

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13705

研究課題名(和文)ポリペプチド側鎖の動的組換えによるタンパク質の高次構造および分子認識能の発現

研究課題名(英文) Emergence of protein-like higher-order structure and molecular recognition ability by dynamic exchange of polypeptide side chains

研究代表者

大山 俊幸 (OYAMA, Toshiyuki)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：30313472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：側鎖末端にメチルチオエステル構造を有する水溶性ポリペプチドを合成し、このポリペプチドを多種類の低分子量チオールと水中で共存させた。その結果、チオエステル/チオール間の動的結合組換えの進行が確認され、水中でのポリペプチド側鎖配列の再編成が可能であることが示された。また、側鎖組換えの進行に伴い、ポリペプチドの高次構造が変化することが明らかとなった。さらに、低分子量チオールとして水への溶解性が比較的高い化合物を使用した場合には、組換え反応時の側鎖組成および高次構造を保ちつつコポリペプチドを単離できることが示された。

研究成果の概要(英文)：A water-soluble polypeptide having a methyl thioester structure at the side chain was synthesized, and this polypeptide was reacted with various low-molecular-weight thiols in water. As a result, progress of dynamic bond exchange between thioester and thiol was confirmed, which indicates successful rearrangement of the polypeptide side-chain sequence in water. It was also revealed that the higher-order structure of the polypeptide changed with the progress of side-chain exchange. Furthermore, it was shown that when the exchange was carried out by using low-molecular-weight thiols having relatively high solubility in water, the resulting copolypeptide could be isolated while maintaining the side-chain composition and higher-order structure generated during the exchange reaction.

研究分野：機能性高分子の合成および応用

キーワード：ポリペプチド 動的共有結合 高次構造 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は可逆的に天然状態までフォールディングし機能を発現する。フォールディングはアミノ酸の配列情報に基づき行われるが、タンパク質におけるアミノ酸配列の設計原理はよく分かっていない。一方、エネルギー的に安定な単一の高次構造にフォールディング可能なポリマーはフォールディング・ファネルと呼ばれる漏斗状のエネルギー曲面をもつことが理論的に示されている。ファネル型のエネルギー曲面をもつポリマーには以下の条件が必要とされている¹⁾。

- ・ 様々な相互作用が可能な多種のモノマー（ヘテロモノマー）からなるヘテロポリマーである。
- ・ フラストレーションが最小となる配列でモノマー単位がヘテロポリマー中に配列している（フラストレーションとは、ヘテロポリマー鎖がフォールディングした時にモノマー単位間で生じる相互作用の矛盾）。

Shakhnovich らは、各ユニット間の相互作用が最小になるようにモノマーユニットの交換を繰り返していくと、フラストレーションが最小化された熱力学的に最安定な配列を持ち可逆的フォールディングが可能なヘテロポリマーが得られることを示している²⁾。従来は、この系は生物進化のモデルとしてのみ捉えられてきたが、モノマーユニットの交換は高分子主鎖への動的共有結合の導入により実現可能となっている。さらに、「主鎖切断によるモノマーユニットの交換」と「側鎖官能基の交換」は本質的に等価な生成物を与えるため（Figure 1）側鎖への動的共有結合の導入によっても Shakhnovich らのモデルは再現可能と考えられる。側鎖交換系では主鎖としてポリペプチドが使用できるため、CD スペクトルなどによる高次構造の同定も容易となる。

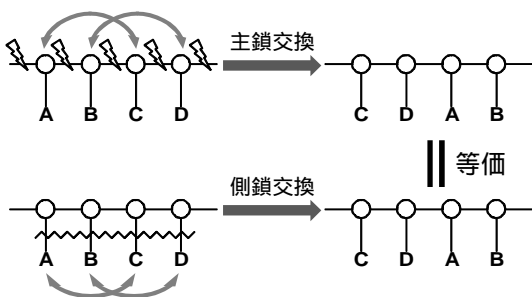


Figure 1 主鎖交換と側鎖交換の等価性

我々は、合成が簡便なイミンを側鎖に有するポリペプチドを用いた予備検討において側鎖の動的交換に成功しているが³⁾、イミン結合は水中で加水分解されるため、通常のポリペプチドが高次構造と機能を発現する溶媒である水を用いることができなかった。有機溶媒中では溶媒のヘリックス誘起効果が大きいので、側鎖交換前後で微小な CD スペクトル変化はあったものの、基本的には α -ヘ

