人工蛋白質による基質結合モデル

繊維高分子材料研究所 森 井 尚 之

By means of "de novo design" approach several artificial proteins are developing. The construction of helix bundle structures and the characteristics of their hydrophobic binding are discussed.

protein/de novo design/amphiphilicity/ α -helix bundle/inclusion

1. はじめに

人工タンパク質には遺伝子工学的に変異を導入したタンパク質から、天然物に化学的な修飾をほどこした物、あるいはコラーゲン等を模した合成ポリペプチドなどまで、多様なものが存在する。ここでは、それらのうちで de novo 設計と呼ばれる、目的とする高次構造や機能のイメージから出発して一次構造を設計するという手法でつくられた人工タンパク質に話を限定させて頂くことにしたい。de novo 設計タンパク質は、天然のタンパク質が進化の過程で機能のある特定のアミノ酸配列を選択してきた結果であるというのと異なり、一次構造に関する制約がない。夢をもって表現すると無限の可能性ということになるが、換言すると砂漠にオアシスを求めるような話でもある。この辺の事情が研究を困難にしている。de novo 設計で合成したタンパク質が果して高次構造をとりうるのか、そしてそれが単一の構造なのか、あるいは高次構造をつくらないとすればその原因は何か、など最も基本的な部分でさえ多くの問題が存在する。

2. α -ヘリックスバンドルの構造

de novo 設計で最もよく研究されているのが、 α -ヘリックスバンドルである。この構造は天然ではヘムエリトリンなどに見られる 4-ヘリックスバンドル(図1)が代表的なものであるが、トロポミオシンなどのコイルドコイル構造やロドプシンの膜貫通ヘリックス束なども同類ととらえることができる。最大の特徴はよく知られているように α -ヘリックスの両親媒

図1. ヘリックスバンドル構造(左図). 各 α -ヘリックスでは疎水性残基がヘリックスの周期3.6に近い周期で配列し、両親媒性を形成している(右図). 影をつけた部分が疎水性部分.

性構造にある。水溶液中では各ヘリックスの疎水性面同士が会合してヘリックスバンドルを形成する。主な設計の原理としては、両親媒性の他、X線構造データベースをもとにした各アミノ酸残基の二次構造傾向性が考慮される^{1),2)}。特に後者はヘリックス以外の部分の設計に重要である。人工および天然の代表的なバンドル性の α -ヘリックスについて、疎水性パラメータをもとにヘリックスを軸方向に投影した時の両親媒性パターンを図2に示した。親水性タンパク質では特に両親媒性が顕著である。

では、このように設計したペプチドが水溶液中で本当にバンドルを形成するのであろうか。サイズ排除クロマトグラフィーでヘリックスの会合数が見積られて

Binding Properties of de Novo Designed Proteins

Hisayuki MORII

Research Institute for Polymers and Textiles

図2. 代表的なバンドル形成ヘリックスの両親媒性パターン。各残基の疎水性パラメータをもとに1残基の広がり $\pm 40^\circ$ として 20° 単位の極座標上に表した。円の外側が疎水性、内側が親水性。 $\langle H \rangle$ 、 $\langle \mu_H \rangle$ はそれぞれ残基平均の疎水性パラメータおよびヘリックス疎水性モーメント³⁾。

いる^{4)~6)}。シーケンスにも依存するが2~6本のヘリックスの会合が報告されている。ただしいずれも流体力学的にStokes半径が考慮されていないので、場合によってはこれより少ない本数の可能性もある。DeGradoらは希薄溶液ではランダムコイル状のペプチドが高濃度で一挙にN本ヘリックスからなるバンドルを形成する(N·(random coil) $\rightleftharpoons$ (N-helix bundle))と仮定し、ヘリックス存在量に対応するCDスペクトルの $[\theta]_{222}$ の濃度依存性の実測曲線に最もフィットするNとして、N=4を得ている⁴⁾。またヘリックス部分を2個連結したペプチドからもN=4を得ている。Nishinoらはヘリックス集合体の形成を溶液粘度、CD、蛍光プローブの取り込みのそれぞれ濃度依存性を測定し、臨界ミセル濃度(CMC)に類似の挙動を認めている⁵⁾。これらの結果はいずれも集合体形成がN=2ではなくて、より大きい、協同性の高い構造形成過程であることを示している。このことはヘリックスをターン(あるいはループ)で連結すれば、ヘリックスの集合体がより形成され易くなることを意味し、それは実験的にもN=4を連結した系で確かめられてい

る。特にDeGradoらの設計したN=4連結体はグアニジン塩酸塩による変性中点濃度が6.3Mにもなっており、非常に安定なバンドル構造が形成されている⁷⁾。筆者らは連結部分のシーケンスを変えることで、連結したヘリックスのバンドルが変性剤によって途中N=2を経て変性する系があることを見いだしており⁸⁾、連結部の設計もバンドル構造の形成や安定性に無関係ではない。

