

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19550163
 研究課題名 (和文) ペプチド骨格におけるらせん構造の持続と反転に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on Helix Propagation and Reversal in Peptide Backbones
 研究代表者
 稲井 嘉人 (INAI YOSHIHITO)
 名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：60223210

研究成果の概要： 蛋白質らせん鎖の巻き(右巻きあるいは左巻き)の持続と停止は、形状および機能の鍵となる現象である。本研究では、らせんの巻き情報の発現、持続、停止・反転を支配する要因を、異常アミノ酸を含む人工ペプチドを用いて調べた。このモデルペプチドは、巻き方向に特化したユニークな情報を得ることができる。様々なペプチドを用いた実験結果から、ペプチドの化学構造や外部条件(添加剤や溶媒など)が、巻き情報の支配因子として重要であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

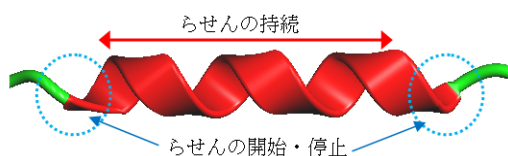
研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・生体関連化学

キーワード： 生体関連高分子、ペプチド、らせん構造、不斉情報、計算機化学、キラル相互作用、円二色性

1. 研究開始当初の背景

らせん構造は生体高分子の重要な基本骨格であり、生体構造の非対称性や生命機能の源となっている。高分子らせんは、一方の巻きを持続させるとともに、その巻き情報を停止あるいは反転させる傾向を持つ。



(らせん模型はArgusLabで作図：Thompson, M. A. ArgusLab 4.0.1; Planaria Software LLC: Seattle, WA, 2004.)。多くの蛋白質はα-ヘリックスやβ-ストランドなどの2次構造が1本鎖の上に出現し、らせんの持続と停止を繰り返しながら高次構造を発現している。

らせん鎖の反転については、蛋白質中の右巻きα-ヘリックス鎖のC末端グリシン(Gly)残基でしばしば見られる。このGly残基は、

左巻きらせんのコンホメーションを取る傾向がある [“Schellman-motif”あるいは“ \cdot -motif”と定義されている: Schellman, C. In Protein Folding; Jaenicke, R., Ed.; North-Holland Biomedical Press, Elsevier: Amsterdam, 1980; pp 53-61. Aurora, R. Srinivasan R, Rose GD. *Science* 264, 1126 (1994).].

らせん鎖の巻き情報を支配する要因を解明するため、様々な人工らせん鎖を用いた研究が展開されている[Nakano, T.; Okamoto, Y. *Chem. Rev.* 101, 4013 (2001). Yashima, E.; Maeda, K.; Nishimura, T. *Chemistry* 5, 42 (2004). Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. *Chem Rev.* 101, 3893 (2001). Green, M. M.; Peterson, N. C.; Sato, T.; Teramoto, A.; Cook, R.; Lifson, S. *Science* 268, 1860 (1995).].

しかし、“ \cdot -アミノ酸”からなるペプチド骨格において、キラル情報に着目したらせんの持続と反転の問題は系統的に解明されていない。これは、蛋白質の基本単位がL-アミノ酸であるため、巻き方向に特化した問題に単純化できないためである(L-アミノ酸シーケンスは、一方のらせんを優先したり、らせん以外の立体構造を形成するため)。

2. 研究の目的

本研究では、蛋白質模倣鎖(ペプチド骨格)におけるらせんの持続と反転に及ぼす要因、さらに巻き情報の発現および伝達に関する要因を明らかにする。

本研究の特徴は、らせん形成性の異常アミノ酸からなるアキラルセグメントを用いる点にある。このセグメントは、キラル作用が全くない状況では、左右のらせんを同じ確率で取る。ここに様々なキラル刺激や情報が作用することによって、巻きの優先性に偏りが発生し、結果的にらせんの巻きに特化した情報が得られる。

この光学不活性らせんに、様々な内因的効果(ペプチドの化学構造)および外因的効果(添加剤や外部環境)を与えたとき、誘導されるらせんの持続と反転、および不斉情報の発現や伝達について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 光学不活性らせんセグメントの設計と合成