リックス構造のままであった。以上より、「動的交換による配列の安定化→特定の安定な高次構造」の実現には、水中で安定な動的共有結合を側鎖に有するポリペプチドの使用が必須であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

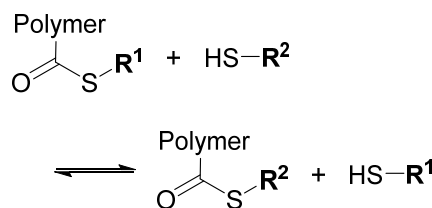
前項でも述べたように、本研究では、水中におけるポリペプチド側鎖の動的交換によって、アミノ酸ユニット間のフラストレーションが最小化された熱力学的に最安定な配列を有するポリペプチドを創出すること、およびそのポリペプチドが可逆的フォールディング能および高次構造に基づく機能を有しており、天然のタンパク質でのみ実現されている「モノマー配列 高次構造 機能」の創発現象が人工的に実現可能であることを示すことを目的としている。

これらの目的の実現のために、まず水中での開裂・再結合が可能な動的共有結合を側鎖に導入したホモポリペプチドを合成する。次に、得られたホモポリペプチドを用いた水中での動的な側鎖交換を実現する。さらに、側鎖交換に伴う各官能基の導入率や高次構造の変化などを調査することにより、側鎖の動的な結合再編成を十分に行ったコポリペプチドが、タンパク質と同様の「熱力学的に安定なモノマーユニット配列に基づく特定の安定な高次構造」を有し、可逆的フォールディング性および高次構造に基づく機能を発現可能であることを明らかにする。

動的共有結合部位としては、水中の分解性が低く、かつ比較的親水性が高いチオエステル結合をポリペプチド側鎖に導入し、側鎖チオエステル/低分子量チオール間での動的結合組換えを利用した側鎖再編成を行う。

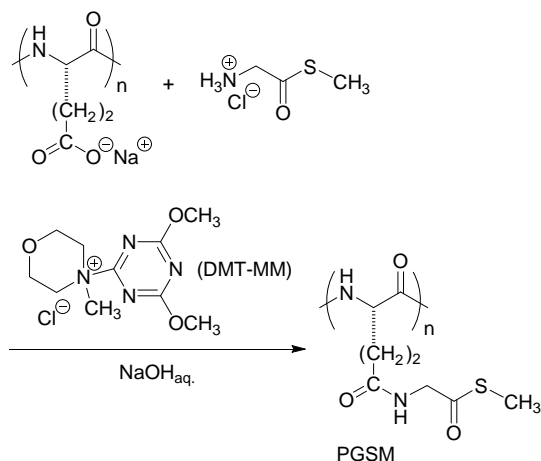
3. 研究の方法

本研究で用いる動的共有結合には「組換え時に側鎖間の相互作用が乱されない」こと、「通常のポリペプチドが高次構造と機能を発現する水中での組換えが可能である」こと、および「組換え後に配列の固定化が可能である」ことが求められる。よって本研究では、特別な刺激なしで水中での動的結合組換えが可能でチオエステル/チオール系⁴⁾ (Scheme 1)を用いることにより種々の官能基のポリペプチド側鎖への導入と側鎖配列の最適化を達成し、組換え後にチオールを迅速に除去することにより側鎖配列を固定化する。



Scheme 1

まず、側鎖にカルボキシル基を有するポリペプチドであるポリ(L-グルタミン酸)のナトリウム塩とチオグリシン S-メチルエステル塩酸塩との縮合反応により、側鎖にチオエステル結合を有する水溶性ポリペプチドホモポリマー-PGSM を合成する (Scheme 2)。



Scheme 2

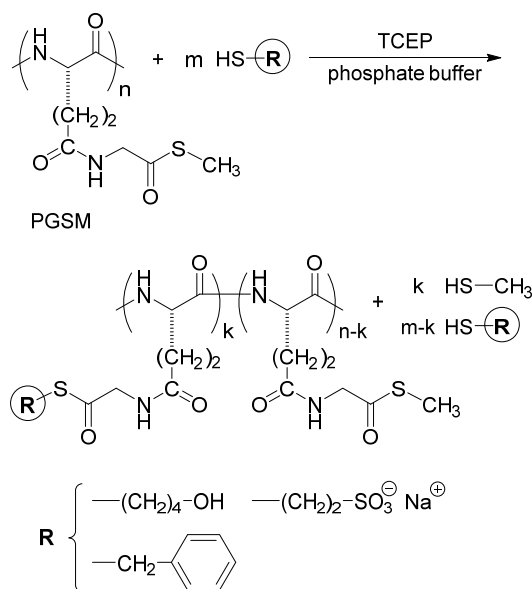
次に、得られた PGSM を多種類のチオールと水中で共存させ、側鎖官能基の動的組換えを行う。フラストレーション最小化に伴うフォールディング能の発現のためには様々な相互作用が可能な多種の官能基を導入することが重要であるので、水素結合、疎水相互作用、 π - π スタッキング、極性相互作用、イオン結合など、様々な相互作用が可能な多種類の官能基を有するチオールを使用する。

