

論文の内容の要旨

論文題目 **Regulation of Functional Molecule Arrangement by
Utilizing Peptide-peptide Interaction**
(ペプチド間相互作用を利用した機能性分子の配置制御)

氏 名 室 田 和 敏

[緒言]

新たな材料は、工学のみならず医・薬・生命科学分野における技術革新の鍵を握っており、高度な機能を有する材料の開発が望まれている。そのための方法論の一つとして、分子レベルでの機能性団配置制御が挙げられる。分子の配置様式には「 n 次元配置」、「特定場への分子配置」、「特定位置への単分子配置」などがあり、目的とする機能に応じて使い分ける必要がある。これまでそれぞれのタイプについて種々の分子間相互作用を用いた「配置」が行われているものの、1) 多様な場への柔軟な対応性、2) より高い精密さ、などの広がるニーズに対応するには十分ではなく、より優れた配置手法の開発が求められている。

一方、生体内でポリペプチドはその一次配列の情報に基づいて自発的に高次立体構造を形成し、アミノ酸側鎖官能基などの空間配置制御を達成している。ペプチドフラグメント間の疎水相互作用、静電相互作用、ならびに水素結合等が選択的かつ協同的にはたらくことで、ユニット間の相互配置が厳密に調整され、機能の発現に至っている。そこで、生体の優れた空間配置能力を模し、任意の空間配置性を得るため、これまでにペプチド一次配列と高次構造の関係について多くの知見の獲得が成されている。そこで本研究では、目的となる配置様式に最適となるようペプチド一次配列を設計し、そのペプチドの高次構造を利用して機能性分子の配置の制御を行った。

[実験と結果]

1. コイルド・コイル構造を利用したタンパク固定化ヒドロゲルの開発

「特定場への分子の配置」として、場としてヒドロゲル、配置する分子としてタンパク質を用いる配置制御を行った。刺激に応答してタンパク質の吸着、放出を制御するゲルはこれまでも報告されているが、用いられた外部刺激は、温度、pH 変化等に限定されている。使用可能な外部刺激の種類の増加は、より自在な薬剤放出を可能とするため、優れたツールの開発に必要となる。

そこで、特異的ペプチド間相互作用を利用したヒドロゲル中へのタンパク質固定化とペプチド分子を新規刺激とする脱離システムの開発を目指した。

タンパク質をヒドロゲル中に固定化する手法として、ヘテロストランドコイルドコイル構造を形成するペプチドに着目した。ペプチド鎖の一方 (1 α E 配列) をタンパク質の両末端に複合化し、ゲル中には相補的配列を持つペプチド (1 α K 配列) を固定化した (Fig. 1)。2本のペプチド間における特異的ヘテロコイルドコイル構造形成によって、ゲル中にタンパク質が固定化されることを期待した。また、固定化されたタンパク質は外部からの1 α Kあるいは1 α Eペプチド添加によってゲル外に放出されると考えた。今回の実験では、ゲルへの吸着・脱離挙動を容易に調べるために、タンパク質として、緑色蛍光タンパク質 (GFP)を用いた。

設計したペプチドのコイルド・コイル形成能を確認するため、NTrp-1 α K、NDns-1 α EY、CDns-1 α EYのCDスペクトル測定、並びにTrpからDnsへのFRET測定を行った。その結果、1 α Kと1 α EYはパラレルの配向でコイルド・コイル構造を形成することを確認した。また、NTrp-1 α K存在下における1 α E-GFP-1 α EのCDスペクトルから、GFP上でのコイルド・コイルの形成が示唆された。一方、1 α E-GFP-1 α EのUV-visスペクトル、蛍光スペクトル上ではNTrp-1 α Kの添加による変化は見られず、コイルド・コイル形成はGFPの物性に影響を与えないことが分かった。

吸着実験に用いるヒドロゲルは、アクリルアミド、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド、NAcr-1 α K (10000:25:1)と過硫酸アンモニウム、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミンをバッ

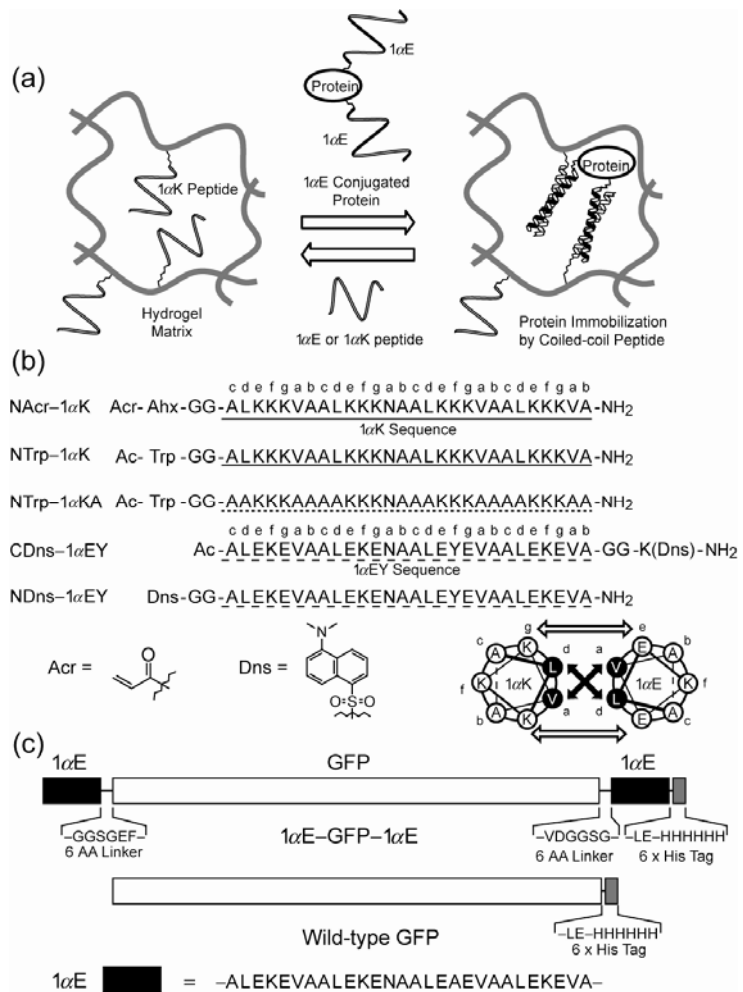


Figure 1. (a) Schematic illustration of the protein immobilization of a hydrogel using designed coiled-coil peptides; (b) Structure of designed peptides; (c) Structure of designed protein, 1 α E-GFP-1 α E.

ファー中で反応させて得た。得られたゲルを 10 μ M GFP 溶液に加え、ゲル中へ GFP の固定化を行った。その結果、1 α E-GFP-1 α E は 1 α K を有するゲルに強い固定化能を示したのに対し、GFP はゲル中に固定化されなかった。さらに、1 α K を欠くゲルの場合もタンパク質の固定化は見られなかった。この結果は 1 α K と 1 α E のコイルド・コイル構造形成が、効果的なタンパク質固定化に寄与していることを示唆している。

脱離実験は 1 α E-GFP-1 α E 固定化ゲルに NTrp-1 α K、NTrp-1 α KA、NDns-1 α EY を添加することで行った。コイルド・コイル形成能を持つ NTrp-1 α K、NDns-1 α EY の存在下では、速やかに 1 α E-GFP-1 α E の脱離が起こり、ペプチド非添加時と比べて、5 倍量が脱離した。対照的に、NTrp-1 α K と電荷量は同じだが、Leu、Val を Ala に変えコイルド・コイル形成能を失わせた NTrp-1 α KA では、ペプチド添加による脱離効果が見られなかった。すなわち、タンパク質の可逆的脱離には単なる電荷相互作用ではなく高次構造の形成が重要であることが示された。コイルド・コイル構造の利用により、高い選択性を持った脱離が可能であることが示唆された。

