

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18750152

研究課題名（和文）ラジカル重合反応を用いるたんぱく質 β -シートの高機能化研究課題名（英文）Fictionalization of β -sheet by radical copolymerization

研究代表者

森 健（MORI TAKESHI）

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：70335785

研究成果の概要：以下の3点を達成した。 β -シートの鎖間の距離（4.8 Å）と、重合距離の一致するジエンに注目し、これを9量体ペプチドの中央に導入した。このペプチドは静電相互作用および疎水性相互作用により β -シートを形成した。その状態で紫外光を照射したところ、重合によりジエンが消失した。CDおよびTEMより、架橋後に β -シートにひずみが生じることなく、その構造が維持されることがわかった。このようにして得られた安定化 β -シートの有機溶媒および酸に対して高い耐性を示すことが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,400,000	0	2,400,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	600,000	180,000	600,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	180,000	3,880,000

研究分野：化学

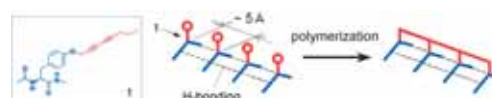
科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体関連高分子化学

1. 研究開始当初の背景

ジアセチレンおよびジエンは固相あるいは濃縮状態でラジカル重合可能なモノマーである。固相重合のためにはモノマーを5 Åの間隔で配置する必要がある。我々は、モノマーを配置するためのモチーフとして、ペプチドの2次構造の一つである β -シート構造が利用できることを見出した。下図のように両端にアミドを導入したアミノ酸では、アミド間に水素結合が働き、 β -シートを形成する結果、ジアセチレンの重合が定量的に進行した¹。さらに、最近、ジエン誘導化アミ

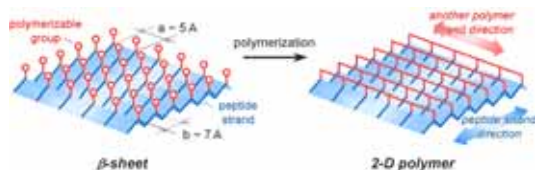
ノ酸を配列中央に配したオリゴペプチドが、溶液中、 β -シート形成条件において、高率で重合することが分かった。興味深いことに、得られた架橋 β -シートは、酸や有機溶媒添加に対して高い安定性を示すことが分かった²。



2. 研究の目的

上記の成功を受け、本研究では次の2つのことを目的とする。

2種のポリマー鎖で編まれた構造の「2次元ポリマー」の開発：右図に示すこの新しい高分子の溶液・バルク物性ならびにポリジアセチレンの電気的・光学的特性に由来する機能を評価する。たんぱく質のβシート領域への本アミノ酸の導入による機能改変：βシート領域がその機能発現に大きく関与しているたんぱく質（絹たんぱく質、発光性たんぱく質）を用い、βシート領域の架橋による高機能化を図る。



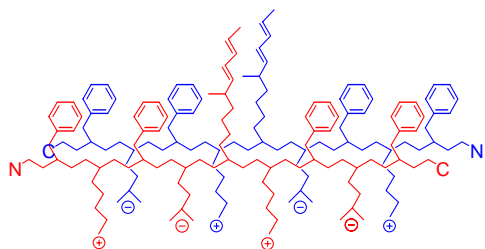
3. 研究の方法

アミノ酸の合成

これまで我々はエーテル結合により重合性官能基を側鎖導入したアミノ酸を合成してきた。しかし、エーテル結合はペプチド固相合成中にいくらか切断されてしまう。したがって、切り出し反応によっても切断されないアミド結合によって重合性官能基を導入したアミノ酸 1、2 を合成する。

ペプチドの設計と重合

右図のように静電相互作用により逆平行型βシートを形成する配列 (Ac-Phe-Lys-Phe-Glu-Xaa-Lys-Phe-Glu-Phe-NH₂, Xaa = 1 or 2) を設計・合成する。高次構造の形成時における溶液の pH および溶媒の極性に依存して、全高次構造に占めるβシートの含量が変わると予想されるので、形成条件の最適化を行う。FT-IR 測定装置を購入し、現有の CD スペクトル測定装置と併用することで、βシート含量を決定する。



ペプチドの重合法として、光重合および開始剤による重合を比較する。モノマー転化率は、ジエンあるいはジアセチレン由来のUV吸収の減少により算出する。また、サイズ排除クロマトグラフィーにより重合を確認する。

上記ペプチド配列中の4つのPhe部のいくつかを重合性アミノ酸 (Xaa) に置換する。その置換数を増やし、βシートの安定性との相関を求める。置換数が増えるにつれ、βシートの安定性は向上するものと考えられる。

