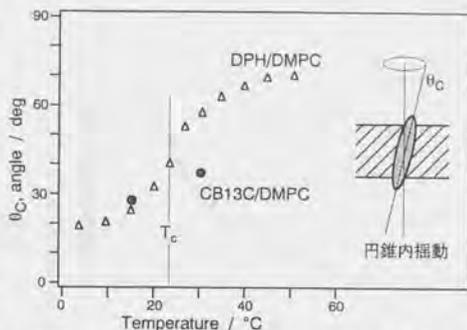


図12.12 DMPC膜中における蛍光性分子の円錐内揺動のゆらぎ角 (○は本研究、△は文献値³⁴⁾)

されていることがわかる。またこのことは逆にCB13Cの脂質膜中での運動性が脂質の転移温度にあまり影響されずに低いことを意味している。

脂質膜上での人工膜タンパク質の機能

この人工膜タンパク質の機能としては、前述したようにイオンチャネル的なものを想定している。一般にイオンチャネルはgateの機構から膜電位作動性とリガンド作動性に大別される²⁾が、いずれもなんらかのきっかけを構造変化につなげているという点で共

通である。この人工膜タンパク質については、カルシウムイオンの結合が構造変化につながるようという設計にした。

多価イオンの結合によるペプチドCBの構造変化はCDスペクトル上では明確には観測されなかった。そこで金属イオンの結合を明確にするために、蛍光性のテルビウム(Tb^{3+})を使用してペプチド中の励起トリプトファンからの蛍光エネルギー移動による Tb^{3+} の発光の観測を行なった。図12.13のように、CB13WとCB30Wを比較すると、CB13Wでは Tb^{3+} の発光はみられないものの、CB30Wでは

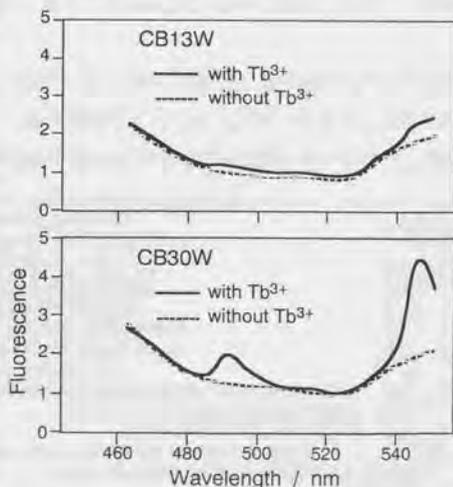


図12.13 ペプチドCBを担持したリボソーム系中の Tb^{3+} の蛍光スペクトル (Trpを励起)

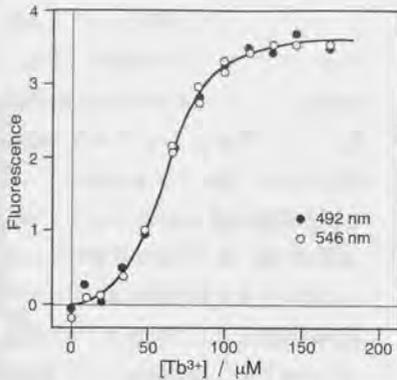


図12.14 CB30WのTrp近傍の Tb^{3+} の蛍光強度(ペプチド-リボソーム系)

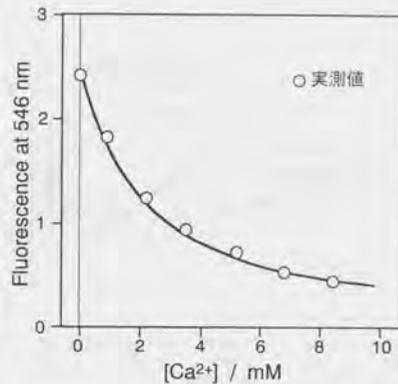


図12.15 リボソーム上のCB30Wに結合した Tb^{3+} の Ca^{2+} による交換(Tb^{3+} 蛍光)

490nm および545nm に Tb^{3+} の蛍光が観測される。このことはCBの30位付近すなわちカルシウム結合ループ部分に Tb^{3+} が結合していることを示している。添加する Tb^{3+} 量を増して蛍光強度変化を測定すると、図12.14のようになる。蛍光強度は単純な1:1錯体の形成ではなくS字型の変化を示す。ひとつの解釈としてはアロステリックな現象である可能性もある。すなわち、集合体を形成したペプチドに Tb^{3+} が結合すると、その近傍のペプチドのループ部分に Tb^{3+} が結合しやすくなるような現象が起きていることが予想される。

次に、カルシウムイオンの結合を調べるために、 Tb^{3+} が結合した状態から Ca^{2+} を添加して蛍光強度の変化を観測した。 Ca^{2+} 量が増加するにつれて Tb^{3+} の蛍光は次第に減少した(図12.15)。この変化から Ca^{2+} の結合定数が求められる。CBについては pK_d 値は約3となり、troponin Cのループとヘリックス部からなるフラグメント³⁵⁾より、いくらか結合性が高い(表12.3)。しかしながら、troponin Cやcalmodulinのより長鎖のものに比較すると、結合能はやや低い。このことはカルシウム結合能を有するペプチドの設計においては、ループ部分の両端の構造も重要

protein or fragment	pK_d (Ca)
calmodulin	5.3
calmodulin, F12 fragment	5.3
calmodulin, F1 fragment	2~3
troponin C, high affinity domain	6.7
troponin C, low affinity domain	4.8
troponin C, fragment	
KSEELAEAFRIFDRNADGYIDAEELAEIFRAGS	5.4
AFRIFDRNADGYIDAEELAEIFRAGS	4.6
DRNADGYIDAEELAEIFRAGS	2.5
CB30W, bound with DMPC liposome (本研究)	
.....LLKLLQLLSALLDKDBNGQWSAKELG	3.3

表12.3 各種ペプチドタンパク質の Ca^{2+} 結合能の比較

であることを意味している。

次に、膜電位プローブ³⁰⁾とされる 3,3'-dipentyloxadicarbocyanine iodide (DiOC₂(5)) を使用して、リポソームの内水相と外水相に与えた化学ポテンシャルの緩和過程を膜電位プローブの蛍光で測定した (図 12.16)。ペプチド CB を膜担持させたリポソームは Ca²⁺ の存在によって緩和過程が変化する。この結果は、Ca²⁺ のペプチドへの結合が脂質膜の状態に影響を与えていることを示唆している。

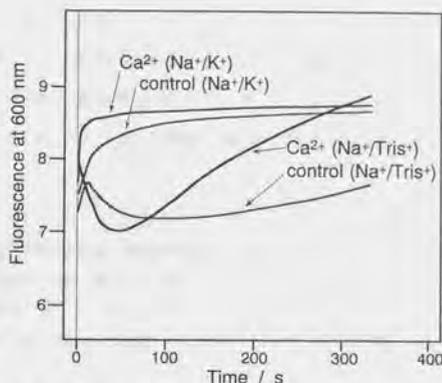


図 12.16 リポソーム膜内外に異なるイオン種を置いた後の DiOC₂(5) の蛍光の時間過程

以上のように、ここでは脂質膜上で機能する人工膜タンパク質を設計合成し、構造的には期待通り、膜貫通ヘリックスとして 3~4 量体の、おそらくバンドル構造の形成を示す結果が得られた。さらに、この人工タンパク質は金属イオン結合部を膜表面の水相に出して、Ca²⁺ や Tb³⁺ を結合する機能を発揮した。推定される構造の模式図を図 12.17

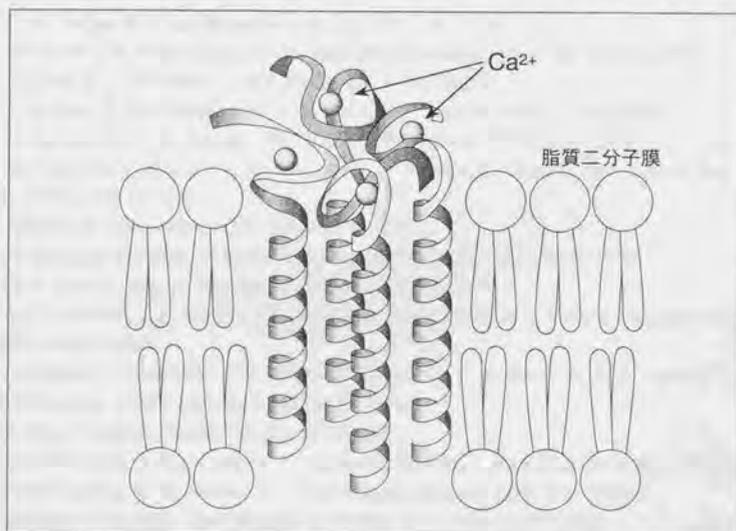


図 12.17 脂質二分子膜上に構成された人工タンパク質 CB の推定構造 (4 分子の配向がそろった場合を図示した)

に掲げた。金属イオン結合部は、必ずしも同一膜面に向いていないが、分子設計において分子端を接続するなどの工夫を加えることで配向をそろえることが可能である。また、金属イオン結合能を高めたり、チャネル透過の選択性を変えたり、など様々な分子設計を加えることで、より高度な機能性人工膜タンパク質が構築できると考えられる³⁶⁾。

引用文献

1. 日本生物物理学会 編, 生体膜の分子素子分子機械, 学会出版センター (1990)
2. 香川靖雄, 生体膜と生体エネルギー, 東京大学出版会 (1985)
3. 日本分析化学会北海道支部 編, 膜と界面, 学会出版センター (1990)
4. ニューバイオフィジックス刊行委員会 / 曾我部正博 編, イオンチャネル, 共立出版 (1997)
5. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *Nature*, 318, 618-624 (1985)
6. M. Noda, S. Shimizu, T. Tanabe, T. Takai, T. Kayano, T. Ikeda, H. Takahashi, H. Nakayama, Y. Kanaoka, N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo, M. A. Raftery, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata, S. Numa, *Nature*, 312, 121-127 (1984)
7. 徳永史生, 岩佐達郎, 生体の科学, 38, 252-260 (1987)
8. D. M. Engelman, R. Henderson, A. D. McLachlan, B. A. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 2023-2027 (1980)
9. J. Finer-Moore, R. M. Stroud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 155-159 (1984)
10. N. Unwin, *J. Mol. Biol.*, 229, 1101-1124 (1993)
11. C. M. Deber, S.-C. Li, *Biopolymers*, 37, 295-318 (1995)
12. M. Murata, K. Nagayama, S. Ohnishi, *Biochemistry*, 26, 4056-4062 (1987)
13. J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157, 105 (1982)
14. J. D. Lear, Z. R. Wasserman, W. F. DeGrado, *Science*, 240, 1177 (1988)
15. M. O. Montal, T. Iwamoto, J. M. Tomich, M. Montal, *FEBS Lett.*, 320, 261 (1993)
16. M. Higuchi, T. Kinoshita, A. Takizawa, Y. Tsujita, K. Okochi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 1916-1920 (1990)
17. 滝澤章, 膜 (*Membrane*), 15, 147-159 (1990)
18. K. Kono, S. Kimura, Y. Imanishi, *Biochemistry*, 29, 3631-3637 (1990)
19. H. Vogel, F. Jahrig, *Biophys. J.*, 50, 573-582 (1986)
20. J. C. Franklin, J. F. Ellena, S. Jayasinghe, L. P. Kelsh, D. S. Cafiso, *Biochemistry*, 33, 4036-4045 (1994)
21. R. Smith, F. Separovic, T. J. Milne, A. Whittaker, F. M. Bennett, B. A. Cornell, A. Makriyannis, *J. Mol. Biol.*, 241, 456-466 (1994)
22. S. Rex, *Biophys. Chem.*, 58, 75-85 (1996)
23. D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall, *J. Mol. Biol.*, 179, 125 (1984)
24. D. Eisenberg, R. M. Weiss, T. C. Terwilliger, *Nature*, 299, 371 (1982)
25. 磯辺俊明, 奥山典生, 蛋白質核酸酵素 (*TNE*), 33, 1955-1968 (1988)
26. M. K. Dhaon, R. K. Olsen, K. Ramasamy, *J. Org. Chem.*, 47, 1962-1965 (1982)
27. J. P. Tam, W. F. Heath, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6442 (1983)

28. 野島, 砂本, 井上, リボソーム, 南江堂 (1988)
29. I. D. Clark, J. P. MacManus, D. Banville, A. G. Szabo, *Anal. Biochem.*, 210, 1 (1993)
30. D. McKinley, G. Meissner, *J. Membrane Biol.*, 44, 159 (1978)
31. W. Veatch, L. Stryer, *J. Mol. Biol.*, 113, 89-102 (1977)
32. T. Förster, *Modern Quantum Chemistry*, Academic Press, New York (1965)
33. K. Kinoshita, Jr., S. Kawato, A. Ikegami, *Biophys. J.*, 20, 289-305 (1977)
34. K. Kinoshita, Jr., A. Ikegami, *Biochim. Biophys. Acta*, 769, 523 (1984)
35. R. E. Reid, D. M. Clare, R. S. Hodges, *J. Biol. Chem.*, 255, 3642 (1980)
36. H. Morii, S. Honda, H. Uedaira, *Pept. Chem.*, 1993, 413-416 (1994)