次に、ゲル中へのタンパク質の固定化量、脱離量、ならびに脱離速度の制御に向け、タンパク質に融合したペプチドの数、ならびに融合位置に関する知見の獲得を試みた。そこで、1 α E を 2 本持つ 1 α E-GFP-1 α E に加えて、GFP の N 端、または C 端の一方に 1 α E 配列を複合化した 1 α E-GFP と GFP-1 α E を新たに調製した。三種の GFP の固定化挙動の比較より、平衡に達するまでの時間はペプチドが N 端にあるものは短く、C 端のみの場合は長くなることが判った。吸着量はいずれも同程度であった。脱離実験は、GFP 誘導体含有ゲルに NTrp-1 α K、および NDns-1 α EY を加えて行った。その結果、添加剤の種類、ペプチドの導入位置、本数のいずれも脱離挙動に関与していることを明らかにした。

2. グルコース応答性タンパク放出ゲルの開発

前節ではペプチドに応答する新規刺激応答性ゲルの構築を行った。ドラッグデリバリーシステムなどへの応用を考えた場合、多様な任意の刺激に応答できるよう改変する必要がある。そこで本節では刺激の種類を変える方法として、二段階応答性ゲルを考案した (Fig. 2)。この系ではタンパク含有ゲルに外部からペプチドを加えて脱離を促すのではなく、タンパク含有ゲルと刺激応答性ペプチド含有ゲルを予め共存させておく。第一段階では、任意の外部刺激に応答したペプチドの放出が起こり、次に、このペプチドがタンパク質の放出を促すことを狙っている。二段階反応により、タンパク質をさらに改変することなく多様な刺激を利用可能となる。さらに、ペプチドは様々な非天然機能団や非標準アミノ酸を用いた改良が可能であるため、より多様な刺激に応答するようになると期待される。本実験ではゲルにペプチドを固定するため、ボロン酸含有ゲル BAgel とグリセロール結合ペプチド NTrp-CTGO-1 α EY を用いた。ペプチドはボロン酸とグリ

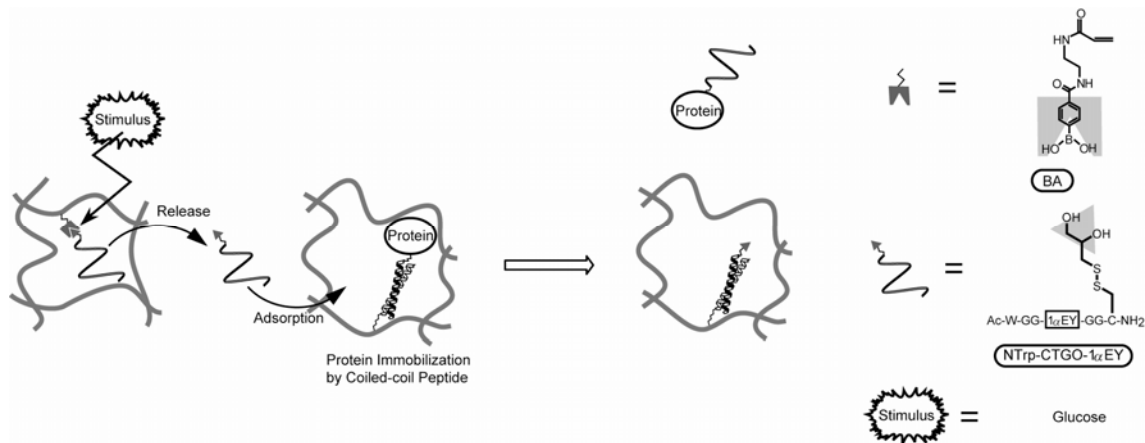


Figure 2. Schematic illustration of two-step approach of glucose-sensitive protein-release gel.

セロールの結合によりゲル中に固定化され、グルコース添加によりその結合が解けて放出される設計とした。

脱離実験において、 $1\alpha\text{E-GFP}$ 含有ゲルにグルコースを加えたのみでは $1\alpha\text{E-GFP}$ の放出は見られなかった。一方、 $1\alpha\text{E-GFP}$ 含有ゲルと $\text{NTrp-CTGO-}1\alpha\text{EY}$ 含有ゲルの共存下グルコースを添加することで脱離量の増加が観察された。この結果は二段階反応により $1\alpha\text{E-GFP}$ が放出されていることを示唆しており、タンパク放出の刺激を任意に変えられることが示された。