異常アミノ酸である(β - \cdot -aryl \cdot , \cdot -dehydroalanine (\cdot - β AA) と \cdot -aminoisobutyric acid (Aib)からなるらせんペプチドをアズラクトンの開環鎖延長により合成した。適宜、このセグメントの適当な位置にキラル残基を導入したり、末端部分を化学修飾した。また、N末端へのキラルアミノ酸オリゴマーの導入は、N末端アミノ基を開始剤としてアミノ酸NCAの重合により行った。

(2) らせん構造の証明: 赤外(IR)、核磁気共鳴(NMR)、円二色性(CD)などの分光学的測定により調べた。

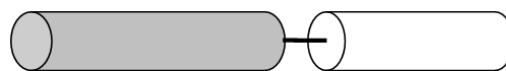
(3) 巻き情報の特定: 様々な条件下、対象ペプチドのCDスペクトルを測定した。ペプチド鎖内の発色基の吸収帯に注目し、その領域でのCDパターンを符号より巻き方向を特定した。さらに、CD信号強度からその巻きの優先性を推定した。

(4) 計算機化学によるシミュレーション: 分子軌道計算により、モデルペプチドのらせん鎖の構造最適化やスペクトルの再現を行った。

4. 研究成果

主に得られた成果を以下に示す。

(1) キラルーアキラルセグメント間の不斉情報伝達: らせん持続と反転



右巻きヘリックス (L-アミノ酸オリゴマー) 光学不活性らせん (アキラルセグメント)

① C末端近傍のキラル残基によるらせん制御

アキラル鎖のN末端にL-アミノ酸オリゴマーを有するペプチドでは、らせん反転を起こし、右巻きから左巻きのヘテロキラルヘリックスを優先する[Ousaka, N.; Inai, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 14736 (2006).]. ここでは、L-アミノ酸オリゴマーが右巻き α -ヘリックス構造を形成し、キラルーアキラル鎖境界付近で反転が起こる。次に、この左巻き情報がアキラル鎖部分にドミノ的に持続し、結果として右巻きから左巻きの反転が起こることを既

に見出している。このシーケンスのC末端部分にキラル残基を導入した場合、そのキラリティによってらせんの持続(ホモキラルヘリックス)および反転(ヘテロキラルヘリックス)を優先することも示唆されている。

本項では、このらせん持続-反転の指向性に及ぼす外部条件の影響を検討した。特定の極性溶媒中では、何れのペプチドでもホモキラルヘリックスを取り、らせん持続を優先した。この溶媒と低極性溶媒の混合系において、らせん持続-反転がその溶媒組成に応じて変化することが分かった。また、ある溶媒組成における温度変化より、らせん持続-反転の優先性を制御できる可能性を示した。

分子軌道法による構造計算より、ホモキラルヘリックスは棒状構造、ヘテロキラルヘリックスは屈曲構造と推定できた。即ち、蛋白質模倣らせんの持続-反転に伴う形状変化を外部刺激により制御できる可能性を示す。

② キラル-アキラルセグメント間の結合部分の影響

らせん持続-反転の優先性に及ぼすキラル-アキラルセグメント間のスペーサーの効果を調べた。その結果、スペーサーの違いが、持続-反転の優先性に影響を与えることが分かった。即ち、結合部分の化学構造が、らせん鎖間の情報伝達に大きく寄与することが示された。

(2) らせん末端構造とアミノ酸シーケンスに関する理論的研究

本研究では、らせん構造の停止がその末端のアミノ酸シーケンスによってどのように影響するかを理論的観点から検証した。

右巻き α -ヘリックス構造をとる L-アラニンオリゴマーの C 末端にジペプチド単位(-X-Y-)を導入したペプチドに着目した。様々な-X-Y-単位の初期構造からその安定構造を分子軌道計算により予測した。巻き方向の指標として、X, Y 残基の主鎖二面角 ϕ (C-N-C α -C)の符号を用いた ($\phi < 0$: 右巻き)。X, Y = L-Ala の場合、 $\phi < 0$ が安定となる傾向を示した。最安定構造は、右巻きらせん構造を保持した。一方、反転構造はより高いエネルギー領域に現れた。これは、L-Ala 残基は固有の

