

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4703079号
(P4703079)

(45) 発行日 平成23年6月15日 (2011. 6. 15)

(24) 登録日 平成23年3月18日 (2011. 3. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/00 (2006. 01)

C O 7 K 14/00 Z N A

C O 7 K 1/113 (2006. 01)

C O 7 K 1/113

請求項の数 28 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2001-525220 (P2001-525220)
 (86) (22) 出願日 平成12年9月18日 (2000. 9. 18)
 (65) 公表番号 特表2003-511353 (P2003-511353A)
 (43) 公表日 平成15年3月25日 (2003. 3. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2000/003576
 (87) 国際公開番号 W02001/021646
 (87) 国際公開日 平成13年3月29日 (2001. 3. 29)
 審査請求日 平成19年9月14日 (2007. 9. 14)
 (31) 優先権主張番号 9922013. 9
 (32) 優先日 平成11年9月17日 (1999. 9. 17)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 502096808
 ザ ユニバーシティ オブ サセックス
 イギリス イースト サセックス ビーエ
 ヌ1 9 エスビー プライトン ファルマ
 ー
 (74) 代理人 100089244
 弁理士 遠山 勉
 (74) 代理人 100090516
 弁理士 松倉 秀実
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100098268
 弁理士 永田 豊
 (74) 代理人 100089026
 弁理士 木村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質構造およびタンパク質繊維

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 の鎖中に配列された複数の第 1 のペプチドモノマー単位および第 2 の鎖中に配列された複数の第 2 のペプチドモノマー単位を含むタンパク質構造体であって、前記第 1 及び第 2 のモノマー単位は複数の 7 残基反復モチーフ (a b c d e f g) を含み、
 対応する第 1 及び第 2 のモノマー単位中の相補的な 7 残基反復モチーフ中の相補的な位置「 a 」に一對のアスパラギン残基が存在し、
 それぞれの第 1 のペプチドモノマー単位上の位置「 e 」および「 g 」が荷電アミノ酸残基であり、
 それぞれの対応する第 2 のペプチドモノマー単位上の位置「 e 」および「 g 」が逆荷電アミノ酸残基であり、
 前記第 2 の鎖の対応する第 2 のペプチドモノマー単位を越えて延びるおのものの第 1 のペプチドモノマー単位の末端部分に、少なくとも 1 つの荷電アミノ酸残基が存在することにより、
 前記第 1 及び第 2 の鎖が互い違いの平行ヘテロ二量体超らせん構造を確実に形成することを特徴とし、
 前記第 1 及び第 2 のモノマー単位中の、残りの位置「 a 」および全ての位置「 d 」が疎水性残基であることを特徴とする、
 タンパク質構造体。

【請求項 2】

10

20

少なくとも1つの鎖はそれぞれ第1のまたは第2のペプチドモノマー単位だけからなる、請求項1に記載のタンパク質構造体。

【請求項3】

前記第1及び第2のモノマー単位の、残りの位置「a」はイソロイシンまたはバリンから選択される、請求項1又は2に記載のタンパク質構造体。

【請求項4】

前記第1及び第2のモノマー単位の、1又は複数の位置「d」にロイシンを有することを特徴とする、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質構造体。

【請求項5】

前記逆荷電残基はグルタミン酸およびリジン残基、あるいはこれらのアミノ酸残基の合成誘導体である、請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質構造体。

10

【請求項6】

管状構造を形成するよう配列される、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質構造体。

【請求項7】

前記反復モチーフは配列中の2又はそれ以上のアミノ酸位置によりオフセットされ、それにより前記ペプチドモノマー単位が円筒体を形成する、請求項6に記載のタンパク質構造体。

【請求項8】

前記第1のおよび第2のペプチドモノマー単位は以下の配列

20

a) K I A A L K Q K I A S L K Q E I D A L E Y E N D A L E Q (S A F - p 1 C) および

b) K I R A L K A K N A H L K Q E I A A L E Q E I A A L E Q (S A F - p 2 D) をそれぞれ有するか、または

c) K I A A L K Q K I A A L K Q E I D A L E Y E N D A L E Q (S A F - p 1 A) および

d) K I R A L K W K N A H L K Q E I A A L E Q E I A A L E Q (S A F - p 2 C) をそれぞれ有するか、または

e) K I A A L K Q K I A S L K Q E I D A L E Y E N D A L E Q (S A F - p 1 C) および

30

f) K I R A L K W K N A H L K Q E I A A L E Q E I A A L E Q (S A F - p 2 C) をそれぞれ有する、請求項1～7のいずれか一項に記載のタンパク質構造体。

【請求項9】

以下の配列

a) K I A A L K Q K I A S L K Q E I D A L E Y E N D A L E Q (S A F - p 1 C)、

b) K I R A L K A K N A H L K Q E I A A L E Q E I A A L E Q (S A F - p 2 D)、

c) K I A A L K Q K I A A L K Q E I D A L E Y E N D A L E Q (S A F - p 1 A)、

および

d) K I R A L K W K N A H L K Q E I A A L E Q E I A A L E Q (S A F - p 2 C)、

から選択されるアミノ配列を有する、タンパク質構造体の調製に用いるためのペプチドモノマー単位。

40

【請求項10】

少なくとも1つのアミノ酸残基が誘導体化される、請求項1～8のいずれか一項に記載のタンパク質構造体又は請求項9に記載のペプチドモノマー単位。

【請求項11】

2又はそれ以上の、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質構造体を含み、それらは同時に結合してT字型複合構造を形成することを特徴とする、分枝自己集合繊維。

【請求項12】

前記タンパク質構造体の少なくとも1つは、1又は複数の中央システイン残基を含み、かつ少なくとも1つの残りのタンパク質構造体は末端システイン残基を含む、請求項11

50

に記載の分枝自己集合繊維。

【請求項 1 3】

タンパク質構造体の製造方法であって、会合して請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体を形成する第 1 及び第 2 のモノマー単位の混合物を提供することを含み、第 1 及び第 2 のモノマー単位は 7 残基反復モチーフ (a b c d e f g) を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 1 4】

前記タンパク質構造体は誘導体化される、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記タンパク質構造体は架橋により安定化される、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法 10

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体の会合により生成されるタンパク質繊維。

【請求項 1 7】

タンパク質構造体の製造のためのキットであって、会合して請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体または請求項 1 6 に記載のタンパク質繊維を形成する第 1 のおよび第 2 のペプチドモノマー単位を含み、第 1 のおよび第 2 のモノマー単位は 7 残基反復モチーフ (a b c d e f g) を含むことを特徴とする、キット。

【請求項 1 8】

20

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体または請求項 1 6 に記載のタンパク質繊維を含む二次元グリッド。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体または請求項 1 6 に記載のタンパク質繊維を含む三次元マトリックス。

【請求項 2 0】

溶液中で集合するよう配列される請求項 1 9 に記載のマトリックス。

【請求項 2 1】

前記タンパク質構造体に 1 又は複数の結合剤が融合され、1 又は複数の結合剤は 1 又は複数の標的存在物に対する強い親和力が生じるように配列される、請求項 1 9 または 2 0 に記載のマトリックス。 30

【請求項 2 2】

1 又は複数の標的存在物を結合するよう配列される、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のマトリックス。

【請求項 2 3】

ウイルスを結合するよう配列される、請求項 2 2 に記載のマトリックス。

【請求項 2 4】

第 1 のおよび第 2 の、それぞれ異なるモノマー単位の混合物が提供され、第 1 のおよび第 2 のモノマー単位は 7 残基反復モチーフ (a b c d e f g) を含み、それらは会合して請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体を複数形成し、それらのタンパク質構造体は会合して三次元マトリックスを形成する、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のマトリックスの形成方法。 40

【請求項 2 5】

前記マトリックスはインシトゥで形成される請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

合成ポリマーの製造を制御する方法であって、該ポリマーと共に、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体を集合させることを含む方法。

【請求項 2 7】

前記タンパク質構造体は前記ポリマーの合成後に除去される、請求項 2 6 に記載の方法 50

【請求項 28】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のタンパク質構造体を含む、原子間力顕微鏡に用いるためのチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、タンパク質構造、それらのタンパク質構造の製造方法、ならびにそれらのタンパク質構造を用いて生成されるタンパク質繊維およびその他の物質および集合体に関する。