組換え反応の進行は、高分子鎖へのチオールの導入量を $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより追跡することで確認する。高次構造の変化は CD スペクトルの形状の変化により確認する。ポリペプチドでは波長 190-240 nm における CD スペクトル形状により主鎖二次構造の同定が可能であるため、側鎖の動的結合再編成に伴う高次構造の創発が確認可能である。

4. 研究成果

PGSM と種々の低分子量チオールをリン酸バッファー中で反応させ、側鎖官能基の動的組換えを行った (Scheme 3)。側鎖間に種々の相互作用を導入するため、ホモポリマー側鎖末端のメチル基の他に、低分子量チオールとして 4-mercapto-1-butanol (MB), sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA), benzyl mercaptan (BM) を選択した。また、チオールの酸化によるジスルフィドの生成を防ぐため、還元剤として tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) を添加した。

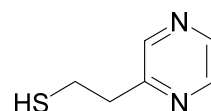
MB, MESNA および BM を PGSM 側鎖のチオエステル基に対して 3 当量用いて組換え反応を行い、反応の進行を $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより追跡した結果、メチル基の脱離に由来するピークの強度の減少と、ポリマーに



Scheme 3

新たに導入された官能基に由来するピークの出現が観測され、側鎖組換え反応の進行が確認された。続いて円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により、PGSM の二次構造および動的組換え反応の進行が高次構造に及ぼす影響について調査した。その結果、PGSM が α -ヘリックス構造を有していること、および側鎖官能基の組換えに伴ってポリペプチドが二次構造を変化させていることが明らかとなった。また、6 時間の組換えによりポリペプチドの二次構造が安定化していることが示唆された。

組換え反応後のコポリペプチドの単離について検討を行ったところ、低分子量チオール間の溶解性差が大きいため、単離操作において低分子量チオールを同時に除去することができず、その結果、一部のチオールを除去した段階でさらに組換えが進んでしまうことが明らかとなった。そこで次に、Scheme 3 の系において最も親水性の低いチオールである BM の代わりにより親水性の高い 2-mercaptoethylpyrazine (MP, Scheme 4) を用い、PGSM 側鎖のチオエステル基と 3 種の低分子量チオール (MB, MESNA, MP) との動的側鎖組換えが高次構造に及ぼす影響を調査した。



Scheme 4

PGSM のチオエステル基に対して MESNA と MB を各 3 当量、MP を 1 当量用いた側鎖組換え反応の進行を $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより追跡した。反応開始から 21 時間後のスペクトルを Figure 2 に示すが、ポリペプチド側鎖に導入された MESNA, MB および MP に

対応するピークの出現が観測され、組換え反応の進行が確認された。また、側鎖組換えに伴う主鎖高次構造の変化を CD スペクトル測定により追跡したところ、反応の進行に伴い主鎖高次構造が α -ヘリックス構造から変化することが明らかとなった (Figure 3)。

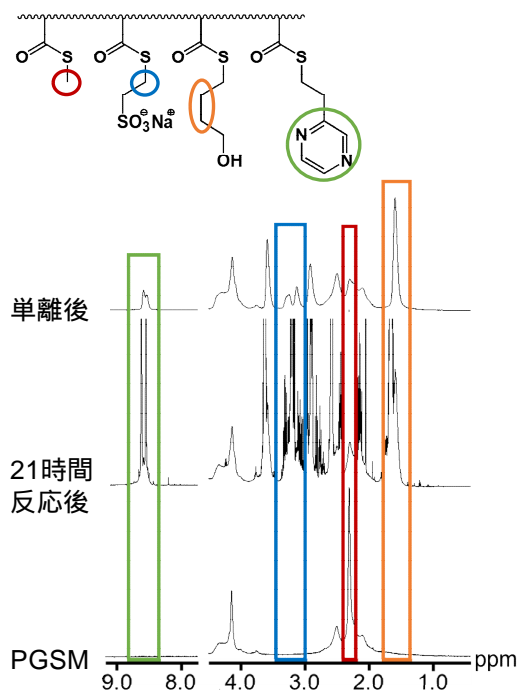


Figure 2 PGSM, 反応溶液 (21 時間反応後) および単離したコポリペプチドの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (phosphate buffer (D_2O), rt)