結晶化が困難なためか、いままでのところX線構造解析の例は乏しい。Eisenbergらは16残基のペプチド結晶構造を報告している⁹⁾。結果はDeGradoらがCDから推定(前述)した4-ヘリックスバンドルではなく、N=2のバンドルがクロスした#型のtetramerやhexamer構造であった。しかし、このことでN=4体の存在が否定されたわけではない。筆者らは蛍光プローブを取り込ませたヘリックス会合体について、蛍光偏光解消の解析からNの値として約 4 ± 1 の結果を得た¹⁰⁾。ここで用いたペプチドはヘリックス2, 3, 4, 6本をそれぞれループで連結したもの(残基数40, 58, 80, 120)であるが、いずれもほぼ同じようなNを与えた。この結果は2本連結体がN=4体を形成していることを推測させるが、他の連結体については解析法の精度の限界からNの確定には至っていない。他に、バンドル内での分子間SS結合のかかり易さ¹¹⁾や、ピレニルアラニンを含むペプチドでのピレンのexcimerの観測¹²⁾から4-ヘリックスバンドルの存在がかなり実証されてきている。各研究者がそれぞれ異なるシーケンスを用いているにもかかわらず、同じNに至っていることも興味深い。

天然にはN=2のロイシンジッパーやトロポミオシン、N=4のシトクロームb562などが存在する。しかしそれ以外のNは、会合体や膜貫通ヘリックス以外では認められていない(ただしアポフェリンダイマーのような4+4バンドルは存在する)。では何故N=2あるいは4なのであろうか? また、よく似た両親媒性のヘリックスが何故あるものはN=2になり、別のものはN=4のバンドルになるのか? ヘリックス同士の会合についての理論¹³⁾によればヘリックスは単なる円筒ではなく、円筒側面のアミノ酸残基の配置(格子)によるパッキングが会合形態を決定する。この理論は2本のヘリックス間のねじれ角が $+20^\circ$ か -50° であることをよく説明しており、バンドルにおけるヘリックス数Nもこのような残基のつくる格子のパッキングの問題と関係すると考えられる。

3. 基質結合モデル

両親媒性ヘリックスからなるバンドル構造は de novo 設計された高次構造体としては最もよく機能面への展開が図られている。ここでは狭い意味での基質結合に留まらず、ヘリックスバンドルと他分子の相互作用という点で研究を整理してみたい。

Nishino らは疎水性蛍光プローブの取り込み能を有する両親媒性ヘリックスの疎水性部に His と Cys を配置して酢酸 p-ニトロフェニルの加水分解速度を調べている¹⁴⁾。ヘリックスが集合体を形成する濃度以上で著しい触媒活性の増大を観測し、この結果から酵素類似の基質結合過程を推定している。前述したように複数のヘリックスを連結することでかなり低濃度からバンドル構造の形成が可能になるが、Hahn らは C 端で連結した 4 本の両親媒性ヘリックスの N 端に His, Asp, Ser を置いてキモトリプシンのモデルとして活性を検討した¹⁵⁾。基質としてアミノ基を保護した Tyr のエステルを用いてエステラーゼ活性を調べ、Michaelis 定数や活性化エネルギーにおいてキモトリプシンに匹敵する値を得ている。また Sasaki らはボルフィリン環の面に垂直な方向にヘリックスバンドルが形成されるような設計を行い、アニリンを基質とした p-アミノフェノール化活性を実現した¹⁶⁾。速度定数は低いが、ヘモグロビンと同程度の Michaelis 定数を与えた。いずれの設計例も基質結合部としてヘリックスバンドルの中心部、すなわちヘリックスの疎水性面の会合した領域をイメージしている。

疎水性物質の取り込み場の性質を探索するために、筆者らは蛍光プローブにより検討を行った¹⁰⁾。疎水性プローブと呼ばれるアニリノナフタレンスルホン酸 (ANS) を用いた場合、ヘリックスの連結数 2, 3, 4, 6 本の分子の内 6-ヘリックスのものが他に比べて、より大きい蛍光強度と蛍光極大波長の著しい短波長シフトを示した。このことは 6 本のヘリックスによって、それ以下ではできない束縛の強い包接構造ができていることを意味する。蛍光寿命測定では複数の寿命成分が観測され、包接構造は必ずしも単一ではない可能性がある。

またプローブにアクリジノレンジ誘導体 AODB を用いた時には誘起 CD が観測された。このスペクトルから AODB のモノマーとスタッキングダイマーの 2 つの包接種の存在が示される。特に後者のスタッキング様式は P (プラス) のねじれを有しており、コイルドコイルに代表される $N = 2$ 体のねじれ +20° と同

図 3. バンドル構造の基本となるヘリックス-ヘリックス相互作用 (コイルドコイル) におけるねじれと、包接時に観測されるアクリジノレンジ芳香環部分のスタッキングのねじれ。

じ向きである (図 3)。同様の P 型のねじれは、Mihara らのスタッキングしうる位置にビレニルアラニンを含むヘリックスにおいても観測されている¹⁷⁾。これらの結果は基質を結合した構造においても、ねじれを有するバンドル構造が存在していることを示唆している。

