

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655099

研究課題名（和文） ポリペプチド側鎖の動的結合再編成によるタンパク質型高次構造と機能の創発

研究課題名（英文） Emergence of protein-like higher order structures and functions by dynamic reorganization 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・准教授

研究者番号：30313472

研究成果の概要（和文）：

側鎖にアミノ基を有するポリ（L-リシン）に少量の親水性側鎖を導入したのちに一種類のアルデヒドと反応させ、アルデヒド由来の官能基がイミン結合を介して側鎖に導入されたポリペプチドを合成した。このポリペプチドを種々の官能基を有するアルデヒドとメタノール中で共存させた結果、イミン/アルデヒド間の動的組換えに基づく側鎖配列の再編成が進行した。また、側鎖組換え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。

研究成果の概要（英文）：

A polypeptide to which a functional group derived from an aldehyde was introduced via imine bond was prepared by the reaction of the aldehyde with amino groups of poly(L-lysine) having a small amount of hydrophilic side chains. The polypeptide was dissolved in methanol along with aldehydes with various functional groups, and shuffling of side chain functional groups based on dynamic exchange between imine and aldehyde was observed. Higher-order structure of the polypeptide was found to be changed with the side-chain shuffling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：機能性高分子の合成および応用

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：動的共有結合、ポリペプチド、イミン、アルデヒド、高次構造、CD スペクトル、動的組換え

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ことが知られている。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、可逆的なフォールディングを可能にするアミノ酸配列の設計原理は明らかになっていない。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。ポリマーがファネル型のエネルギー曲面をもつためには、以下の条件が必要とされている。

- 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、格子モデルを用いたシミュレーションにおいて、ヘテロポリマーにおける各モノマー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明らかにしている。しかし従来は「モノマーユニットの交換」は現実には不可能であるとされ、この系はおもに生物進化のモデルとして捉えられてきた。コンピュータ上でのアミノ酸ユニットの組換えにより、フラストレーションを低下させる設計を施したポリペプチドを実際に合成する試みも行われているが、ポリペプチド系の正確なシミュレーションは難しく、望みの高次構造や機能を得ることは難しいのが現状である。

それに対して我々は、光・触媒などの刺激により可逆的に開裂・再結合が可能な共有結合である「動的共有結合」の主鎖への導入により Shakhnovich らのモデルの実現が期待できる、との考えのもと、光刺激型動的共有結合であるジチオカルバメート結合でアミノ酸が連結されたポリマーを合成し、主鎖の結合組換えが可能であることを確認した。しかし、ポリマー合成時に分子量が十分に伸びず、円二色性 (CD) スペクトルによる高次構造の同定も不可能であったため「モノマーユニット配列の安定化→特定の安定な高次構造」の概念の証明には至らなかった。

一方、主鎖の切断・再結合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、ポリペプチド側鎖の交換によっても Shakhnovich らのモデルは再現可能であると期待される。また、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合成上有利であり、さらに CD スペクトルなどによる高次構造の同定も容易となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、「1. 研究開始当初の背景」で述べたように、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持ち、可逆的フォールディングが可能なヘテロポリマーを、ポリペプチド側鎖の交換によって創出し、タンパク質で実現されている「モノマーユニット配列→高次構造→機能」という非線形的な創発現象を人工的に実現することを目的としている。

この目的の実現のために、まず開裂・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、様々な官能基を有する動的共有結合含有低分子量化合物と共存させ、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の調査を行うことにより、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、タンパク質と同様に「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」を有することを明らかにする。

動的共有結合部位としては、モノマーユニット間の相互作用を熱的に乱さず、かつアミノ酸中の官能基との副反応が起こらないように、特別な刺激なしで組換えを進めることができるイミン結合を利用する。イミン結合は、アミンとアルデヒドとの反応により簡便に合成できることも大きな利点である。

3. 研究の方法

本研究では、主鎖の切断・再結合によるモノマーユニット交換の代わりに、主鎖交換と本質的に等価な側鎖交換を利用することにより (Figure 1)、主鎖としてポリペプチドを使用することを可能にする。これは、合成上有利であるだけでなく、タンパク質研究における、CD スペクトル等による高次構造解析についての研究成果をそのまま援用できる点も大きな利点である。