4. 研究成果

シートのβ鎖間の距離 (4.8 Å) と、重合距離の一致するジエンに注目し、これを9量体ペプチドの中央に導入した (Ac-Phe-Lys-Phe-Glu-Xaa-Lys-Phe-Glu-Phe-NH₂, Xはジエンを側鎖に有するアミノ酸)。このペプチドは静電相互作用および疎水性相互作用により首尾よくβシートを形成した。その状態で紫外光 (270 nm以下をカットした超高圧水銀灯) を照射したところ、照射に伴いジエンに由来する260 nm付近の吸収が減少し、4時間後にはその減少は飽和に達した。これは重合によりジエンが消失したことを示していると思われる。

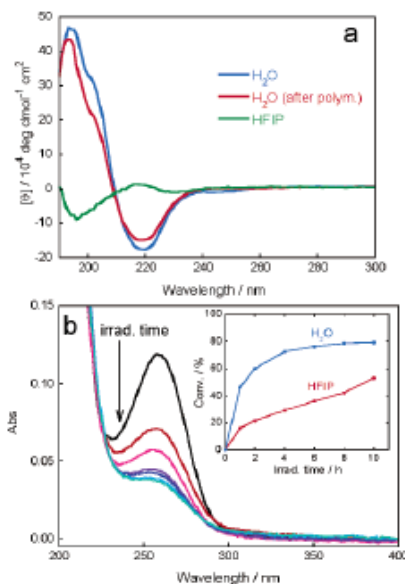


図1. (a) CDスペクトル、(b)重合にともなうUV吸収の変化。

重合はGPCによって排除限界にかかるフラクションが現れたことから確認された。重合後もCDスペクトルにほとんど変化はないことから、βシート構造が維持されていることがわかった。

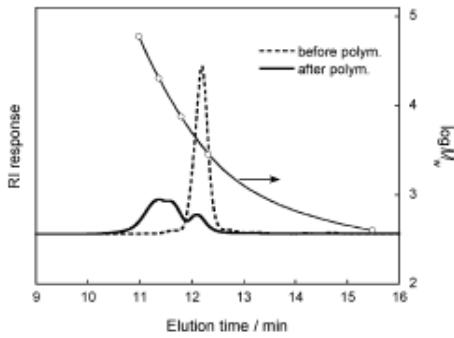


図2 . GPCスペクトル

また、TEM観察される直径3nmの シートファイバーは重合後にも同様に観察された。以上のことから、ジエンを架橋基として用いたことにより、架橋後に シートにひずみが生じることなく、その構造が維持されることがわかった。

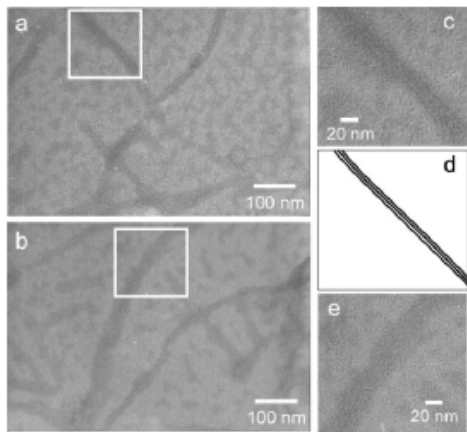


図3 . TEM像

このようにして得られた安定化 シートの有機溶媒および酸に対する耐性を調査した。HFIPを50%加えた場合にも、高い シート含量を維持していること、また、pH2としてもまったく変性が起こらないという興味深い事実が明らかとなった。

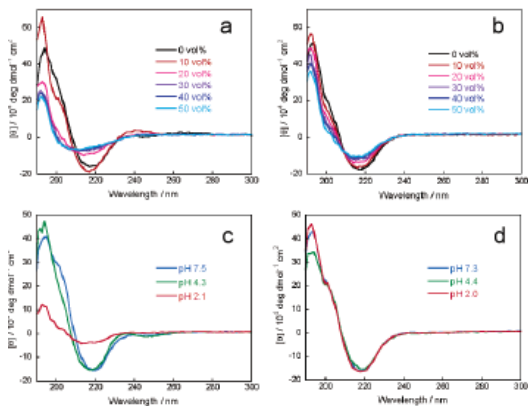


図4 . HFIPにより誘起されるCDの変化。(a)重合前、(b)重合後。pH変化により誘起されるCDの変化。(c)重合前、(d)重合後。

温度応答性高分子として知られるポリ(N-n-propylacrylamide)について、立体規則性の効果を調べた。合成は、水素結合性アルコールを重合系に加えることで、ラジカル重合により行うことが出来た。最高で72%のrを持つポリマーが得られた。得られたポリマーの相転移を調べたところ、シンジオタクチシターの増加に伴い、転移幅が狭くなり、相転移の協同性が高まることを明らかとした。

