

機関番号：24403

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20550112

研究課題名 (和文) デルタアミノ酸関連ペプチドの合成と構造解析

研究課題名 (英文) Synthesis and Conformation Analysis of δ -Amino Acid Related Peptides

研究代表者

岡 勝仁 (OKA MASAHITO)

大阪府立大学・総合教育研究機構・教授

研究者番号：70203966

研究成果の概要 (和文)：ペプチド核酸モノマーをデルタアミノ酸として把握し、その関連する非天然アミノ酸についての構造解析を行った。側鎖に核酸塩基を有しないデルタアミノ酸残基は残基内水素結合に基づく特有のコンホメーションが安定となることが明らかになった。核酸塩基を有するデルタアミノ酸残基からなるペプチドが形成する相補的塩基対について理論的に予測された構造は実験値と良い一致をみた。さらに関連するペプチドにおいてペプチド結合との共役構造の設計が可能であることも示された。

研究成果の概要 (英文)：From a new viewpoint recognizing peptide nucleic acid monomers are recognized as δ -amino acids, conformation study was carried out for the peptides of δ -amino acids and of their related non-native amino-acids. It was shown that the most fundamental δ -amino acid residue have very interesting conformation properties caused by favorable intra-residue hydrogen bond, and also that theoretical results correspond to the experimental ones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：生体関連高分子

1. 研究開始当初の背景

本研究は、これまで分子生物学的興味から研究の行われてきたペプチド核酸をペプチド化学の視点から見直し、ペプチド核酸モノマーをデルタアミノ酸と認識することで、生体関連高分子分野での新しい研究領域を切り開こうとするものである。

ペプチド核酸はその命名の由来にあるように、主鎖にペプチド結合を含む核酸で、

N-(2-アミノエチル)グリシンの縮合により主鎖が形成され、核酸塩基がメチレン基とカルボニル基を介して主鎖に結合している。ペプチド核酸はDNAやRNAと相補的な塩基対を形成するが、DNAやRNAとは異なり主鎖に電荷が存在しないため、主鎖間における静電反発は生じない。そのため、形成された二本鎖は、DNA間に形成される二本鎖よりも強い結合性を有することになる。すなわち、

DNA よりも高い相補鎖認識機能をペプチド核酸は有することになる。この分子特性に着目し、診断分析やアンチセンス療法への応用への期待から、分子生物学的研究が進められてきた。しかしながら、ペプチド核酸のコンホメーション特性については、二本鎖形成特性の「光」の影に隠れて、これまで系統的な研究はなされていない。

申請者は、天然のタンパク質のアミノ酸配列反復部分のコンホメーション特性を明らかにするため、Pro 残基を含むアミノ酸配列反復部分をモデル化した周期性ポリペプチドを対象として、アミノ酸配列と立体構造との対応関係の実験的理論的検討を系統的に行ってきた。実験的には、種々の反復アミノ酸配列からなる周期性ポリペプチド

poly(Xaa-Pro-Pro-Pro)、poly(Xaa-Pro-Pro)、poly(Xaa-Pro)、poly(Xaa-Xaa-Pro)、poly(Xaa-Xaa-Xaa-Pro)、(Xaa は Ala, Leu, Val, Phe, Glu, Asp, Lys 等のプロリンでない残基)を合成し、種々の溶媒中での円二色性(CD)スペクトル測定により、その構造解析を行った。この研究を通じて以下の二点「(1) poly(Xaa-Pro-Pro-Pro)の水溶液の場合はポリプロリンの典型的な二次構造であるポリプロリン-II構造に類似のCDスペクトルを示すが、反復アミノ酸配列におけるPro残基分率の減少にともない、ポリプロリン-II構造とは明確に異なるCDスペクトルへと変化する。(2)Xaa残基の種類、および溶媒の種類に対応してCDスペクトルは変化する。得られたCDスペクトルの多くは既知のCDスペクトルとは全く異なっており、配列特有の構造の存在を強く示唆している。」を、実験的に明らかにした。また、理論的にも前述の周期性ポリペプチドを対象として、周期性条件化での全コンホメーション空間にわたる構造最適化計算、および水溶液系における分子動力学計算を行い、既知の α -ヘリックスや β -ストランド構造とは異なる特異な構造が、反復アミノ酸配列に対応して存在しうることが明らかにした。