第13章 ポルフィリン結合部位を持つ人工ヘムタンパク質

13.1 序論

天然のタンパク質のうち、光や電子に関係する機能を有するものには、ヘム、クロロフィル、キノン、レチナール、NADHなどの機能性原子団が構成成分として含まれている¹⁾。言うまでもなく、これらの原子団は機能のために重要であるが、構造形成においても重要な要素である。すなわち、タンパク質はこれらの原子団の存在によって、安定性と特異的な立体構造を獲得している¹⁻³⁾。例えば、代表的なヘムタンパク質であるcytochrome b_{562} においては、ヘムを持つholo体に比べて、持たないapo体で明らかに、熱的安定性と、熱転移のエンタルピーが低下している^{4,5)}。このことは、タンパク質という高次構造体を設計する際に、機能性原子団の構造的特徴、とりわけ熱力学的な特性を考慮する必要があることを意味している。しかしながら現状では、設計に利用できる程度には理解が至っていない。従って、逆に試行錯誤を経て、機能性原子団を構造部品として用いる際の know-how を蓄積することが現在の課題である。

ヘムタンパク質は、構造的にはポルフィリンが共有結合でタンパク質と直接つながっているものと、直接結合していないものに大別できる。また機能的には、catalaseなどの酸化還元酵素、cytochrome *b*, *c* などの電子伝達タンパク質、hemoglobinやmyoglobinなどの酸素運搬タンパク質に分類できる。またporphyrin骨格の周辺基の多様性もある。化学的には中心金属の種類と軸配位子の種類と距離が機能に大きく影響する^{6,7)}。このようなさまざまな構造と機能の特徴は、ヘムタンパク質を人工的に設計することでその可能性をさらに拡大できると考えられる。本研究ではまず、ヘムを取り囲む枠組みとなるタンパク部分の設計を中心に、いかにして安定かつ特異的なヘムの保持を実現するかを検討した。

天然の例をみると、cytochrome c_3 はわずか100残基程度のタンパク質中に4個のヘムを含有しており⁸⁾、これらのヘムはそれぞれ異なる酸化還元ポテンシャルを有している。cytochrome c_3 は含有しているヘムの密度からは興味深いタンパク質であるが、タンパク質部分に明確な二次構造がなく、これをモデルにした設計は困難である。一方、cytochrome b_{562} は4ヘリックスバンドルの骨格を持ち、ヘムはそのうち2本のヘリックスに挟まれる形で存在する⁹⁻¹¹⁾。cytochrome b_{562} のヘムに対する配位子はMetとHisで、結晶構造からはこのHisは両親媒性ヘリックスのコアであるaあるいはd位置ではなく、隣接するe位置に存在する。またヘム自身も半分くらいは溶媒中に露出している。この場合のヘムはprotoporphyrin IXで、2つのカルボキシル基が存在することが、ヘム

の露出に関係しているとも考えられる。しかしながらこの露出に機能的な意味があるのか、また溶媒からタンパク質がヘムを獲得するのに、分子内部に埋もれた配位性残基では不可能なのか、などについてはよくわかっていない。すでにいくつかの porphyrin 系化合物を含有するタンパク質が設計されている¹²⁻¹⁸⁾。ひとつは porphyrin の官能基にペプチド鎖を2あるいは4本連結した設計で、Sasaki らや、Mihara らによる報告がある。別の種類としてはヘリックスバンドル構造で His 残基によってヘムを配位結合するものが報告されている。ここでの人工タンパク質の設計では、タンパク質骨格として4-ヘリックスバンドルを用い、His 残基を配位子として、どのような位置に配置すれば有効にヘムを結合しうるかに焦点をあてて検討した。また、比較的小さなタンパク質に対して複数のヘムを導入することが可能かどうかを検討した。

13.2 実験：合成と結合実験

ヘムタンパク質の設計

人工ヘムタンパク質（シリーズ名：MF）は両親媒性ヘリックス4本からなるタンパク質として設計した。MF3とMF4はターン構造性の数残基を中間に含む43残基のペプチドをC端付近でシスチン架橋して、4-ヘリックス体とした。ヘリックス部分の基本配列

MF3

GWKKLHDTHKEALKELQKGDNGAQVLDKLEHFKAHQDLGKCK
 GWKKLHDTHKEALKELQKGDNGAQVLDKLEHFKAHQDLGKCK

MF4

GWKKHHDTLKEALKELQKGDNGAQVLDKLEHFKAFQDLGKCK
 GWKKHHDTLKEALKELQKGDNGAQVLDKLEHFKAFQDLGKCK

MF11

AEWKKLHETHNEQLKELQKELKALEKGDNC CQLKKALEKLQKELTKHF⁺EAHKELNKAGKC
 AEWKKLHETHNEQLKELQKELKALEKGDNC CQLKKALEKLQKELTKHF⁺EAHKELNKAGKC

MF16, MF17, MF18の原型 (His置換前)

AcELKQFLEELAKALEELKKALEQLKQGG
 AcELKQFLEELAKALEELKKALEQLKQGG-K
 AcELKQFLEELAKALEELKKALEQLKQGG
 AcELKQFLEELAKALEELKKALEQLKQGG-K-K-W

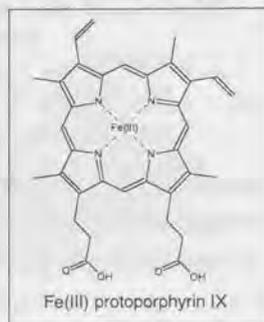


図 13.1 合成した人工ヘムタンパク質の一次構造
 (上図, MF3とMF4のC端はカルボキシル基、その他はアミド基)と用いた protoporphyrin IX の構造
 (右図)

は、第4、第7、第11章と同様に人工的なアミノ酸配列とし、疎水性コアをすべてLeuとした。この基本配列をもとに、a,d位置を各ヘリックスで2箇所Hisに置換したMF3、a,gあるいはd,e位置をやはりヘリックスにつき2カ所Hisに置換したMF4を設計した(図13.1および13.2)。MF11は、各ヘリックス部分の鎖長をより長くしたもので、高分子量となるため、30残基のfragmentをC端とN端でシスチン結合でつないだ後、さらに別のシスチン結合で2量化して120残基のペプチドとした。MF16、MF17、MF18はこれとは対照的に、より簡便な方法での高分子量ペプチドの合成を試みたものである。また、MF16では、a,d位置、MF17ではa,g位置、MF18ではe,g位置と、His残基の場所を変えたものとして設計した(図13.1および図13.3)。

ペプチド合成

ペプチド合成はFmoc法により、Shimadzu-PSSM8合成機を使用して行った。Fmocアミノ酸はWatanabe Chem.製の試薬を用い、Lys(Boc)、His(Trt)、Asp(OtBu)、Thr(tBu)、Glu(OtBu)、Gln(Trt)、Asn(Trt)の各側鎖保護基のものを用いた。また合成用樹脂には、MF3とMF4にはC端カルボキシル基を与えるhydroxymethylphenoxymethyl基を有

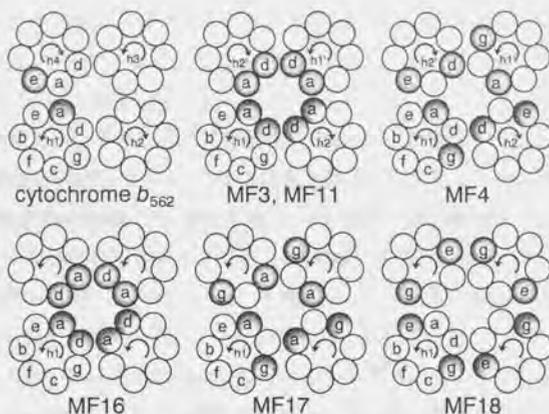


図13.2 各タンパク質のヘリックス部分の車輪表示 (His等の配位性残基のheptad上の位置を灰色で示した)

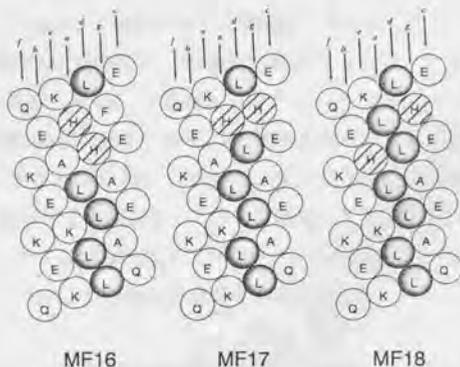


図13.3 各タンパク質のヘリックス部分のhelical-network表示 (疎水性コア残基を灰色で示し、His残基をハッチングで示した。上がN端側)

するPEGグラフトPSt-DVB樹脂、他はC端アミドを与えるTGS-CHA (Shimadzu)を使用した。カップリングはTBTU-HOBT-NMM、脱Fmoc反応は、DBU-piperidineを使用した。cleavageと精製は第11章と同様に行った。

MF3とMF4はそれぞれ43残基ペプチドをHPLC精製後、pH6の5%酢酸アンモニウムbuffer中、20%DMSO水溶液で処理して、フリーのSH基を酸化し、ジスルフィド結合を形成した¹⁹⁾。反応液は5%酢酸水溶液で10倍に希釈し、RP-HPLCの分取用カラムに送液したのち、グラジエント溶出させて目的ペプチド(86残基)を得た。MF11は、SH基フリーのCysをC端に持つA鎖(AEWK...)と、N端はフリーSH基のCysでC端は保護基を持つCys(Acm)を含むB鎖(CQLK...)から合成した。まずA鎖(15 μ mol)の10%酢酸水溶液1m ℓ に、30 μ molの2,2'-dipyridyldisulfide²⁰⁾のDMF(250 μ ℓ)と25mMリン酸ナトリウムbuffer(pH7)溶液(4.5m ℓ)を加え、窒素ガスでバブリングして酸素を除いた。次に、1MのNaOHでpH8に調整し、5時間反応後、酢酸を添加して酸性にし、RP-HPLCで精製した。精製したA鎖とB鎖をそれぞれ0.1Mの酢酸アンモニウムbuffer(pH6.5)に溶かし、窒素ガス下で混合して反応させた。1.5時間後に酢酸を加えて酸性にし、RP-HPLCで精製し、disulfide結合でつながったAB鎖を得た。続いてAB鎖に残るAcm基を、AgBF₄で処理してはずし、diethyletherに沈殿させて回収、上記と同様にして20%DMSOによりdisulfide結合を形成させて、目的物のMF11(120残基)を得た。MF16、MF17、MF18は、C端付近において合成時にFmoc-Lys(Fmoc)-OHを用いることで、分岐構造を形成させ、これを2回用いて、C端でつながった同一アミノ酸配列の4本のヘリックスからなるタンパク質(112残基)とした。

タンパク質の定量は、含まれているTrp残基の吸光度をもとに行った。

分光測定および滴定実験

CDスペクトルはJasco-J600 spectropolarimeterにより20°Cで測定した。UV-VISスペクトルはShimadzu-UV1200を用いて25°Cで測定した。測定溶液には20mMのリン酸ナトリウムbuffer(pH7)を使用した。

ヘムはferric protoporphyrin IX(hemin)(図13.1参照)を3mg正確に計量し、1MのNaOHに溶かしたのち水で20倍に希釈し、これを原液として用いた。heminの濃度は重量から求めた。滴定実験には、hemin原液を20mMのリン酸ナトリウムbuffer(pH7)でさらに100倍に希釈し(hemin濃度、24 μ M)、ここへ0.2mMの人工タンパク質MFの溶液を少量づつheminと同濃度になるまで添加して、UV-VISスペクトルを300~650nmで測定した。タンパク質添加から測定までのincubation時間は3分間とした。

sodium dithionite(Na₂S₂O₄)によるヘムの還元(Fe(III)→Fe(II))は、各20 μ Mの

hemin とタンパク質に対して、1.5mMの $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を使用した。