右巻き指向性により、鎖末端でらせん反転を起こしにくいと予想できる。

一方、Gly 残基を含む場合(X = Gly, Y = L-Ala)、その部位でらせん反転が見られた。アキラル残基の導入により、らせん反転がエネルギー的に許容となった。この傾向は、D-Ala 残基導入のとき、さらに顕著になった。

以上の結果より、C末端部位でのらせん停止を支配する要因として、アミノ酸の立体化学の重要性が挙げられる。Gly 残基の C 末端部位への導入によるらせん反転は、天然蛋白質系の"Schellman-motif"などに見られる。また、反転によって、らせん分子全体の dipole moment が低下することが分かった。

(3) 計算機化学によるらせん構造およびスペクトルの予測

本研究の主題の一つは、ペプチドラせん鎖上でキラル情報がどのように伝搬するかを解明することである。このため、 Δ^2AA と Aib からなる光学不活性らせんセグメントを用いてきた。研究遂行には、このセグメントのらせん構造の証明および巻き方向の特定が必須である。

通常、これらの解析を溶液状態で行うためには、NMR、IR、CD 測定を用いる。一方、デヒドロアミノ酸は、その残基内の C α =C β の存在により、基本アミノ酸型ペプチドとは異なるスペクトル特性を示す。IR スペクトルでは、C α =C β の存在により複雑なアミドパターンを示す [例えば、Ousaka, N.; Inai, Y.; Okabe, T. *Biopolymers* **83**, 337 (2006).]。また、巻き方向を決定するための CD スペクトルについても、共役系残基であるため厳密な電子遷移状態および旋光性などの解釈が必要となる。

そこで、実験結果の理論的解釈を行うために、IR や CD スペクトルの分子軌道法によるシミュレーションを行った。 Δ^2AA 残基を導入したモデルペプチドについて、分子軌道計算による構造最適化から、らせん構造を予測した。この構造に対して IR スペクトルを計算したところ、アミドパターンにおいて実験で観測される傾向を示した。即ち、C α =C β の存在が C=O 振動エネルギーを変化させることを理論的に証明できた。

CD スペクトルの計算に対しては、まず Δ^2AA 残基含有ペプチドのらせん構造をエネルギー最小化によって求めた。次に、得られた構造に対して、半経験的分子軌道計算により電子遷移状態およびキロオプティカルパラメーターを算出し、CD スペクトルを再現した。理論 CD と実験 CD スペクトルの比較により、ペプチドらせん鎖の巻きおよびその伝達に関する情報を得ることが出来た。

一部のモデルペプチドについては、密度汎関数法を用いたより高い精度の CD シミュレーションを行った。結論として、半経験的分子軌道法に基づく計算結果の妥当性を示すことができた [Ousaka, N.; Inai, Y. *J. Org. Chem.* **74**, 1429 (2009).].

(4) 外部因子によるペプチドらせんの巻き情報の伝達

① 複数の発色基を含むペプチド

特定のキラル分子が、アキラルペプチド鎖の N 末端に作用し、巻き方向を発現させることを実験的に示している [Inai, Y.; Komori, H.; Ousaka, N. *Chem. Rec.* **7**, 191 (2007).]. 特に、N 末端側と C 末端側に異なる発色基を導入したシーケンスにより、片末端で受けたキラル情報を他端に伝達できる実験結果を既に有している。

この情報伝達に及ぼす様々な外部因子の効果を検証した。その結果、温度やキラル添加剤の違いによって、巻き方向の発現および C 末端部位への巻き情報の伝達を制御できることが分かった。また、複数の芳香族性側鎖を有する異なるアキラルペプチドについても不斉情報の伝達に関する知見を得た。

さらに、鎖中に L-アミノ酸残基を組み込んだ 2 種類の芳香族性デヒドロ残基を含むキラルペプチドについても調べた。外部分子のキラリティの符号によって、N 端側セグメントおよび C 端側セグメントのらせん性に影響することが明らかとなった。シーケンス中に 2 種類の発色基対を位置特異的に導入することによって、鎖の部位特異的ならせん性を検出することに成功した。