前述のように、ペプチド核酸モノマーは主鎖部分がN-(2-アミノエチル)グリシンとなっている。このアミノ酸は、別の見方をすると、3位(β 位)の炭素が窒素に置換されているデルタアラニン、すなわち、3-アザデルタアラニンとなる。3位の窒素に結合している原子団を側鎖原子団とするとデルタアミノ酸の一種と考えることができる。

近年、通常のベータアミノ酸、ガンマアミノ酸、デルタアミノ酸については、多くの研究がなされ、天然の α -アミノ酸とは異なる柔らかい主鎖コンホメーション特性を有することが明らかにされた。しかしながら、本研究において対象とするデルタアミノ酸は3位に窒素原子が存在するため、炭素骨格のみからなる通常のデルタアミノ酸と比較して、主

鎖の自由度は小さいと予想される。ペプチド核酸の分子設計の着想もこの予測に由来する。さらに、主鎖骨格に不飽和結合を有する場合は、ペプチド結合との共役性の出現が予想され、主鎖の自由殿制限は大きくなると考えられる。ペプチド核酸モデルとしてのデルタアミノ酸の発展方向の一つとして興味深い。

本研究が対象とするデルタアミノ酸は、その側鎖部分に機能性原子団を多角的に導入でき、また導入用リンカーの長さも調節するという特徴を有する。さらに、三官能性分子としての特徴も生かして、 dendroimer 形成能を有するアミノ酸としての利用も可能である。またデルタアミノ酸からなる種々のペプチドが形成する主鎖コンホメーションも興味深い。さらに、 α -アミノ酸等との共縮合により、多様な主鎖コンホメーションも設計しうると期待される。

デルタアミノ酸関連ペプチドは、これまでのペプチド核酸の枠を越えて、創薬研究支援、医薬品開発、プローブなどの診断試薬開発のみならず、食品の開発・製造、環境浄化・修復、ナノテクノロジー分野など様々な活用が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、3年間の研究期間において、次の3点を具体的な目標とする。

(1) ペプチド核酸モノマーを視点においたデルタアミノ酸残基のコンホメーション特性を明らかにし、分子動力学計算に必要な諸パラメータを決定する。さらに、汎用型プログラムへの組み込みを試みる。

(2) ペプチド核酸を視点においたデルタアミノ酸からなるペプチドのコンホメーション特性について、理論的実験的に検討を加える。

(3) 通常のデルタアミノ酸とは異なる主鎖特性を有するという視点からの構造設計、機能設計に基づくデルタアミノ酸関連ペプチド(α -アミノ酸等も成分アミノ酸として含む)について、その構造特性・機能特性を理論的実験的に検討する。

3. 研究の方法

(1) 図1に示した側鎖を有するデルタアミノ酸残基を対象として、回転可能なすべての二面角の格子点構造について、Gaussian09を用いた非経験的量子化学計算を行い、この5種類のデルタアミノ酸の全コンホメーション空間にわたる電子状態を明らかにする。コンホメーション変化による各原子の荷電状態、結合角、結合長の変化について詳細な検討を行う。主鎖末端については、保護基を有しない場合と、アセチル基とN-メチルアミド基を有する場合のいずれについても非経験

量的量子化学計算を行い、側鎖のメチレン基数の変化による依存性も含めて、その影響を詳細に把握する。

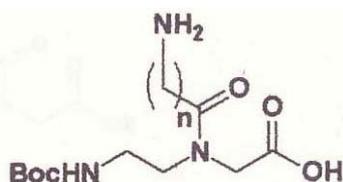


図 1.
3-(2-aminoalkanoil)-3-aza- δ -alanine の Boc 置換体

分子力学・分子動力学計算に必要な諸パラメータを決定し、汎用プログラムへの組み込みを図る。

(2) 上記のデルタアミノ酸残基(側鎖誘導体も含む)からなるペプチドについて、Gaussian09 を用いた非経験的量子化学計算および分子動力学計算を行い、そのコンホメーション特性を明らかにする。また上述のデルタアミノ酸からなるペプチドを合成し、X線結晶解析、NMR スペクトル測定、CD スペクトル測定により、実験的な構造解析を行う。