13.3 結果と考察：ヘム受容部位としての安定なヘリックスバンドル構造

最初に、合成した6種のペプチドについて、その二次構造をCDスペクトルにより検討した。いずれのペプチドも水溶性で、20mMリン酸ナトリウムbuffer中でのスペクトルは、MF16, MF17, MF18については高い α -ヘリックス性のパターンを与えたが、MF3, MF4, MF11は低いヘリックス性しか示さなかった。予備実験において、MF3, MF4に対応するHisを含まない基本配列のペプチドは、ヘリックス性を示し、両親媒性ヘリックスの会合により、おそらくバンドル構造が形成されていると予想されたが、疎水性コアのLeuをHisに置換したことで予想以上にヘリックス形成能が低下したものと考えられる。MF3, MF4でhelicityが低下したため、ヘリックス形成能を向上させるために、ヘリックス部分の周期数を、MF11では5から7に増した。しかしながらコア領域でLeuからHisへの置換を行うと、やはりヘリックス性は減少した。このことは疎水性コアのa,d位置だけでなく、e,g位置にもある程度の疎水性残基が必要であることを示している。そこで、MF16, MF17, MF18ではPheやAlaをe,g位置に用いることで、His置換時にも安定なヘリックスバンドル構造を形成することができた。

一定濃度のheminに対してタンパク質濃度を増加させてUV-VISスペクトルの変化を観測した結果は、図13.4、図13.5のようになった。タンパク質のない場合には、360~380nm

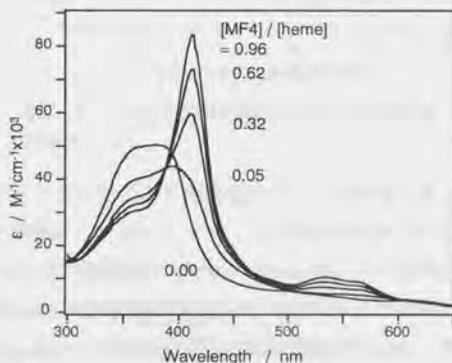


図13.4 MF4-ヘム系の滴定による吸収スペクトル変化

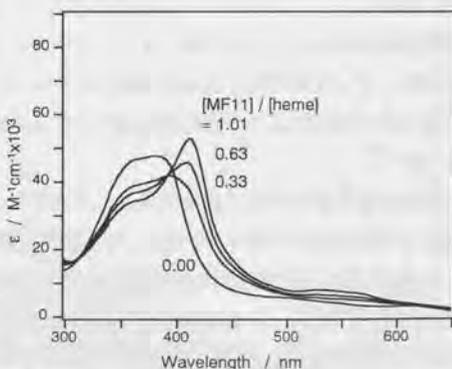


図13.5 MF11-ヘム系の滴定による吸収スペクトル変化

に見かけ上ひとつの幅の広い吸収を持つ。タンパク質の添加とともに、360nmの吸収は減少し、380nmの吸収はシャープな414nmのSoretバンド⁶⁾となって吸収強度が著しく増大する。また535nmと565nm付近には α/β バンドが観測されるようになる。この変化はHisが軸配位したヘムの典型的なスペクトル変化である。タンパク質毎の違いをみると、MF4は、MF3やMF11よりも高いヘム結合能を示した。これは、このタンパク質が高次構造をとっていないので、一次構

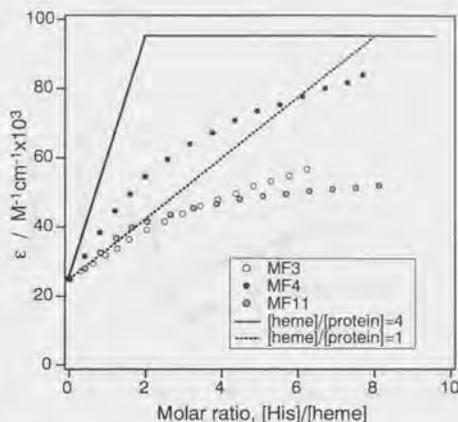


図13.6 Soret帯の吸収強度のタンパク質濃度依存性

造上隣接したHis残基がヘムをサンドイッチ型にはさんで配位結合するのに最適であったためと考えられる。一方、同様にHisが隣接したMF17では、二次構造が形成されるために逆にヘムに対する結合能が低下した。滴定曲線を414nmのSoretバンドの吸光度変化で描くと、図13.6のようになる。タンパク質濃度が低い時、すなわちヘムが過剰に存在するときの吸光度の増加率から、ヘムとタンパク質の結合の化学量論がわかる。すべてのHisがヘムとの結合に関与するとすると、タンパク質中のHisが2個でひとつのヘムを結合できる。従って、結合の強い場合には $[\text{His}]/[\text{heme}]=2$ (言い換えると $[\text{heme}]/[\text{protein}]=4$)で吸光度は飽和値に達する。この折れ線に近いのがMF4で、この場合、すべてのHis残基がヘム結合に関与していると考えられる。MF3では、ヘム結合の化学量論は見かけ上 $[\text{heme}]/[\text{protein}]=1 \sim 2$ で、タンパク質がヘムを1分子結合して、なんらかの構造変化を起こした結果、結合に関与しないHis残基が他のヘムと結合することが困難になったためと考えられる。

長いヘリックス部分を有するMF11の場合は、ヘムの存在しない条件下ではMF3、MF4と同様に、低いヘリックス含量の構造であるが、5倍のモル量のヘムが存在する条件でCDを測定したところ、誘起された α -ヘリックス構造が観測された(図13.7)。このことは、序論で述べたように、ヘムは単なるゲスト分子ではなく、タンパク質とヘムとが協同的にひとつの構造形成を起こしていることを意味している。MF11はMF3、MF4と比べて、ヘリックス部分を長くしたことが構造形成に有効であったといえる。また、図13.6の滴定曲線では、MF11はMF3、MF4よりも急速に飽和値に達している。この時の

漸近線から結合の化学量論は、 $[\text{heme}]/[\text{protein}]=4$ と推定される。しかしながら吸光度の飽和値はcytochrome b_{562} などの 10^5 程度の値には達しておらず、その原因として、ヘリクス構造が形成されたために、ヘムの配位構造に歪みがかかっていることなどが推定される。

ここで得られた滴定曲線は、おそらく4:1, 3:1, 2:1, 1:1のような多様な複合体からなっているため、変化曲線は単純ではない。また、414nmの滴定曲線と360nmあるいは533nmのバンドでの滴定曲線はかならずしも一致せず、このような多状態の平衡系であることを示唆している。

ヘムを配位結合したタンパク質のヘム周辺の環境を調べるために、Soretバンド付近のCDスペクトルを測定した。得られた結果を図13.8に示した。縦軸は測定系中のヘムの全濃度で換算して表した。この系ではタンパク質、ヘムともに濃度は約 $20 \mu\text{M}$ で、His残基濃度からはタンパク質が過剰である。ヘム自身は不斉(chirality)を持たないために、本来はCDスペクトルが観測されないが、タンパク質の存在によって、誘起CDが観測された。MF4存在下では正のCotton効果が観測された。滴定実験ではタンパク質あたり4つのヘムが結合するが、単一のCDバンドを与えたことは励起子相互作用(exciton coupling)がないことを意味している。すなわち、配位したheminは隣接する2つのHis残基に配位していて、それぞれがランダム構造のペプチド鎖で隔てられて比較的離れていることが推定される。ところが、MF3ではDavydov

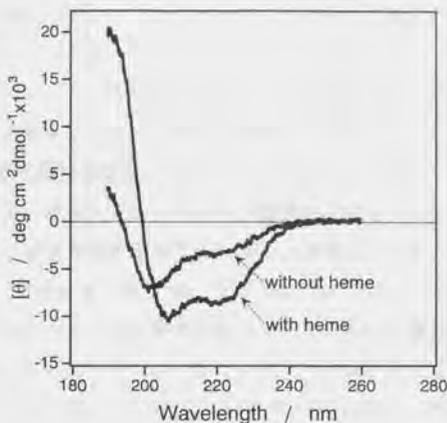


図13.7 タンパク質MF11のCDスペクトル

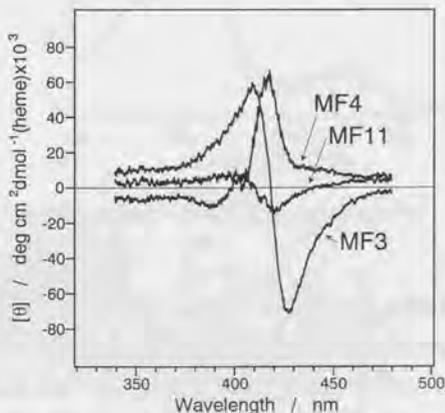


図13.8 人工ヘムタンパク質のSoret帯周辺のCDスペクトル (濃度は図13.6の最大量に対応)

分裂^{21,22)}の CD パターンを示し、その分散波形のモードから M (minus) の遷移双極子のねじれに対応すると考えられた。これはタンパク質 1 分子にヘムが 2 分子結合して、しかもそのヘム同士が、タンパク質 MF3 のヘリックスではないがなんらかの構造形成の結果、一定の位置関係で存在しているためと考えられる。この MF3 存在下の CD スペクトルから予想されることは、ヘムの His 残基への結合は全くのランダムではなく、特定の、より強い親和性のサイトが存在することで、さらにまた、タンパク質部分は完全にランダム構造ではなく、配位結合した各ヘムに特定の構造を与えていることが推定される。

一方、ヘム結合によって α -ヘリックス構造を形成する MF11 は、図 13.8 のように誘起 CD の強度はあまり大きくなかった。Davydov 分裂は遷移双極子のなす角度にも関係して強度が決まるので、正確な議論はできないが、これはこのヘムタンパク質の吸光度自体が低いこととも関係していると思われる。MF11 存在下の CD パターンは MF3 と同様の chirality を示し、配位したヘムの遷移双極子間に相互作用があること、すなわち複数のヘムが近傍に存在していることを示唆している。

ヘムの露出度を調べるために行った sodium dithionite による porphyrin 中の Fe(III) の還元実験では、MF3、MF4、MF11 とも同程度によく還元され、Soret バンドは 426nm にシフトし、560nm にややシャープなバンドが現れた(図 13.9)。この変化は cytochrome b_{562} の場合とほぼ同じであった⁴⁾。タンパク質部分の高次構造はそれぞれ異なるが、溶媒への露出度の点では、いずれもあまり遮蔽されていないことが推測される。

次に、ヘムの存在しない条件でもヘリックス性の高い MF16、MF17、

MF18 について、同様にヘムの結合能を UV-VIS スペクトルで調べた(図 13.10)。興味深いことに、MF16 は高い結合能を示したが、MF17、MF18 はタンパク質濃度が過剰の条件でもヘムの結合はほとんど観測されなかった。すなわち His 残基の配置としては、これを両親媒性ヘリックスの疎水性コアに置くことがヘムの配位結合に有効であることを示している。MF17 と MF18 でうまくヘムが配位しなかったのは、ヘムの一部分の疎水

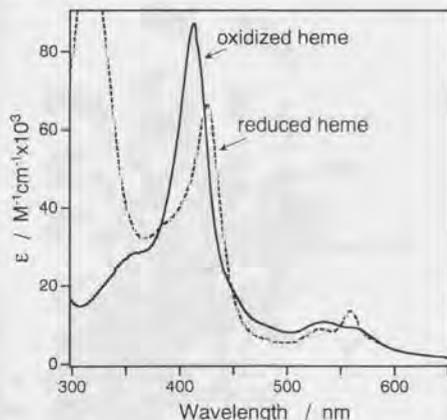


図 13.9 MF4-ヘム系の還元による吸収スペクトル変化

性領域への挿入と、Fe(III)へのHisの配位結合が両立しないような位置にHis残基が配置されていたためと考えられる。MF16についての滴定実験から、ヘムはタンパク質あたり1分子が結合していると考えられる。このことは、8個のHis残基のうち配位結合に関与しているのはそのうちの2個だけであることを意味している。すなわち、当初期待した1分子あたり複数のヘムの配位は実現しなかった。

以上の結果をまとめると、ヘリックスバンドル構造をヘリックスの鎖長やコアの疎水性を増して、安定化させることで、ヘム結合性を向上させることが示された。また、ヘムの配位結合には疎水性コアにHisを導入することが必要であり、溶媒に露出した位置にHisを置くことはあまり有効でない。4ヘリックスバンドルに対してヘムが1個しか結合できなかったことは、ヘムのサイズとの関係から、バンドル構造の安定性に限界があるためと考えられる。よりかさ高い疎水性基を持ったヘリックス部分を設計することで、この点は改善され、また違った特徴のヘムタンパク質が創り出せると思われる。また、ここでは、天然にないトポロジー、すなわち4本のヘリックスのC端を束ねた分岐型構造体においてもヘム結合性が実現することを示すことができた（推定構造を図13.11に示

