

# ポリペプチドのフォールディングと集積化により形成される高次構造と機能

亀山 敦\* 森井 尚之\*\*\* 岩岡 道夫\*\*\* 高橋 明\*\*

## Higher Order Structures and Function Formed by Polypeptide Folding and Integration

Atsushi KAMEYAMA\* Hisayuki MORII\*\*\* Michio IWAOKA\*\*\* Akira TAKAHASHI\*\*

### 1. 緒言

本プロジェクト研究は、タンパク質が線維状に集積した構造体であるアミロイド線維に着目し、その特異な高次構造、ペプチド鎖の集積・形成過程の解明、およびそれら構造的な特徴に基づくことで発現する分子機能の開拓を目的とする。アミロイド線維は一般に、数残基程度から 200 残基以上まで幅広いペプチド・タンパク質が多点での水素結合により形成する平行/逆平行  $\beta$  シート構造がさらに集積した、極めて強固な集積構造をもつ (Fig. 1)。これが一旦脳内で生成すると分解が極めて困難であり、アルツハイマー型認知症など多くの病気の原因になることが知られている。これまで、アミロイド線維の分子構造および発症機構の解明が進められているが、適用できる解析手法が限定的であることから詳細な解析は難しく、現在も研究議論が継続している。

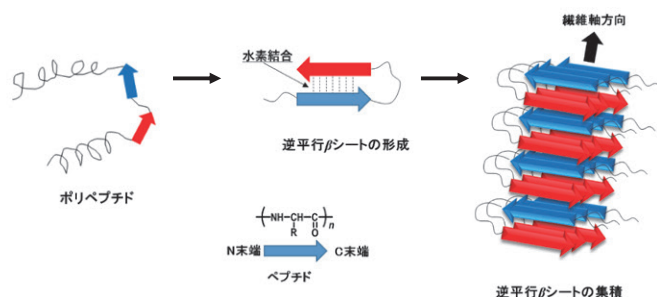


Fig. 1. Hierarchical structural formation of amyloid fibril.

一方で、アミロイド線維の強固な集積構造はシルクやクモの糸の優れた物性の起源になっており、これを再現した生体模倣材料の研究が報告されている<sup>1,2)</sup>。このような背景から、本研究ではシルクフィブロインの部分配列を模したセリン含有 6 アミノ酸残基ペプチド類を合成し、その集積構造の形成について検討を行っている。今年度は 6 アミノ酸残基ペプチドのアミノ酸配列の違いと集積構造との相関や、構造中のセリンの重要性について検討した。

\*教授 化学教室

Professor, Dept. of Chemistry

\*\*助教 化学教室

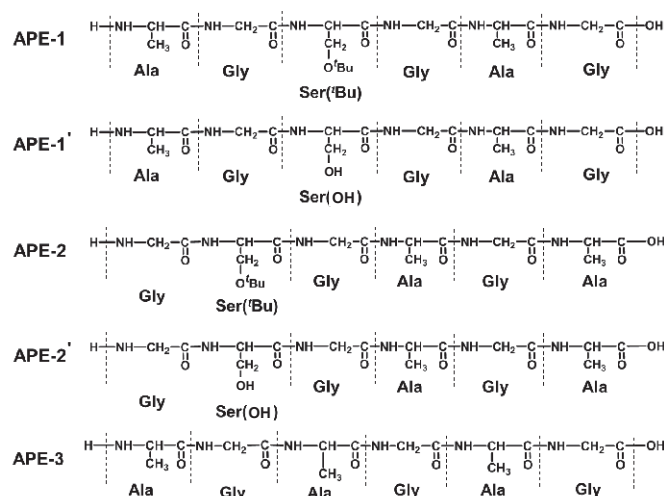
Assistant Professor, Dept. of Chemistry

\*\*\*客員教授 工学研究所

Guest Professor, Research Institute of Engineering

### 2. 6 アミノ酸残基ペプチド類の合成

シルクフィブロインには、アラニン(Ala)–グリシン(Gly)–セリン(Ser)–グリシン(Gly)–アラニン(Ala)–グリシン(Gly) の繰り返し配列が多く見られる。そのため、本研究ではこの配列ないしそれに準じた配列を持つ 4 種類のセリン含有 6 アミノ酸残基ペプチド類、および対照サンプルとしてセリンを持たないペプチドの合成を行った (Scheme 1)。FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, および ESI-TOF MS スペクトル測定により、目的の 6 アミノ酸残基ペプチド類が合成されたことを確認した。



Scheme 1. Structures of the serine-containing peptides.

### 3. ペプチド類の集積構造評価

まず、FT-IR 測定による集積構造評価を行った。既報より、逆平行  $\beta$  シート構造の中で水素結合によって分子同士が連なっているとき 1630  $\text{cm}^{-1}$  と 1700  $\text{cm}^{-1}$  付近に逆平行  $\beta$  シート構造に由来するピークが見られることが報告されている<sup>3)</sup>。また、1650  $\text{cm}^{-1}$  にはペプチド鎖がアモルファス凝集した際の C=O 由来のピークが現れる。APE-1 の FT-IR では、1630  $\text{cm}^{-1}$  と 1700  $\text{cm}^{-1}$  付近にピークが明確に見られ、逆平行  $\beta$  シート構造を形成していることが示唆された。一方、APE-2 ではこれらのピークは小さくなり、さらに 1650  $\text{cm}^{-1}$  付近のピーク強度比が高かった (Fig. 2)。このことから、APE-1 の方がより規則的な集積構造が形成されていることが示唆された。

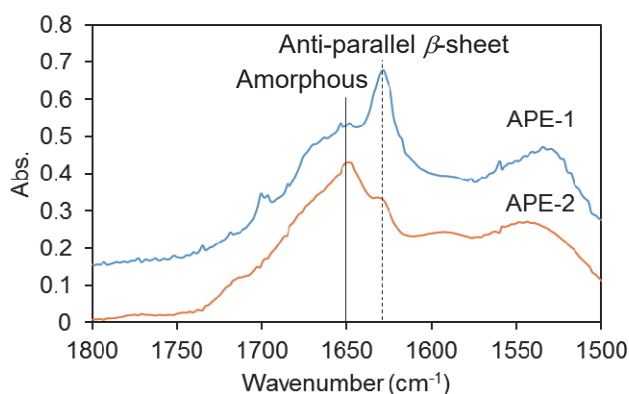


Fig. 2. FT-IR spectra of APE-1 and APE-2.

次に、広角 X 線散乱 (WAXS) 測定によるペプチド類の集積構造評価を行ったところ、いずれのペプチドにおいても約 4.2~4.6 Å の面間隔  $d$  に相当するピークが見られた (Fig. 3)。これは逆平行  $\beta$  シート構造の基本単位である 2 つのペプチド鎖間の一般的な距離に相当し (Fig. 4)、全てのサンプルにおいて逆平行  $\beta$  シート構造が形成されていることが示唆された。一方、ピークの鋭さやアモルファスピークが占める割合が大きく異なることも読み取れた。そこで、各 WAXD スペクトルに対してカーブフィッティングを行うことで集積構造に由来するピークを分離し (Fig. 3)、下記 Scherrer の式を用いて集積構造のサイズを見積もった。

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

ここで、 $D_{hkl}$  は集積構造のサイズ (Å)、 $\beta$  はピークの半値幅 (rad)、 $\theta$  は Bragg 角 (rad)、 $\lambda$  は X 線の波長 (1.54 Å)、および  $K$  は定数 (ここでは 0.94) である。その結果を Table 1 にまとめた。Ser 側鎖の OH が *t*-ブチル基 ('Bu) で保護された APE-1 の  $D_{hkl}$  は 116 Å、APE-1' の  $D_{hkl}$  は 28.6 Å であり、APE-1' の方が集積しやすく、より大きな集積体が形成されることが分かった。このことから、APE-1 では Ser 側鎖の 'Bu の疎水相互作用により  $\beta$  シート間のスタッキングを誘起していることが示唆された。また、APE-1 は APE-2 と比べ、逆平行  $\beta$  シート構造由来のピーク面積が大きく、したがって集積構造のサイズは APE-1 の方が大きいことが示唆された。これは、6 アミノ酸残基の配列が逆平行に並んだ逆平行  $\beta$  シート構造の中で、Ser 側鎖

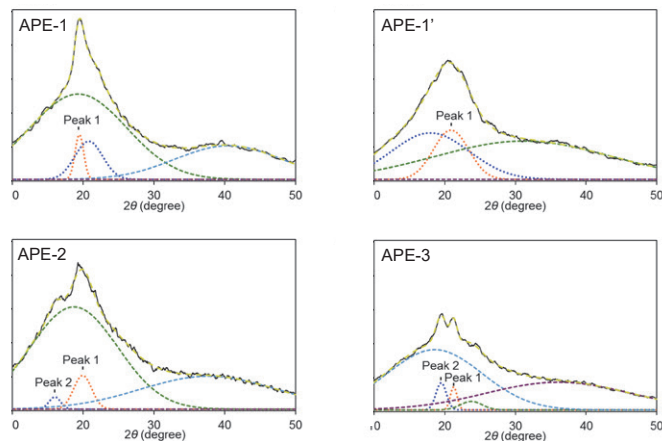
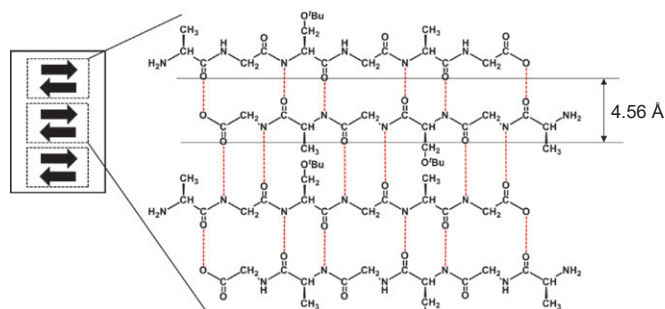


Fig. 3. WAXS profiles of the obtained peptides.

Table 1. Curve-fitted WAXD profiles

Peptide	Peak No.	$d$ (Å)	Peak area ratio (%)	$D_{hkl}$ (Å) <sup>a)</sup>
APE-1	1	4.56	3.2	116
APE-1'	1	4.25	15.7	28.6
APE-2	1	4.45	4.7	52.4
	2	5.54	1.1	85.6
APE-3	1	4.18	1.7	149
	2	4.55	3.0	95.9

a) Calculated from Scherrer's equation.

Fig. 4. Speculated anti-parallel  $\beta$ -sheet structure of APE-1.

の疎水性 'Bu 基が APE-2 に比べて互いに近傍に位置するので、1 枚の逆平行  $\beta$  シート構造が層状に集積しやすかったことが考えられる。また、APE-1 は APE-3 と比べても全体の構造中の集積構造の割合が大きく、6 アミノ酸残基ペプチドの構成成分として、側鎖 'Bu 基を有するセリン (Ser ('Bu)) を 1 つ含有することで集積特性が向上することが示唆された。

以上、本研究ではシルクフィブロインの優れた物性発現に重要な役割を果たしているペプチド部分をモデル化した、部分配列の異なるセリン含有 6 アミノ酸残基ペプチド類の合成を行い、その分子構造・分子配列と集積特性の相関について検討し、Ser 側鎖の疎水性保護基がペプチドの集積化を促進することを明らかにした。

## 6. 参考文献

- (1) O. Rathore and D. Y. Sogah, Nanostructure Formation through  $\beta$ -Sheet Self-Assembly in Silk-Based Materials, *Macromolecules*, 34, 1477-1486 (2001).
- (2) T. B. Yu, J. Z. Bai and Z. Guan, Cycloaddition-Promoted Self-Assembly of a Polymer into Well-Defined  $\beta$  Sheets and Hierarchical Nanofibrils, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 1097-1101 (2009).
- (3) H. Morii, M. Nara, S. Konakahara, T. Tsuji and T. Shimizu, Infrared Studies on Amyloid Structure of Insulin, *Peptide Science* 2014, 307-308 (2015).