【0002】

分子自己集合の過程は全ての生物学的系にとって中枢的であり、バイオテクノロジー (L. Q. Gu, et al(1999)Nature 398, 686) およびナノテクノロジー (K.E.Drexler, (1999)TIBTECH 17, 5) における重要性および用途が漸増していると考えられる。天然生体分子集合体の特性化は、モデル自己集合系の開発を動機付け、導き、次いでこれらは生物学についてのわれわれの理解を前進させる。タンパク質に関しては少なくとも、超らせん(coiled coil)は恐らく間違いなく最も簡単な自己集合系である。超らせんは、広範な種々のタンパク質 - タンパク質相互作用を導き、かつ強く結びつけるタンパク質フォールディングモチーフ (motif) である (A.Lupas, (1996)Trends Biochem. Sci. 21, 375)。構造的にいえば、超らせんは相対的に真っ直ぐに向かう。それらは、平行、逆平行または混合トポロジーで配列され得る 2 ~ 5 鎖による α ヘリックスバンドルである。ペプチドから超らせんの形成を導く基本配列特徴は、合理的に十分に理解されている (P.B.Harbury et al(1993)Science 262, 1401; D.N.Woolfson and T.Alber(1995)Protein Sci. 4,1596)。例えば、ほとんどの超らせん配列は、「7 残基反復」として既知の、疎水性 (H) および極性 (P) 残基の 7 残基反復 (H P P H P P P)_n により支配される。 α ヘリックスを形づくる場合、このパターンは両親媒性構造を示し、その疎水性面はオリゴマー集合を導く。さらに、超らせんバンドル内の鎖の数および方向はともに、疎水性コアを形成するか、または疎水性コアと側面を接する残基、すなわち 7 残基反復の第 1、第 4、第 5 および第 7 位置の残基により主に確定される。例えば、二量体 (すなわち 2 本鎖集合体) を形成する超らせんは、通常は、第 1 位置にイソロイシンまたはバリン残基、そして第 4 位置にロイシン残基を有する。対照してみると、三量体 (すなわち 3 本鎖集合体) を形成する超らせんは、両「H」位置に同一残基 (すなわち、ともにイソロイシンまたはともにロイシン) をしばしば有する。最後に、ヘテロオリゴマー (すなわち、異なるアミノ酸配列を有する鎖から作られる超らせん) は、疎水性コアと側面を接する相補的荷電相互作用により導かれ得る。この理由のために、超らせんに基づいた多数の新規タンパク質デザインが首尾よくなされてきた。これらは、超らせんモチーフの天然レパートリーを伸長するいくつかの意欲的な構造を含む (S.Nautiyal et al(1995) Biochemistry 34, 11645; A.Lombardi et al(1996) Biopolymers 40, 495; D.H.Lee et al(1996) Nature 382, 525; P.B.Harbury et al(1998) Science 282, 1462; J.P.Schneider et al(1998) Folding Des. 3, R29)。

【0003】

単一連続 7 残基反復を有する一般に認められた構造のほかに、本発明者等は、超らせんにおけるオリゴマー状態を詳しく説明するのに役立つ多重オフセット(offset) 7 残基反復を有する配列を同定した。例えば、2 つの 7 残基反復を有する配列は、2 つの残基によりオフセットする。すなわち、a / f - b / g' - c / a' - d / b' - e / c' - f / d' - g / e' は、形成されるらせんの反対側に 2 つの疎水性シームを生じさせる。このようならせんは、2 つの異なる方法でこれらの疎水性表面を隠すために併合して、2 つの別個の構造、すなわち開放性「 α シート」および閉鎖性「 α 円筒体」を形成し得る。

【0004】

超らせん構造のその他の関連の態様は、WO 99 / 11774 に記載されている (この開示は、参照により本明細書中に援用される)。

【0005】

超らせんのこの理解、ならびに結果的に生じるタンパク質デザインは、種々の転写因子に

見出されるロイシンジッパーモチーフにより例示されるような短構造を中心としている (E.K.O'Shea et al(1989) Science 243, 538; E.K.O'Shea et al(1991) Science 254, 539)。これに対比して、ほとんどの天然超らせんは数百のアミノ酸にわたって延びて (A.Lupas(1996) 同上; J.Sodek et al(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 69, 3800)、そして多くが集合して、より厚い多重鎖フィラメントをさらに形成する (H.Herrmann and U.Aebi(1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8, 177)。

【0006】

超らせんについてのわれわれの理解を改善するために、そしてタンパク質デザイン研究を進展させるために伸長構造を作製するという目的を持って、われわれは最初に2つの28残基ペプチド - 平坦化 (dubbed)自己集合繊維ペプチドSAF - p1およびSAF - p2をデザインし、混合してフォールディングし、伸長繊維を生成した。構造の隠された疎水性コアの位置に集中する場合、平行二量体形成を導き、代替的オリゴマーおよびトポロジーから護るために規則が組入れられた (P.B.Harbury et al(1993)同上; D.N.Woolfson and T.Alber(1995) 同上; L.J.Gonzalez et al(1996) Nature Struct. Biol. 3, 1011)。当該デザインの構成単位は、突出末端または「付着」末端を有する互い違い(staggered)ヘテロ二量体であった。これは、今日までに特性化されている天然およびデザイナー超らせん集合体と対比し、区別するが、この場合、ポリペプチド鎖はレジスター(register)中では一列をなし、すなわちそれらは平滑末端 (blunt ends)または「平滑」末端("flush" ends)を有する。相補的コア相互作用および側面に位置するイオン対が突出部に組入れられて、ヘテロ二量体の縦方向の会合を促す (図1および2)。「付着末端」使用のこの原理は、DNAを集合するための分子生物学において十分に開発され (S.J.Palmer et al(1998) Nucleic Acids Res. 26, 2560)、複雑なDNA結晶をデザインするために用いられてきた (E.Winfree et al(1998) Nature 394, 539)。しかしながら、われわれの知る限りでは、付着末端特異的分子集合のペプチドへのわれわれの適用は、新規である。しかし、らせんの頭部 - 尾部パッキングは、2つのデザイナーペプチドに関して、近年解明された結晶構造で観察されている (N.L.Ogihara et al(1997) Protein Sci. 6, 80; G.G.Prive et al(1999) Protein Sci. 8, 1400)。これらは、固体状態で擬似連続らせんを生成するために、接触した状態で、それらのらせん末端で結晶化したらせんペプチドであった。言い換えれば、それらは「平滑末端」配列を形成した。

【0007】

本発明の一態様によれば、第1の鎖中に配列された複数の第1のペプチドモノマー単位および第2の鎖中に配列された複数の第2のペプチドモノマー単位を含み、この両鎖が好ましくは超らせん構造を形成するタンパク質構造であって、第1の鎖中の第1のペプチドモノマー単位が第2の鎖中の対応する第2のペプチドモノマー単位を超えて両鎖の方向に伸びるタンパク質構造が提供される。本発明のタンパク質構造は、多数の利点を有する。例えば、相対的に長いタンパク質繊維は、細かな物質で形成され得る。すなわち、ペプチドモノマーの100 μM溶液1 μlは、50 nm厚の繊維10 mを生成するのに十分な物質を提供し得る。

【0008】

第1のペプチドモノマー単位の少なくとも1つの荷電アミノ酸残基は、第2のペプチドモノマー単位の逆荷電アミノ酸残基を引き付けるよう配列され得る。好ましくは、荷電アミノ酸残基は、第2の鎖中の対応する第2のペプチドモノマー単位を超えて延びる第1のペプチドモノマー単位の末端部分に存在する。少なくとも1つの鎖は、それぞれ第1のまたは第2のペプチドモノマー単位だけから成る、すなわち同種鎖であり得る。異種鎖も意図される。ペプチドモノマー単位は、反復構造単位を含み得る。好ましくは、反復構造単位は、以下のパターン：

hphpppp

abcdefg

を有する7残基反復モチーフを含む。

【0009】

好ましくは、反復構造単位は、位置 a にイソロイシンまたはアスパラギンを、そして位置 d にロイシンを含み得る。その他の反復（例えば 1 1 残基 - a b c d e f g h i j k ）およびアミノ酸組成も用いられ得る（WO 99 / 1 1 7 7 4 参照）。

【 0 0 1 0 】

好ましくは、7 残基反復は、それぞれ位置 e および g に逆荷電残基を含む。逆荷電残基は、例えばグルタミン酸およびリジン残基またはアスパラギンおよびアスパラギン酸であり得る。合成アミノ酸、例えばオルニチンの使用も想定される。

【 0 0 1 1 】

本発明のタンパク質構造は、対応する第 1 のおよび第 2 のペプチドモノマー単位により提供される「a」位置のアスパラギン残基の対によっても明示され得る。

10

【 0 0 1 2 】

好ましいタンパク質構造では、第 1 のおよび第 2 のペプチドモノマー単位は、以下の配列：

- a) KIAALKQKIASLKQEIDALEYENDALEQ (S A F - p 1 C) および
- b) KIRALKAKNAHLKQEIAALEQEIAALEQ (S A F - p 2 D) をそれぞれ有し、または
- c) KIAALKQKIAALKQEIDALEYENDALEQ (S A F - p 1 A) および
- d) KIRALKWKNAHLKQEIAALEQEIAALEQ (S A F - p 2 C) をそれぞれ有し、または
- e) KIAALKQKIASLKQEIDALEYENDALEQ (S A F - p 1 C) および
- f) KIRALKWKNAHLKQEIAALEQEIAALEQ (S A F - p 2 C) をそれぞれ

有する。

20

【 0 0 1 3 】

これらは 4 つの 7 残基構造の例だけであり、本発明に用いるためにはその他の長さが可能であり、想定される。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の態様によれば、タンパク質構造の製造方法であって、会合して本発明のタンパク質構造を形成する第 1 のおよび第 2 のペプチドモノマー単位の混合物を提供することを含む方法が提供される。当該構造は、誘導体化されおよび / または架橋により安定化され得る。