ここまではヘリックスバンドル中により小さい分子が取り込まれる系を見てきた。相互作用の相手がより大きい分子の場合はどうであろうか。ミオシン I 鎖キナーゼの両親媒性ヘリックスはカルモジュリンとコンプレックス形成し、その立体構造が最近 NMR で解析された¹⁸⁾。同様に、人工的な両親媒性ヘリックスがカルモジュリンと非常に強く結合することが DeGrado らにより報告されている¹⁹⁾。また Enser らは両親媒性ヘリックスが BSA や β -ラクトグロブリンと相互作用しこれらを安定化うることを示している²⁰⁾。いずれもシークエンス特異性が低いことと両親媒性構造が必要であるという点で、疎水性部分の相互作用と考えられる。

4. おわりに

両親媒性ヘリックスによる基質結合をテーマに述べてきたが、これまでの de novo 設計の研究は相互作用としては疎水性の相互作用が中心であり、そのため多くは非特異的結合であった。一方、天然物では特異的結合の系も多く、しかもそれらの結合部位はループ構造部分であることが知られている²¹⁾。こうした分野への de novo 設計の新たな挑戦に期待したい。また、天然では制御されたフォールディング過程によって高次構造が形成されているが、de novo 設計タンパク質のフォールディングの制御も残された課題である。

最後に日頃お世話になっている共同研究者の皆様、

そして本稿執筆にあたり御助言いただいた上平初穂室長に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Cohen, C., Parrry, D. A. D. (1990) *Proteins*, **7**, 1-15.
- 2) 八尾 徹 (1991) 現代化学, 12月号, 32-37.
- 3) Eisenberg, D., Weiss, R. M., Terwilliger, T. C. (1982) *Nature*, **299**, 371-374.
- 4) Ho, S. P., DeGrado, W. F. (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6751-6758.
- 5) 西野憲和, 杉田裕三, 山本敏浩, 藤本 勉 (1984) 旭硝子工業技術奨励会研究報告, **45**, 191-198.
- 6) Mutter, M., Tuchscherer, G. (1988) *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **9**, 437-443.
- 7) Regan, L., DeGrado, W. F. (1988) *Science*, **241**, 976-978.
- 8) Morii, H., Honda, S., Ichimura, K., Uedaira, H. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 396-402.
- 9) Hill, C. P., Anderson, D. H., Wesson, L., DeGrado, W. F., Eisenberg, D. (1990) *Science*, **249**, 543-546.
- 10) Morii, H., Ichimura, K., Uedaira, H. (1991) *Proteins*, **11**, 133-141.
- 11) DeGrado, W. F., Wasserman, Z. R., Lear, J. D. (1989) *Science*, **243**, 622-628.
- 12) 西野憲和, 田中雄三, 泉直之, 三原久和, 藤本勉 (1992) *Polym. Prep. Jpn.*, **41**, 1018.
- 13) Chothia, C., Levitt, M., Richardson, D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4130-4134.
- 14) 西野憲和, 杉田裕三, 山本敏浩, 藤本勉 (1986) 旭硝子工業技術奨励会研究報告, **48**, 149-155.
- 15) Hahn, K. W., Klis, W. A., Stewart, J. M. (1990) *Science*, **248**, 1544-1547.
- 16) Sasaki, T., Kaiser, E. T. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 380-381.
- 17) Mihara, H., Nishino, N., Kiguchi, S., Fujimoto, T. (1991) *Peptide Chemistry 1990*, 329-332.
- 18) Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B., Bax, A. (1992) *Science*, **256**, 632-638.
- 19) DeGrado, W. F., Erickson-V., S., Wolfe, Jr., H. R., O'Neil, K. T. (1987) *Proteins*, **2**, 20-33.
- 20) Enser, M., Bloemberg, G. B., Brock, C., Clark, D. C. (1990) *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 118-124.
- 21) Branden, C., Tooze, J. (1991) *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York and London.

もりい ひさゆき

東京大学工業化学科で合成高分子の重合機構論を専攻。1980年に繊維高分子材料研究所入所。重合の立体化学の解析とその応用を研究。数年前よりペプチド合成化学に足を踏み入れ、現在、ディノープ設計タンパク質による nano world の構築に夢を抱いている。趣味は手工芸、風に歌うこと。

連絡先 〒305 繊維高分子材料研究所分子機能研究室

(1993年より組織改革, 新研究所発足予定)

☎0298-54-6337

【 編 集 後 記 】

2年の長きにわたる編集委員の任務を終えて、正直な感想を言えばほっとしたという所かな。年に3〜4回の編集会議が主な仕事だったけれど、各委員の持ち寄る執筆候補案の数の多さや、さらに各案件の熱の入った討論やらで半日の会議は息つく暇も無いくらい。実現できなかった案もいくつかあったけれど、それはこちらの力量不足。ごめんなさい。

21世紀の編集委員会ではどんな議論があるのでしょうか。楽しみにしてます。

2年を終えても、やっぱり生物物理学はよくわからない学問ですが、とにかくなかなか貴重な体験でした。

(磯野)