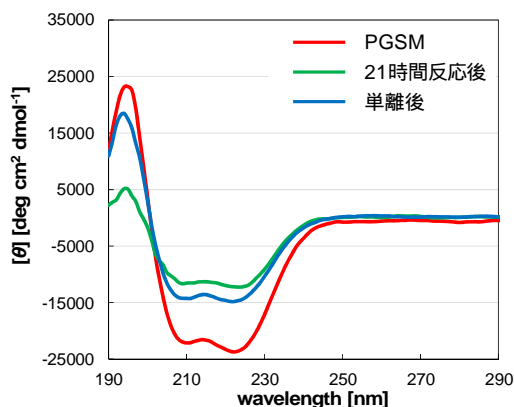


Figure 3 PGSM, 反応溶液 (21 時間反応後) および単離したコポリペプチドの CD スペクトル (phosphate buffer (H_2O), 25)

そこで次に、側鎖組換え後のポリペプチド溶液を塩析しポリペプチドと低分子量チオールとを分離したのちに、ポリペプチドを透析により精製した。単離したコポリペプチドの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (Figure 2) における各ピークの積分強度比より、側鎖組成はメチル基 (PGSM 由来): 24%, スルホネート基 (MESNA 由来): 9%, OH 基 (MB 由来): 54%, ピラジル基 (MP 由来): 13%と算出さ

れた。また、単離後のポリペプチドの CD スペクトル形状は組換え反応中のスペクトルと大きく変化しておらず (Figure 3) 組換え時の側鎖組成および高次構造を保ちつつポリペプチドを単離することに成功したことが示唆された。

<引用文献>

- 1) J. D. Bryngelson, J. N. Onuchic, N. D. Socci, P. G. Wolynes, *Proteins*, **21**, 167 (1995).
- 2) E. I. Shakhnovich, A. M. Gutin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7195 (1993).
- 3) 遠藤慶一郎, 高橋昭雄, 大山俊幸, 高分子学会年次大会予稿集, **61**, 285 (2012).
- 4) Y. Ura, J. M. Beierle, L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science*, **325**, 73 (2009).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 7 件)

大山俊幸 (他 4 名), "Induction of change in higher-order structure of a polypeptide by the reaction using dynamic covalent bonds introduced in its side chains", The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), 2016 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

大山俊幸 (他 4 名), "動的共有結合を利用したポリペプチド側鎖の動的組換え反応に伴う高次構造変化", 第 65 回高分子討論会, 2016 年 9 月 15 日, 神奈川大学横浜キャンパス (神奈川県・横浜市)

大山俊幸 (他 2 名), "チオエステル交換反応を利用したポリペプチド側鎖官能基の動的組換えにおけるチオール構造の影響", 第 65 回高分子学会年次大会, 2016 年 5 月 26 日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

大山俊幸 (他 1 名), "Synthesis of a water-soluble polypeptide containing thioester bonds on its side chains and dynamic exchange reaction using the thioesters", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015 年 12 月 16 日, Honolulu (USA)

大山俊幸 (他 2 名), "Stabilization of higher-order structure of polypeptides by dynamic exchange of functional groups on their side chains", The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME 2015), 2015 年 10 月 20 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

大山俊幸 (他 2 名), "動的共有結合を用いたポリペプチド側鎖官能基の動的組換えによる高次構造の創出", 第 64 回高分子討論会, 2015 年 9 月 15 日, 東北大学川内キャンパス (宮城県・仙台市)

大山俊幸(他2名),“ポリペプチド側鎖の動的組換えにおける側鎖官能基の効果”,第64回高分子学会年次大会,2015年5月29日,札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 俊幸 (OYAMA, Toshiyuki)
横浜国立大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 30313472

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

所 雄一郎 (TOKORO, Yuichiro)
横浜国立大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 80709692

(4) 研究協力者

井上 侑紀 (INOUE, Yuki)
浦井 聡史 (URAI, Satoshi)
中川 和俊 (NAKAGAWA, Kazutoshi)
北原 友貴奈 (KITAHARA, Yukina)