【 0 0 1 5 】

集合前および集合後のペプチドモノマー単位の、本発明のタンパク質構造への誘導体化が実施され得る。例えば、WO 99 / 1 1 7 7 4 に記載されているように、蛍光部分（フルオロフォア）が超らせんに結合されてもよい。蛍光部分の付加は、タンパク質構造の可視化を補助してもよい。7 残基反復における「f」位置の官能基による置換は、その位置がらせんの外側にあるので、特に好ましい（図 1 C および 1 E 参照）。その他の誘導体は、例えば他の存在物を結合し得る単位が生成され得るよう、ペプチドモノマー単位への結合剤の取付けを含み得る。

30

【 0 0 1 6 】

第 1 のおよび第 2 のペプチドモノマーならびに当該鎖は、上記の特徴を有し得る。

【 0 0 1 7 】

本発明は、本発明のタンパク質構造の会合により生成されるタンパク質繊維も提供する。

40

【 0 0 1 8 】

タンパク質構造は、管状構造を形成するようにも配列され得る。特に当該構造は、ナノチューブを形成するよう配列され得る。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の態様によれば、タンパク質構造の製造のためのキットであって、会合して本発明のタンパク質構造またはタンパク質繊維を形成する第 1 のおよび第 2 のペプチドモノマー単位を含むキットが提供される。

【 0 0 2 0 】

本発明のタンパク質構造は、二次元および三次元アレイに集合され得る。例えばフィルターとして機能し得る二次元マットが、形成され得る。例えばふるいまたはフィルターとし

50

て用いるための、あるいは三次元のその他の会合および共役分子を組織化するための三次元グリッドまたはマトリックスも形成され得る。

【 0 0 2 1 】

好ましい実施形態では、マトリックスはインシトゥ (in situ) で集合される。例えばマトリックスは、溶液中に夾雑物を閉じ込めるために溶液中に形成され、次にマトリックスは夾雑物と一緒に、例えば遠心分離により溶液から除去され得る。

【 0 0 2 2 】

高温でのタンパク質構造の安定性は、対応する第 1 のおよび第 2 のモノマー単位残基間の重複が増大されるように、ペプチドモノマーをより長くすることにより改善され得る。モノマー長の増大は、超らせん構造を安定化することが以前から示されている。あるいは、安定性は、同一鎖中の隣接ペプチドモノマー単位間に結合を導入することにより改善され得る。例えば、Kent (Dawson et al (1994) Science 266:776) と共同研究者等は、カップリング、およびその後の、1 つのポリペプチド単位の N 末端のシステイン残基を別の単位のチオエステル誘導体化 C 末端へ転位することにより隣接ポリペプチド単位間にペプチド結合を生成した。

【 0 0 2 3 】

さらに、タンパク質構造は、合成ポリマーの重合のための鋳型にそれらを用いることにより、安定化され、誘導化され得る。

【 0 0 2 4 】

定義

本明細書中で用いられる用語は、当業者により普通に用いられている意味である。以下に説明を示す。

【 0 0 2 5 】

アミノ酸

この用語は、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびにある種の特性 (例えば電荷) を変えるためになんらかの方法により修飾された天然アミノ酸のいずれもを含む。全ての場合に、天然アミノ酸に対する内容は、それに代わって置換され得る合成アミノ酸を含むと考えられ得る。

【 0 0 2 6 】

超らせん

超らせんは、通常は、3 および 4 残基間隔の疎水性残基の連続パターンを有するペプチド / タンパク質配列であって、これは集合 (フォールド) してらせんの多量体バンドルを形成する。多重オフセット反復を有する配列を含めた超らせんも意図される。

【 0 0 2 7 】

二量体

二量体は、二本鎖構造物である。

【 0 0 2 8 】

ヘテロ二量体

ヘテロ二量体は、2 つの異なる鎖により形成される二量体構造物である。

【 0 0 2 9 】

互い違いヘテロ二量体

互い違いヘテロ二量体は、2 つの鎖が集合して、ヘテロ二量体内で相互作用していない重複末端を残す。

【 0 0 3 0 】

平滑末端集合

平滑末端集合は、2 つの鎖が併合して、平らにされた、すなわち非重複の末端を生じる会合である。

【 0 0 3 1 】

プロトフィブリル

プロトフィブリルは、それらの突出末端を介して相互作用する互い違いヘテロ二量体から

10

20

30

40

50

縦方向に集合されるタンパク質構造である。

【 0 0 3 2 】

繊維

繊維は、2つまたはそれ以上のプロトフィブリルの側面会合により形成される構造である。

【 0 0 3 3 】

本発明によるタンパク質構造およびタンパク質構造の製造方法を、添付の図面1～8を参照しながら、もっぱら実施例を通じてここに説明する。

【 0 0 3 4 】

1) ペプチドデザインおよび合成

上記のように種々のペプチドモノマー単位をデザインした。モノマーおよびキャッピングペプチド(平滑末端を生成し、そして縦方向繊維集合を阻止するためにモノマーの付着末端を補足するようデザインされる)を表1に記載する。

【 0 0 3 5 】

【表1】

表1

ペプチド	配列 g abcdefg 5 10 15 20 25 a b c d e f g	デザイン	CD データ @ 10 μ M @ 100 μ M	LD データ @ 10 μ M @ 100 μ M	EM データ @ 10 μ M @ 100 μ M
CAP-p1A	*YCPGE IAALEQE NAALEQ	原型	折りたたまれてない		観察なし
SAF-p1A	K IAAALKQK IAAALKQE IDALEYE NDALEQ	原型 ゆっくりと交換	折りたたまれてない		観察なし
SAF-p1B	*K IAAALKQK IAAALKQE IDALEYE NDALEQ*	末端の12残基キャッピング (不安定)	~60% α -ヘリックス	~45% α -ヘリックス ~70% α -ヘリックス	観察なし
SAF-p1C	K TAAALKQK IAAALKQE IDALEYE NDALEQ	キャッピングなし (不安定) A11→Sへの交換 (15残基およびヘリックス安定)	折りたたまれてない	~20% α -ヘリックス	観察なし
CAP-p2A	K IAAALKQK NAAALKQK GW*	原型	折りたたまれてない		
SAF-p2A	K ISALKRWK NAAALKQK IAALEQE IAALEQ	原型 底着性	折りたたまれてない		
SAF-p2B	*K IAAALKQK NAAALKQK IAALEQE IAALEQ*	S ₃ →Rおよび S ₁₁ →Hへの交換 (15残基およびヘリックス安定)	~60% α -ヘリックス	~85% α -ヘリックス	
SAF-p2C	K IAAALKQK NAAALKQK IAALEQE IAALEQ	キャッピングなし (不安定)	折りたたまれてない	~20% α -ヘリックス	観察 観察
SAF-p2D	K IAAALKQK NAAALKQK IAALEQE IAALEQ	W ₁₇ →Aへの交換 (15残基およびヘリックス安定)	~15% α -ヘリックス	~45% α -ヘリックス	観察なし
SAF-p2E	K IAAALKQK NAAALKQK IAALEQE IAALEQ	A ₁₇ →Cへの交換 (15残基およびヘリックス安定)			観察なし

* = 化学的キャッピング = N末端のCH₃COおよびC末端のNH₂

【0036】

図1(A)は、自己集合に関するメカニズムを示す。「コンパニオン」ペプチドにおける相補的電荷は、互い違いの平行ヘテロ二量体の形成を導く。その結果生じる「付着」末端も相補的で、伸長構造への縦方向会合を促す。図1(B)は、デザインされたアミノ酸配列を示す。各々のペプチドは、a位置のイソロイシンおよびd位置のロイシンを有する最も簡単な7残基反復(abcdefg)を含んで、超らせん二量体の形成を導いた。逆荷電残基は、eおよびg位置に組み入れられて、付着末端を有する互い違い二量体を付与した。アスパラギン残基(a部位で互いに優先的に対合する(Gonzalez L et al(1996) Nature Structural Biology 3, 13:1011-1018))が含まれて、指示レジスターをさらに堅く

10

20

30

40

50

結びつけ、平行構造を付与した。図 1 (C) は、らせん - ホイール表示であって、本文中のデザイン配列を要約する。図は、7 残基部位標識 a - g を有する N 末端から見たもので、3 . 5 残基 / らせん回転を想定して、7 残基反復を強調する。

【 0 0 3 7 】

固相法および Fmoc 化学を用いて、Applied Biosystems 432 A ペプチド合成機でペプチドを合成した。逆相 HPLC を用いてペプチド試料を精製し、MALDI - TOF 質量分析法によりそれらの同一性を確認した。

【 0 0 3 8 】

表 2 に記載するように、ペプチドモノマーおよびキャッピングペプチドの種々の組合せを試験した。

【 表 2 】

表2

備考	ペプチド混合物	平衡	CD データ @ 10 μ M @ 100 μ M	LD データ @ 10 μ M @ 100 μ M	EM データ @ 10 μ M @ 100 μ M
1D-NMR における 繊維から シグナルなし	SAF-p1A, SAF-p2A	急速	~20% α -ヘリックス	~40% α -ヘリックス Tm $\approx$ 30°C	繊維なし
	SAF-p1A, SAF-p2A, CAP-p1A, CAP-p2A		~20% α -ヘリックス	~20% α -ヘリックス Tm $\approx$ 38/48°C (相対移動がない)	
	SAF-p1A, SAF-p2B		~70% α -ヘリックス Tm $\approx$ 25°C (相対移動がない) 繊維は 19°CをTm	~65% α -ヘリックス Tm $\approx$ 35°C (相対移動がない) 繊維は 38°CをTm	
	SAF-p1B, SAF-p2B	急速	~20% α -ヘリックス	~80% α -ヘリックス Tm $\approx$ 35°C (相対移動がない) 繊維は 19°CをTm	繊維なし 太 繊維 (~4.5 μ m幅)
	SAF-p1A, SAF-p2C	遅 @ 100 μ M; 曇り発生	~20% α -ヘリックス	~80% α -ヘリックス 二相性熱溶融体	
	SAF-p1C, SAF-p2C	遅 @ 100 μ M; 曇り発生	~25% α -ヘリックス	~65% α -ヘリックス (0.5M時25%) 異常スベクトル形状; 芳香族シグナルなし	
	SAF-p1C, SAF-p2D	遅 @ 100 μ M; 曇り発生	~25% α -ヘリックス	~85% α -ヘリックス (0.5M時20%) 異常スベクトル形状	繊維なし 太 繊維 (~4.5 μ m幅) 0.5M中で で繊維なし

大構造物が形成されることを示す。

【0039】

さらに、そして対照として、SAF-p1c配列を並べ替えて(NおよびC末端半分を交換した)、ペプチドSAF-p3を生成した:

E IDALEYE NDALEQK IAALKQK IASLKQ

【0040】

このデザインは、SAF-p2Dと組合せて平滑末端構造を形成すべきであって、繊維を形成すべきものではない。

【0041】

2) タンパク質繊維構造のモデリング

クリックの方程式を用いて生成され、理想的にパックされた界面を有したモデル超らせん 35 量体 (L A A L A A A)₅ の最小化構造から、S A F - p 1 および S A F - p 2 の集合に起因するデザインタンパク質繊維の三次元構造のモデルを作製した (G. Offer and R. Sessions, J. Mol. Biol. 249, 967 (1995))。35 量体のコピーを 1 つの 7 残基反復のオーバーラップと重ね合わせて構造鋳型を伸長し、重複セグメントの除去後に、主鎖を再結合した。二重鎖鋳型中の残基を S A F ペプチドの配列と置き換えて、図 1 B の配列にしたがって 2 つの 7 残基反復により互いに対して互い違いにした。構造物を 5 層の水に浸漬させて、エネルギーに関して座標の平均絶対導関数が 0.01 kcal^{-1} より低下するまで、エネルギーを最小限にした。構造を構築し、Insight II 97.0 (Molecular Simulation s Inc.) を用いて可視化し、一貫した原子価場で Discover 2.9.8 (Molecular Simulations Inc.) を用いてエネルギー最小化した。図 2 (A) では、S A F - p 1 および S A F - p 2 (各々、N 末端から暗灰色 - 明灰色に着色された) は、アスパラギン対 (中間灰色に着色) を含めたコア残基を介して相互作用して、互い違いの平行超らせん繊維の 2 つの鎖を形成する。図 2 (B) では、負荷電グルタメート側鎖 (明灰色に着色) および正荷電リジン側鎖 (黒色に着色) は、S A F ペプチド間の相補的電荷相互作用を生じる。

【0042】

3) 円二色性実験

10 mM の M O P S (3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸)、p H 7、5 中で、ペプチド試料をインキュベートした。試料濃度は、280 nm (S A F - p 1) および 214 nm (S A F - p 2) でのそれらの UV 吸光度から測定した。ベースライン補正後、ペプチド結合の濃度に関する標準化により、楕円率 (mdeg) をモル楕円率 ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{res}^{-1}$) に変換した。205 ~ 260 nm の範囲で全 nm を 5 秒間 (新鮮な 100 μM ペプチド混合物に関しては 1 秒) の信号を積分することにより、1 mm 路長のセル中でデータを記録した。CD 測定は、ペルティエ温度制御装置を装備した J A S C O J - 715 分光旋光計を用いて実行した。

【0043】

図 3 に示した CD データは、S A F ペプチドによるらせん構造の形成に関する分光学的証拠を提供する。図 3 (A) は、S A F - p 1 (----)、S A F - p 2 (---)、これらのスペクトルの平均 (---)、および実験的 S A F ペプチド混合物 (o) に関する 10 μM での円二色性 (CD) スペクトルを示す。図 3 (B) は、100 μM での CD スペクトルを示す。鍵となるのは図 3 (A) の場合と同様であるが、しかしさらなるスペクトル (・) は、1 時間の「熟成」後の S A F ペプチド混合物に関するものである。

【0044】

われわれのデザインと一致して、S A F - p 1 も S A F - p 2 も、p H 7 および 5 の水性溶液中で高度に構造化されなかった (図 3)。しかしながら、等比率で混合すると、円二色性 (CD) スペクトルは変化し、さらに、単離ペプチドに関するスペクトルを平均して出した理論的スペクトルと顕著に異なった。特に、混合物に関するスペクトルは、 α ヘリックス構造の形成と一致する 208 および 222 nm で強度最小を有したが、これらの特徴は、個々のペプチドのスペクトルにおいては顕著でなかった。これは、2 つのペプチドが相互作用して、デザインどおりの α ヘリックス構造を生成したという明らかな証拠であった。さらに、そして多量体化事象に関して予測されたように、これらのスペクトル変化の大きさはペプチド濃度に依存している：10 μM の各ペプチドとの S A F 混合物は、多少の α ヘリックス構造を示す弱い信号を示したが、100 μM 混合物は非常に強い信号を生じた (図 3 A および B)。

【0045】

S A F ペプチドの 100 μM 混合物からのスペクトルの形状および強度は、時間とともに変化した (図 3 B)。「新鮮な」試料を混合直後に記録されたスペクトルは、多少の α ヘリックス構造を示した。しかしながら 5 で 1 時間、混合物をインキュベーション後 (熟成)、222 nm での信号はより強く、約 75 % α ヘリックスを示したが、これはその後

の超らせん形成と一致した。

【 0 0 4 6 】

1 0 0 μ M の S A F ペプチド混合物の熟成は、試料のわずかな曇りも伴った。このような試料からの散乱作用は、C D スペクトルの減衰および歪を生じ得る (D.Mao and B.A.Wallace, (1984) Biochemistry 23, 2667)。しかしながら、試料と、C D 計器の検出器との間の距離の変更はスペクトルの形状または強度に影響を及ぼさなかったため、われわれはこの可能性を無視できた。さらに、熟成 1 0 0 μ M S A F 混合物の遠心分離により回収された懸濁物質を伴わない上清から得られた混合物からの大多数の C D 信号は、1 0 μ M 混合物と同様の弱 C D 信号のみを生じた。

【 0 0 4 7 】

したがって、C D データは、所望の α ヘリックス S A F デザインと全体的に一致し、さらに、大集合体の形成を示した。

【 0 0 4 8 】

対照として、S A F - p 3 (S A F - p 1 の互換物 (S A F - p 1 c と同一)) をデザインして、さらに繊維に集合すべきでない S A F - p 1 との平滑末端ヘテロ二量体を生成した。分析用超遠心機での沈降平衡により、S A F - p 2 (S A F - p 2 D と同一) および S A F - p 3 の 1 0 0 μ M 混合物を分析した。その結果生じたデータは溶液中の単一理想種と仮定して、最良に適合され、適合中に分子量を変化させた。6 4 2 2 の M_r (5 9 2 4 および 6 9 1 1 の 9 5 % 信頼限界を有する) を得たが、これは、個々のペプチドの質量 (分光) 分析から算定された 6 3 0 3 という予測ヘテロ二量体値に非常に近い。1 0 0 μ M 繊維生成混合物 (S A F - p 1 と S A F - p 2 との) に関する、ならびに平滑二量体生成混合物 (S A F - p 2 と S A F - p 3 との) に関する C D スペクトルを記録した。平滑二量体生成混合物に関しては、C D スペクトルの形状および強度は、デザインされたような超らせん形成と完全に一致した。繊維形成混合物と対比して、平滑二量体生成混合物は熟成の兆候を示さない、すなわち、インキュベーション中は無視してよいほどのスペクトル変化が起こり、溶液の曇りは生じなかった。興味深いことに、 α ヘリックス構造および α ヘリックスフォールディングの一般に認められた指標である 2 2 2 nm 近くで最小の強度は、両混合物に関して同様であった。これは、熟成時に観察されたスペクトルシフトにもかかわらず、繊維生成混合物でデザインされたような α ヘリックス構造の形成を強く支持する。