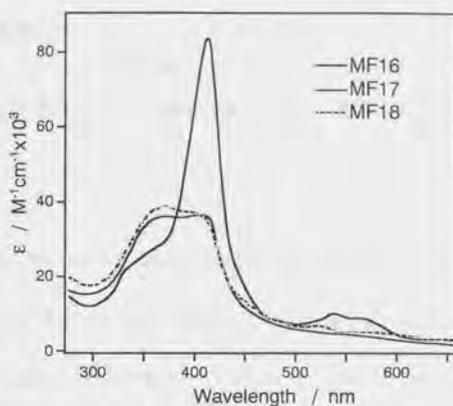


図13.10 分岐型ペプチド鎖を有するヘムタンパク質の吸収スペクトル (タンパク質過剰時)

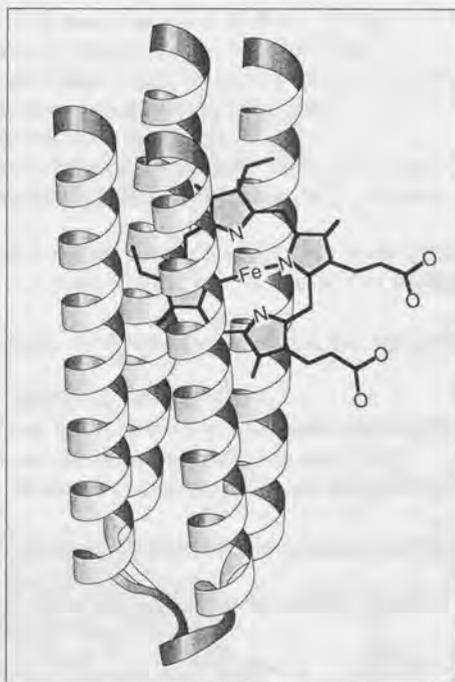


図13.11 分岐型ヘムタンパク質MF16の推定構造

す)。構造形成の観点からは、タンパク質部分がランダムコイル構造であっても、ヘムの結合は特異的な構造を生み出していること、さらにある場合にはヘリックス構造が誘起されることが示された。ここで得られた知見は、さらに機能化を意識した設計において有用となろう²³⁾。

引用文献

1. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry* 2nd Ed. John Wiley & Sons (1995); 田宮, 村松, 八木, 吉田 訳, ヴォート生化学, 東京化学同人 (1996)
2. H. Savage, M. Cyrklaff, G. Montoya, W. Kuhlbrandt, I. Sinning, *Structure*, 4, 243-252 (1996)
3. J. Koepke, X. Hu, C. Muenke, K. Schulten, H. Michel, *Structure*, 4, 581-597 (1996)
4. Y. Feng, S. G. Sligar, *Biochemistry*, 30, 10150-10155 (1991)
5. 金慶煥, 小林一稔, 長棟輝行, 雀部博之, 森井尚之, 上平初穂, 熱測定討論会要旨集 (1992)
6. 森正保, 生化学の魔術師ポルフィリン, 裳華房 (1990)
7. 白井汪芳, 英謙二, 化学工業, 1991, 301-310 (1991)
8. M. Czjzek, F. Guerlesquin, M. Bruschi, R. Haser, *Structure*, 4, 395-404 (1996)
9. K. Hamada, P. H. Bethge, F. S. Mathews, *J. Mol. Biol.*, 247, 947-962 (1995)
10. F. S. Mathews, P. H. Bethge, E. W. Czerwinski, *J. Biol. Chem.*, 254, 1699-1706 (1979)
11. Y. Feng, A. J. Wand, S. G. Sligar, *Biochemistry*, 30, 7711-7717 (1991)
12. T. Sasaki, E. T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 380 (1989)
13. H. Mihara, N. Nishino, R. Hasegawa, T. Fujimoto, *Chem. Lett.*, 1992, 1895 (1992)
14. C. T. Choma, J. D. Lear, M. J. Nelson, P. L. Dutton, D. E. Robertson, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 856 (1994)
15. D. R. Benson, B. R. Hart, X. Zhu, M. B. Doughty, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8502 (1995)
16. W. A. Kalsbeck, D. E. Robertson, R. K. Pandey, K. M. Smith, P. L. Dutton, D. F. Bocian, *Biochemistry*, 35, 3429-3438 (1996)
17. T. Arai, K. Kobata, H. Mihara, T. Fujimoto, N. Nishino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, 1989-1998 (1995)
18. 三原久和, 青柳東彦, 西野憲和, 高分子論文集, 52, 801-812 (1995)
19. J. P. Tam, C.-R. Wu, W. Liu, J.-W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 6657-6662 (1991)
20. D. R. Grassetti, J. F. Murray, H. T. Ruan, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 603 (1969)
21. N. Harada, K. Nakanishi, *Circular Dichroism Spectroscopy*, Tokyo Kagaku Dojin, Tokyo (1982)
22. A. S. Davydov, *Theory of Molecular Excitons*, (M. Kasha, M. Oppenheimer, Jr., trans.) McGraw-Hill, New York (1962)
23. H. Morii, M. Ishimura, S. Honda, H. Uedaira, *Pept. Chem.*, 1995, 481-484 (1996)

第14章 シクロデキストリンとヘリックスの複合超構造による分子認識

14.1 序論

タンパク質や核酸は高度な機能を有する典型的な超分子である。これらをモデルにして機能分子を設計する場合、素材の枠を広げ、生物的な手法のみでなく化学的な手法を取り入れることによって、様々な天然にない新規な機能を持った構造体を実現できると期待される。本章においては、タンパク質の機能として分子認識能を取り上げ、酵素をはじめ各種制御に関係するタンパク質における特異性の高い分子認識を人工的な複合超構造系で実現する可能性を探った。

天然の多くのタンパク質は機能ドメインの複合超構造体であるという見方ができる。例えば、flavocytochrome b_2 はFMNを持つドメインとヘムを持つドメインが進化的に合体してできたタンパク質で、この2つの機能ドメインが連携して電子移動を行う¹⁾。また、leucine zipper ではDNAを把持するcoiled-coilドメインと認識のための塩基性ドメインからなっている²⁾。第5章で述べたkinesinは、cargoドメインとstalkドメインとmotorドメインからなり、さらにmotorドメインはATPase機能ドメインと微小管結合ドメインなどからなっている³⁾。このように機能の高度化は、機能ドメインの複合化による機能分担、協同、連携によって実現していると考えられることができる。

分子認識について考えてみると、タンパク質の分子認識にはいくつかの代表的な様式があることが指摘できる。ひとつは、タンパク質表面に配置された複数のループ部分による認識である。ループによる認識の例としては、immunoglobulinがある²⁾。このタンパク質では β シートの集積構造の一端に存在する3本のループからなるhypervariable領域によって抗原の認識が行われる。alcohol dehydrogenaseなどのnucleotide結合タンパク質も、 α/β 構造体の一端に存在するループ部分がnucleotideを結合する。別の様式は、DNA結合タンパク質に見られるような α -ヘリックスによる認識である。第8章で述べたMybタンパク質は α -ヘリックスがDNA螺旋のmajor grooveにフィットする形で結合し、多くの局所的な残基間の相互作用の結果として高い結合能と認識能を発揮している²⁾。これらの例はいずれも、分子認識能の実現には相互作用面の広さと形状や種類の多様性が必要であることを意味している。

以上のような考察から、第9章および第10章において述べた両親媒性ヘリックスの疎水性分子との結合能を利用し、さらに特異的な認識点としてシクロデキストリンをペプチドにハイブリッド化して導入した複合超構造体を分子設計した。シクロデキストリン

シクロデキストリンを共有結合させるために、Cys 残基を疎水性コアに隣接する heptad のうちの e, g 位置に配置した。またN端に Tyr を用いてペプチドの定量に利用した。2個のシクロデキストリン基はペプチド部分の coiled-coil 形成により dimer の反対側に位置するようになるが、coiled-coil の相手分子のシクロデキストリンが存在するために図 14.2

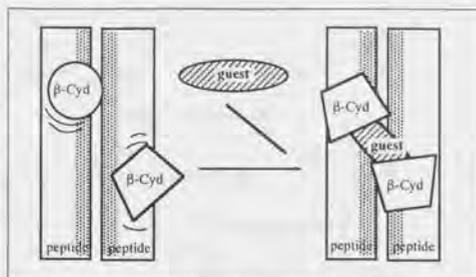


図 14.2 HA2 および HB2 の予想機能構造
(ペプチドの疎水性領域を灰色で示した)

のように coiled-coil の片方の側面に 2 つのシクロデキストリン基をもたせることができる。ペプチドの Cys 残基の位置を変えた HA2 および HB2 の 2 種類を設計した。

HC3 と HC6 ではそれぞれ 3 および 6 個の Cys 残基をヘリックスの側面に沿って配列するように導入した。これは鎖状のゲスト分子を数珠つなぎのように包接するか、ジッパーのように包接するための分子設計で、Cys 残基は heptad の連続する f と b 位置に配してある。

ハイブリッド分子の合成

β -シクロデキストリン(5mmol)を 0.4M の NaOH 水溶液(110m l)に溶解し、氷水浴下で *p*-toluenesulfonic chloride (30mmol)を添加して、室温で 1 時間攪拌した。反応後、未反応の不溶試薬を濾去し、濃塩酸を加えて中和した。生成する沈殿物を濾取し、これを熱水から再結晶して、mono-6-O-(*p*-toluenesulfonyl)- β -cyclodextrin (6-TsO- β -Cyd) を得た。6-TsO- β -Cyd (1mmol)を水(10m l)に懸濁し、80°C に保って NaN_3 (11mmol)を添加、5 時間攪拌した。反応後、室温にし acetone(70m l)に注いで、沈殿物 6-N₃- β -Cyd を回収した。次に 6-N₃- β -Cyd (0.5mmol)と triphenylphosphine(0.3g)を DMF(10m l)に溶解し、28%アンモニア水(2m l)を加えて、4 時間反応させた。反応液を acetone に注いで沈殿を濾取し mono-6-deoxy-6-amino- β -cyclodextrin (6-NH₂- β -Cyd) を得た。

3-mercaptopropionic acid (0.5mmol)とわずかに過剰量の 2, 2' dipyridyl disulfide を DMF (0.5m l)中混合し、3-(2-pyridyl)dithiopropionic acid を合成した^{14,15}。反応はほぼ定量的に進行するので、これを単離せずに 15 分後、TBTU-HOBt-NMM をカップリング試薬として上記の 6-NH₂- β -Cyd(0.6mmol)と反応させる(図 14.3)。反応 60 分後 acetone に注いで沈殿物を回収し乾燥させて、3-(2-pyridyl) dithiopropionyl 化した

β -シクロデキストリン (6-PysSPrNH- β -Cyd) を得た。

ペプチド部分の合成は通常の Fmoc 固相合成法に従い、TBTU-HOBt-NMM 系のカップリング試薬で Shimadzu-PSSM8 合成機により合成した。合成用樹脂はアミド型 C 端を与える TGS-CHA 樹脂 (Shimadzu 製) を用いた。シクロデキストリンを導入するための Cys 残基は Trt 保護基を使用し、最終脱保護を TFA-EDT-water-phenol (88:7:4:1) により 100 分間行い、Cys (Trt) を含む各保護基を除去した。

精製は逆相 HPLC により water-acetonitril 系溶出液を用いて行った。目的ペプチドは凍結乾燥して使用時まで保存した。

シクロデキストリン基のペプチドへの導入は、6-PysSPrNH- β -Cyd (10 μ mol) を DMF (0.3m ℓ) に溶かし、0.1M の酢酸アンモニウム buffer (pH6.5; 0.7m ℓ) で希釈した後、分子中に 2 個の SH 基を持つ HA2 の場合、これをペプチド (1 μ mol) の水溶液 (1.9m ℓ) と混合し、さらに同 buffer (2m ℓ) を添加して pH5.9 で 3 時間反応させた。反応液を逆相 HPLC にかけて主ピークを分取して、目的とするペプチド-シクロデキストリン複合体 HA2 および HB2 を得た (反応スキームを図 14.3 に示す)。

合成した複合体は MALDI-TOF-MS / Kratos Kompact MALDI-4 により分子量測定した結果、分子量は 6363 (HA2)、6355 (HB2) であった (ともに理論分子量 6383)。従って設計通りの化合物が合成されていることが確認された。

HC3 と HC6 も同様の反応で合成したが、逆相 HPLC ではカラムへの吸着が著しく、Sephadex-G25SF による SEC カラムで精製した。分子量は ESI-MS で測定し、目的物 HC3 および HC6 の分子量 6660.8、10303.1 に対して、6660.0 と 10298.0 を観測し、同定することができた。この場合、マスマスペクトル装置中でイオン化する段階での分子切断が起きていると考えられるシクロデキストリン断片のピーク (実測 1222.5、計算 1220.1) も観測された。

