

研究終了報告書

「可逆的ペプチド鎖による高次ナノ構造構築法の開発」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:澤田 知久

1. 研究のねらい

タンパク質をはじめとする、生物の分子構造が組み上がる過程では、フォールディングと自己集合が協奏的もしくは階層的に作用している。一方、人工系ではこれまで、フォールディングする分子や分子の自己集合現象の研究がそれぞれ独立に大きく発展してきた。本研究では、両者を統合する新たな合成法を開拓し、既存の手法では到達できない分子構造を実現することをねらいとした。その方法として、ペプチドフラグメントと可逆な配位結合を組み合わせる、「可逆的ペプチド鎖」をコンセプトとした。その特徴として、可逆的な結合が鎖のくぐり抜けを可能にするため、通常の生体高分子鎖では見られない分子トポロジーの生成が期待される。また、高効率・大スケールでの合成が可能であることや、水系に限らず有機溶媒系におけるタンパク様構造の精密構築が期待される。このような考えのもと、可逆的ペプチド鎖を用いたナノ構造構築法を開拓し、ナノ構造構築法に新たなブレークスルーをもたらすことを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

可逆的に連結したペプチド鎖が創り出す、高次ナノ構造の構築と機能化を実施した。その内容は、① β ストランド性のタンパク質様構造の精密人工構築と②高度な絡まりトポロジー構造の創出、の二項目である。項目①では、生体のアミロイド線維に見られるクロス β 構造の人工構築、微生物に存在する L/D-アミノ酸の交互配列がつくる β ヘリックス二重らせんの構造制御、人工 β バレル構造の創出、を達成した。項目②では、可逆な結合によってペプチド鎖が潜在的に絡まり合う性質を用い、既存の合成手法では未踏の絡まりトポロジー構造であった、9、10 交点数のトーラス結び目分子およびトロイダル超らせんの構築、60 交点数の巨大球殻構造の創出を実現した。

(2) 詳細

研究テーマ①「 β ストランド性タンパク質様構造の精密人工構築」

クロス β 構造の人工構築

激しい凝集性のために精密構築が困難とされる平行 β シート構造を、配位結合を導入することで実現した。平行 β シート構造の片面に金属配位側鎖を、もう一方の面にアルキル側鎖を集積させる設計により、4 残基ペプチド配列中の奇数残基に金属配位性残基を、偶数残基に疎水性のアルキル側鎖をもつ残基を交互配置させた。

様々なアルキル側鎖をもつペプチド配位子 11 種類とヨウ化亜鉛(または銀塩)の錯形成を実施し、それぞれ針状結晶を高収率で得た。X 線構造解析により、平行 β シート構造の形成を確認した。 β シートの面間にはアルキル側鎖同士の精密な疎水性相互作用(立体ジッパー)

が観測され、アルキル鎖のかさ高さに応じて「噛み合い構造」、「コンタクト構造」、「凹凸構造」をとる様子を観測した(図 1)。偶数残基の側鎖に水酸基や芳香環を導入すると、向かい合う β シート面が通常の逆平行様式ではなく平行様式となることも明らかにし、これは天然のタンパク質由来のペプチド構造も含め、初の観測例となった。さらにペプチド配列を伸長した場合には結晶性粉末が得られ、電子線回折構造解析により、同様の平行 β シート構造が生成していることも明らかにした。(5. 主な研究成果リストの代表的な論文 1)。

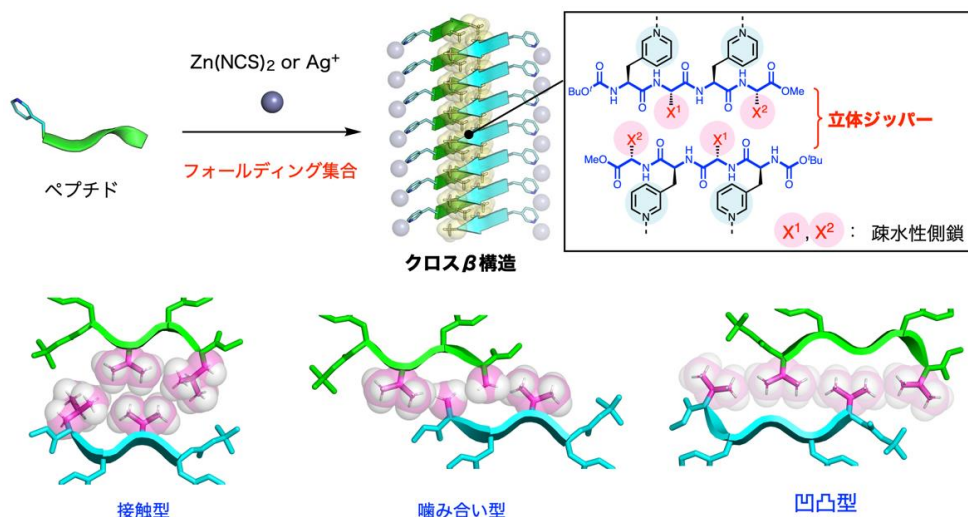


図 1 クロス β 構造形成スキームと、観測された各立体ジッパー構造。

β ヘリックス二重らせんの構造制御

微生物内に見られる L 体と D 体のアミノ酸の交互配列ペプチドは、らせん状の β ストランド配座 (β ヘリックス) をとり、二重らせんを形成する。このとき、逆平行型二重らせん、平行型二重らせん、単量体が平衡で混在する。本研究では、(L,D)-オクタバリン配列に対して、側鎖に金属架橋を施し、その架橋位置に応じた β ヘリックス二重らせんの構造制御を実現した(図 2)。

L/Dアミノ酸交互配列のペプチド

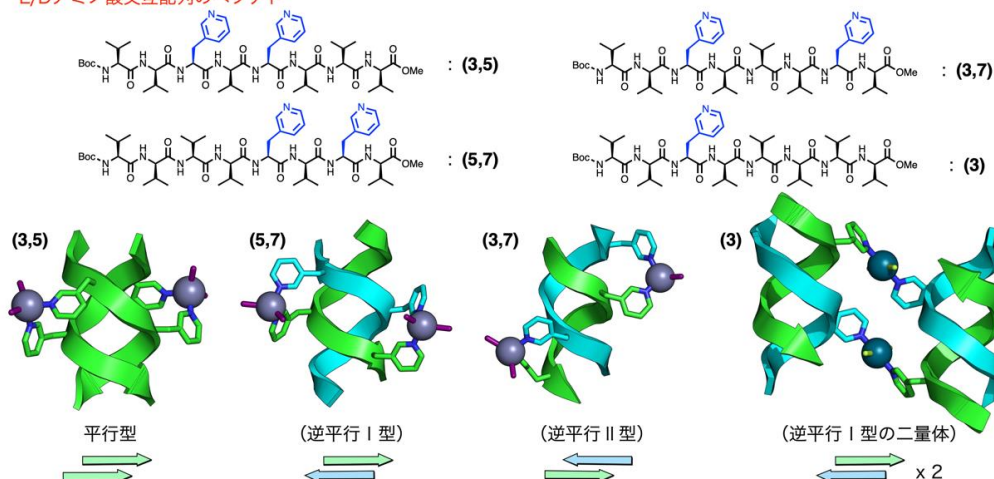


図 2 金属架橋位置に基づいた、三種類の β ヘリックス二重鎖と二量体構造の選択的構築。

まず、N 末端から(3,5)残基目をヨウ化亜鉛によって金属架橋した場合には平行型 β ヘリックス二重らせんが、(5,7)残基目を金属架橋した場合には逆平行型 β ヘリックス二重らせんが選択的に生成した。(3,7)残基目を金属架橋した場合には、ペプチド鎖の向きが反転した逆平行型 β ヘリックス二重らせんを得ることに成功し、これによって、取りうる三種類の二重らせん構造全てを作り分けることに成功した。さらに、N 末端から 3 残基目のみを塩化パラジウムによって金属架橋した場合には、逆平行型 β ヘリックス二重らせんの二量化構造が定量的に得られることも見出した。(5. 主な研究成果リストの代表的な論文 2)。

研究テーマ②「高度な絡まりトポロジー構造の創出」

高交点トーラス結び目およびトロイダル超らせん構造の構築

可逆的ペプチド鎖が可能にする構造群として、既存の合成手法では到達できない高度な絡まり構造の構築に着目した。これまで構築した 7 および 8 交点数のトーラス結び目構造を基に、緻密な分子設計による絡まりトポロジーの拡張を試みた。トーラス結び目構造の中央の空孔にかさ高いアミノ酸側鎖を配置し、立体障害を与えることで結び目構造を段階的に拡張させることにした。このとき、ペプチド主鎖の配座に影響を与えないアミノ酸残基である点も考慮し、直鎖アルキル基を側鎖にもつペプチド配列を設計した(図 3)。

トリペプチド配位子と銀イオンの錯形成を実施し、新たに 9 および 10 交点数のトーラス結び目構造へと拡張することに成功した。側鎖のアルキル鎖をさらに伸長したペプチド配位子を検討したところ、予想外にトロイダル超らせん構造が得られることも発見した。これは、溶液中で生成した 9 または 10 交点のトーラス結び目構造が立体ひずみによって開環し、無限に連なった超らせんポリマー構造へと結晶化の過程で変換された構造である。これにより、有限分子構造から一次元ポリマー構造への展開も実現した。(5. 主な研究成果リストの代表的な論文 3)。

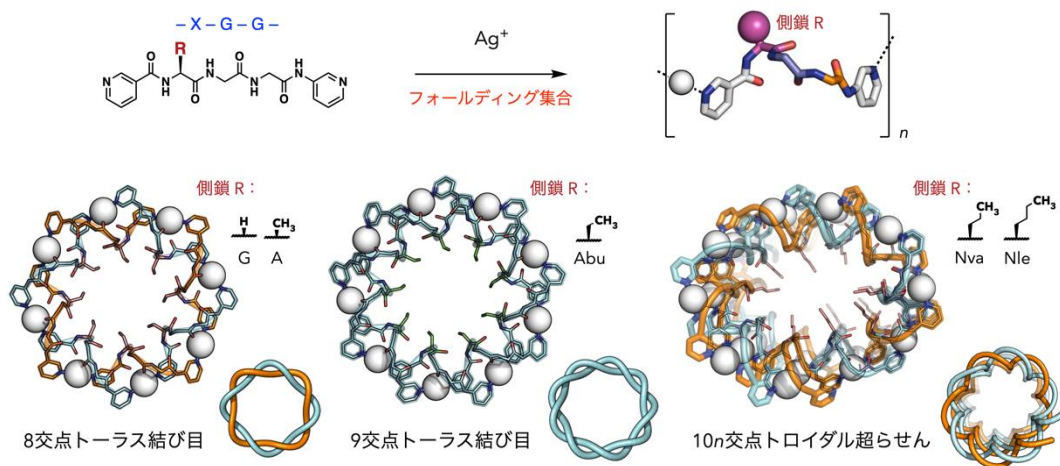


図 3 8 および 9 交点トーラス結び目分子と 10n 交点のトロイダル超らせんの構築。

3. 今後の展開

本研究により、可逆的ペプチド鎖がさまざまな高次ペプチド構造を構築する上での重要な合成コンセプトとなりうることを実証した。

精密構築したクロス β 構造は、アルツハイマー病の原因物質とされるアミロイド線維の基本構造である。アミロイド線維の形成初期の平行 β シート面の分子認識化合物として応用できれば、医療への応用が実現する。そのためには、生理条件下で構造を維持/凝集しない仕組みを開発することが必要であり、次の10年でそのブレークスルーを実現したい。

精密構造制御法を確立した β ヘリックス二重らせんは、高次ペプチドナノ構造を構築するためのビルディングブロックとして活用できる。人工タンパク質創出のための新しい構造モチーフとして発展させたい。

高次トラス結び目構造とトロイダル超らせん構造は、今後、トポロジカルポリマーの合成への展開が期待できる。可逆的な結合部位を強い結合へ置き換える方法論を確立することで、精密な絡まりトポロジーを有する高分子の創出につながるであろう。しなやかで強靱な高分子鎖を実現する糸口を今後見出したい。

4. 自己評価

可逆的ペプチド鎖により未踏の高次ナノ構造の構築を実現するという独自のコンセプトは実証できたと考えている。論文や国際学会にて、追従するいくつかの研究グループの出現が最近見られることから、新技術シーズとしての手応えを感じつつ、今後到来する国際的な競争に負けない様に革新的技術へ発展させたい。研究実施にあたっては、研究期間中に当時の所属研究室の移転や自身の異動があり、さまざまな困難には直面したもののさきがけのご支援のお陰で乗り越えることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:5件

1. Eisuke Tsunekawa, Yusuke Otsubo, Yusuke Yamada, Akihito Ikeda, Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Akira Takasu, Shinji Aramaki, Toshiya Senda, Sota Sato, Satoshi Yoshida, Makoto Fujita, and **Tomohisa Sawada**, “X-ray and Electron Observations of Steric Zipper Interactions in Metal-induced Peptide Cross- β Nanostructures”, *Journal of the American Chemical Society*, 145, 16160–16165 (2023).

β シートの片面に金属イオンとの結合サイトを導入し、金属イオンによる自己組織化を利用することで、人工的にペプチドの立体ジッパー構造を模倣し、合成することに成功した。本手法により構築したジッパー構造を用いて、向かい合った β シート間に働く、さまざまな側鎖の噛み合いや接触構造の高精度なX線・電子線観測も実現した。

2. **Tomohisa Sawada**, Wataru Iwasaki, Motoya Yamagami, and Makoto Fujita, “Parallel and antiparallel peptide double β -helices controlled by metal-induced folding and assembly”, *Natural Sciences*, 1, e10008 (2021).

L/D アミノ酸交互配列のペプチドが作り出す β ヘリックス二重らせんに対し、側鎖の金属架橋によって構造制御を達成した。8残基のペプチド配列に二ヶ所の配位性残基を導入しヨウ化亜鉛との錯形成を実施した。金属架橋の位置の違いによって、平行型、逆平行型 I、逆

平行型 II の三種の二重らせんの構築に成功した。さらに配位性残基を一ヶ所にし、塩化パラジウムを用いることで β ヘリックス二重らせんの二量化構造の構築にも成功した。

3. Yuuki Inomata, **Tomohisa Sawada**, and Makoto Fujita, “Metal–Peptide Nonafoil Knots and Decafoil Supercoils”, *Journal of the American Chemical Society*, 143, 16734–16739 (2021).

9 および 10 交点のトーラス結び目構造の初の化学合成に成功した。これまで、短いペプチド配位子と銀イオンの錯形成によって得た 8 交点のトーラス結び目構造を基に緻密な配列設計を実施することで、高交点数の結び目構造を合成することに成功した。さらに、トーラス結び目が開環重合したトロイダル超らせん構造の構築にも成功し、有限絡まり分子構造から無限の絡まり分子構造への新展開を実現した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件

1	発 明 者	藤田 誠、澤田 知久
	発 明 の 名 称	配位性化合物、細孔性化合物の結晶、包接体、及び結晶構造解析用試料の作製方法
	出 願 人	国立大学法人 東京大学
	出 願 日	2021/5/21
	出 願 番 号	特願 2021-86031
	概 要	親水性で、かつ、ゲスト分子を規則的に収容し得る大きさの細孔を有する細孔性化合物を与える配位性化合物、前記配位性化合物を含む細孔性化合物の結晶、前記細孔性化合物がホスト分子として機能して成る包接体、及び結晶構造解析用試料の作製方法を提供する。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 東京工業大学プレスリリース 2023 年 8 月 2 日
(和文)「ペプチドの精密な「立体ジッパー」構造の人工合成に成功—密に噛み合う仕組みを、金属の自己組織化を用いて模倣—」
(英文)“Steric Zipper Interactions in Artificial Crystalline Peptide β -sheets”
- 国際学会 基調講演 2022 年 7 月 7 日(フランス, ナンシー, ENSIC)
International Conference on Metal-Binding Peptides: Methodologies and Applications
“Metal-induced peptide folding and assembly”
- 国際学会 招待講演 2022 年 11 月 25 日(韓国, 仁川, Sheraton Grand Incheon Hotel)
19th Korea–Japan Joint Symposium on Organometallic and Coordination Chemistry
“Highly Entangled Metal–Peptide Rings and Nets”
- 国際学会 招待講演 2023 年 9 月 4 日(ドイツ, ミュンヘン, Ludwig-Maximilians Universität München)
Munich Symposium on Foldamers 2023
“Highly entangled nanotopologies created by metal–peptide strands”
- 国際学会 招待講演 2023 年 7 月 10 日(京都大学 iCeMS)
SPEED Symposium –a Bridge between Chemistry and Biotechnology–
“Metal-induced short peptide folding and assembly”