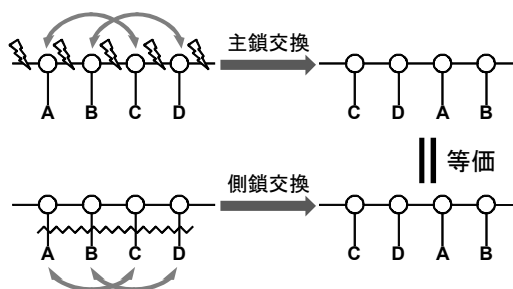
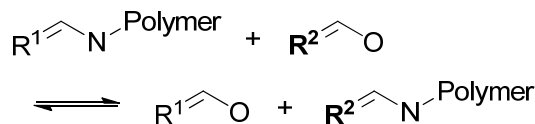


Figure 1 主鎖交換と側鎖交換の等価性

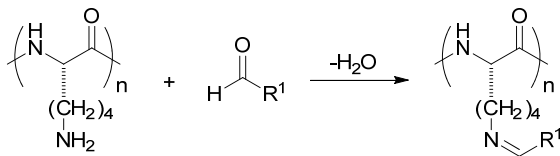
また、本研究における側鎖組換えでは、アミノ酸ユニット間の相互作用を乱さないために室温以下での可逆的開裂・再結合が望まれる。よって、動的共有結合としては、合成が簡便であり、かつ特別な刺激なしで組換えを進めることができるイミン結合を用い、イミン/アルデヒド間の動的結合組換え (Scheme 1) により種々の置換基をポリペプチド側鎖に導入する。



Scheme 1

まず、側鎖にアミノ基を有するポリペプチドであるポリ(L-リシン)と1種類のアルデヒドとの反応により、側鎖にイミン結合を有するポリペプチドホモポリマーを合成する (Scheme 2)。

次に、得られたホモポリペプチドを多種類のアルデヒドと共存させ、側鎖官能基の動的結合組換えを行う。アルデヒド間のアルドール縮合などの副反応を避けるため、アルデヒ



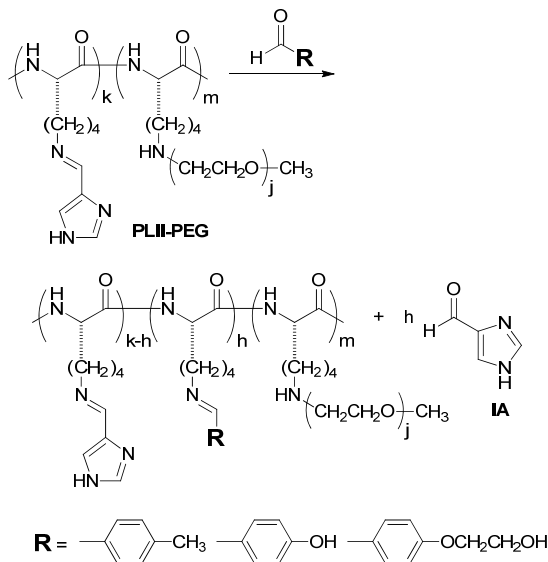
Scheme 2

ドとしては芳香族アルデヒドをおもに使用する。また、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、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の官能基を有するアルデヒドを使用する。

組換え反応の進行は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより各アルデヒドの存在量を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

少量のポリエチレングリコール (PEG) を導入したポリ (L-リシン) にイミダゾール-4-カルボキシアルデヒド (IA) を反応させることにより、イミン結合を側鎖に有したホモポリマー-PLII-PEG (Scheme 3) を合成した。



Scheme 3

得られた PLII-PEG を 3 種の低分子量アルデヒドとともに重水素化メタノールに溶解させることにより側鎖交換反応を行い (Scheme 3)、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定により

追跡した。その結果、時間の経過に伴いホモポリマーからの IA の脱離と、IA 以外のアルデヒドの減少が観測され、ポリマー側鎖への低分子量アルデヒドの導入が確認された (Figure 2)。

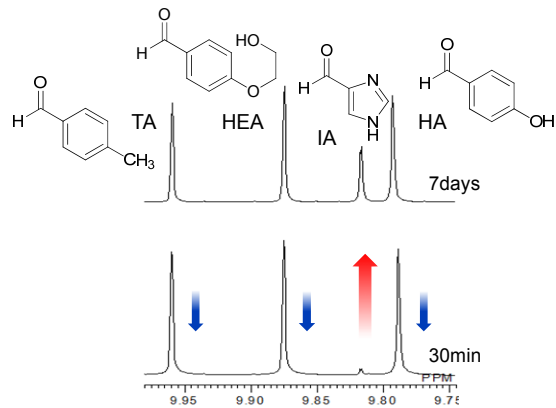


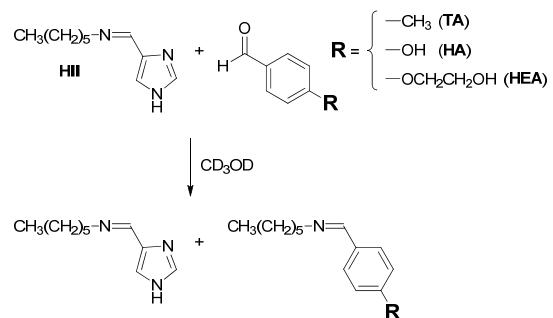
Figure 2 PLII-PEG/低分子量アルデヒド系の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (CD_3OD , rt)