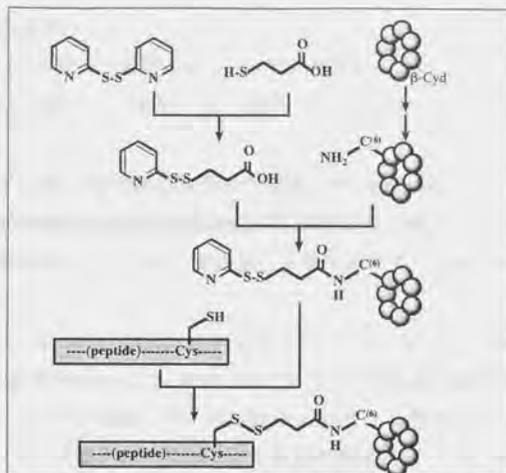


図 14.3 ペプチド-シクロデキストリン複合分子の合成スキーム

分光測定およびゲスト分子の結合認識能

円偏光二色性(CD)測定はJasco-J600旋光分散計により行った。測定セルは0.2mm光路長の恒温水ジャケット付石英セルを用い、50mMのリン酸カリウム buffer (pH7.0) 中、20°Cで測定した。

吸収スペクトルはShimadzu-UV1200分光光度計を用いて測定した。10 μ Mのethyl orange (sodium N,N-diethylaminoazobenzenesulfonate)の20mMリン酸カリウム buffer (pH7.0) 溶液にペプチド複合体を0~100 μ M添加して吸収スペクトル変化を測定した。

また蛍光スペクトルはShimadzu-RF5000 蛍光光度計を用いた。Dansyl-アミノ酸 (Dansyl: 5-N,N-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl) とペプチド複合体の濃度はそれぞれ10 μ Mおよび60 μ Mで、20°Cで測定した。溶媒は50mMのリン酸カリウム buffer (pH7.0) を用い、Dansyl-アミノ酸を溶解するために測定時濃度2%のDMFを使用した。アミノ酸のD, L-体の蛍光強度が完全に等しくなるように重量から算出したDansyl-アミノ酸濃度を補正して、Dansyl-アミノ酸の添加量を決めた。蛍光励起波長はDansyl基に対応する330nmとした。

ペプチド性ゲスト分子の合成

HC3とHC6に対応するゲスト分子として、図14.4の各ペプチドを合成した。合成は通常のFmoc固相合成法によって行い、HPLCで精製した。GU4, GU8, GU12はC端付近の親水性領域にシクロデキストリンのゲストとなるTrpを含み、N端側に-Gly-Sar-Sar-Gly-の繰り返し配列を持つ細いペプチド鎖を有するもので、Haradaらによって発見されたpoly(ethylene glycol)鎖を包接したシクロデキストリンナノチューブ¹⁸⁻²⁰⁾を参

GU4	Ac-GXXG <u>W</u> KAE
GU8	Ac-GXXGGXXG <u>W</u> KAE
GU12	Ac-GXXGGXXGGXXG <u>W</u> KAE
GUW2	<u>E</u> W <u>K</u> X <u>E</u> WKA
GUW2A	<u>Adm</u> - <u>E</u> W <u>K</u> X <u>E</u> WKA
GUW5	<u>E</u> W <u>K</u> G <u>E</u> W <u>K</u> X <u>E</u> W <u>K</u> G <u>E</u> W <u>K</u> X <u>E</u> WKA

(X = Sar)

図14.4 設計合成したゲスト分子(シクロデキストリンに親和性の高いTrp残基とアダマンチル基を下線で示す)

考にしたデザインである。また、GUWのシリーズは数残基置きにTrpを持つペプチドとし、複数サイトの協同的な高い包接能の実現の可能性をさぐるためのものである。

14.3 結果と考察：ダンシルアミノ酸の不斉認識とマルチサイト型複合体形成

合成した複合分子HA2,HB2のCDスペクトルは、リン酸buffer (pH7.0) 中で典型的な α -ヘリックスのパターンを示した(図14.5)。 $[\theta]_{222\text{nm}}$ 値は -20000 および $-22500 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ とHA2,HB2とも同程度で、また、50%トリフルオロエタノール中での値 $-24000 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ に近いことから、ペプチド鎖の大部分は α -ヘリックス構造をとっていると考えら

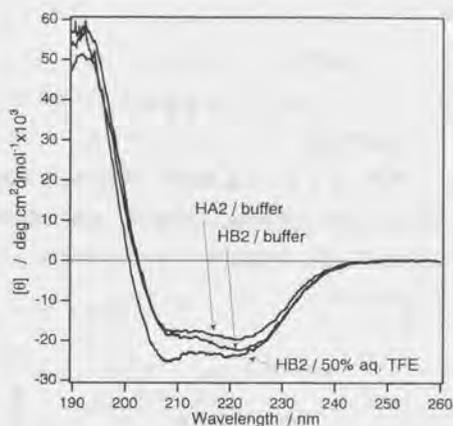


図14.5 HA2とHB2のCDスペクトル

れる。ただし、CDの強度的には末端部分でヘリックスがいくらかほどけていることが考えられる。また、スペクトル波形において208nmのバンド強度が222nmより小さいことから、coiled-coil型のダイマーを形成していることが推定される。シクロデキストリンを結合していない同ペプチドのCDと比較して、シクロデキストリン2個を分子中に有するHA2,HB2の系では、シクロデキストリンの導入によるヘリックス性の低下は見られなかった。また、複合体濃度を 0.17 mM から $7 \mu \text{ M}$ に下げた場合でもヘリックス性の低下はみられず、coiled-coil形成能がかなり高いことを示している。従って、以下の分光測

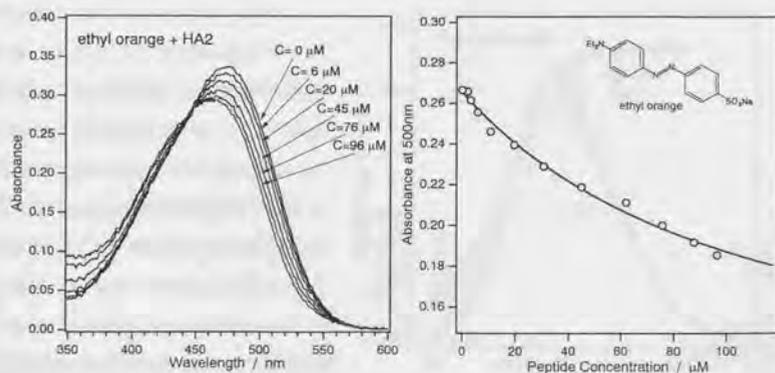


図14.6 HA2によるethyl orangeの包接(左図は吸収スペクトル、右図は強度の濃度依存性。図中の濃度はHA2濃度、またethyl orange濃度は $10 \mu \text{ M}$)

定、結合実験においても複合体分子は coiled-coil 型の dimer で存在すると考えられる。

ゲスト分子との結合能を評価するために、ethyl orange を用いて滴定実験を行った。一定濃度の ethyl orange に対して、ペプチド複合体の濃度を増加させると、ペプチド複合体が存在しない時は吸収極大波長が475nmであったものが、ペプチド複合体濃度の上昇につれて、460nm (ペプチド複合体濃度0.1mM時) に短波長シフトする。同時に吸収スペクトル波形も420nm付近に肩がみられるようになる。この変化は ethyl orange がシクロデキストリン基に包接されたことを意味している。結合能を見積もるために、

500nmの吸収強度をプロットすると、図14.6右のように吸光度は包接に伴って減少し、1:1複合体形成の理論曲線とフィットする。解離定数はシクロデキストリン基濃度で計算して、110 μ Mを与えたが、この値はシクロデキストリン単独の場合と同程度であった。すなわち、設計において期待したシクロデキストリンの包接能と両親媒性ヘリックスの包接能の協同効果は見られなかった。この原因はひとつには、用いたゲスト分子のサイズが小さく、またその疎水性部が芳香族性のみであることによると考えられる。

次に、ゲストとしてDansyl-アミノ酸を用い、HA2,HB2との包接体形成をDansyl基の蛍光スペクトルで評価した。Dansyl-Leuについては、図14.7のようにDansyl基の蛍光は、ホスト分子が存在しない時に比べてやや増大したが、 β -シクロデキストリンをペプチド複合体中のシクロデキストリン基と同じ濃度で用いた場合と比較すると蛍光強度はより低い。すなわち、蛍光強度がゲスト分子の取り込み量と相

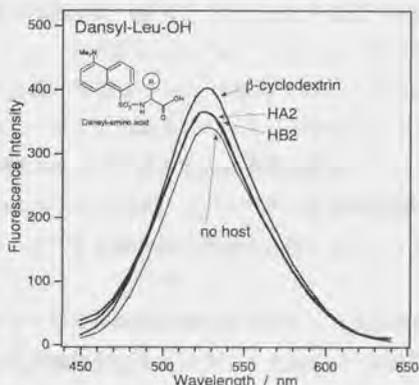


図14.7 Dansyl-Leuに対する複合体ペプチドの包接能 (比較のため同一濃度のシクロデキストリンによる蛍光スペクトルを示す)

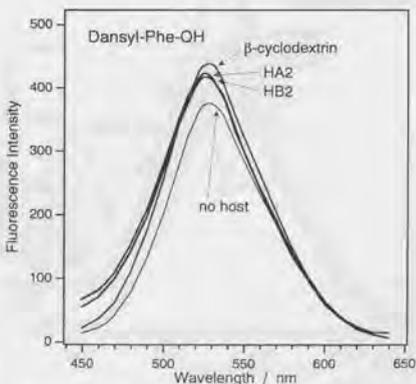


図14.8 Dansyl-Pheに対する複合体ペプチドの包接能

聞しているとする、ペプチド鎖の存在によって Dansyl-アミノ酸のシクロデキストリン基による包接がいくらか妨げられたことになる。このような現象は、例えば周辺の基による立体障害やペプチドの他残基がシクロデキストリン基に自己包接したことなどの可能性が考えられる。しかしながら、蛍光極大波長はペプチド複合体の存在時において、 β -シクロデキストリン単独時よりも短波長シフトしており、単にシクロデキストリン基のみではない別の包接、おそらくペプチドの coiled-coil がつくる疎水性コア領域の関与が考えられる。

図 14.8 には、Dansyl-Phe を用いた結合認識実験の結果を示した。この場合も傾向的には Dansyl-Leu と類似しており、蛍光のピーク強度は HA2, HB2 とともに β -シクロデキストリンよりも低い、やはり蛍光極大波長の短波長シフトが観測された。おそらく Dansyl-Leu の場合と同様に、シクロデキストリンに包接されたゲスト分子にペプチドの疎水性コア領域がこれをサポートあるいはキャップする形で結合または近接していると推定される。Dansyl-Phe においては Dansyl-Leu と比較して、ペプチド複合体存在時の蛍光強度の増加率が相対的に大きく、よりペプチド複合体との結合に適したゲスト分子であるといえる。

上記の結果から考えられることは、ゲスト分子の複数の疎水性部分がより高い疎水性を有することがより高い結合能につながる可能性があるということである。そこで次に、より疎水性の側鎖を有する Dansyl-Trp をゲスト分子として結合認識実験を行った。さらに L-体と D-体を用いて、不斉認識能の検討も同時に行った。予備実験として Dansyl-L-Trp と Dansyl-D-Trp の β -シクロデキストリンに体する結合性を蛍光スペクトルで比較したところ、Dansyl-L-Trp に比べて Dansyl-D-Trp のほうが強い蛍光を示した。すなわち、シクロデキストリンは D-グルコース単位から成っているため、もともと不斉ホストであることによって D, L-選択性が生じたものと考えられる。Dansyl-D-アミノ酸がより取り込まれやすいことは、すでに Ueno らによって報告されている Dansyl-Leu 修飾シクロデキストリン^{4,16,17}において、Dansyl-Leu

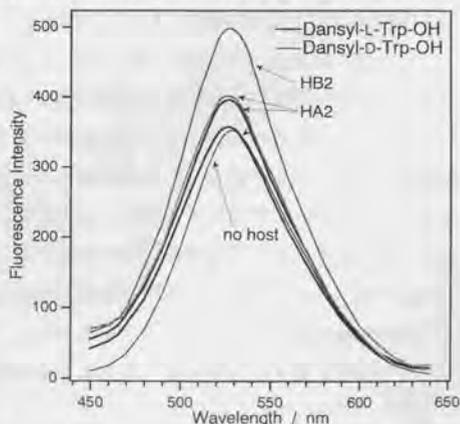


図 14.9 Dansyl-Trp に対する DL 認識能 (黒実線は L 体、灰色は D 体を示す)

修飾シクロデキストリンの自己Dansyl基包接がD-Leuでより強く、NMR構造解析でもDansyl-D-Leu基がより深くシクロデキストリンに挿入されていることと一致している。

このようなDansyl-D-アミノ酸に適合性が高い β -シクロデキストリンをペプチド複合体とした場合に不斉認識能がどのようになるかを検討したのが、図14.9である。先のDansyl-LeuおよびDansyl-Pheの場合と同様に、Dansyl-L-TrpおよびDansyl-D-Trpにおいても、蛍光極大波長は短波長シフトが観測された。HA2の場合は、 β -シクロデキストリンと同様にD-体に対する高い結合能を示したが、D-体、L-体に対するそれぞれの蛍光強度はシクロデキストリンと同程度であった。すなわち、HA2の不斉選択性はシクロデキストリン基のみの効果で決定されていると思われる。一方HB2では、D-体、L-体ともHA2より蛍光強度が著しく増大した。さらに、D-体/L-体の強度比も、HB2ではHA2よりも大きくなっており、HB2のDansyl-Trpに対する不斉選択性が高いことを示している。HB2とDansyl-D-Trpの系で蛍光強度の著しい増大が観測されたことは、この組み合わせが特異的認識に一步近づいたものと考えられる。ペプチド複合体においては、ペプチドの疎水性コア部分、あるいは近接したもう一方のシクロデキストリン基の関与もありうると思われるが、シクロデキストリン基が離れた位置にあるHB2で結合能が高かったことは、前者の可能性のほうがより高いと考えられる。HA2とHB2の差異を説明するモデルとして次のことが考えられる。 α -ヘリックスにおけるアミノ酸残基側鎖のC(α)-C(β)結合の方向は、一般にペプチドのN端方向に傾いており、そのため側鎖に付加した基はN端方向になびくように向きやすいと思われる。このため、HB2では26位のCysから伸びたシクロデキストリン基はここよりN端側の22,21,19,18位のLeu残基と相互作用しうるのであろう。一方HA2においては、19位のCysに付いたシクロデキストリン基の上記と対応する15,14,12,11位にはLeuの他に極性のSerやHisが存在するために、ゲスト分子結合能があまり高くならなかったと考えられる。

ここまでの実験結果は、両親媒性ヘリックスの骨格上でシクロデキストリンが包接ホストとして機能しうることを示している。しかし、目標とする高度な分子認識のためには結合能がまだ不十分である。ひとつにはペプチド部分の疎水性領域の寄与が不十分なこと、また2つのシクロデキストリン基の協同効果がゲスト分子のサイズに比べて相対的に離れているために機能しなかったことが考えられる。このような点を改善するためには、認識結合に関わる部位をさらに多数有するホストおよびゲスト双方の分子設計が不可欠であると考えられる。

HA2とHB2の結果をふまえて、3個および6個のシクロデキストリン基を有するペプチドHC3、HC6の設計と評価を次に行った。ペプチド-シクロデキストリン複合体の構

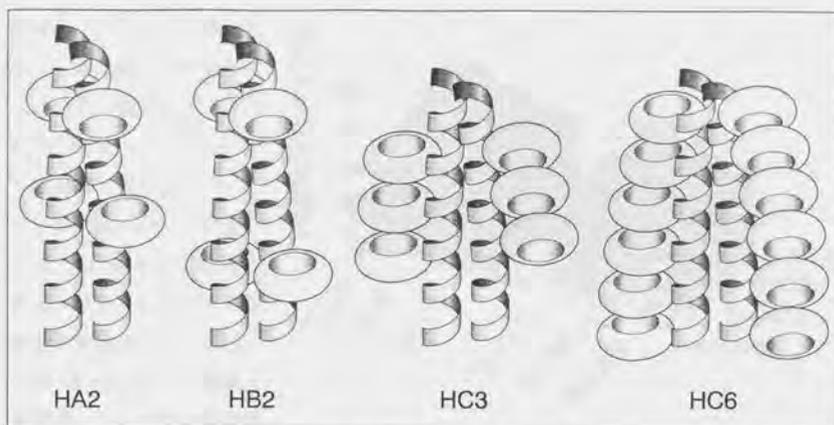


図 14.10 ペプチド-シクロデキストリン複合超分子の推定構造
(リボンはペプチド、楕円はβシクロデキストリン基を示す)

造模式図を図 14.10 に示す。HC3 と HC6 の CD スペクトルを図 14.11 に示した。対照としてヘリクス誘起性の溶媒である 50% TFE 中でのスペクトルを同図中に示した。これらに比べて、buffer 溶液中での HC3 と HC6 の CD スペクトルはいくらか強度が低下しており、ヘリクス含有量が多数のシクロデキストリン基の存在によって低下したと考えられる。しかし、ある程度のヘリクス性は維持しており、図 14.10 に近い構造を形成していると思われる。これらのマルチサイト型ペプチドを用いて、ゲスト分子として GU および GUW の各ペプチドに対する取り込み能を蛍光スペクトルにより評価した。結果を Trp 残基の濃度で規格化して図 14.12 に示した。いずれのゲスト分子に対しても、シクロデキストリン単独より、HC3 では蛍光強度が増大しており、シクロデキストリン間の協同性が働いていることが推測される。ところが、HC6 では蛍光強度が HC3 よりも逆に低くなるという結果になった。またゲストによってはシクロデキストリン単独よりも低下した。このことは一見 HC6 の二次構造性の低下と

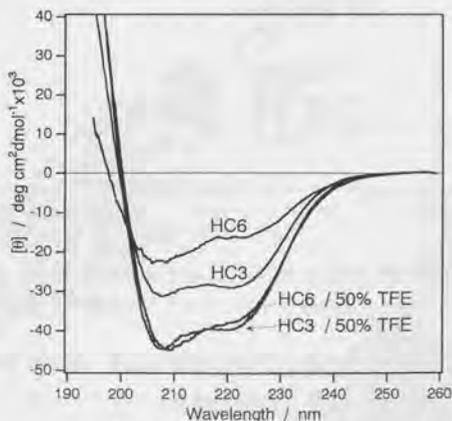


図 14.11 ペプチド複合分子 HC3 と HC6 の水溶液中および 50% TFE 中の CD スペクトル

関係しているように思われるが、蛍光極大波長を調べてみると、図14.13のようにHC6は、GUW2Aに対してかなり短波長シフトしている。またGU12に対しては、buffer中よりも長波長にシフトするという奇妙な結果が得られた。このことはHC6において実際は短波長シフトと蛍光強度増大が起きているにもかかわらず、短波長域で蛍光の消光 (quenching) が起きているためであると解釈できる。すなわち、HC6においてもシクロデキストリンの協同的な作用でゲストペプチドの取り込みが実現している。

図14.12を詳細に見てみると、GUのゲスト分子に対してはGU4, GU8, GU12の差はあまり顕著ではなく、期待した数珠つなぎ型(細いペプチド鎖が複数のシクロデキストリンを連続して貫通する)の包接¹⁸⁻²⁰⁾

はあまり起きていないと思われる。この系では単にTrpが包接されていると考えられる。一方GUWのゲスト分子の系では、GUW2Aに対する包接能が著しく高い。これはadamantyl基(Adm)の強い包接によってこの分子中のTrpも協同的によく包接されたためと考えることができる。この結果を利用すれば、結合能の非常に高いホスト-ゲ

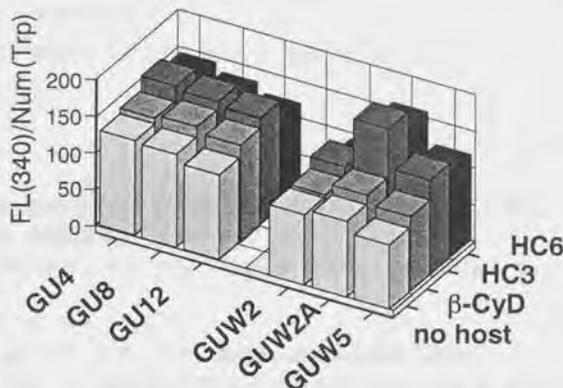


図14.12 各種ゲストペプチドに対するHC3およびHC6の包接能 (340nmの相対蛍光強度で示す)

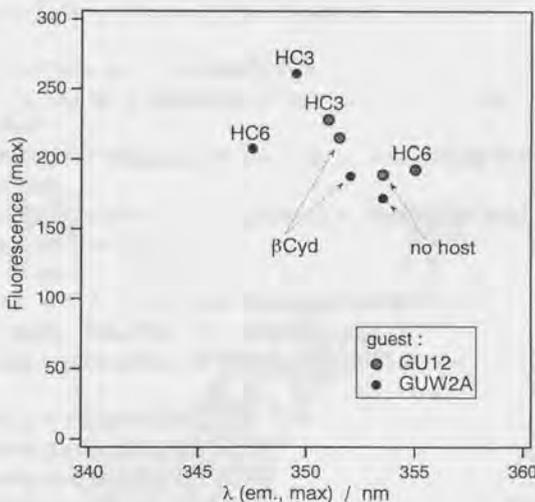


図14.13 ゲスト分子GU12およびGUW2Aのペプチド複合超分子存在下の蛍光スペクトルのピーク極大値

ストの系を新規に構築できる可能性がある。以上のように、HC3とHC6ではマルチサイト型の包接が実現できた。より精密な分子設計によって、特異的な結合をするペアを生み出すことができると考えられる²¹⁾。

引用文献

1. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry* 2nd Ed., John Wiley & Sons (1995); 田宮, 村松, 八木, 吉田 訳, ヴォート生化学, 東京化学同人 (1996)
2. C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York (1991)
3. I. Rayment, *Structure*, 4, 501-504 (1996)
4. 戸田不二緒 監, 上野昭彦 編, シクロデキストリン基礎と応用, 産業図書 (1995)
5. D. Dochene, Ed., *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, Editions de Sante, France (1988)
6. E. A. Lewis, L. D. Hansen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2081 (1973)
7. K. Fujita, S. Ejima, T. Imoto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1277 (1984)
8. R. Breslow, N. Greenspoon, T. Guo, R. Zarzycki, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8296 (1989)
9. R. Breslow, B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 5882 (1992)
10. T. Akaike, Y. Nagano, Y. Yamamoto, A. Nakamura, H. Ikeda, A. Ueno, F. Toda, *Chem. Lett.*, 1994, 1089 (1994)
11. E. van Dienst, W. I. I. Bakker, J. F. J. Engbrsen, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Pure Appl. Chem.*, 65, 387-392 (1993)
12. F. D'Alessandro, F. G. Gulino, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, D. Sciotto, G. Vecchio, *Tetrahedron Lett.*, 35, 629-632 (1994)
13. C. Cohen, D. A. D. Parry, *Proteins*, 7, 1 (1990)
14. D. R. Grasseti, J. F. Murray, H. T. Ruan, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 603 (1969)
15. 松本博, 国則登代, SH基の定量法, 学会出版センター (1978)
16. A. Ueno, S. Minato, I. Suzuki, M. Fukushima, M. Ohkubo, T. Osa, *Chem. Lett.*, 1990, 605 (1990)
17. 上野昭彦, シクロデキストリンシンポジウム95, (1995)
18. A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Nature*, 356, 325 (1992)
19. A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Nature*, 364, 516 (1993)
20. G. Li, L. B. McGown, *Science*, 264, 249-251 (1994)
21. H. Morii, H. Kanegae, K. Harata, *Pept. Chem.*, 1996, 453-456 (1997)

第6編

総括

第15章 本研究の総括

15.1 総括

「化学」が「オングストロームの世界」を明確に理解し応用してきた歴史に比べて、「ナノメートルの世界」の理解と応用はまだ始まったばかりである。本研究は、ナノメートルの世界の一員であるタンパク質を取り上げ、その構造形成原理の理解と、人工的な構築を試みたものである。以下に各章の要点を記述しつつ、本研究の流れを総括する。

第1編では、本研究の主旨を理解しやすくするために構成したもので、この研究領域の展開史とそこでの問題意識や注目される研究例、および筆者が重要と考える諸点を記述した。

第2編では、全体を通しての方法論の基礎となる合成方法について、特に本研究過程において新規に開発した手法を述べた。

(2章) 人工タンパク質の化学合成のための最適な溶媒系の探索を、反応速度およびペプチド鎖の溶解性の両方の観点から行った。特に塩化リチウム/DMF系の有効性を本研究で初めて示した。

(3章) 新規な固相合成用の担体を開発した。合成段階におけるペプチド担持ビーズの非凝集性と、脱保護反応後における高い親水性を実現した。また、合成収率に及ぼすビーズのリンカー部分の分子構造の影響を詳細に解析した。

第3編では、両親媒性ヘリックス構造に着目して、これを基本としたヘリックスバンドルの構造形成を熱力学的に解析することで、天然のタンパク質の特徴的な高次構造形成が、いかにしてそのアミノ酸配列にプログラムされているかの解明を試みた。