(3) 通常のデルタアミノ酸とは異なる主鎖特性を有するという視点からの構造設計・機能設計に基づくデルタアミノ酸関連ペプチド(α -アミノ酸等も成分アミノ酸として含む)として、主鎖部分の共役性に着目したペプチドについて Gaussian09 を用いた非経験的量子化学計算による理論的検討をおこなう。またさらに二次構造形成能に着目し分子設計したペプチドを合成し、実験的理論的に構造と機能について検討を加える。

4. 研究成果

(1) デルタアミノ酸残基の構造特性

N 端と C 端をそれぞれアセチル基と N-メチルアミド基で保護した 3-(2-アミノアセチル)-3-アザデルタアラニン残基について Gaussian09 を用いて基底関数 6-31G(d) レベルでの構造最適化を行った。すべての二面角(N 端から α , β , γ , δ , ε と定義、側鎖部分については主鎖に近い結合に関するものから κ_1 , κ_2 , κ_3 と定義)についての極小値の組み合わせを初期構造として用いた。最安定構造を図 2 に示した。二面角は(α , β , γ , δ , ε , κ_1 , κ_2 , κ_3)=(71, 53, 61, -103, -93, 1, 178, 53)で、主鎖のアミド水素とカルボニル炭素の間に水素結合が形成されている。主鎖二面角の符号がすべて異なる鏡像関係にある極小構造も存在しておりエネルギーは等しい。

準安定構造の二面角は(α , β , γ , δ , ε , κ_1 , κ_2 , κ_3)=(80, 56, 67, -110, -132, -4, 177, 53)と ε の値が最安定構造と約 40 度異なっているのみで両者の構造は非常に類似している。またエネルギー差は 0.9kJ/mol と近い値となった。

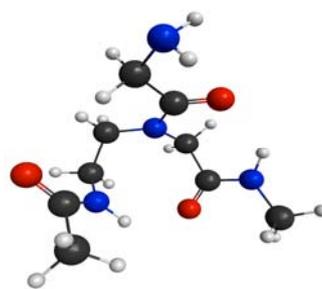


図 2.
Ac-[3-(2-aminoacetyl)-3-aza- δ -alanine]-NMe の最安定構造

エネルギー差 10kJ/mol の範囲に 22 の極小構造が存在しているが、主鎖のアミド水素とカルボニル炭素間の水素結合の形成による類似した骨格構造となっている。

さらに PCM 法により水溶媒中での構造最適化を行った。最安定構造を図 3 に示した。二面角は(α , β , γ , δ , ε , κ_1 , κ_2 , κ_3)=(103, 58, 69, -109, -156, -2, 179, 57)で真空中での値と大きくは異なっていない。

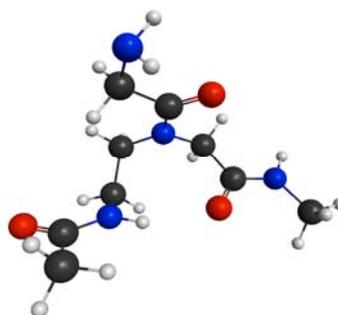


図 3.
Ac-[3-(2-aminoacetyl)-3-aza- δ -alanine]-NMe の最安定構造(水溶媒中)

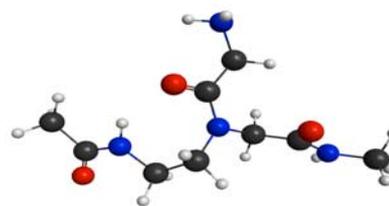


図 4.
Ac-[3-(2-aminoacetyl)-3-aza- δ -alanine]-NMe の延伸した極小構造(水溶媒中; 最安定構造とのエネルギー差 7.2kJ/mol)

しかしながら、主鎖における水素結合が存在しない延伸した構造が安定化し、エネルギー差 7.2kJ/mol 以降に極小構造 (図 4) として出現している。

構造最適化により得られた構造から、分子力場のパラメータを決定し、分子動力学計算を行った。得られた安定構造についてそれぞれの二面角の値の分布が、Gaussian09 を用いて基底関数 6-31G(d) レベルで計算したものと一致することを確認した。

