The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	刺激応答性構造変化能を有する新規α-helical coiled coilペプチドの分子設計に関する研究
Author(s)	鈴木, 和雄
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42715
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【3】

氏　　名	鈴木和雄（すずき かずお）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　15696　号
学位授与年月日	平成12年8月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**刺激応答性構造変化能を有する新規α-helical coiled coil ペプチドの分子設計に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授　今西　武 （副査） 教授　小林　祐次　　教授　大森　秀信　　教授　土井　健史

論文内容の要旨

人工タンパク質の分子設計における最終目標は、天然タンパク質の構造や機能の知見を基に高機能性人工タンパク質を創製することにある。そのための第一段階として、合成ペプチドに設計通りの構造をとらせる検討や、これらの特定構造を有する合成ペプチドにイオンチャンネル活性や酵素活性等の機能性を付与する検討が試みられている。しかし、今のところこれらの設計においては機能部位のみが作製されているため、その機能は常にオンの状態である。天然タンパク質の様に外部環境に応答した機能のオン／オフ制御が可能になれば、より高機能な人工タンパク質の創製につながると期待される。

α-Helical coiled coil 構造（以下、単に「coiled coil 構造」と略記）は、天然タンパク質中に頻出することやその構造が比較的単純なことから、ペプチドによる構造／機能の構築に関する研究においてよく用いられている。そのアミノ酸配列は特徴的な7残基パターン（*abcdefg*）から成っており、*a* 位置及び *d* 位置には疎水性アミノ酸残基が強く保存されている。このようなアミノ酸配列のペプチドはα-helix を形成した際に、その疎水性アミノ酸残基がヘリックス鎖の一方の面に偏在することになる。このため、水溶液中では疎水性相互作用によって数本のペプチド鎖がα-helix を形成しながら自己会合し、会合体内部には疎水性のコアが形成される。この際、右巻きのα-helix 鎖数本が左ねじれに束なった超らせん構造が形成され、また通常のα-helix は1ターン3.6残基であるが、coiled coil 構造では3.5残基となる。

超らせん構造を形成することから、coiled coil 構造は種々の天然タンパク質の会合に深く関与している。また、会合によって機能性を発現するようなタンパク質あるいはそのドメインに coiled coil ペプチドを融合すれば、自己会合の補助を介した人為的な機能発現の誘導が可能である。ここで、もし coiled coil ペプチドが刺激に応答して構造を大きく変化させれば、このような融合タンパク質の機能もオンからオフへと変化すると考えられる。実際、天然には coiled coil 構造の構造変化によって機能性が制御されているタンパク質も存在する。例えば、マクロファージスカベンジャー受容体（macrophage scavenger receptor；MSR）は中性条件下で結合したリガンドを酸性条件下で解離するが、この結合／解離の制御には coiled coil ドメインの構造変化が関与していることが示唆されている。以上の背景から著者は、刺激応答性構造変化能を有する coiled coil ペプチドの分子設計に関する研究を実施した。

まず MSR に着目し、その coiled coil ドメイン由来のペプチドの coiled coil 構造を調べることによって、coiled

coil ドメインのC末端側半分からなるα-Cフラグメントを束ねた（α-C)$_3$ペプチドが酸性で coiled coil 構造、中性で random coil 構造という pH 依存的構造変化を示すことを明らかにした。また、（α-C)$_3$ペプチドについて種々の変異体の構造の pH 依存性を調べ、疎水性位置の Glu^{242}残基の重要性を明らかにした。さらに、疎水性コア内に集まった Glu 残基間での中性条件での静電反発による coiled coil 構造形成阻害と、酸性条件での Glu^{242}残基のプロトン化に伴う静電反発の解消による coiled coil 構造形成、という構造変化機構を提唱した。

より短鎖で合成が容易な新規ペプチドの構築を目指し、まず pH に関係なく平行三本鎮 coiled coil 構造を形成する IZ ペプチトを構築した。そして、このペプチドが溶液中で native-like 構造を有していることを明らかにした。次に、IZ ペプチドの疎水性位置の一つの Ile 残基を Glu 残基に置換することによって、酸性条件では IZ ペプチドと同様の三本鎖 coiled coil 構造、中性条件では random coil 構造という、pH 依存的構造変化を示す新規ペプチド（IZ-2aE と IZ-2dE）を得た。

また著者は、pH 変化以外の外部刺激への対応も考え、まず IZ ペプチドの疎水性コア内に His 残基による金属結合部位を有する新規ペプチド（IZ-3adH）を設計し、遷移金属イオンに応答して平行三本鎖 coiled coil 構造を形成させることに成功した。特に Ni（II）による構造形成が顕著であり、その解離定数は約 5μM であった。その Ni（II）結合部位が疎水性コア内に存在する六個の His 残基からなる正八面体型六配位構造であることを示唆した。IZ ペプチドに金属結合部位として Cys 残基を、また coiled coil 構造の安定性調節用に Ala 残基を、それぞれ導入した IZ-AC ペプチドを設計し、Cd（II）,Hg（II）のような HSAB 説（Theory of hard and soft acid and base）における軟らかい金属イオンに選択的に応答して三本鎖 coiled coil 構造を形成させることに成功した。また、Hg（II）については、過剰に添加することによって、三配位型から二配位型への配位構造が変化し、coiled coil 構造形成が阻害されることが分かった。

本研究によって得られた知見や新規ペプチドは、coiled coil 構造の刺激応答性構造変化に重要な情報を与えるだけでなく、高機能性の人工タンパク質の創製につながるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は各種の外部環境の違いにより、構造が変化する人工ペプチドの分子設計に関するもので、以下の内容を含んでいる。

1)マクロファージ・スカベンジャー受容体の coiled coil 領域のC末端半分からなるα-Cフラグメントを化学結合で3本束ねた（α-C)$_3$ペプチドを調整し、このものが pH 依存的に coiled coil 構造と random coil 構造をとることを見い出し、この知見を基に、より短鎖で同様な pH 依存的構造変化能を有する新規人工ペプチド IZ-2aE 及び lZ-2dE を得ることに成功している。

2)Ni イオンなど遷移金属イオンに依存して構造変化するペプチド IZ-3adH 及び Hg イオンや Cd イオンなど重金属イオンに選択的に依存して構造変化するペプチド IZ-AC を設計、合成し、これらが期待どおりにそれぞれのイオン依存下においてのみ3本鎖 coiled coil 構造をとることを明らかにしている。

以上の成果は博士（薬学）の学位授与に充分に値する内容であると判断する。