(4章) 2~6本の両親媒性ヘリックスを柔軟なペプチド鎖でつないだ人工タンパク質を設計し、その超二次構造形成を実現した。熱力学的な解析により、この構造は4または6本のヘリックスバンドル構造と考えられた。また変性過程の解析から、その多形性ととも、2本組を単位とする段階的な構造形成過程を見出した。

(5章) 2本型のバンドル構造であるcoiled coil構造を含む両親媒性ヘリックス構造を、熱力学的な安定性に基づいて、その形成可能領域を予測する方法を新たに開発した。この手法は従来法に比べてより詳細な両親媒性の評価ができるものである。本法をkinesinのネック領域に適用し、実験結果と比較することによって、その有効性を確認することができた。kinesinにおいては、両親媒性が途中でとぎれたcoiled coilが存在しており、そのモータータンパク質の運動における機能的な意味にも言及した。

(6章) 両親媒性ヘリックス領域を有する生理活性ペプチドの会合挙動を検討した。一般

に知られている両親媒性ヘリックスが濃度依存的な平衡に基づいて単純な会合過程を示すのに対して、このペプチドはそれ自身がミセル形成後に希釈によって解離することでヘリックスバンドル構造の4量体が特異的に生成するという特殊な系であることを発見した。このことはタンパク質の高次構造形成における道筋の重要性を示唆している。

(7章) 2本および4本型のヘリックスバンドルを設計し、その疎水性コア領域の各種残基置換による熱転移挙動の変化を解析した。転移エンタルピーは転移温度と相関があり、安定性にはコアの疎水性よりもバックリングが重要であることを明らかにした。またコア領域がすべて芳香族性であるヘリックスバンドルを初めて実現した。さらに芳香族性残基が周辺の側鎖の立体構造を制限することで三次構造の形成に有効であることをNMR的に明らかにした。

(8章) 3本型の変形ヘリックスバンドル構造を持つDNA結合タンパク質ドメインのコア領域に存在するキャビティに注目し、キャビティ形成に関係する103位の残基を非天然アミノ酸を含む10種類の脂肪族アミノ酸に置換して分光学的、熱力学的に解析した。安定化エネルギーはキャビティのバックリングのvan der Waalsエネルギーによって大きく変化することを明らかにし、さらにはキャビティの形状に関する情報をも得ることができた。この結果は、このタンパク質のDNA結合機能との関係で重要な意味を持つことを示した。

このように両親媒性ヘリックスの疎水性領域の性質、部分的な欠陥の寄与、疎水性領域のバックリングの問題、コアにおけるキャビティの安定化への寄与、構造形成過程の特殊な経路の存在などを明らかにした。これらは、分子設計原理である「両親媒性」をより詳細に解明したもので、次に述べる人工タンパク質構築のための重要な基盤となっている。

第4編では、両親媒性ヘリックスバンドルの単独での三次構造に基づく機能を発現させ、またその原理を解明することを主眼に研究を進めた。

(9章) 設計した4本型および6本型の両親媒性ヘリックスバンドルにより、各種の疎水性化合物が包接されることを示した。柔軟なループ構造の寄与と合わせて、この人工タンパク質の包接場はゲスト分子に対するサイズの制約が少なく、さらにはまた不斉性を有する新しいタイプのホスト分子であることを明らかにした。特に本研究で初めて開発した6本型のヘリックスバンドルは非常に高い包接能を示した。

(10章) 潜在的に両親媒性を有するにもかかわらず二次構造をとらない生理活性ペプチドに対して、4本型の両親媒性人工ヘリックスバンドルを共存させることで、両者が複合体を形成して、そのペプチドにヘリックス構造を誘起させることを初めて見いだした。こ

の機能はシャペロン機能の原型とも考えられるものであり、構造形成の道具としての応用も考えられる。

(11章) coiled coil 構造の平行と反平行の配向に着目し、その選択的な形成を実現するための分子設計を行った。疎水性領域に非疎水性の残基欠陥を導入すること、あるいはヘリックスの端に一方に偏った荷電を有する領域を付加することで、この制御が可能となった。

これらの結果、タンパク質の天然の機能にとらわれない新規な機能の発現を行うことができた。また同時に自然界におけるタンパク質の機能原理の一部を明らかにできた。

第5編では、機能性原子団の導入により、さらに高度なあるいは複合的な機能を実現することを試みた。

(12章) リポソーム膜に結合する疎水性の高いヘリックスバンドルを設計し、さらに分子の一端には金属イオン結合ループを付加した。この全く新しい人工タンパク質は、脂質二分子膜上で集合体構造を形成し、カルシウムイオン結合能を実現した。脂質膜上で動作する機能素子の可能性を示すことができた。

(13章) ポルフィリン系化合物を配位するためのヘリックスバンドル構造の設計を各種検討した。安定なポルフィリンの配位にはヘリックス構造形成が重要であること、また配位性のアミノ酸残基は両親媒性ヘリックスバンドルのコア領域に配置する必要があることを結論した。また、合成の容易な天然にはない分岐型のヘムタンパク質を開発した。

(14章) 2本型の両親媒性ヘリックスバンドルに2~6個のシクロデキストリンを導入し、協同的なゲスト分子の取り込みができるタンパク質を開発した。シクロデキストリン2個を有するハイブリッド人工タンパク質は、Dansyl-tryptophan に対して特徴的な不斉認識能を示した。また、3および6個のシクロデキストリンを直線的に配置した人工タンパク質は、複数のインドリル基やアダマンチル基を有する小ペプチドを効率よく結合し、特異的な分子間結合の系を開発できる可能性を示した。

以上のように、本研究においては、一次構造の設計と合成から始めて、高次構造の構築を行い、さらにはその機能発現と、そして複合的な超分子構造の構築へと、研究展開を試みた。自然界の仕組みに学んで、機能性人工タンパク質の設計原理を明らかにし、またその知見を次の設計へと応用した。本研究によって、多様性に満ちたタンパク質ワールドを切り拓くための設計原理を明らかにし、またいくつかの人工タンパク質を創出することができた。

発表論文リスト

審査論文リスト

1. Solubility and Coupling Reactivity of Protected Peptides in Highly Polar Solvents
H. Morii & K. Ichimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2730-2732 (1989)
2. Amphiphilic Tailor-made Proteins as Novel Chiral Hosts
H. Morii, K. Ichimura & H. Uedaira, *Chem. Lett.*, **1990**, 1987-1990 (1990)
3. Association Characteristics of Amphiphilic α -Helices Connected by Flexible Links
H. Morii, S. Honda, K. Ichimura & H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 396-402 (1991)
4. Asymmetric Inclusion by de Novo Designed Proteins: Fluorescence Probe Studies on Amphiphilic α -Helix Bundles
H. Morii, K. Ichimura & H. Uedaira, *Proteins*, **11**, 133-141 (1991)
5. α -Helical Assembly of Biologically Active Peptides and Designed Helix Bundle Protein
H. Morii, S. Honda, S. Ohashi & H. Uedaira, *Biopolymers*, **34**, 481-488 (1994)
6. Comparison of ncd and Kinesin Motor Domains by Circular Dichroism Spectroscopy
T. Shimizu and H. Morii, *J. Biochem.*, **120**, 1176-1181(1996)
7. Identification of Kinesin Neck Region as a Stable α -Helical Coiled Coil and Its Thermodynamic Characterization
H. Morii, T. Takenawa, F. Arisaka and T. Shimizu, *Biochemistry*, **36**, 1933-1942 (1997)
8. Special Folding Pathway to Tetramer Only through Micelle State of Corticotropin-Releasing Factor
H. Morii, H. Uedaira, M. Ishimura, S. Kidokoro, T. Kokubu and S. Ohashi, *Biochemistry*, **36**, 15538-15545 (1997)
9. Landscape and Energetics of Cavity in c-Myb Probed by Natural and Non-Natural Amino-acid Mutations
H. Morii, H. Uedaira, K. Ogata, S. Ishii and A. Sarai, to be submitted.
10. Molecular Design for Parallel and Antiparallel Orientations of Coiled-Coil Peptides
H. Morii, M. Ishimura, H. Uedaira, and S. Honda, to be submitted.

関連発表リスト (1990年以降, 非審査)

1. Reinvestigation of Synthetic Methods for Zinc meso-Tetraphenyltetrabenzoporphyrin
K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, S. Fukui & O. Ohno, *Inorg. Chim. Acta*, **176**, 31-33 (1990)
2. Configurational Feature of Electrochemically-Prepared Poly(3-dodecyl-thiophene)
M. Sato & H. Morii, *Polym. Commun.*, **32**, 42-44 (1991)
3. Nuclear Magnetic Resonance Studies on Electro-Chemically Prepared Poly(3-dodecylthiophene)
M. Sato & H. Morii, *Macromolecules*, **24**, 1196-1200 (1991)
4. Solution Structure of Human Growth Hormone-Releasing Factor Fragment(1-29) by CD: Characteristic Conformational Change on Phospholipid Membrane
S. Honda, S. Ohashi, H. Morii & H. Uedaira, *Biopolymers*, **31**, 869-876 (1991)
5. Unequivocal Synthesis of meso-Tetraphenyltetrabenzoporphine
K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, S. Fukui & O. Ohno, *Inorg. Chim. Acta*, **182**, 83-86 (1991)
6. Structural Study on Human Growth Hormone Releasing Factor Fragment(1-29) in Hydrophobic Environment
S. Honda, H. Morii, S. Ohashi & H. Uedaira, *Peptide Chemistry*, **1990**, 379-382 (1991)
7. Fluctuation and Rotation of Human Growth Hormone-Releasing Factor in the Presence and the Absence of Phospholipid Membrane
S. Honda, H. Morii, S. Ohashi & H. Uedaira, *Biochim. Biophys. Acta*, **1068**, 81-86 (1991)
8. Optical and Redox Properties of meso-Diphenyl-tetrabenzoporphirins
M. Yasuike, A. Yamaoka, O. Ohno, K. Ichimura, H. Morii & M. Sakuragi, *Inorg. Chim. Acta*, **185**, 39-47 (1991)
9. Formation of Tetrabenzoporphine Skeleton by the Reactions of Phthalimide with Zinc Carbonates
K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, Y. Toda, M. Fukui & O. Ohno, *Inorg. Chim. Acta*, **186**, 95-101 (1991)
10. Thermal Stability of the DNA-Binding Domain of Myb Onco-Protein
A. Sarai, H. Uedaira, H. Morii, T. Yasukawa, Y. Nishimura, K. Ogata & S. Ishii, *Biochemistry*, **32**, 7759-7764 (1993)
11. Structure and Function of Designed Calcium-Binding Peptide
H. Morii, S. Honda & H. Uedaira, *Peptide Chemistry*, **1993**, 413-416 (1994)

12. The Role of Interior Residues of de Novo Designed 4-Helix Bundle Peptides
H. Morii, M. Ishimura, S. Honda & H. Uedaira, *Peptide Chemistry*, **1994**, 445-448 (1995)
13. Design of Membrane Protein Consisting of a Metal Binding Loop and a Transmembrane Helix
S. Honda, H. Morii & H. Uedaira, *Peptides*, **1994**, 447-448 (1995)
14. De Novo Design of Heme-Binding Peptides
H. Morii, M. Ishimura, S. Honda & H. Uedaira, *Peptide Chemistry*, **1995**, 481-484 (1996)
15. De Novo Design of Amphipathic Peptide Hybrids with Oligosaccharide and Their Functions
H. Morii, H. Kanegae and K. Harata, *Peptide Chemistry*, **1996**, 453-456 (1997)
16. Design and Synthesis of Cyclodextrin-Peptide Conjugates and Their Characterization
H. Kanegae, H. Morii and K. Harata, *Peptide Chemistry*, **1996**, 477-480 (1997)
17. Hydrolysis of AMPPNP by the Motor Domain of ncd, a Kinesin-Related Protein
Y. Suzuki, T. Shimizu, H. Morii and M. Tanokura, *FEBS Lett.*, **409**, 29-32 (1997)
18. Multi-state Thermal Transitions of Proteins: DNA-Binding Domain of the c-Myb Oncoprotein
H. Uedaira, H. Morii, K. Ogata, S. Ishii and A. Sarai, *Pure Appl. Chem.*, **70**, 671-676 (1998)
19. Substituent Effect on the cis-trans Photoisomerization of trans,trans, trans-1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrienes
Y. Sonoda, H. Morii, M. Sakuragi, Y. Suzuki, *Chem. Lett.*, **1998**, 349-350 (1998)

化合物等の略称

(一般)