(2) デルタアミノ酸残基からなるペプチドの構造特性

3-(2-アミノアセチル)-3-アザデルタアラニン残基からなるペプチドが形成するヘリックス構造について Gaussian09 を用いて検討した。残基内水素結合で安定化している最安定構造から形成されるヘリックス構造よりも安定なヘリックス構造 (1つ前の残基のカルボニル酸素と1つ後の残基のアミド水素間の水素結合により安定化している) の存在を確認した。

核酸の GGC 塩基配列に対応するペプチド核酸 Ac-GGC-NHMe について、並行型と逆並行型の相補的なペプチド核酸がそれぞれ形成する二重ラセン構造について、すべての可能な初期構造を用いて、分子動力学と Gaussian09 (基底関数 3-31G(d) レベル) による解析を行った。

Table 1. Average values of the dihedral angles (degrees)

Structure	α	β	γ	δ	ϵ	ω	κ_1	κ_2	κ_3
S1	-107	58	81	78	19	179	2	-159	-104
S2	107	-58	-81	-78	-19	-179	-2	159	104
S3									
(strand I)	-109	58	82	78	16	180	3	189	-105
(strand II)	-144	64	80	69	42	178	-176	177	-97
S4	-79	-59	-67	-76	-168	-178	-5	-179	95
S5	-125	63	75	71	21	-179	-176	175	-90

Table 2. Comparison of the energies of the duplex and strands at the 3-21G level (A.U.)

Structure	Form	Energy	Incremental (kJ/mol)
S1	antiparallel	-6198.62306	
(strand I)		-3172.17232	
(strand II)		-3026.24124	
S2	antiparallel	-6198.62306	0.00000 (0.0)
S3	parallel	-6198.61614	0.00692 (18.2)
(strand I)		-3172.17042	
(strand II)		-3026.23011	
S4	antiparallel	-6198.61494	0.00812 (21.3)
S5	antiparallel	-6198.55806	0.06500 (170.7)

得られた安定構造の二面角を表 1 に示した。最安定構造は S1 (図 5) と S2 (S1 の鏡像体) で、実験値 (PDB の 1pup と 1hzs) に一致した。並行型構造 (S3 ; 図 6) は表 2 に示したように逆並行型構造よりは不安定であること、および strand I の二面角は S1 の二面角にほぼ対応しているが、strand II の二面角は κ_1 が S1 とは異なることがわかった。

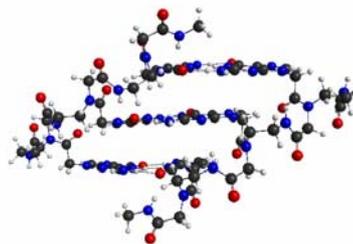


図 5. 構造 S1 の分子図

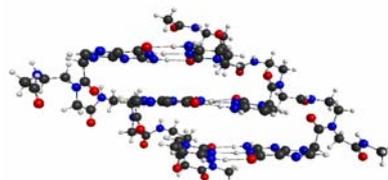


図 6. 構造 S3 の分子図

(3) 通常のデルタアミノ酸とは異なる主鎖特性を有するという視点からの構造設計・機能設計

N 端と C 端を、アセチル基 (Ac)、および N-メチルアミド基 (NHMe) で保護した 3-アミノプロペン酸 (E 体と Z 体の 3-アミノプロペン酸残基を、E3App、および Z3App と略記する) とそのペプチドについて、Gaussian03 (基底関数 B3LYP/6-31+G(d) レベル) を用いて構造最適化を行った。(ϕ , ψ) 平面の全格子点についてのエネルギー計算は 30 度間隔で行い、さらに安定領域については 10 度間隔での詳細な検討を行った。

Ac-E3App-NHMe、および Ac-Z3App-NHMe は、いずれも窒素原子と sp^2 炭素原子間の距離が 1.37 Å、 sp^2 炭素原子とカルボニル炭素原子間の距離が 1.48 Å となった。通常のペプチドにおける窒素原子と α 炭素原子間における単結合距離と N=C 結合距離がそれぞれ 1.45 Å と 1.29 Å、また α 炭素原子とカルボニル炭素原子間における単結合距離と C=C 結合距離がそれぞれ 1.53 Å と 1.34 Å であることから、この結合部分では、 π 電子の非局在化が部分的に生じていることが分かる。またグリッド計算により、Ac-3App-NHMe は、E 体と Z 体のいずれにおいても、(ϕ , ψ)=(180°, 180°) のみが安定領域で、かつ Z 体の方が E 体よりも 5kcal/mol 以上も安定であることがわかった。すなわち、Ac-Z3App-NHMe の最安定構造が、3App 残基の唯一の安定構造であり、