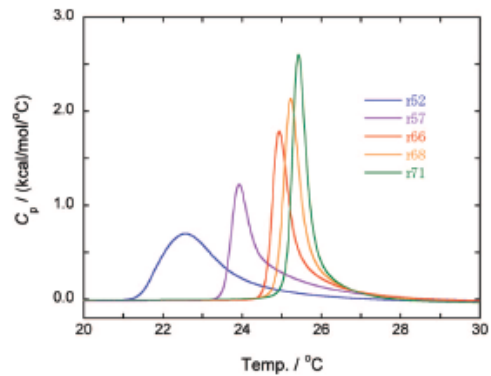


図5 . DSC の変化

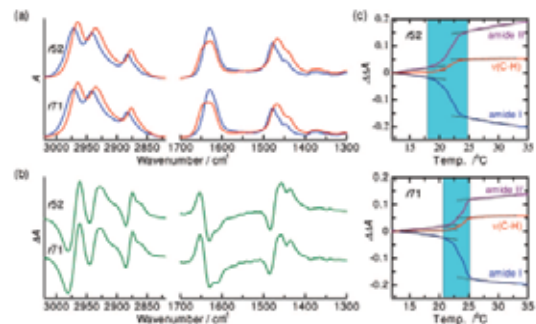


図6 . FT-IR スペクトルの温度依存性

示唆操作熱量分析による脱水和に伴う吸熱ピークの解析、および、アミノドのIR吸収の脱水和に伴うシフトから、上記の事実を示した。この現象の駆動力としては、脱水和に伴うらせん状構造の形成であることが分子構造のシミュレーションにより示唆された。

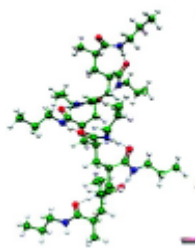


図7．分子動力学計算結果

また、脱水和後のアミドの吸収を水和成分と分子内水素結合成分に分離したところ、シンジオタクチシチーの向上に伴い、分子内水素結合成分が上昇した。この事実は、脱水和に伴う高次構造の形成に矛盾しない。このような脱水和にともなう高次構造の形成は、タンパク質の低温変性のモデルといえることができる。これまで温度応答性高分子のコイル-グロブユール転移は低温変性のモデルとみなされてきたが、タンパク質と合成高分子の違いは、前者がグロブユール状態で明確な高次構造を形成するのに対して、後者はランダムな構造しかとれないことにある。したがって、今回の発見はタンパク質の変性フォールド転移のモデルとなるはじめての例である。

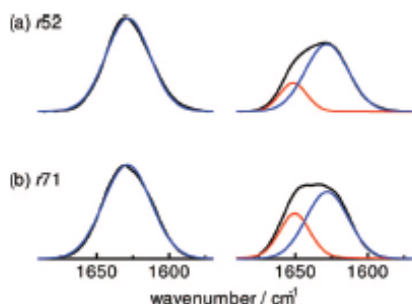


図8．相転移温度以上、以下における IR スペクトル。

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)

〔雑誌論文〕(計3件)

T. Mori et al., “Threading” of beta-sheet peptides via radical polymerization, *Biomacromolecules*, 8(2), 318-321 (2007).

T. Mori et al., Temperature-responsive Poly(dehydroalanine)s: Diversifying Phase Transition Temperatures Utilizing α,α -Disubstituted Motif, *Chemistry Letters*,

36(2),334-335 (2007).

T. Mori, T. Hirano, Syndiotactic Poly(N-n-propylacrylamide) Shows Highly Cooperative Phase Transition, *Langmuir*, 28, 48-50 (2009).

〔学会発表〕(計2件)

塚本彩子、森健ら、温度応答性フォルダマーの物理ゲル化、日本化学会生体関連部会、2007年9月9日、東北大学

塚本彩子、森健ら、がん治療を指向した磁場刺激により発熱するマグネタイト粒子内包 NIPAM ゲル、バイオマテリアル学会、2008年9月9日、大阪大学

6．研究組織

(1)研究代表者

森 健 (Takeshi Mori)

九州大学・大学院工学研究院・助教

18750152

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし