

氏名	黄 檠 達 人
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第569号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	外的刺激によるヘリックス構造の可逆的制御とその応用

(主査)  
論文調査委員 教授 杉浦幸雄 教授 藤井信孝 教授 松崎勝巳

### 論文内容の要旨

序論 ヘリックス構造は天然のタンパク質の生理活性発現において重要な役割を果たしており、その構造を制御することでタンパク質機能の調節が期待できる。ヘリックス構造を安定化させる様々な試みがなされてきたが、ヘリックス構造の不安定化を積極的に利用した機能性制御の試みはあまりなされていない。そこで筆者はFeの酸化-還元を利用したヘリックス構造制御ならびにロイシンジッパーペプチドの相互認識変換を通して、この方法論の有用性を示した。また、このような構造変化を起こすペプチドをイオンチャネルペプチドの膜外配列として用いることにより、膜外ペプチドの構造変化をチャネル電流として膜内に伝え得ることを示した。さらに構造制御による転写活性の制御を目指して、分子内にDNA認識ヘリックス構造を有する転写調節因子Sp1由来の亜鉛フィンガーのペプチドの化学合成についても検討した。

#### 第一章 ヘリックス構造不安定化によるペプチドの二次構造及び分子認識の制御

N<sup>ε</sup>, N<sup>ε</sup>-ビスカルボキシメチルリジン (Ida) を含むヘリックスの金属イオンによる構造不安定化が報告されているが、筆者はヘリックスペプチドにおけるIdaの導入位置により、ヘリックスが不安定化することを見出した。すなわち、ヘリックスペプチド中のi番目とi+2番目の位置にIdaを導入したところ、Fe(III)の添加によりヘリックス含量が減少することが分かった。一方、Fe(II)はヘリックス含量に影響を及ぼさなかった。この知見に基づき、上記のIda含有ペプチドに対して、Fe(III)の添加、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>によるFe(III)のFe(II)への還元、vortexによる空気酸化を順に行うことで、ヘリックス構造は可逆的に減少・増加をくり返し、Feの酸化還元によるヘリックス構造の制御が可能であることが示された。さらに、転写調節因子Fos由来のロイシンジッパーペプチドのヘリックス構造不安定化を利用した転写調節因子Jun由来のロイシンジッパーペプチドとの相互認識調節について検討した。Fosペプチドの分子中央部分にiとi+2の位置関係をとるようにIdaを導入したペプチド[Fos(Ida)]を調製し、まず、CDにより金属添加によるヘリックス含量の減少を確認した。Jun-Fos ⇌ Jun-Jun間の相互認識制御の検討には蛍光エネルギー移動(FRET)を利用した。nitrobenzofurazan(NBD)及びcarboxytetramethylrhodamine(Rho)で標識したJunペプチド(NBD-Jun, Rho-Jun)を混合した系にFos(Ida)ペプチドを加えたところ、FRET効率(E<sub>FRET</sub>)は減少した。さらに、この系にFe(III)を加えるとE<sub>FRET</sub>はFos(Ida)ペプチド添加前とほぼ同じ値まで回復した。これらの結果は、Rho-Jun/NBD-Junホモダイマーが、Fos(Ida)の添加によりRho-Jun/Fos(Ida)とNBD-Jun/Fos(Ida)のヘテロダイマーに変換され、さらに、Fe(III)の添加によりFos(Ida)のヘリックス構造が不安定化され、Jun-Junホモダイマーが再生されたことを示唆する。

#### 第二章 金属イオン感受性イオンチャネルペプチドの創出

天然の受容体型イオンチャネルペプチドは細胞外からの伝達物質を感知し、構造変化することにより、チャネル電流刺激を細胞内に伝える。本章では、膜外受容体領域として上記のFos(Ida)ペプチドを用い、膜内イオン透過領域にチャネル形成ペプチドであるアラメチシンを用いることにより、金属イオン感知機能を有するチャネル系の創出を行った。活性の測定は、脂質平面膜法を用いて行った。まず、脂質平面膜上にアラメチシン-Fos(Ida)ペプチドによるイオンチャネルを形

成させ、次に Fe (III) を加えたところ、膜電流の増大が確認された。次に、EDTA を加えたところ、膜電流の減少が確認された。すなわち、Fe (III) による膜外 Fos (Ida) 配列の立体構造変化が膜電流変化として反映される系が創出できた。

### 第三章 亜鉛フィンガーにおける非天然型リンカーの DNA 結合への影響

転写調節因子 Sp1 の DNA 認識領域は 3 個の亜鉛フィンガーモチーフから構成されている。各フィンガー中の  $\alpha$ -ヘリックス領域が DNA 認識に重要な働きをしており、この部分の構造変換により、転写活性が制御できる可能性がある。このような機能を有する人工亜鉛フィンガーペプチド設計のための基礎的知見を得るために、本章においては、Sp1 の DNA 認識領域に対応する亜鉛フィンガーペプチド [Ac-Sp1(532-623)-NH<sub>2</sub>] の化学合成を行うとともに、リンカーの構造と DNA 結合活性との間の関連性について検討した。Ac-Sp1(532-623)-NH<sub>2</sub> の合成にあたっては、全体を 2 つのセグメントに分け、チオエステル法により縮合し、目的物を得た。また、ゲルシフトアッセイにより求めた Ac-Sp1(532-623)-NH<sub>2</sub> の GC-box DNA との結合における K<sub>D</sub> 値は 130nM だった。次に、Finger 1, Finger 2, Finger 3 に対応するセグメントをシステムの SH 基とクロロアセチル基との間のチオエーテル結合形成により連結した人工リンカー型 Sp1 を調製した。GC-box DNA との結合親和性を検討したところ、人工リンカー型 Sp1 の濃度が 1.25mM の場合でも、DNA との結合は検出されなかった。これらのことから亜鉛フィンガー型タンパク質の化学合成において、リンカーの設計はその活性発現に非常に重要であることが示された。

本研究の結果は、外的刺激により活性が制御される機能性分子の設計に基礎的知見を提供するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ヘリックス構造は天然のタンパク質の生理活性発現において重要な役割を果たしており、その構造を制御することでタンパク質機能の調節が期待できる。そこで本研究においては Fe の酸化還元を利用したヘリックス構造制御ならびにロイシンジッパーペプチドの相互認識変換を通して、この方法論の有用性について検討した。また、このような構造変化を起こすペプチドをイオンチャネルペプチドの膜外配列として用いることにより、膜外ペプチドの構造変化をチャネル電流として膜内に伝え得る人工受容体イオンチャネルの創出について検討した。さらに構造制御による転写活性の制御を目指して、分子内に DNA 認識ヘリックスを有する転写調節因子 Sp1 由来の亜鉛フィンガーペプチドの化学合成についても検討した。

N<sup>ε</sup>, N<sup>ε</sup>-ビスカルボキシメチルリジン (Ida) を含むヘリックスの金属イオンによる構造安定化が報告されている。本研究においてはヘリックスペプチドにおいて Ida を i 番目と i+2 番目の位置に導入すると、Fe (III) の添加によりヘリックス含量が減少し、一方、Fe (II) の添加はヘリックス含量に影響を及ぼさないことが示された。さらに、上記の Ida 含有ペプチドに Fe イオンの添加、酸化還元を行うと、ヘリックス含量は可逆的に減少・増加をくり返し、Fe の酸化還元によるヘリックス構造の制御が可能であることが示された。次に、転写調節因子 Fos 由来のロイシンジッパーペプチドのヘリックス構造不安定化を利用した転写調節因子 Jun 由来のロイシンジッパーペプチドとの相互認識調節について検討した。Fos ペプチドの分子中央部分に i と i+2 の位置関係をとるように Ida を導入したペプチド [Fos(Ida)] を調製し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して、Jun-Fos  $\rightleftharpoons$  Jun-Jun 間の相互認識制御の検討を行った。Fos (Ida), Fe (III) の添加に応じて、FRET 効率 (E<sub>FRET</sub>) は、減少、増大し、Fe (III) の添加による Jun-Fos 相互認識の制御が可能であることが示された。

さらに、膜外受容体領域として上記の Fos (Ida) ペプチドを用い、膜内イオン透過領域にチャネル形成ペプチドであるアラメチシンを用いて、金属イオン感知機能を有するチャネル系の創出を行った。まず、脂質平面膜上にアラメチシン-Fos(Ida)ペプチドによるイオンチャネルを形成させ、さらに Fe (III), EDTA を加えたところ、膜電流の増減が確認され、Fe (III) による膜外 Fos (Ida) の立体構造変化が膜電流変化として反映されることが示された。

転写調節因子 Sp1 の DNA 認識領域は 3 個の亜鉛フィンガーモチーフから構成され、各フィンガー中の  $\alpha$ -ヘリックス領域が DNA 認識に重要な働きをしている。従って、この部分の構造変換により、転写活性の制御が期待できる。このような人工亜鉛フィンガーペプチド設計のための基礎的知見を得るために、Sp1 の DNA 認識領域に対応する亜鉛フィンガーペプチド [Ac-Sp1(532-623)-NH<sub>2</sub>] のチオエステル法による化学合成及び 3 個の亜鉛フィンガーをチオエーテルを介して連結した人工リンカー型 Sp1 の調製を行い、リンカー構造と DNA 結合活性との間の関連性について検討した。ゲルシフト

アッセイにおいて人工リンカー型 Sp1 と GC-box との結合は確認されず、このことから亜鉛フィンガー型タンパク質の化学合成において、リンカーの設計はその活性発現に非常に重要であることが示された。

以上、本研究は、外的刺激により活性が制御される機能性分子の設計に基礎的知見を提供したものと考えられる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月1日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。