分子全体が剛直な板状の構造を取ることが明らかになった。さらに、図7に示したように、分子全体に亘る π 電子の非局在化も明らかになった。四量体Ac-(Z3App)₄-NHMeについても、Ac-Z3App-NHMeと同様の主鎖コンホメーションを有すること、および、分子全体に亘る非局在化状態が存在していることを確認した。このことは、残基間の相互作用は小さく、ポリ3-アミノプロペン酸は、残基内の相互作用で得られた最安定構造に基づくヘリックス構造を安定構造として形成することを示しており、分子全体に亘る π 電子の非局在化が生じることが予測される。すなわち、ポリアセチレン型の導電性物性を示すポリペプチドとしての展開が期待される。



図7. Ac-Z3App-NHMe の分子軌道図

さらに、主鎖部分に不飽和結合を有するガンマアミノ酸、およびデルタアミノ酸についても、Gaussian03 (基底関数 B3LYP/6-31+G(d)レベル) を用いて構造解析を試みた。主鎖の二重結合部分とペプチド結合が隣接する場合は、共役性が生じた主鎖部分が延伸構造となるため、ペプチド全体としても延伸した構造が安定となることが明らかになった。

β -ヘアピン構造や β -シート構造を形成するように分子設計したペプチドを合成し、実験的理論的な構造解析を行った。ペプチドが形成する高次構造に由来する材料物性の発現を実験的に確認し、理論的方法の先導的役割を明らかにした。

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 12 件)

- ① T. Kawaguchi, K. Inai, Y. Hirano, M. Oka, Theoretical conformation analysis of 4-amino-4-S-methyl-2-butenic acid residue and its peptides, Peptides Science, 査読有、2010 巻, 2011, 155
- ② K. Inai, M. Oka, Structural prediction of PNA double strands by ab initio calculations, Peptides Science, 査読有、2010 巻, 2011, 157

- ③ M. Wada, Y. Hirano, Combination of RGDS and β -strand peptide for tissue engineering scaffold, Peptides Science, 査読有、2010 巻, 2011, 271
- ④ N. Nishimura, Y. Hirano, β -peptides as a cross-linker for alginate hydrogel, Peptides Science, 査読有、2010 巻, 2011, 274
- ⑤ Y. Hirano, N. Nishimura, H. Kimura, Synthesis and evaluation of new type alginate hydrogel using self-assembly β -strand peptides, Peptide Science, 査読有、2009 巻, 2010, 399-402
- ⑥ T. Kawaguchi, Y. Hirano, M. Oka, Theoretical conformation analysis of peptides having double bond in main-chain, Peptides Science, 査読有、2009 巻, 2010, 443-446
- ⑦ 平野義明、田宮伸剛、岡 勝仁、分岐型 β -シートペプチドを用いた生体超分子の設計 “、高分子論文集、査読有、67 巻、2010, 596-604
- ⑧ M. Oka, Y. Hirano, Built up of stimulus-responsive hydrogels using self-assembling β -hairpin peptides, N. Nishishita, Y. Morimoto, Peptide Science, 査読有、2008 巻, 2009, 445-448
- ⑨ T. Kawaguchi, Y. Hirano, M. Oka, Theoretical design of new conjugated systems in main-chain, Peptides Science, 査読有、2008 巻, 2009, 493-496
- ⑩ T. Kawaguchi, Y. Hirano, M. Oka, Molecular dynamic simulations of α -hairpin structures in aqueous solution system, Peptide Science, 査読有、2008 巻, 2009, 497-500
- ⑪ S. Inoue, Y. Iida, Y. Otani, Y. Tabata, Y. Hirano, Adhesion behavior of human adipo-stromal cells on self-assembled monolayers with different surface densities or gradients of RGD peptide, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 査読有、20 巻, 2009, 495-510
- ⑫ S. Inoue, M. Imamura, Y. Hirano, Y. Tabata, Adhesion and proliferation of human adipo-stromal cells for two- or three-dimensional poly(ethylene terephthalate) substrates with or without RGD immobilization, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 査読有、20 巻, 2009, 721-736

[学会発表] (計 21 件)

- ① K. Inai, M. Oka, Structural prediction of PNA double strands by ab initio calculations, 5th International

- Peptide Symposium, 2010年12月5日、Kyoto international conference center
- ② T. Kawaguchi, K. Inai, Y. Hirano, M. Oka, Theoretical conformation analysis of 4-amino-4-S-methyl-2-butenic acid residue and its peptides, 5th International Peptide Symposium, 2010年12月5日、Kyoto international conference center
- ③ M. Wada, Y. Hirano, Combination of RGDS and β -strand peptide for tissue engineering scaffold, 5th International Peptide Symposium, 2010年12月5日、Kyoto international conference center
- ④ 岡 勝仁、量子化学計算による主鎖部分に二重結合を有するペプチドの構造特性の解析、日本コンピュータ化学会2010秋季年会、2010年10月23日、長岡技術科学大学
- ⑤ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、延伸構造が安定となるペプチドの理論的設計、第59回高分子討論会、2010年9月16日、北海道大学
- ⑥ 大田真平、平野義明、自己組織化 β -ヘアピンペプチドを用いたハイドロゲルの設計、第59回高分子討論会、2010年9月16日、北海道大学
- ⑦ 和田全展、山本雅哉、田端泰彦、平野義明、細胞接着配列と β -シート構造を組み合わせたペプチドの機能評価、第59回高分子討論会、2010年9月15日、北海道大学
- ⑧ 西村直剛、平野義明、 β -スとランドペプチドを架橋点に利用したアルギン酸ハイドロゲルの設計、第59回高分子討論会、2010年9月15日、北海道大学
- ⑨ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、4-アミノ-4-S-メチル-2-ブテン酸残基の構造特性の解析、第59回高分子学会年次大会、2010年5月27日、パシフィコ横浜
- ⑩ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、ヘアピン基部にジスルフィド結合を有する α -ヘアピン構造の動的挙動、第59回高分子学会年次大会、2010年5月27日、パシフィコ横浜
- ⑪ 岡 勝仁、量子化学計算による主鎖共役性ペプチドの理論的設計、日本コンピュータ化学会2009秋季年会、2009年11月13日、東北大学
- ⑫ T. Kawaguchi, Y. Hirano, M. Oka, Theoretical design of new artificial polypeptides having conjugated characters, 1st FAPS polymer congress, 2009年10月21日、Nagoya international conference center
- ⑬ T. Kawaguchi, Y. Hirano, M. Oka, Conformation study of repetitive polypeptides having L-Pro-D-Pro sequence, 1st FAPS polymer congress, 2009年10月21日、Nagoya international conference center
- ⑭ 岡 勝仁、理論化学による主鎖共役性ペプチドの分子設計、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月15日、九州大学
- ⑮ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、4-アミノ-2-ブテン酸残基からなるペプチドのコンホメーション特性の理論的解析、第58回高分子討論会、2009年9月17日、熊本大学
- ⑯ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、ヘリックスの中央部にジスルフィド結合を有する α -ヘアピン構造の安定性、第55回高分子研究発表会、2009年7月17日、兵庫県民会館
- ⑰ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、4-アミノ-2-ブテン酸残基の構造特性の解析、第58回高分子学会年次会、2009年5月28日、神戸国際会議場
- ⑱ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、二つのヘリックス間にジスルフィド結合を有する α -ヘアピン構造の動的挙動、第58回高分子学会年次会、2009年5月28日、神戸国際会議場
- ⑲ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、量子化学計算による主鎖共役性ペプチドの理論的設計、第45回ペプチド討論会、2008年10月30日、タワーホール船堀
- ⑳ 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、主鎖に二重結合を有するアミノ酸残基の分子特性、第57回高分子討論会、2008年9月24日、大阪市立大学
- 21 川口拓也、平野義明、岡 勝仁、ab initio 計算による3-アミノプロペン酸残基の構造特性の解析、第54回高分子研究発表会、2008年7月18日、兵庫県中央労働センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 勝仁 (OKA MASAHITO)
大阪府立大学・総合教育研究機構・教授
研究者番号：70203966

(2) 研究分担者

平野 義明 (HIRANO YOSHIAKI)
関西大学・化学生命工学部・教授
研究者番号：80247874