② 官能基側鎖を有するペプチドのキラル相互作用と情報伝達

官能基を側鎖部分に有するアキラルペプチドとキラル分子との相互作用を調べた。通常、官能基側鎖を持たない末端保護したペプチドは、外部分子からの不斉情報伝達は起こらない [Inai, Y.; Komori, H.; Ousaka, N. *Chem. Rec.* **7**, 191 (2007).]. しかし、側鎖官能基を持つことによって明確な誘起 CD 信号が観測された。即ち、外部キラル刺激から側鎖、側鎖から主鎖への不斉情報の伝搬を示すことができた。これらのペプチド系を用いることにより、蛋白質らせんの巻き情報の伝達やキラル相互作用に関して、側鎖および鎖末端を含めた包括的解析が可能になったといえる。

③ 水中における不斉情報の伝搬に関する研究

疎水性セグメントの C 末端に親水基を導入した両親媒性ペプチドを用いた。このペプチドの水中での不斉相互作用を検証した。様々な水溶性キラル分子を添加したところ、顕著な誘起 CD を与えるものが観測された。添加するキラル分子の違いが、CD 信号の符号および強度に大きな影響を与えた。また、この誘起 CD 信号の温度制御についても試みた。結論として、水溶液中での不斉情報の伝達に関する系統的知見を得ることができた。

※まとめ

α -アミノ酸を基とする蛋白質骨格において、らせんの持続と反転、さらにキラル相互作用やキラル情報伝達に関する様々な知見を集積することができた。これらは、人工的に設計した光学不活性らせん鎖を用いることで、巻き情報やキラル相互作用に焦点を当てたユニークなデータといえる。

さらに、外部因子によって構造変化できるらせん分子は、概念の科学的な重要性だけでなく、ペプチド型センサーや分子マシンの新規分子材料としての展開が期待できるであろう。

※謝辞：本研究を遂行するにあたり、研究室の学生の皆さんに多くのご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

また、貴重な資金をご提供頂いた国民の皆様ならびに採択頂いた文部科学省・日本学術振興会の関係各位に深く感謝致します。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Naoki Ousaka and Yoshihito Inai*

"Transfer of Noncovalent Chiral Information along an Optically Inactive Helical Peptide Chain: Allosteric Control of Asymmetry of the C-Terminal Site by External Molecule that Binds to the N-Terminal Site"

J. Org. Chem.

審査有, Volume 74, Issue 4, 2009 年, pp.1429-1439.

[本論文は、同誌の Featured Articles に選定された。また、同 Issue の表紙(cover art)を飾る。]

[学会発表] (計 8 件)

※代表者に下線

① 稲井嘉人・逢坂直樹・仁田尾晶雅

"ペプチド鎖に沿った不斉情報とらせん構造"

第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 20 日, 名古屋市 (名古屋工業大学)

② 仁田尾晶雅・逢坂直樹・稲井嘉人

"2本のセグメント鎖を有するペプチド分子の不斉構造"

第 56 回高分子討論会, 2007 年 9 月 21 日, 名古屋市 (名古屋工業大学)

③ 稲井嘉人

"蛋白質らせん構造とその末端シーケンスに関する理論的考察"

第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 30 日, 横浜市 (パシフィコ横浜)

④ 北川靖子・稲井嘉人

"ドミノ効果によるペプチドらせん構造の制御とその証明"

第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 30 日, 横浜市 (パシフィコ横浜)

⑤ 今井喜輝・仁田尾晶雅・稲井嘉人

"キラルセグメントの共有結合型ドミノ効果によるアキラルデヒドロペプチドセグメントの不斉誘導"

第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 30 日, 横浜市 (パシフィコ横浜)

⑥ 藤田沙紀・尾高善樹・稲井嘉人

"デヒドロペプチドの水の中での不斉相互作用と不斉誘導"

第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 30 日, 横浜市 (パシフィコ横浜)

⑦ 佐々木崇泰・稲井嘉人

"デヒドロアミノ酸を含む短鎖ペプチドの溶液中での不斉相互作用"

第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 30 日, 横浜市 (パシフィコ横浜)

⑧ 藤田沙紀・稲井嘉人・山田圭一・奥浩之
"官能基側鎖を有するデヒドロペプチドの不斉誘導"

第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2008 年 11 月 9 日, 名古屋市 (名古屋大学)

※第 58 回高分子年次大会(神戸、2009 年 5 月)にて、7 件の発表を予定していたが、当該学会の開催が中止となった。これらは結果を補足し、以降の学会での発表を計画している。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲井 嘉人 (INAI YOSHIHITO)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 60223210

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし