

生体高分子の自己組織化と分子進化

「形とはたらき」領域 三原 久和

要 旨

プレ生命ポリマーの分子進化の概念を参考にし、シンプルな構造で「自己組織化能」や「自己複製能」を有するペプチド分子の構築を目指した研究を行った。ペプチド β シートが3次元的に組織化した集合体であるアミロイド繊維構造を利用し、「自己認識能」や「自己複製能」をもつペプチド分子の設計に成功した。また、DNAの核酸塩基と複合化した α ヘリックス分子を設計・合成し、それらの「自己認識能」に基づいた「自己複製系」も構築した。本研究の成果は、新たな「分子設計」技術へと発展させることが可能である。

1. 研究のねらい

生体高分子の「分子進化」は、生物誕生や生物進化と関連し、我々の究極の研究目標の一つとなっている。シンプルな構造で「自己組織化能」や「自己複製能」を有する分子は、生命の起源において重要なはたらきをしていたと考えられる。生体高分子の分子進化の秘密を探ることにより、新たな分子の性質を見つけだし、新たな「分子設計」技術へと発展させることが可能となると考えられる。シンプルな「プレ生命ポリマー」から「情報コード分子」がいかに関進化してきたかを探る研究は、最もチャレンジングな領域であるとともに、得られた分子設計原理は情報コード分子など全く新規の物質を設計するための科学技術に発展することが期待される。分子が「自己複製能」を獲得するためには、分子どうしが「自己組織化」し、「自己複製触媒能力」を有する必要がある。また、プレ生命ポリマーは有機化学的にもシンプルな構造を有しているべきである。これらの特性は、「ホモキラルポリマー」である生体高分子に与えられた特徴であり、シンプルなキラルポリマーから設計原理に基づき探索することにより、これらの特性を備えたポリマーの発見が期待される。本研究においては、とくに「プレ生命ポリマー」の候補の一つとして、ポリペプチドに焦点を絞り、ペプチド組織化集合体の形と分子進化との関連性の追求から、新規分子設計原理の確立を目的とした。具体的には、狂牛病やヤコブ病として有名なプリオン病や老人性痴呆症のアルツハイマー病などの原因となるアミロイドタンパク質をモデル化した繊維状集合体を利用した。ペプチドアミロイド繊維は、 β シートが3次元的に組織化した集合体である。このアミロイド繊維の

自己組織化における、相補的分子認識機構を明らかにし、自己複製能を有するポリマーの設計に発展させる研究を行った。また、DNA や RNA がもつ相補的認識機構を有する人工ペプチドを設計することを目的として、側鎖に A, T, G, C の核酸塩基をもつアミノ酸を合成し、 α ヘリックス構造を有するペプチド中に導入した。この核酸機能と複合化したペプチドが自己相補的な認識に基づき、自己複製能を発揮するポリマー系の構築を行った。

2. 研究方法と成果

2-1 ペプチドアミロイドの自己組織化と自己複製

近年、狂牛病やヒトのヤコブ病として有名になったプリオン病や老人性痴呆症のアルツハイマー病などのアミロイド病は、タンパク質（ポリペプチド）のミスフォールディングにより起こるアミロイド繊維形成が主原因である。この「ペプチドアミロイド」繊維化現象は、アミノ酸配列も3次元構造も全く異なる種々のタンパク質に共通したものであり、ポリペプチド高分子の有するひとつの「共通の自己組織化能」としてとらえることができる（図1）。分子進化的特徴として、生成した β シート構造からなるアミロイド繊維構造は、「自己触媒的」に立体構造を複製し、自己組織化する能力を有している。シンプルな構造（アミノ酸配列）を有するアミロイド性ペプチドを設計・合成することにより、アミロイドの「立体構造的自己複製反応」の秘密を探り、分子の「化学的自己複製反応」の開発に結びつける研究を行った。

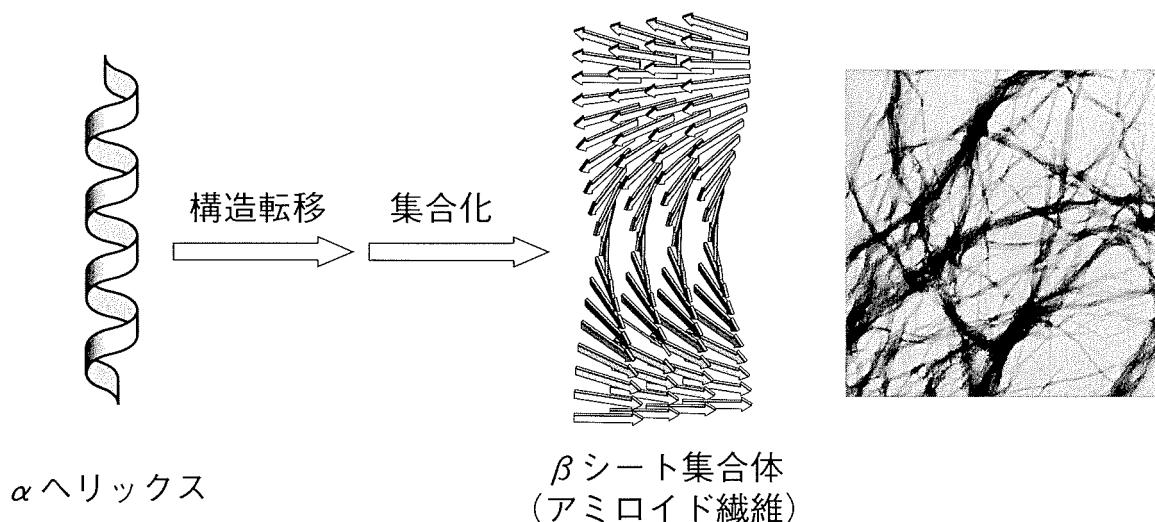


図1 アミロイドペプチドの自己組織化. ペプチドが α ヘリックスから β シートへの立体構造変化を伴い集合化し、アミロイド繊維化する（透過型電子顕微鏡写真：右）

ペプチドの設計と2次構造転移反応およびアミロイド繊維形成

任意のアミノ酸配列を設計し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。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。本研究では、このデノボデザイン手法により、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プリオンモデルペプチドの合成に成功した。このペプチドは、 α ヘリックス性のペプチドを2本平行に並べたものであり(図2)、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一つであると示唆されている。そこで、その設計したペプチド

の末端に露出する疎水性基(アダマンタン基やオクタノイル基)を配置した。このペプチドは中性水溶液中で、図2のようなカーブで α ヘリックスから β シートへと構造転移し、核形成に基づく自己複製・自己触媒的反應過程を示した。 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1)。このアミロイド繊維化は2次構造転移とほぼ同時に進行した。

相補的分子認識機構の発見と多分子集合体の構築

素材設計の観点から、如何に β シートの繊維状集合体を設計、構築するかが興味の対象となる。この設計の指針を得るためには、さらに詳細に β シート集合化の分子機構を知る必要

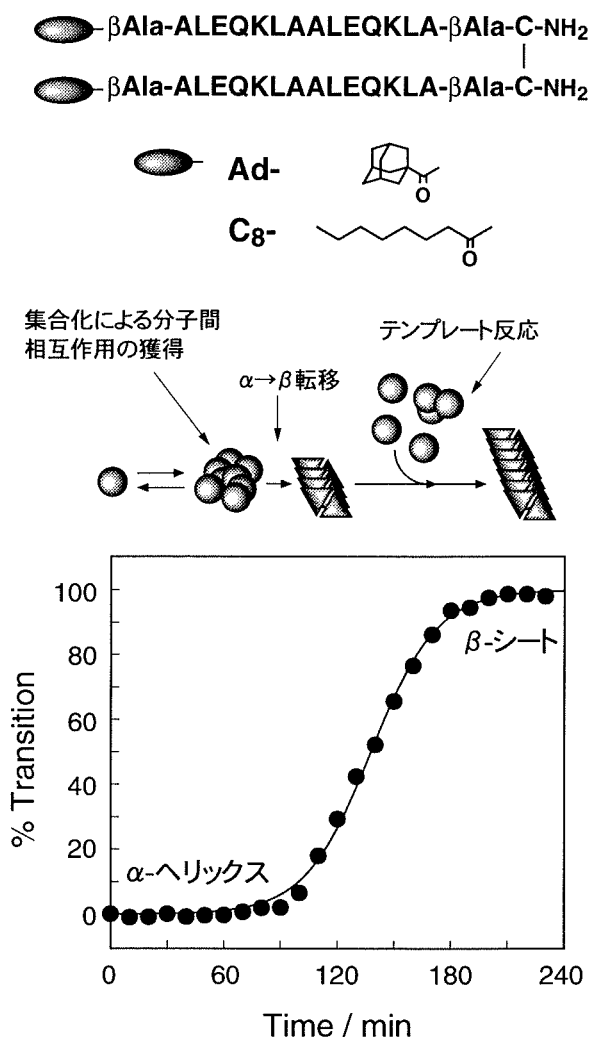


図2 アミロイド性ペプチドの構造と α - β 構造転移を伴うアミロイド組織化機構

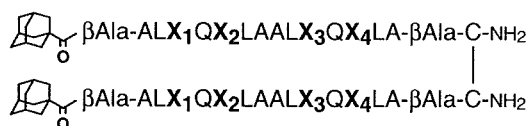
がある。そこで上記2本鎖ポリペプチドの電荷性アミノ酸（リシンKとグルタミン酸E）に着目した。1本鎖中に、4カ所配置したKおよびEの全16種の配置パターンに相当するポリペプチドライブラリを合成した（表1）。それぞれのアミロイド繊維形成を電子顕微鏡および色素観測により調べた結果、表1に示した中性の4種のペプチドのみが自己で集合化する能力を有していた。

さらに異なる2分子種で組織化する相補的分子ペアを探索するために、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）を実施し

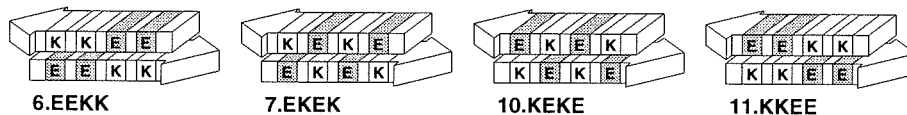
たところ、単独では集合化する能力がないが、相補的な相手が存在する時に初めてアミロイド繊維を形成する組合せが4種見出された。120種中4種の組合せのみが図3bに示すよう

表1 電荷性アミノ酸（E、K）を置換したアミロイド性ペプチドライブラリの構造とアミロイド組織化能

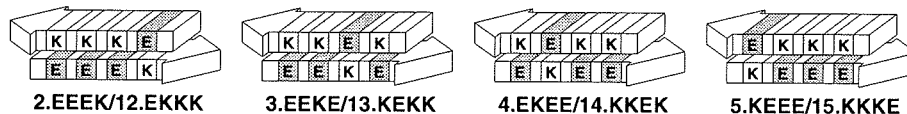
ペプチド	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	ネット電荷	アミロイド生成能
1.EEEE	E	E	E	E	-8	—
2.EEEK	E	E	E	K	-4	—
3.EEKE	E	E	K	E	-4	—
4.EKEE	E	K	E	E	-4	—
5.KEEE	K	E	E	E	-4	—
6.EEKK	E	E	K	K	0	++
7.EKEK	E	K	E	K	0	+++
8.EKKE	E	K	K	E	0	—
9.KEEK	K	E	E	K	0	—
10.KEKE	K	E	K	E	0	+++
11.KKEE	K	K	E	E	0	+
12.EKKK	E	K	K	K	+4	—
13.KEKK	K	E	K	K	+4	—
14.KKEK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



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 2種、3種、4種のヘテロ種で組織化するアミロイド繊維の構築

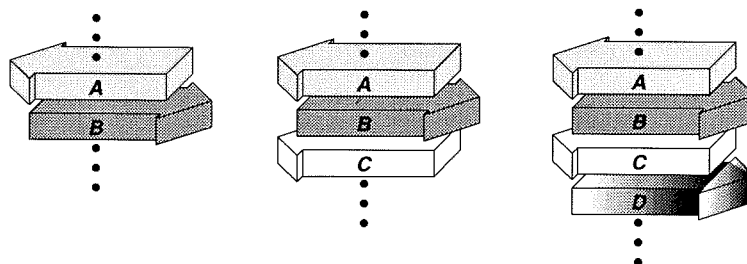


図3 相補的相互作用を利用した1分子種でのアミロイド組織化（a）、2分子種でのアミロイド組織化（b）および多分子組織化（c）

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分かった。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(図3a)。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成すれば良いということになる。この電荷相補性を展開し、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もできた(図3c)。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向できることである。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。

アミロイドペプチドの自己複製反応

アミロイドペプチドの設計に成功し、配列特異的な相補的組織化系を構築できたので、これを応用し、アミロイドペプチド中に触媒基(Cysチオール)を導入し、アミロイドペプチドの「化学的自己複製反応系」の構築を試みた。1本鎖のアミロイド性ペプチド(テンプレート)を新たに設計し、テンプレートペプチドの半分ずつのフラグメント中に、活性基(チオエステル)を導入し、自己の相補的組織化に基づく触媒反応によりテンプレート自身が複製する分子システムを設計した(図4)。

アミロイド繊維化したテンプレートペプチド存在下、各フラグメントペプチドどうしが触媒的に化学的ライゲーション反応を起こし、自己を複製する反応が観測された。アミロイド組織体を形成していない状態や変性剤によりβシート構造を崩した状態では、自己複製反応

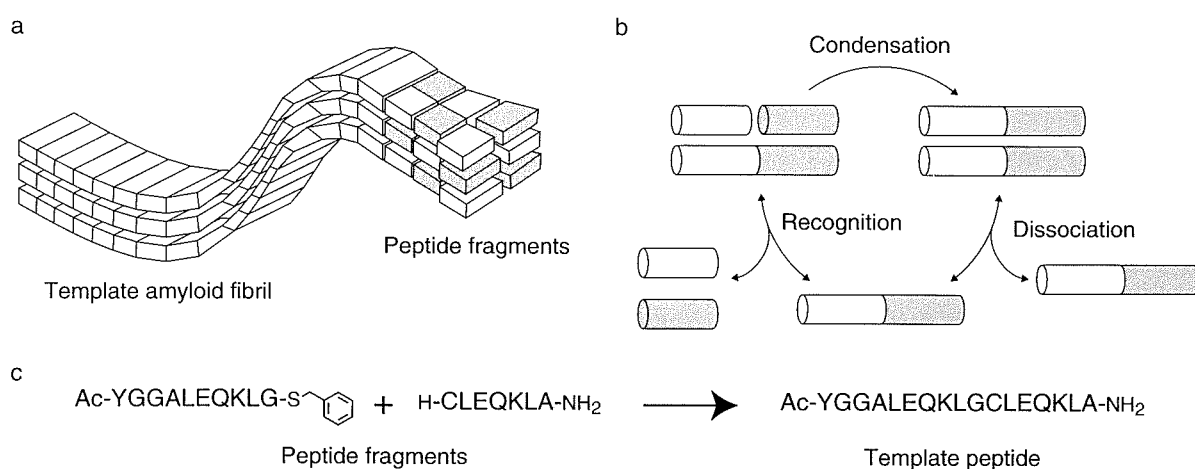


図4 アミロイド繊維の化学的および立体構造的自己複製反応(a)、自己複製反応の模式図(b)と実際のペプチドの化学ライゲーション反応(c)

は、著しく低下し、 β シート構造やアミロイド繊維集合体構造が、テンプレート依存の自己複製反応に寄与していることが示された。

2-2 核酸塩基と複合化したペプチドの自己組織化と自己複製

生体内において分子間の相補的認識は生物化学プロセスの基本であり、タンパク質-タンパク質、核酸-核酸、タンパク質-核酸、あるいはこれら生体高分子とリガンド小分子の間には、特異的かつ相補的な相互作用が働いている。特にDNAやRNAでは核酸塩基が二本鎖間で相補的な水素結合を形成することで相補的認識を担っており、核酸の遺伝情報の保持・伝達分子としての役割を可能にしている。一方、タンパク質における相補的認識は立体構造も含めて複数のアミノ酸が関わった複雑なものであり、立体構造と認識の特異性・相補性を同時に設計することは難しい。そこで、本研究においてはポリペプチドのデノボデザイン手法を用いて、核酸塩基を側鎖にもつアミノ酸を合成し核酸の相補的認識機能を導入したペプチドの設計を行うことにした。核酸塩基をポリペプチド立体構造中に適切に配置することで、相補的認識と立体構造を組み合わせた新たな機能分子デザインが可能になると期待される。

核酸塩基アミノ酸とペプチドの設計

ペプチド立体構造を利用するという観点から、側鎖に核酸塩基をもつL体の α アミノ酸、核酸塩基アミノ酸(NBA)を合成した。異分子ペプチド間の認識因子としてNBAを利用し、核酸塩基間の相補的認識機能を応用したペプチドの自己複製反応系の構築を行った。コイルドコイル構造に基づくペプチド鎖間の認識により、テンプレートペプチド上に2つのフラグメントペプチドが配列し、ネイティブ化学ライゲーション法によりテンプレートと同一のペプチドを生成する「自己複製系」を発展させることにした。コイルドコイル構造中に新たな相補的相互作用因子としてNBAを配置し、自己複製反応における核酸塩基対導入による効果を調べた(図5)。

核酸塩基含有コイルドコイルペプチドの自己複製反応

テンプレートペプチドと2つのフラグメントを混合することにより、ネイティブ化学ライゲーション反応が起こり、テンプレートペプチド自身が生成した(図5)。反応液に添加したテンプレートの初期濃度が高くなるにつれてペプチドの生成量が増加し、テンプレートが縮合反応を触媒する自己触媒反応であることが示された。NBA(核酸塩基対)を導入することにより、自己複製触媒反応の著しい向上がみられた。さらにチミン-アデニン塩基対を

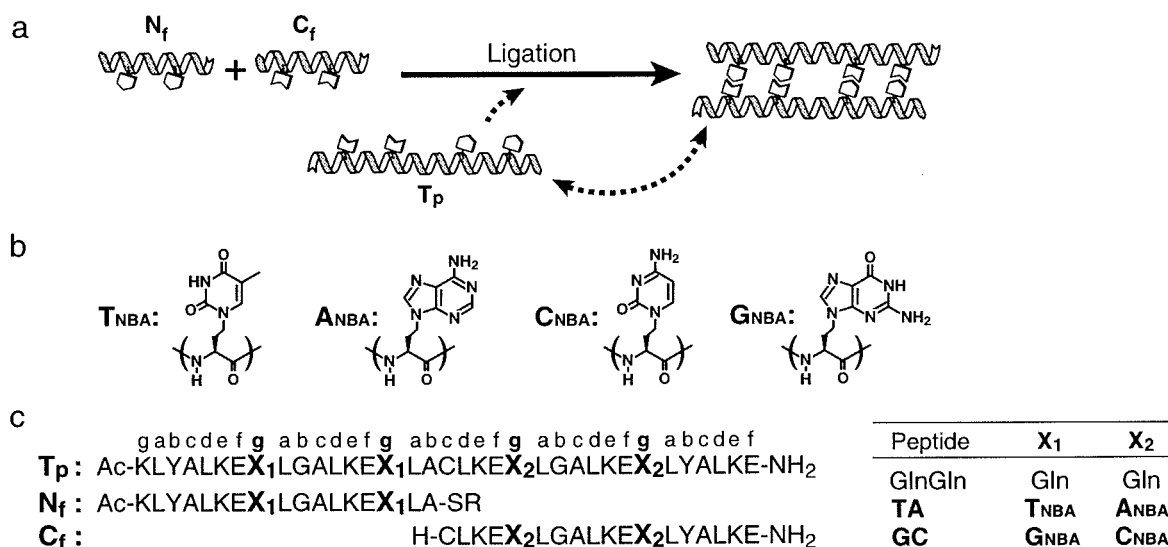


図5 核酸塩基アミノ酸 (NBA) 含有コイルドコイルペプチドの自己複製反応 (a). NBA の構造 (b) とペプチド配列 (c)

導入したペプチドの系に対して、反応液にアデニンを添加すると自己複製反応が阻害された。このことは、コイルドコイル中に配置された核酸塩基間に相互作用が働いており、縮合反応が促進されたことを示唆している。また、変性剤存在下では反応が大きく抑制されたことから、コイルドコイル立体構造が重要である。コイルドコイル構造中に導入された核酸塩基がペプチド間の認識に効果的に機能し、自己複製反応が促進されたことがわかる。

近年開発されたアミノ酸側鎖に核酸塩基を導入したペプチド核酸 (PNA) は、人工設計物であるにもかかわらず、DNA/RNA と相補的なコンプレックスを形成する。現存する DNA/RNA 分子よりかなりシンプルな構造の PNA や NBA の様な核酸塩基複合化ポリペプチドが組織化構造を構築することから、プレ生命ポリマーとしての有力候補となりうる。

3. 今後の展望

生体高分子が進化的に獲得してきた道を、科学的に創造し、逆に辿ってみるアプローチを行ってみることにより、今までは発想しなかった全く新しい分子システムの構築ができる。このような研究展開により、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材料設計分野においても発展させていくことができるであろう。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、最も多様な立体構造を形成でき、最も多様な機能を発揮できるポリマーである。巨大で複雑すぎる天然タンパク質が有する特徴を模倣した簡単な設計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と考えている。

4. 発表リスト

(1) 論文 (主なもの)

- 1 T. Takahashi, K. Hamasaki, I. Kumagai, A. Ueno, H. Mihara, "Design of a Nucleobase-Conjugated Peptide that Recognizes HIV-1 RRE IIB RNA with High Affinity and Specificity", *Chem. Commun.*, 349-350 (2000)
- 2 I. Kumagai, T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mihara, "Construction of HIV Rev Peptides Containing Peptide Nucleic Acid that Bind HIV RRE IIB RNA", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 377-379 (2000)
- 3 S. Matsumura, A. Ueno, H. Mihara, "Peptides with Nucleobase Moieties as a Stabilizing Factor for a Two-Stranded α -Helix", *Chem. Commun.*, 1615-1616 (2000)
- 4 M. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, "Peptide Design Based on an Antibody Complementarity-Determining Region (CDR): Construction of Porphyrin-Binding Peptides and Their Affinity Maturation by a Combinatorial Method", *Chem. Eur. J.*, 6, 3196-3203 (2000)
- 5 Y. Takahashi, T. Yamashita, A. Ueno, H. Mihara, "Construction of Peptides that Undergo Structural Transition from α -Helix to β -Sheet and Amyloid Fibril Formation by the Introduction of N-Terminal Hydrophobic Amino Acids", *Tetrahedron*, 56, 7011-7018 (2000)
- 6 Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, "Mutational Analysis of Designed Peptides that Undergo Structural Transition from α Helix to β Sheet and Amyloid Fibril Formation", *Structure*, 8, 915-925 (2000)
- 7 Y. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, "Heterogeneous Assembly of Complementary Peptide Pairs into Amyloid Fibrils with Structural Transition from α -Helix to β -Sheet", *ChemBioChem*, 2001, 75-79 (2001)
- 8 T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mihara, "Construction of Peptides with Nucleobase Amino Acids: Design and Synthesis of the Nucleobase-Conjugated Peptides Derived from HIV-1 Rev and their Binding Properties to HIV-1 RRE RNA", *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 991-1000 (2001)
- 9 I. Kumagai, T. Takahashi, K. Hamasaki, A. Ueno, H. Mihara, "HIV Rev Peptides Conjugated with Peptide Nucleic Acids and Their Efficient Binding to RRE RNA",

Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1169-1172 (2001)

- 10 M. Sakamoto, A. Ueno, H. Mihara, "Multi-Peptide-Metalloporphyrin Assembly on a Dendrimer Template and Photoinduced Electron Transfer Based on the Dendrimer Structure", *Chem. Eur. J.*, 7, 2449-2458 (2001)

(2) 総説・解説

- 1 H. Mihara, Y. Takahashi, "Self-Assembly of Polypeptides into Amyloid Fibrils with Structural Transitions", *Trans. Material Res. Soc. Jpn.*, 26, 473-478 (2001)
- 2 三原久和, "ポリペプチドの立体構造転移とアミロイド繊維への自己組織化", *機能材料*, 21(10), 11-17 (2001)

(3) 口頭発表

国際学会招待講演

- 1 H. Mihara, "Engineering self-assembly of peptides by amphiphilic 2D motifs", Self-assembling Peptide Systems in Biology, Engineering & Medicine, Crete, Greece, June 30-July 6, 1999
- 2 H. Mihara, Y. Takahashi, A. Ueno, "Complementary self-assembly of designed peptides into amyloid fibrils with α - β structural transitions; 2nd Peptide Engineering Meeting (PEM)/7th Naples Workshop on Bioactive Peptides (CAPRI), Anacapri, Italy, September 5-8, 2000
- 3 H. Mihara, Y. Takahashi, A. Ueno, "Complementary Assembly of Heterogeneous Multiple Peptides into Amyloid Fibrils with α - β Structural Transitions", 2nd International Peptide Symposium, San Diego, USA, June 9-14, 2001

国内学会 招待・依頼講演

- 1 高橋勇太、三原久和, "設計ペプチドの α - β 構造転移とアミロイド繊維形成", 日本生物物理学会第37会年会、和光、1999年10月
- 2 三原久和、高橋勇太, " α - β 構造転移を伴いアミロイド繊維に相補的集合するペプチドのデザイン", 第12回名古屋コンファレンス、岡崎、2000年10月
- 3 三原久和, "Self-assembly of polypeptides into amyloid fibrils with structural transitions", 第12回日本MRS学術シンポジウム、川崎、2000年12月

- 4 三原久和、“ペプチドの組織化・複合化構造体と機能”、日本化学会第80秋季年会、千葉、2001年9月
- 5 高橋勇太、三原久和、“ $\alpha \rightarrow \beta$ 転移ペプチドの相補的認識機構に基づくアミロイド繊維形成”、日本生物物理学会第39会年会、大阪、2001年10月
- 6 高橋勇太、三原久和、“ペプチド立体構造の二面性と配列相補的アミロイド繊維形成”、第74日本生化学会大会、京都、2001年10月

(4) 特 許

- 1 三原久和、熊谷一郎、“レトロウイルスの発現調節蛋白質の修飾体及びその改質法”、特願2000-260644号、平成12年
- 2 三原久和、小幡谷育夫、“ヘムを結合したペプチド、それをを用いた酸化触媒”、特願2000-267093号、平成12年

(5) 取材など

- 1 三原久和、“アミノ酸配列を読み解く”、日経サイエンス、裏表紙、11月（2000）
- 2 馬場嘉信、三原久和、浜地格、杉本直己、“テーラーメイド・バイオケミストリーの目指すもの”、化学, 56, 12-18（2001）

外部発表71件（論文22件、総説2件、特許2件、口頭発表：国際会議14件、国内会議28件、取材3件）

謝 辞

本研究は、東京工業大学大学院生命理工学研究科において行ったものである。自由に研究する機会を与えていただいた上野昭彦教授、および奮闘していただいた学生諸氏（とくに高橋勇太君、高橋剛君、坂本宗由君、松村幸子君、高橋瑞稀君、小幡谷育夫君、坂本清志君、熊谷一郎君、山下太郎君）に感謝いたします。