側鎖に PEG を導入しなかった場合は 30% の IA が脱離するとポリマーの溶解性が低下したのに対し、側鎖に PEG を導入した PLII-PEG では溶解性の低下はみられず、十分に組換えが進行し側鎖官能基の比率が一定に達するまで組換え反応を進行させることができた (Table 1)。側鎖官能基の比率は、組換え開始から 3 日程度ではほぼ一定に達することが明らかとなった。

Table 1 PLII-PEG への各アルデヒドの導入率 (仕込み比: TA : HEA : IA in PLII-PEG : HA = 1.4 : 1.4 : 1.0 : 1.4)

	TA	HEA	IA	HA	PEG
30min	0.03	0.00	0.90	0.04	0.03
1day	0.33	0.14	0.36	0.11	0.03
3days	0.41	0.16	0.27	0.13	0.03
7days	0.41	0.20	0.28	0.10	0.03

また、十分に組換えが進行した際の側鎖官能基の比率は、低分子量のイミンとアルデヒドを用いたモデル反応 (Scheme 4) における生成物比とは異なる傾向を示しており、側鎖



Scheme 4

官能基間の相互作用が側鎖官能基の比率に影響を及ぼしていることが示唆された (Figure 3)。

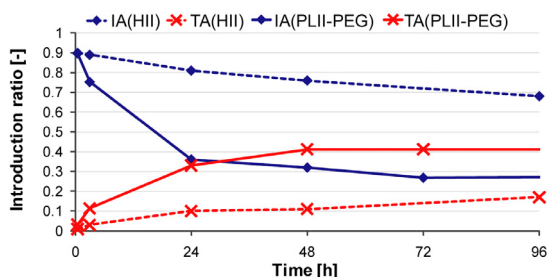


Figure 3 PLII-PEG および HII におけるアルデヒド (IA, TA) 導入率の経時変化
アルデヒド添加量：イミンに対して各 1.4 当量
濃度： 1.4×10^{-2} M (PLII-PEG), 1.5×10^{-2} M (HII)

さらに、側鎖交換反応に伴う CD スペクトルの経時変化を追跡した結果、側鎖交換の進行がポリマーの高次構造に影響を与えていることが明らかとなった (Figure 4)。

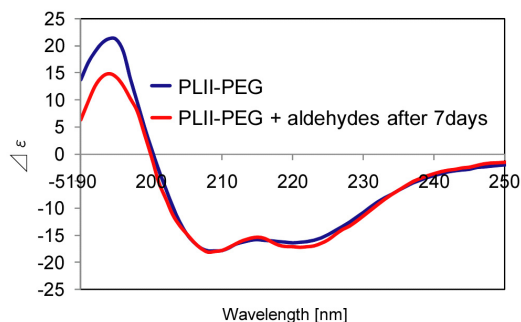


Figure 4 PLII-PEG/低分子量アルデヒド系における CD スペクトル変化 (溶媒：メタノール, 濃度： 1.4×10^{-4} M, 温度：25°C)

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 4 件)

- ① 大山俊幸 (他 2 名), “イミン結合を利用したポリペプチド側鎖の動的組換え反応”, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 25 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市野路東 1 丁目 1-1)
- ② 大山俊幸 (他 2 名), “Introduction of various functional groups onto the side chains of polypeptides using dynamic exchange reaction mediated by imine bonds”, 1st International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN2012),

2012 年 10 月 22 日, メルキュールホテル (ブリスベン, オーストラリア)

- ③ 大山俊幸 (他 2 名), “イミン結合の動的組換えを利用したポリペプチド鎖への種々の官能基の導入”, 第 61 回高分子学会年次大会, 2012 年 5 月 30 日, パシフィコ横浜 (横浜市西区みなとみらい 1-1-1)
- ④ 大山俊幸 (他 2 名), “側鎖に導入したイミン結合の動的組換えがポリペプチド主鎖の高次構造に及ぼす影響”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 30 日, 岡山大学津島キャンパス (岡山市北区津島中 2-1-1)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 俊幸 (OYAMA TOSHIYUKI)
横浜国立大学・工学研究院・准教授
研究者番号：30313472

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：