3. 環状ペプチドを用いた分子の一次元配置テンプレートの開発

次に、より高い精密性を目指した「一次元配置」へのペプチド高次構造の利用を行った。一次元配置制御を行うためのペプチド基体として、Ghadiri らにより報告されたD-,L-アミノ酸交互環状ペプチドに注目した。このペプチドは高い平面性を持ち、アンチパラレルに一軸方向に水素結合を形成し、チューブ状構造をとることが知られている。そこでこのアミノ酸側鎖に機能性分子を導入することで、チューブ状構造形成に伴い、機能性分子を一軸方向に配置することが可能になると考えた。しかしながらこの分子は擬4回回転対称性を有するため、隣接分子間のスタッキング様式は一通りとならず、機能性分子はチューブ上にランダムに配置される。そこで環状ペプチド中に Lys、Glu という静電相互作用部位を導入することで、スタッキング様式の制御を試みた (Fig. 3)。スタッキング様式の知見を得るため、蛍光プローブとしてピレンを導入した。今回の設計では、AP ではプローブであるピレニル基がチューブ側面の同一方向に連なり、BP では隣接ユニット間でピレニル基が互いに逆方向を向いた構造が期待される。

透過型電子顕微鏡観察、赤外吸収スペクトル測定の結果、AP、BP 共に、アンチパラレル構造により環状ペプチドが一軸状に集積していることが分かった。さらに、遠心式限外濾過フィルターを用いた解析の結果、溶液中でも 90 量体以上の集合体を形成することを明らかにした。以上の結果より、AP、BP は水溶液中でもマクロには同一のチューブ状構造を形成していることが示

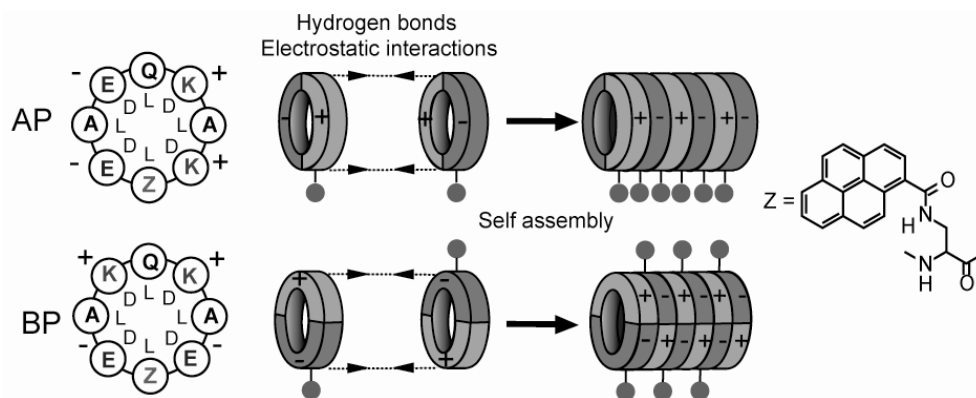


Figure 3. Designed cyclic peptides.

唆された。

次に、ピレニル基の分光学的特性測定によりスタッキング様式の考察をおこなった。UV-vis スペクトルにおいて、バッファー中の AP のスペクトルは BP に比べブロードニングしていた。この結果は、AP 上のピレニル基同士は BP に比べ近接していることを示唆している。蛍光スペクトルにおいて、変性剤中では AP、BP は同一のスペクトルを示した。一方、バッファー中においては BP では 480 nm の蛍光が全く観察されないのに対し、AP では蛍光を示し、エキシマー構造の形成が示唆された。ピレン分子周辺の微視的環境を反映する I_3/I_1 の値は、AP、BP それぞれ 1.25、0.83 であり、AP の方がピレンがより密集し、疎水的になっていることが示唆された。これらの結果は今回の分子集合体設計に合致するものであり、ペプチド間相互作用が機能性基の精密な一次配置制御にも応用可能であることを示している。

[結論]

本研究を通じて、ペプチド間の協同的相互作用が高選択性、汎用性、精密性のある「配置」の実現に有効であることを示すことができた。今回得られた設計指針は、分子配置制御を踏まえた新規材料開発の発展に役立つと考えられる。