【 0 0 4 9 】

4) 直線二色性 (L D) 実験

伸長構造がデザインどおりに形成されつつあるか否かを試験するために、直線二色性 (L D) 分光分析も用いた。D N A 分子のような長いポリマーは、剪断流により配向され得る。この作用は L D 分光分析によりモニタリングされ得るが、ただし、発色団もその流れにより一列になる (aligned) (M.Bloemendal (1994) Chem. Soc. Rev. 23, 265; A.Rodger and B.Norden (1997) Oxford Chemistry Masters (Oxford University Press, Oxford), vol.1)。

【 0 0 5 0 】

C D の場合と同様に、L D に関してペプチド試料を調製した。J A S C O J - 7 1 5 分光旋光計を用いて、2 1 0 ~ 3 2 0 nm の範囲で全 nm を 2 秒間の信号を積分することにより、クエットフローセル中で回転する試料に関して、データを収集した。ベースライン補正後、ペプチド結合の濃度に関する標準化により、吸光度をモル吸光係数 ($1 \text{ mol} \cdot \text{res}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) に変換した。傾斜ベースラインに関する線状補正を、1 0 0 μ M の S A F ペプチド混合物からのデータに対して行なった。

【 0 0 5 1 】

結果を図 3 D に示す。これは、2 0 μ M のトロポミオシン (---)、1 0 μ M の S A F ペプチド混合物 (----)、ならびに 0 . 5 M の K F の非存在下 (・) および存在下 (o) での 1 0 0 μ M の S A F ペプチド混合物に関する直線二色性 (L D) スペクトルを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

例えば、長さ約 4 2 n m の二量体超らせんを形成するトロポミオシンは、一列になって L D 信号を生じることを、われわれは見出した (図 3 D) 。われわれのデザインおよび C D データ、1 0 μ M の S A F 混合物 (図 3 D) を用いた、1 0 0 μ M の個々のペプチドに関する (データは示されていない) 実験に対照をなして、そして一致して、L D 信号は検出されなかった。しかしながら、熟成 1 0 0 μ M の S A F ペプチド混合物は、ペプチド主鎖からの強い吸光度 (2 1 0 ~ 2 4 0 n m) 、ならびに流れ配向中の芳香族領域 (2 6 0 ~ 2 9 0 n m) における何らかの信号を生じた (図 3 D) 。この技術により長い構造のみが列を成す (aligned) ので、データは、少なくとも 5 0 0 n m の長さの長い繊維が熟成 1 0 0 μ M の S A F ペプチド混合物の溶液中に存在することを実証した。

10

【 0 0 5 3 】

5) 電子顕微鏡

繊維集合を確認するために、電子顕微鏡を用いてペプチド調製物中の構造を直接可視化した。T E M 実験のために、ペプチド試料を、濾過 (された) 1 0 m M の M O P S 、p H 7 、5 下で 1 時間インキュベートした。ペプチド溶液 1 滴を炭素被覆銅検体グリッド (Ag ar Scientific Ltd, Stansted, UK) に適用し、0 . 5 % 水性酢酸ウラシルによるネガティブ染色の前に濾紙で乾燥させて、その後 5 下で乾燥させた。検体グリッド上に直接、2 0 0 μ M で個々のペプチドの予備インキュベート溶液を混合することにより、「新鮮な」S A F ペプチド混合物を調製した後、上記と同様に乾燥させ、ネガティブ染色した。1 0 0 k V で日立 7 1 0 0 T E M でグリッドを検査して、(8 0 0 x 1 2 0 0 画素) 電荷結合装置カメラ (charge-coupled device camera) (Digital Pixel Co. Ltd., Brighton, UK) でデジタル画像を取得して、分析した (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) 。

20

【 0 0 5 4 】

走査電子顕微鏡 (S E M) 検査のために、ネガティブ染色検体グリッドを金でスパッター被覆して、Leo S t e r e o s c a n 4 2 0 S E M で、2 0 k V で、1 0 p A のプローブ電流を用いて検査した。

【 0 0 5 5 】

1 0 μ M の S A F 混合物に関して、または 1 0 0 μ M の濃度の個々のペプチドに関して、透過型電子顕微鏡 (T E M) による 1 0 0 , 0 0 0 倍の倍率まで、構造は見えなかった (データは示されていない) 。しかしながら、5 0 , 0 0 0 倍の倍率での 1 0 0 μ M の S A F 混合物の T E M は、長い繊維性構造の時間依存性形成を明示し、これは C D および L D データと一致した。新鮮な混合物は、種々の幅の多数の伸長繊維を示した。これらの大多数は、約 2 0 n m の直径を有した (図 4 A (1 0 0 μ M の新鮮な混合物) および図 4 D) 。より細い繊維が存在したが、しかしそれらの太さは信頼性高く測定されることはできなかった。熟成混合物に関して記録された画像は、新鮮な混合物で観察されたよりも少ない繊維を示したが、これらはより明確で、かつより厚みがあった (図 4 B および D) 。

30

【 0 0 5 6 】

熟成混合物の走査電子顕微鏡 (S E M) は、繊維分枝の証拠を示さなかった。むしろ、繊維は、あたかも互いの上に積層されたように、単に絡み合わされた (図 4 C) 。絡まり合っているために、繊維の全長を追跡検査できなかったが、しかしそれらは少なくとも数百ミクロンの長さであった。繊維の密度は E M グリッドの表面全体で変化した。少なくとも熟成試料に関しては、それらの直径は全く均一で、4 3 . 3 (S D = 9 . 3) n m の平均太さを有した。本来のデザインは縦方向伸長型に関してであったので、そうでない場合、われわれが予測し得た二本鎖超らせんの平均直径は、約 2 n m であった。したがって、E M データは、デザインされた二本鎖超らせん繊維が高次集合体と側面で会合することを示唆した。

40

【 0 0 5 7 】

6) X 線繊維回析

1 0 m M の M O P S 、p H 7 中の 5 0 0 μ M の S A F ペプチドの混合物を、氷上で少なくとも 1 時間インキュベートした後、6 5 0 0 g で 5 分間遠心分離した。遠心分離管の底

50

から採取した繊維含有溶液の小滴を、2つの蠟充填毛管の末端間に懸濁し、4 で一夜、ゆっくり乾燥させて、部分的整列化 (aligned) 繊維の小集団を得た。R i g a k u C u K α 回転陽極光源 (波長 1 . 5 4 1 8) および R - A X I S I V 検出器を用いて、X 線繊維回析画像を収集した。データ収集中は、クリオストリーム (Oxford Cryo-systems) からの冷風を用いて、試料を 5 で保持した。S A F ペプチド繊維から収集された X 線繊維回析パターンは、以下の特徴を示した (図 6) : (1) 5 . 1 1 $\pm$ 0 . 0 3 での短い子午線方向 (すなわち、繊維長軸と平行) の反射、(2) 1 0 . 1 9 $\pm$ 0 . 0 5 でのこの 5 . 1 1 反射の調波、(3) 赤道上で 8 . 8 $\pm$ 0 . 1 5 で集中させたより強力な、より拡散性の反射。これらの特徴は、繊維軸と一列をなす α ヘリックス超らせんと一致する。5 . 1 子午線反射は、超らせん内のらせんのピッチに対応する。子午線上のその他の予測される反射 (すなわち 1 . 5 での、そして残基当たりの上昇に対応する) は、最新データ組によって解決できないが、一方、赤道反射は、 α ヘリックス軸間の平均距離を示す。8 . 8 でのこの値は、ケラチンに関して観察された値より低い、二量体超らせんペプチドに関して報告された範囲内にある。

【 0 0 5 8 】

7) タンパク質繊維集合に及ぼすフッ化カリウムの作用

伸長二本鎖超らせんへの S A F 配列の分子モデリングは、プロトフィブリルの表面での潜在的相補的電荷相互作用も際立たせる (図 1 および 2)。これにしたがって、実験的には、中等度濃度の塩がプロトフィブリルおよび厚い繊維集合体を抑制することが判明した。第一に、個々のペプチドおよび S A F ペプチド試料の 0 . 5 M のフッ化カリウムとの 1 0 0 μ M 混合物の両方に関して記録した C D スペクトルは、らせん C D 信号低減を示し、混合試料における「熟成」の証拠は認められなかった (図 3 C)。第二に、熟成 1 0 0 μ M の S A F ペプチド混合物に関して前に記載した L D 信号も、塩の存在下で実験を反復すると、失われた (図 3 D)。最後に、1 0 0 μ M の S A F 混合物の T E M 画像も、0 . 5 M の K F の存在下では繊維が形成されなかったことを実証した (図 4 E)。図 4 E は、0 . 5 M の K F の存在下でインキュベートした 1 0 0 μ M での熟成 S A F ペプチド混合物の T E M の結果を示す。

本発明者等は、二本鎖超らせんのさらなる会合を助長するために S A F ペプチドに対するいかなる特徴も承知の上でデザインしたわけではなかった。したがって、S A F ペプチド調製物中の厚みのある繊維の観察は、問題を提起した。すなわち、これらの高次集合体を導き、かつ安定化する相互作用は何かという問題である。したがって、本発明者等は、それらがデザインされた種類の反復構造に固有の特徴は、このような繊維集合 (原繊維発生) を自然に促進する、ということを提唱する。

【 0 0 5 9 】

図 1 B および 2 A に示したようなプロトフィブリルを考えていただきたい。構成ペプチドのいずれかまたは両方によりその表面に認められるあらゆる配列特徴は、プロトフィブリルに沿って一定間隔で反復される。反復長は、ペプチドの長さに等しい (S A F - p 1 および S A F - p 2 に関しては、これは 2 8 残基または約 4 . 2 n m であった)。さらに、当該モチーフは超らせんの超らせんの跡をたどるプロトフィブリル周囲をらせん状に進み、これは、連続 7 残基ベースの二量体構造に関しては約 1 5 n m のピッチを有する。このシナリオにおいては、プロトフィブリル - プロトフィブリル相互作用は、第一のものと相補的なもうひとつの配列モチーフが考え得る相手中に存在する場合、促進され得る。これは、各プロトフィブリル上の相補的モチーフのピッチが正確に適合するためである。したがって、いったん開始されると、プロトフィブリルの側面的会合 - すなわち原繊維発生 - は、結晶中の場合のような多数の一定間隔の相互作用により強く結び付けられる。その結果、プロトフィブリル - プロトフィブリル相互作用の安定性は少数の強力な相互作用よりむしろ親和性作用に基づいているので、相補的相互作用はもっぱら弱い必要がある。集合体の構成成分がある種類の相補的表面より多くなされ得るとすれば、非常に広範な分子集合体が生じ得る。

本発明者等は、静電相互作用を用いて、ヘテロ二量体形成を指図し、そしてプロトフィブ

リルの伸長を促進した（図 1 および 2）。これらの特徴は、プロトフィブリル中の電荷の周期的および交互的パッチも作製するが、但し、それらは包含される場合には規則的である（図 1 B および 2 B）。これらの荷電パッチは、高次集合体を導きかつ安定化し得る。実際、同様の特徴が、いくつかの天然繊維性タンパク質において認められており、多タンパク質フィラメントの集合（J.J.Meng et al(1994) Biol. Chem. 269, 18679; A.D.McLachlan and M.Stewart(1976) Mol. Biol.103,271）および小合成ペプチド系（S.G.Zhang et al(1993) Proc. Natl. Sc. U.S.A.90, 3334）に関連付けられている。塩（K F）を用いた上記実験は、塩橋（静電相互作用）が少なくとも一部分、原繊維発生の原因であることを示唆する。

【 0 0 6 0 】

10

8) 超らせんデザイン

a. 2つの重ね合わせられる 7 残基に関して、それぞれ 6、5 および 4 残基オフセットと等価である 1、2 および 3 残基の 3 つの考え得る配列オフセットが存在する。規則的 3.6 - 残基 / α ヘリックス 1 回転に関しては、これらは、らせんの外側の周囲にそれぞれ 100°、160° (360 - 200) および 60° (360 - 300) の角度オフセットを有する 2 つの疎水性面を生じさせる。これは、らせんホイールに関して最良に観察される。らせんスーパーコイル化を説明し - すなわち 3.5 残基 / 回転と仮定し、超らせんに関する一般に認められたらせん - ホイール表示を用いて、これらの角度オフセットをそれぞれ 103°、154° および 51 度に変える。しかしながら、いずれの組の角度も、側鎖サイズ、幾何学形状およびパッキングもらせん界面に影響を及ぼすため、実際の超らせん系におけるらせん - らせん相互作用を考えた場合、過度の単純化である（Harbury, P.B. et al(1993) Science 262, 1401-1407; Harbury, P.B. et al(1994) Nature 371, 80-83; Malashkevich, V.N. et al(1996) Science 274, 761-765）。それにもかかわらず、多数の天然超らせん集合は、少なくとも、ほぼ角度オフセットと一致することを、われわれは見出した。三量体は、3 つの残基により分離された重複 7 残基を有すると考えられる（角度オフセット = 51 / 60°）。一方、四量体および五量体超らせんはしばしば、1 残基による 2 つの 7 残基反復オフセットに関する主題の変形体であった（100 / 103°）。

20

【 0 0 6 1 】

b. 2 つの残基による 2 つの 7 残基反復オフセット: α 円筒体構築物

30

2 残基の配列オフセットは、可能性として、1 および 3 残基オフセットより興味深い。これは、a、c、d および f の疎水性（H）残基を c および f に渡して、第二のオフセット 7 残基の a' および d' 位置を有効に作り上げる可能性のためである。これは以下に示されるが、この場合、P は極性（非コア）残基を意味する。

a b d e f g a b c d e f g	反復 1
H P P H P P P H P P H P P P	2 進パターン 1
P P H P P H P P P H P P H P	2 進パターン 2
f' g' a' b' c' d' e' f' g' a' b' c' d' e'	反復 2
a b c d e f g a b c d e f g	割当レジスター
H P H H P H P H P H H P H P	全体的二成分パターン

40

【 0 0 6 2 】

このような配列パターンは、広い角度分離（154 / 160°）を伴う 2 つの疎水性シーム（seam）を生じ、これはらせんのほぼ反対側にそれらを配置する。さらに、それは、平行らせん - らせんパッキング配列に関する 2 つの可能性を提供する。「シン（syn）」。この場合、隣接らせんからの 2 つの同様の面 - すなわち a / d と a' / d'、または c / f と c' / f' が併合して、開放 α シートを生じる。図 6 a; 「アンチ（anti）」。この場合、a' / d' 面対と c' / f'。アンチ配列では、構造は閉じて、 α 円筒体を形成し得る。らせんの逆平行対に関しては、シン定型的会合は円筒体を生じるべきであるが、一方、シートは、アンチ定型的逆平行界面から形成されるべきである。

【 0 0 6 3 】

50

c . 天然 α 円筒体

T o l C は、2つの α 樽様ドメインを有する (Koronakis,V. et al(2000) Nature 405, 914-919)。ともに、3つのモノマーが関与する12らせんを有する。樽下部では、各らせんは同一プロトマーからのもう1つのものと対合して、別個のスーパーコイル化逆平行超らせんを形成する。S O C K E T 分析は、これらの対内 (それらの間ではない) での広範な逆平行孔へのノブ (K I H) 相互作用を明示した。対照するものとして、樽上部のらせんは、傾斜してはいるがより均一にパックして、 α 円筒体を示すように思われる。構造のこの部分のS O C K E T 出力は、樽下部で見出されたよりもより少ないK I H相互作用を多数明示した。さらに、K I H相互作用は、円筒体周囲で連続的でなく、特にそれらは同一モノマー中のらせん間でより広大であるが、しかしモノマーに接するらせん間では規則性が低い。われわれの見解では、樽状T o l C は、本発明のタンパク質構造により形成される円筒体の変形体を示す。

10

【0064】

それにもかかわらず、本発明者等は、樽上部のらせんに関する7残基目録を明瞭に割当て得ることができた。これは、相対的a、c、dおよびf位置でのノブ、ならびに2つのシーム隣接らせんのシン定型的会合を明示し、すなわち、上記の理論と完全に一致した。

【0065】

らせんを平行に用いて、 α シートおよび α 円筒体を構築することが可能である、とわれわれは考える。平行らせんの使用は、 α 円筒体の構築に関する1つの興味深い結果を有するが、これらの構造の対合はアンチ定型的であるので、1つのらせん上のa残基は、構造内の同一レベルの隣接らせんのc残基と組む。同様に、dおよびf残基は、介在レベルで対合する。その結果は、連続らせんが2つの残基によりらせんおよび円筒体軸に変形仕上げられ、これは?3と等価であるというものである。したがって、平行らせんから α 円筒体を構築する試みは、閉じることも閉じ得ないこともあるらせんの渦巻を生じる。しかしながらこれは、上記のようなペプチドベースのナノチューブ作製の可能性を切り開くので、潜在的に非常に興味深いものである。

20

【0066】

α 円筒体構築に関する第二の考察は、らせんおよび超らせんスーパーコイル化の結果である。T o l C の上部バレルは、12のらせんを有する。標準スーパーコイル化を伴う平行らせんの構造、すなわち各らせん中の2つのシーム間の154°の角度の隔たりに基づいて、円筒体は14のらせんで閉じるべきである、とわれわれは算定した。しかしながら、らせん数の変動が予測される。これに関する1つの理由は、らせんが2方向に同時にスーパーコイル化できず、そして両界面でのパッキングを保持するためには何らかの歪を要することである。堅い孔へのノブパッキングが保持されるタンパク質データベースにおけるこのための構造的先例をわれわれは見出した (Walshaw & Woolfson、未発表)。実際、3らせん α シートの中心らせんは、真っ直ぐである (図7b) (n . b . T o l C の樽上部におけるらせんの傾斜は真っ直ぐならせんとスーパーコイル化らせん間の妥協を提供し得る)。完全に真っ直ぐならせんのパッキングを仮定すると、角度オフセットは160°になり、18のらせんが円筒体を閉じることになる。しかしながら、3 -、4 - および5本鎖超らせんの場合と同様に、側鎖がらせん - らせん接触角を媒介すると仮定すると、その他のオリゴマー化状態が考えられ得る (Harbury, P.B. et al(1993) Science 262, 1401-1407; Harbury, P.B. et al(1994) 371, 80-83; Malashkevich, V.N. et al(1996) Science 274, 761-765)。144°~162°の角度オフセットの小調整がらせん数を10から20に変える、とわれわれは算定する。

30

40

【0067】

9) タンパク質構造の形成

上記のように、本発明のタンパク質構造は、以下のような種々の用途を有し得る：

【0068】

ナノチューブ

a . これは、例えば配列中にオフセットを有する上記の7および11残基反復を併合する

50

ことにより達成され得る。当該作用は、全体的疎水性置換を排除することである。言い換えれば、交互的 7 残基および 11 残基反復は、18 残基反復を生じて、 α ヘリックス反復を適合させる。 α ヘリックスにおいて、18 残基は正確に 5 つのらせん回転に亘る。したがって、完全閉鎖ペプチドナノチューブを作製し得る（図 5 は、ナノチューブの一部を示す）。平行直鎖らせんの場合には、「円筒体」の 1 回転当たり 18 のらせんが存在し、回転当たりの上昇は、36 残基である。したがって、2 つの残基による 7 - 11 - 7 - 11 反復オフセットを有する 36 残基ペプチドは、その末端がチューブを閉鎖するために合流するらせんの渦巻きを形成すべきである。このようなナノチューブは、ナノスケールのパイプおよび鉛管の製造に特に有用であり得る。チューブの内部は、異なる小（2 ~ 40）分子の流れを制御するために誘導化され得る。

10

【0069】

b. 誘導化および分枝ペプチドならびにペプチド鑄型

本発明の自己集合ペプチドは、相対的に小型で、合成的に入手し易い。したがって、非標準誘導化可能側鎖が、それらに組入れられ得る。例えば、モノマー単位は、f 位置の外側に単一システイン残基を用いて作製され得る。これらは、チオールベースの化学を用いて、小分子およびその他のペプチドをカップリングするために用いられ得る。広範な種々のチオール反応性プローブが利用可能である。特に、ペプチドはフルオロフォアで標識され得る。例えば、フルオレセインで標識された一方のペプチド、ならびに共焦点顕微鏡により可視化されたローダミン繊維を有する他方のペプチドは、それぞれ緑色および赤色に見える（図 7）。繊維中にしっかりパックされ得るプローブ間の FRET の可能性があり、これは解釈を混乱させ得る。これを避けるために、標識ペプチドが新鮮な集合 SAF 混合物にドーピングされ得る。利用可能な蛍光標識ペプチドを用いると、繊維は、繊維/網状構造集合および配向を追跡する別の経路を提供する。

20

【0070】

分枝自己集合繊維を生成するために、「T 字形」複合ペプチドが作製され得る。これらは、2 つの SAF ペプチドの変異体を一緒に混合し、カップリングすることにより作製された共有ヘテロ二量体である。一方は末端システインを有し、他方は中央システイン残基を有する。所望の生成物は、PHLC によりジスルフィド結合ペプチドのミックスから精製され得る。「T」の「バー」と「幹」の両方が繊維中に組入れられるようになるか、または繊維に着手し得るので、新鮮な SAF 混合物への複合（「T」）ペプチドのドーピングは、三次元での繊維集合を広げるだろう。その結果生じる網状構造は、EM により可視化され、特性化され得る。

30

【0071】

ペプチド合成二ブロックコポリマーハイブリッドが生成され得る。原子伝達ラジカル重合を用いた水溶性二ブロックコポリマーの調製のための適切な方法は、X.S.Wang et al Chemical Communications 1817(1999)およびX.S.Wang et al Macromolecules 33, 257(2000)に記載されている。

【0072】

本発明のタンパク質繊維は、この重合の鑄型を作り、これを制御するために用いられて、ハイブリッド繊維を製造し得るか、あるいはペプチド鑄型がその後取り外され、印を消される場合には、水溶性「漁網」ナノチューブへの経路を提供される。その他の可能性としては、以下のものが挙げられる：プレ集合ペプチド繊維上へのポリマーの結合、繊維集合前のポリマーおよびペプチドの結合、ならびにプレ集合繊維上での重合の実行。

40

【0073】

c. マトリックスの形成

本発明のタンパク質繊維は、それぞれ二次元および三次元グリッドおよびマトリックスを形成するよう配列され得る。このようなマトリックスに対する一用途は、生物学的流体、例えば血液の精製においてである。親和性マトリックスは、血液夾雑物（例えばウイルス）を除去するために集合され得る（例えば血液中でその場に）。ウイルス除去の場合、標的夾雑物のための結合剤（例えば、ウイルスコートタンパク質に対する天然または工学処

50

理親和性を有するペプチドまたはタンパク質)は、本発明のタンパク質構造中のペプチドモノマー単位と融合され得る。次にマトリックスは、軽い遠心分離により任意の結合夾雑物とともに血液から除去され得る。例えば、100nm長の繊維は、容易に除去され得る(12MDaの質量を有すると概算される。このような親和性マトリックスは、大型天然タンパク質を上回る多数の利点を有する。集合マトリックスでは、任意の結合剤が整列化されて、標的化分子に対する非常に有効な親和性を提供する。

【0074】

d. その他の用途

本発明のタンパク質構造のその他の用途を以下に挙げる：

- i. X線結晶学のための生体分子の結晶化の核となるための組織化網状構造の調製、
- ii. 組織工学処理のための細胞成長を促すためのオーダー(ordered)繊維の使用、
- iii. ナノスケール分子ふるいの構築、
- iv. 種々の機能性小分子または高分子のための支持体として用いられ得るナノスケール分子グリッド/骨格の調製、
- v. 機能化グリッドおよび網状構造は、例えば触媒、生物学的流体およびその他の検査溶液の親和性ふるい/精製、概して組織修復および組織工学処理を促すための内在性分子および補因子の漸増、に用いられ得る。
- vi. 新規のラボオンチップ技術(lab-on-chip technology)を作成するために、ペプチド自己集合体は、以下のようにリソグラフィー(lithography)と組合せられ得る：
リソグラフィーおよび関連技法を用いて、ペプチド繊維を収容するために適切なサイズ(例えば、太さおよび深さが20~100nm)を有して作られ得る溝を有する種々の表面をパターン化し得る。次にこれらを用いて、表面で直接混合された溶液からの繊維の集合を指図し得る。さらに、十分に確立された化学を用いて、本発明者等は、種々の小分子およびその他のタンパク質を用いてペプチド繊維の機能化を想定する。ペプチドデザイン、自己集合およびリソグラフィーのこの提唱された組合せは、特定表面での機能性ポリマーのオーダーアレイ(orderd array)の開発を可能にするはずである。
- vii. 集合繊維は、カーボンナノチューブを用いて、限流が約10~25nmであるAFM(原子間力顕微鏡)における微細(したがって、高解像度)チップとしても用いられ得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1A、図1B、図1Cは本発明の自己集合繊維(SAF)ペプチドモノマーのデザインおよび配列を示す。

【図2】 図2A、図2Bは本発明のデザインされた自己集合繊維のコンピューターモデルを示す。

【図3】 図3A、図3B、図3C、図3Dは本発明のタンパク質構造に関する円二色性(CD)および直線二色性(LD)実験の結果を示す。

【図4】 図4A、図4B、図4C、図4D、図4Eは透過型電子顕微鏡により直接可視化された合成タンパク質繊維の集合、および繊維太さの分析を示す。全パネルにおいて、白色スケールバーは、100nmを現す。図4Dは、100μMでのSAFペプチドの新鮮な(白色バー)および熟成された(黒色バー)混合物に関してTEMを用いて確定された繊維太さの分布を示すヒストグラムである(ヒストグラム上での「x」の太さ値は、「(x-5)~x」からなされた全測定値を含む)。

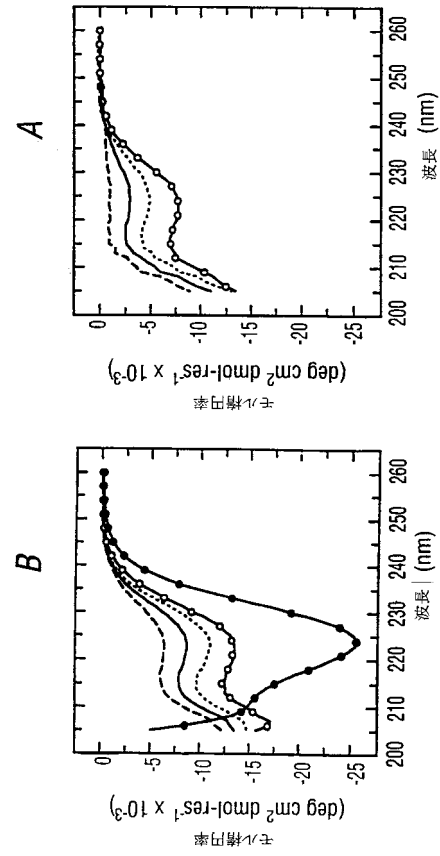
【図5】 図5は、ホモオリゴマーペプチドナノチューブに至る平行らせんペプチドの考え得るアンチ定型的会合を示すカートンである。

【図6】 図6は、本発明の整列化タンパク質繊維のx線回析パターンである。

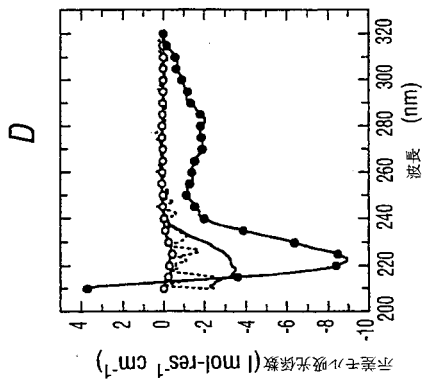
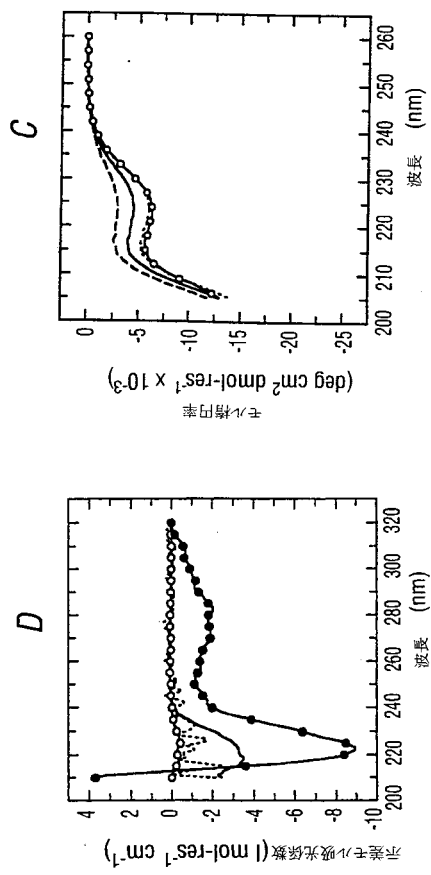
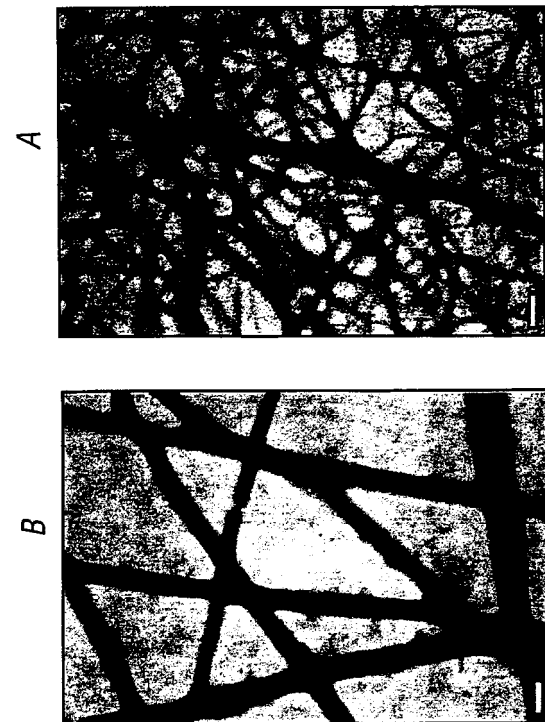
【図7】 図7は、フルオロフォアの含入により誘導体化された繊維を示す電子顕微鏡写真である。

【図8】 図8は、平滑末端ヘテロ二量体を形成するようデザインされたアミノ酸配列を示す。

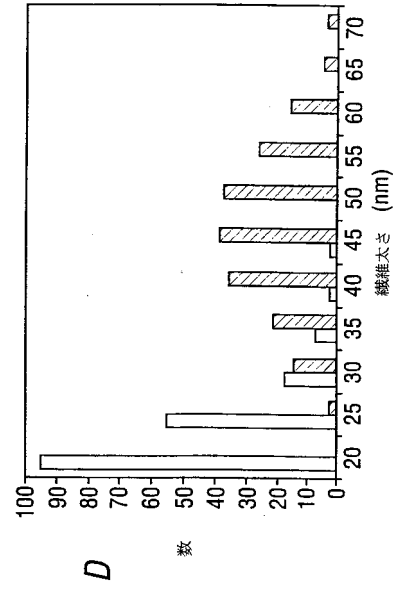
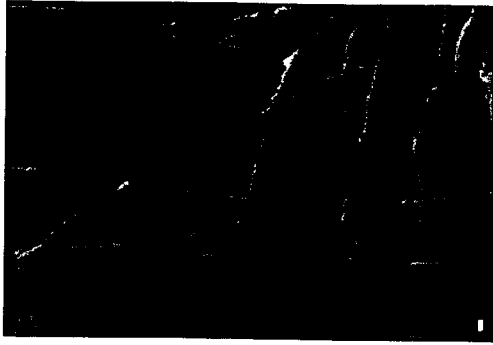
【図 3】



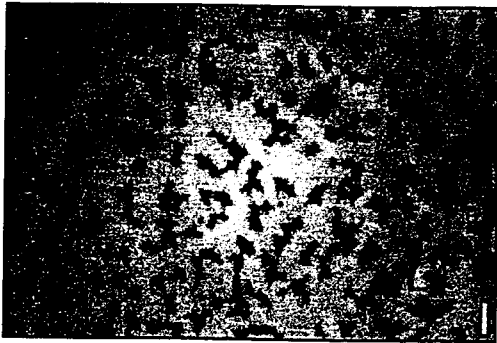
【図 4】



C

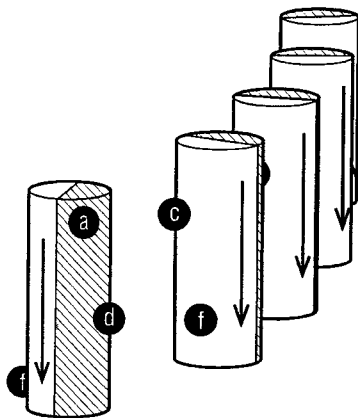
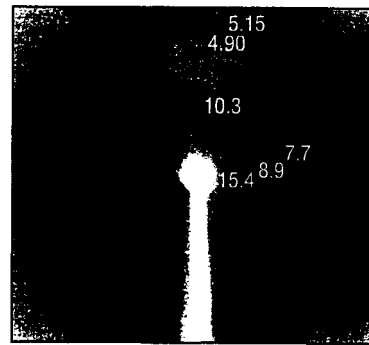


E

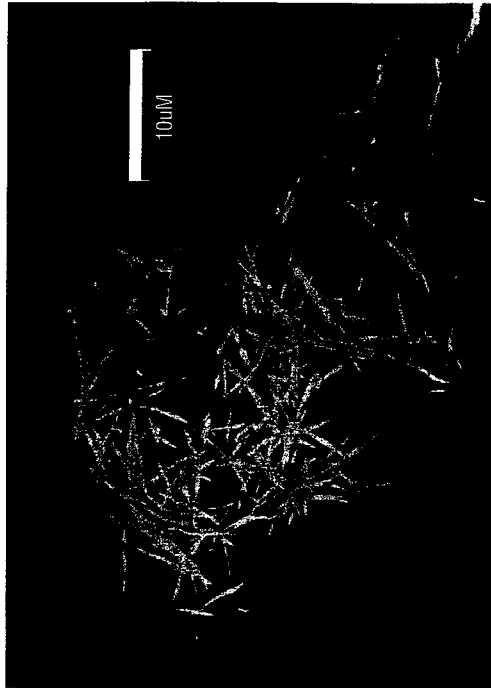


【図 5】

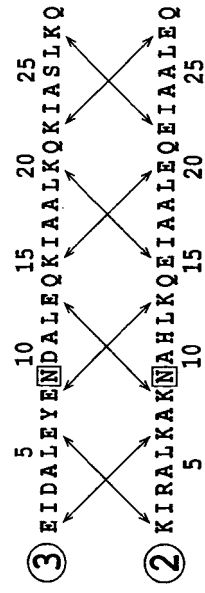
【図 6】



【図 7】



【図 8】



-	+
**	
+	-

フロントページの続き

- (72)発明者 ウールフソン, デレック エヌ.
イギリス サセックス ピーエヌ1 9 キュージー ブライトン ファルマー ユニバーシティ
オブ サセックス
- (72)発明者 ウォルショー, ジョン
イギリス サセックス ピーエヌ1 9 キュージー ブライトン ファルマー ユニバーシティ
オブ サセックス
- (72)発明者 パンドヤ, マヤ ジェイ.
イギリス サセックス ピーエヌ1 9 キュージー ブライトン ファルマー ユニバーシティ
オブ サセックス
- (72)発明者 コルヤー, ジョン
イギリス エルエス17 9 エーエヌ バードシー ミル レーン エルフォードリー

審査官 石丸 聡

- (56)参考文献 米国特許第05712366 (U S , A)
Curr. Biol., vol. 3, pages 658-667 (1993)
J. Struc. Biol., vol. 137, pages 73-81 (2002)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C07K 14/00
C07K 1/113
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)