Acm	acetamidomethyl
AcO	acetyloxy
AcOH	acetic acid
Adm	adamantyl
ADP	adenosine 5'-diphosphate
ANS	8-anilino-1-naphthalenesulfonate
AODB	acridine orange-10-dodecyl bromide
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ATPase	adenosine 5'-triphosphatase
BIPM	<i>N</i> -[<i>p</i> -(2-benzimidazolyl)phenyl]maleimide
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BocON	2- <i>tert</i> -butoxycarbonyloxyimino-2-phenylacetoneitrile
BOP	benzotriazole-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
C18, C8	octadecyl, octyl (alkyl chain or alkylated silica gel)
CD	circular dichroism
ClZ	2-chlorobenzoyloxycarbonyl
CM	carboxylmethyl
cmc	critical micelle concentration
CONTIN	one of the methods for deconvolution of spectrum (See ref. 22 of Chap. 4)
CRF	corticotropin releasing factor
Cyd	cyclodextrin
Dansyl	5- <i>N,N</i> -dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene
DCC	diacyclohexylcarbodiimide
DCU	<i>N,N'</i> -dicyclohexylurea
DEPC	diethylphosphorocyanidate
DIC	diisopropylcarbodiimide
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyl-ethylamine
DMA	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimethylamino)-pyridine
Dmb	3,4-dimethylbenzyl
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DMS	dimethyl sulfide
DMSO	dimethylsulfoxide
DPH	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DPPA	diphenylphospholylazide
DSC	differential scanning calorimetry
DVB	1,4-divinyl benzene
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDT	1,2-ethanedithiol
ESI	electrosprayed ionization
ESI-MS	electrosprayed ionization mass spectrometry

EtOAc	ethyl acetate
FMN	flavin mononucleotide
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
GRF	growth hormone releasing factor
GTP	guanosine 5'-triphosphate
Gua	guanidine
GuaHCl	guanidine hydrochloride
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HCO	formyl
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
HMPA	hexamethylphosphoric triamide
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HOBzl	benzyl alcohol
HONp	<i>p</i> -nitrophenol
HOSu	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
HPLC	high-performance liquid chromatography
ITC	isothermal titration calorimetry
KSCN	potassium thiocyanate
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
Mpa	<i>p</i> -methylphenylacetyl
MS	mass spectrometry
NAM	<i>N</i> -(9-acridinyl)maleimide
ncd	non-claret disjunctional
NMM	<i>N</i> -methylmorpholine
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
NMR	nuclear magnetic resonance spectroscopy
OBt	benzotriazole ester
OG	β -octyl glucoside
OPac	phenacyl ester
OtBu	<i>tert</i> -butyl ester
Pac	phenacyl/ 1-phenyl-1-ethanone-2-yl
Pbf	(2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl
PEG	poly (ethylene glycol)
PHB	<i>p</i> -hydroxymethylphenoxy/ <i>p</i> -hydroxybenzyl alcohol
Pd/C	palladium deposited on active carbon
pK _a	acidic dissociation constant
PSI	polystyrene
PyBOP	benzotriazole-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
Pys	2-pyridinesulfonyl
RP-HPLC	reversed phase high-performance liquid chromatography
SA	symmetrical carbonic anhydride (e.g., (BocPhe) ₂ O, Ac ₂ O)
SDS	sodium dodecylsulfonate
SEC	size exclusion chromatography
SS	disulfide bond
SUV	small unilamella vesicle
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate

tBu	<i>tert</i> -butyl
TEA	triethyl amine
TFA	trifluoroacetic acid
TFE	2,2,2-trifluoroethanol
TFMSA	trifluoromethanesulfonic acid
TIPS	triisopropyl silane
TLC	thin layer chromatography
TOF	time of flight
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trt	triphenylmethyl
TsO	<i>p</i> -toluenesulfonyl/ tosylate
TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
UV-VIS	ultraviolet-visible (spectrometry or wavelength region)
VH, VV	vertical/horizontal, vertical/vertical (directions of polarizers for incoming/emission light)

(天然アミノ酸) (3文字表記, 1文字表記)

Ala	A	alanine
Arg	R	arginine
Asn	N	asparagine
Asp	D	aspartic acid
Cys	C	cysteine
Gln	Q	glutamine
Glu	E	glutamic acid
Gly	G	glycine
His	H	histidine
Ile	I	isoleucine
Leu	L	leucine
Lys	K	lysine
Met	M	methionine
Phe	F	phenylalanine
Pro	P	proline
Ser	S	serine
Thr	T	threonine
Trp	W	tryptophan
Tyr	Y	tyrosine
Val	V	valine

(その他のアミノ酸)

Abu	2-aminobutyric acid
Aib	2-amino-2-methylpropionic acid
Ail	<i>allo</i> -isoleucine
Cha	cyclohexylalanine/ 2-amino-3-cyclohexylpropionic acid
Chg	cyclohexylglycine/ 2-amino-2-cyclohexylacetic acid
Nle	norleucine/ 2-aminohexanoic acid

Nva	norvaline/ 2-aminopentanoic acid
Sar	sarcosine/ <i>N</i> -methylaminoacetic acid
Xaa	amino acid (specific or non-specific ones)

(本論文中で命名した人工タンパク質等)

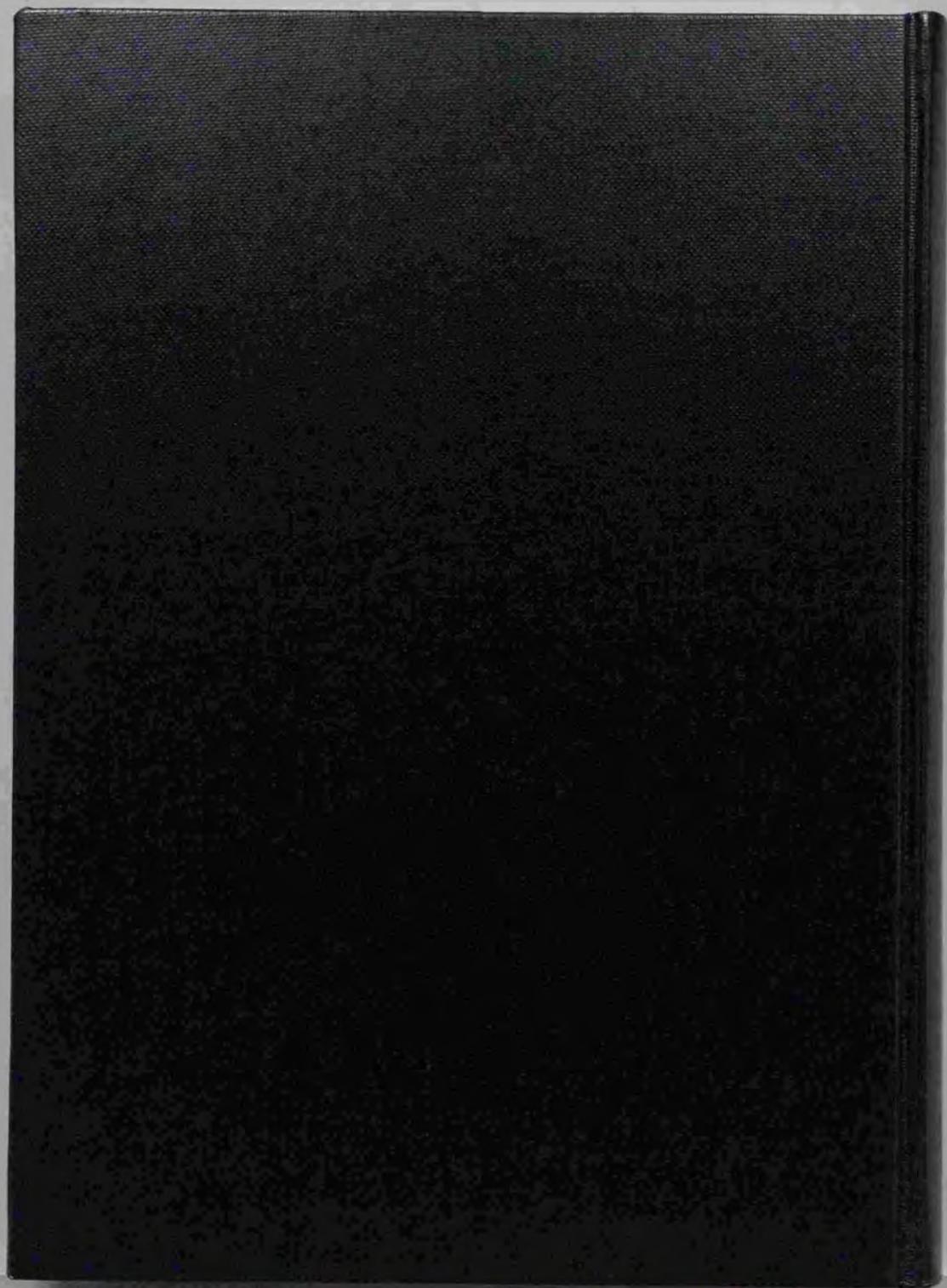
AMPHISEARCH	algorithm to survey amphipathic characteristics of protein sequence (Chap. 5)
CB	(e.g. CB13W) (Chap. 12)
DB	(e.g. [Trp ¹⁴]-DB) (Chap. 7)
FB	(e.g. FB-FF) (Chap. 7)
GU	(e.g. GU8) (Chap. 14)
G UW	(e.g. GUW5) (Chap. 14)
HA	(e.g. HA2) (Chap. 14)
HB	(e.g. HB2) (Chap. 14)
HC	(e.g. HC6) (Chap. 14)
LZ	(e.g. LZ15) (Chap. 11)
MF	(e.g. MF16) (Chap. 13)
PA	(e.g. PA4w) (Chap. 4, 9, & 10)
PLINK	beads support for solid-phase peptide synthesis with peptidyl linker (e.g. PLINK-5) (Chap. 3)

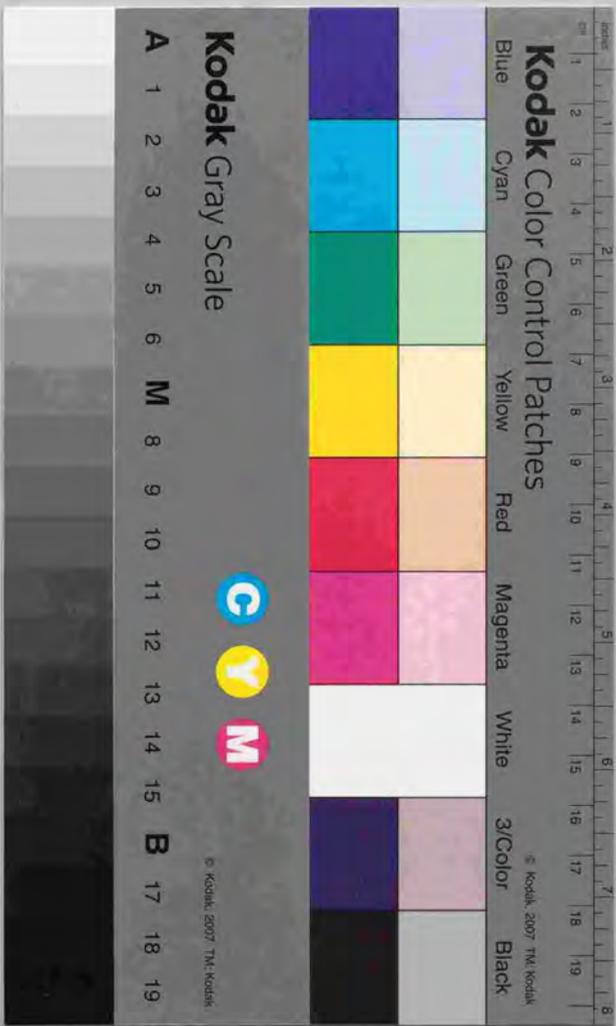
謝辞

本論文の作成にあたり、御懇意な御指導を賜りました東京大学 瓜生敏之教授に深く心より感謝申し上げます。また、本研究の個々のテーマに関わって頂きました共同研究者の方々（五十音順、敬称を失礼ながら略させていただきます。） 有坂文雄、石村美雪、市村國宏、伊藤三恵、上平初徳、大箸信一、緒方一博、鐘ヶ江裕志、城所俊一、国分友邦、皿井明倫、清水隆、竹縄辰行、原田一明、本田真也の各氏には多大な御協力と御支援御指導を頂きましたことを感謝申し上げます。また、学生時代に御指導頂きました東京大学工学部 松崎啓教授、そして繊維高分子材料研究所在職時に御指導頂きました藤重昇永氏、桜木雅子氏をはじめ多くの方々に、様々なことをお教え頂いたことがこの研究の基礎になっていることを記して、ここに感謝申し上げます。さらに研究以外の面では、虎の門病院 熊田博光部長と同病院の看護婦スタッフの方々に大変お世話になり感謝申し上げます。最後に、ささやかながら森井奈保子に感謝致します。

1998. 4. 3 記

森井 尚之





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

© Kodak, 2007 TM Kodak

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM Kodak