ポリペプチドの立体構造依存的自己組織化

三 原 久 和

21 世紀の地球適合型材料を考える際、生物の用いている分子システムを参考にし、材料設計に結びつける戦略的方策が重要になるであろう。多様な高次構造と機能を発揮するタンパク質やポリペプチドの立体構造に依存した自己組織化能は材料開発の観点からも魅力的である。

1. はじめに

タンパク質は 20 種のモノマー単位であるアミノ酸の配列化を利用し、もっとも多様な立体構造を形成でき、もっとも多様な機能を発揮できる生体高分子である。その秘密は立体構造の階層性を生み出すポリアミド主鎖構造と、立体構造上でグラフト状に配置された各アミノ酸側鎖にある。巨大で複雑すぎる天然タンパク質が有する特徴をインスパ이어した、簡単なポリペプチドを開発することにより、地球に優しい機能性材料設計へと展開することが可能になるであろう。

2. タンパク質立体構造

タンパク質、つまりポリペプチドが形成する立体構造には、大きく分けて 2 つのタイプがある (図 1)¹⁾。ひとつは、酵素や抗体などに見られる球状型の構造である。右巻きラセンの α -ヘリックスやひだ状の β -ストランド構造などの二次構造が、ターンやループ構造と組み合わさって、組織化し、全体として球状の三次元構造をとる。これら三次元構造のユニットである 1 本鎖構造の α -ヘリックスや β -ストランド cF 構造が主として疎水性相互作用により集まり大まかな (天然に近い) 球状集合体をつくり、その後ゆっくりと水素結合や静電的相互作用のネットワークが形成され、疎水性残基の内部でのパッキングも安定化され、特定の構造に収束する。もうひとつは、 α -ヘリックスまたは β -

ストランドなどの二次構造が、連続的に数珠つなぎに連結した繊維状の三次元構造である。ポリプロリンヘリックスからなるコラーゲンも繊維状タンパク質の一種である。この場合、多くの二次構造が混合するわけではなく、特定の二次構造が連続的に繰り返すのが特徴である。したがって、その構成アミノ酸配列は、非常に類似した数アミノ酸残基が繰り返したものとなる。

いずれにしても重要なのは非常に複雑な立体構造の形成が正確に自己組織的に起こることである。つまりポリペプチドは、アミノ酸の配列である一次構造が決まれば、二次構造ができ三次構造に自発的に組織化し、機能構造になるすばらしい高分子ということである。

タンパク質特有のこれら三次元構造が触媒や分子認識機能の本質であることは言うまでもない。しかし、時としてこの特有の (あまり安定ではない) 立体構造がくずれ、不溶性の繊維状集合体を形成する場合がある。最近悪名高い狂牛病などのプリオンタンパク質もそのひとつである。プリオンタンパク質の場合は、 α -ヘリックスに富む天然型構造が立体構造の変性および集合化と同時に β -ストランド構造に富んだアミロイド繊維といわれる異常型構造に変化する。言い換えると天然型では球状であるタンパク質が、繊維状構造に変換される反応でもある。もしかするとタンパク質の原始系は繊維状の立体構造をもつものかもしれない

MIHARA, Hisakazu 東京工業大学大学院生命理工学研究科 (226-8501 横浜市緑区長津田町 4259)・助教授, 理学博士。1986 年九州大学大学院理学研究科博士課程修了。専門はペプチド工学, 生体高分子化学

Structurally Dependent Self-Assembly of Polypeptides

図 1 球状と繊維状タンパク質

い。

このようなタンパク質のもつ重要な性質を、人工的にインスパイアすることにより、タンパク質つまりポリペプチドの立体構造形成の本質に迫ることができるだけでなく、立体構造に依存して自発的に組織化するインテリジェントな高分子の設計にも役立つ。

3. アミロイド形成ペプチド

タンパク質は機能構造である天然状態において機能を発揮する。しかしその繊細な構造ゆえに、ときとして通常に代謝されず、何らかの要因で分子集合化した繊維状の構造体（ミスフォールド体）が蓄積することがある。その代表例がアミロイドタンパク質と呼ばれ、プリオン病（ヒトのヤコブ病や狂牛病など）やアルツハイマー病などのアミロイド病をひき起こす^{2), 3)}。アミロイドはタンパク質のミスフォールド体が形成する繊維状の分子集合体である。したがって、アミロイド繊維は生体分子としては望ましくない構造体であるが、一方では、無数の β ストランド二次構造が規則正しく組織化されてできた β シート三次元構造体であると考えられることができる（図2）。

また疾病に関係あるいは無関係の多くのタンパク質がアミロイド繊維集合体を形成することが報告されている²⁾。それらのアミノ酸配列および本来の立体構造や機能はまったく異なるにもかかわらず、いずれも共通したアミロイドという三次元構造を形成するので、アミロイドはポリペプチドの共通構造の一種としてとらえることができる。その繊維の幅は約10 nmで、繊維方向に対して β -ストランドが直角に並んだクロス- β シート構造であると提唱されている。そうした観点から、アミロイド繊維は生化学的研究のみならず、工学的材料研究の面からも注目を集めている。筆者らはそのようなタンパク質の示すアミロイド形成といった特徴を設計した合成ポリペプチドを用いて明らかにし、人工的に利用する研究を展開している。

4. 二次構造転移とアミロイド形成

任意のアミノ酸配列を設計し、目的とした立体構造をつくらうとする試みは、デノボデザインと呼ばれる^{4), 5)}。簡単な配列でありながらタンパク質立体構造の特徴を有するポリペプチドをデザインすることができれば、モノマー単位である各アミノ酸の立体構造形成における役割がより明確になる。

筆者らはこのデノボデザインに基づき、アミロイド繊維化するポリペプチドを種々設計合成してきた^{6)~10)}。設計したポリペプチドは、基本骨格として平行の2本鎖ポリペプチドを有する（図2）。そのアミノ酸配列は、天然のコイルドコイル構造タンパク質に見られる7アミノ酸残基（ヘプ

図2 アミロイド繊維化ペプチド
 α から β への構造転移・集合化によるアミロイド繊維形成と透過型電子顕微鏡図。2本鎖アミロイドペプチド配列とシクロデキストリンによる阻害

テッド配列といわれる）を2回繰り返した14残基を含んだものである。理想的な α -ヘリックスである一方、 β シート構造もとりうる立体構造の二面性を有する。一般にタンパク質の集合化が起こるのは、本来タンパク質内部に包まれるべき疎水性部分が、何らかの要因で水環境にさらされてしまうことが原因のひとつであると示唆されている。そこで、この設計したペプチドの末端に露出する疎水性基を配置した。疎水性基として、環状オリゴ糖である β -シクロデキストリンとの特異的相互作用を意図してアダマンタン基を選択した。

この2本鎖ポリペプチドは水溶液中において、はじめは α -ヘリックスを形成するが自発的に β シートへと構造転移し、さらにアミロイド繊維化する^{6)~10)}。溶液環境を変えることで、 α -ヘリックスと β シート間のスイッチングを行うペプチドの設計は古くから報告されているが、筆者らのペプチドの構造転移は均一環境下で自発的に起こることである。その水溶液中での二次構造転移とアミロイド形成は、図3のようなシグモイダルなカーブで進行し、核形成に基づく自己複製・自己触媒の反応過程を示した。このペプチドの構造転移は、 β -シクロデキストリンの添加によりアダマンタン基をキャップすることで阻害された。また、末端に疎水性部位をもたないペプチドは、 α -ヘリックスを維持し構造転移しなかった。これらのことから、末端に導入した疎水性部位がこの構造転移をひき起こしたと結論できる。またアダマンタン基の代わりにオクタノイル基を配置しても同様に転移反応を起こすことができるが、パルミトイル基など非常に疎水性の高い基では α -ヘリックスのま

図3 核形成（鋳型）依存型のアミロイド繊維形成過程とその転移様式

まで、転移反応を起こすことはできない。つまり構造転移には適度な疎水性が必要になることがわかる。あわせて、有機溶媒や界面活性剤の添加が転移を阻害したことも、この構造転移を誘導するには疎水性相互作用が重要であることを支持する。さらに、等電点 pH において転移がもっとも速かったことや、塩の添加によって転移が阻害されたことなどから、静電相互作用も構造転移に寄与していることが示唆される。

上述のようにしてβシート構造となったペプチドを透過型電子顕微鏡で観察すると、天然のタンパク質と類似したアミロイド繊維形態をもつことが明らかとなった（図2）。このアミロイド繊維化は二次構造転移とほぼ同時に進行した。

5. 繊維状集合体形成の分子機構

筆者らはこの構造転移とアミロイド形成の機構を以下のように推察している^{6,7)}（図3）。はじめのαヘリックス状態ではおもに単量体として存在している。これが時間の経過に伴い末端に導入された疎水性部位に誘導され、αヘリックスのままに集合化していく（平衡反応）。この時間が立体構造変化のない、イナートな状態に相当する。はじめの単量体時にはαヘリックスを形成させる分子内の相互作用のみが働くが、引き続き起こるαヘリックスの集合化によって、新たに分子間の相互作用が生まれる。この新たな分子間相互作用はαヘリックスよりもβシートを安定化させるものであり、ここでαヘリックスからβシートへと水素結合の交換が起こる。さらに、いったんできたβシートは鋳型として働き、βシートの積み重なり、つまり

アミロイド繊維の成長が起こる（ほぼ不可逆反応）。前述した構造転移しないペプチドや阻害される条件においては、中間体としてのαヘリックス集合体の形成が起こりにくいために構造転移しない。

末端に導入した疎水性部位の重要性は前述のとおりであるが、このようなα→β構造転移を起こし、アミロイド化する性質を与えたのはそのアミノ酸配列である。そこで、このペプチドを基本としてアミノ酸を置換した変異体十数種を合成し調べたところ、1カ所の置換でも構造転移やアミロイド繊維形成の有無に大きな影響を及ぼすことがわかった^{9,10)}。また、末端に疎水性部位を導入しなくともペプチド部分の疎水性を上げることによりα→β構造転移・アミロイド繊維形成するペプチドの設計が可能なることもわかった。アミロイド繊維化は疾患とも関連していることから、ミスフォールディングとかミスアセンブリなどと呼ばれたりする。しかし、見方を変えるとアミロイド繊維はミスどころか、アミノ酸配列が1残基レベルで厳密に認識されてできあがる自己組織化構造体である。

6. βシートアレイの設計と材料応用の観点

アミロイドはアミノ酸が配列化したβシートが繊維状にアレイ化したポリペプチド素材である。材料設計の観点から、いかにβシートの繊維状集合体を設計、構築するかが次の戦略となる。この設計の指針を得るためには、立体構造の基であるアミノ酸配列を置換し、さらに詳細にβシート集合化の分子機構を知る必要があった。そこで筆者らは上記2本鎖ポリペプチドの電荷性アミノ酸（リシンKとグルタミン酸E）に着目した。1本鎖中に、4カ所配置したKおよびEの全16種の配置パターンに相当するポリペプチドライブラリを合成した（図4）¹⁰⁾。それぞれのアミ

ペプチド	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	ネット電荷	構造転移とアミロイド生成能
1.EEEE	E	E	E	E	-8	-
2.EEEK	E	E	E	K	-4	-
3.EEKE	E	E	K	E	-4	-
4.EKEE	E	K	E	E	-4	-
5.KEEE	K	E	E	E	-4	-
6.EEKK	E	E	K	K	0	++
7.EKEK	E	K	E	K	0	+++
8.EKKK	E	K	K	K	0	-
9.KEEK	K	E	E	K	0	-
10.KEKE	K	E	K	E	0	+++
11.KKEE	K	K	E	E	0	+
12.EKKK	E	K	K	K	+4	-
13.KKKK	K	K	K	K	+4	-
14.KKEK	K	K	E	K	+4	-
15.KKKK	K	K	K	K	+4	-
16.KKKK	K	K	K	K	+8	-

図4 グルタミン酸(E-)とリシン(K+)の電荷パターンを変化させたペプチドライブラリ(16種)とアミロイド繊維生成能

ロイド繊維形成を電子顕微鏡および色素観測により調べた結果、図4に示した中性の4種のペプチドのみが自己(単独種)で集合化する能力を有していた。さらに16種のペプチドのうち2種ずつを等モルで混合する系(全120種の組合せ)の試験を実施したところ、単独では集合化しないが、相補的な相手が存在するときにはじめてアミロイド繊維を形成する組合せが4種見いだされた(2分子種系)。120種中4種の組合せのみが図5に示すようにβシート構造が逆平行に配置された場合、正電荷のKと負電荷のEがうまく相補的な組合せになることがわかった。この電荷の相補性則を用いれば、16種の内単独で集合化する能力を有していたペプチドが4種のみであったことが説明できる。つまり、βシート構造を繊維状に集合化させる

ためには、電荷をうまく立体構造上で中和するような相補的イオンペアを作製すればよいということになる。

この電荷相補性を展開し、単独種や2分子種のみならず、3種あるいは4種の異なる分子をアレイ状に配向化させることができた(図5)。合成ポリペプチドを用いることによる天然タンパク質と異なる利点は、さまざまな機能性基をペプチド上に化学的配置できることである。つまり上記結果は、機能性基を装備したペプチドを繊維状に配向化した材料設計が可能であることを示している。βシート繊維状集合体の材料応用を展開している研究例として、繊維のゲルとしての性質を利用した材料、ペプチド分子の配向化を利用したバイオミネラリゼーションや細胞・組織工学用のマトリクス材料が報告されている^{11), 12)}。筆者らが発見したペプチドの相補的多品種集合体系を組み入れ、より高次の機能を付与する研究を展開中である。

7. おわりに

生物が進化的に獲得してきた地球適合型の分子システムを21世紀においては材料分野においても展開していなくてはならない。本稿では、ペプチドのアミロイド繊維集合体を例にとり、立体構造に依存し自己組織化するペプチドについて記述した。上記のような、地球適合型材料を生

a 単独でアミロイド繊維形成するポリペプチド

b 2種混合でアミロイド繊維形成するポリペプチド

c 1~4種βペプチドアレイ

図5 単一種でアミロイド繊維形成するポリペプチド(a)と2分子種ペアでアミロイド繊維形成するポリペプチド(b)、および1~4種のβシートから構成されるペプチドアレイ(c)

物システムをインスパイアーし設計していく場合、配列制御され規則的立体構造をとった自己組織化高分子システムの構築が重要となるであろう。

文 献

- 1) 勝部幸輝ほか: タンパク質の構造入門, 教育社, 1992
- 2) H. Mihara, Y. Takahashi: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 501 (1997)
- 3) 山内一也: 蛋白質核酸酵素, **43**, 65 (1998)
- 4) 小幡谷育夫, 三原久和: 生体ナノマシンの分子設計, 共立出版(2001), p. 122
- 5) W. F. DeGrado, C. M. Summa, V. Pavone, F. Nastro, A. Lombardi: *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 779 (1999)
- 6) Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara: *Chem. Eur. J.*, **4**, 2475 (1998)
- 7) Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara: *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 177 (1999)
- 8) Y. Takahashi, T. Yamashita, A. Ueno, H. Mihara: *Tetrahedron*, **56**, 7011 (2000)
- 9) Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara: *Structure*, **8**, 915 (2000)
- 10) Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara: *Chem. Bio. Chem.*, **2**, 75 (2001)
- 11) A. Aggeli, M. Bell, N. Boden, J. N. Keen, T. C. B. McLeish, I. Nyrkova, S. E. Radford, A. Semenov: *J. Mater. Chem.*, **7**, 1135 (1997)
- 12) T. C. Holmes, S. de Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, S. Zhang: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6728 (2000)