

溶液中におけるコラーゲンモデルペプチド三重らせん構造の熱安定性

(阪大院理) 寺尾 憲

【はじめに】 3残基ごとにグリシン残基 (Gly) を持つコラーゲンの三重らせん構造の安定性とシーケンスとの相関はこれまで主に $(\text{Gly-X-Y})_n$ といった規則的な配列をもつモデルペプチドを用いて進められてきた。この中で X 位にプロリン基 (Pro)、Y 位に 4-(R)-ヒドロキシプロリン基 (Hyp) を持つ Gly-Pro-Hyp を単位に持つ連鎖の水中における三重らせん構造が Gly-Pro-Pro からなるものよりもさらに高温まで安定なことや解離のエンタルピーがより大きいことが古くから知られている [1]。一方で、最近連鎖をさまざまに変えた実験から $(\text{Gly-Hyp-Pro})_{10}$ が低温でも三重らせんを形成しないことや $(\text{Gly-Hyp-Hyp})_{10}$ はかなり高温までその三重らせん構造を安定に保持するが、解離のエンタルピーは非常に小さいことが明らかにされた [2]。これらの現象の解明は主に三重らせん構造そのものの安定性をその原子配置から明らかにしようとする方向で進められてきたが、水溶液中での三重らせん構造は三重らせんと解けた状態の自由エネルギーの差によって決まる。従って一本鎖の溶液中での状態についても知る必要があるが、主に転位のエンタルピーや円二色性が調べられたのみで広がりなどについて調べられた例は見当たらない。本研究では、三重らせん状態及び一本鎖状態での溶液中における分子形状についての知見を得るため、主にこれらのモデルペプチド水溶液の小角 X 線散乱 (SAXS) 測定を行った。

【実験】 繰返し単位数 n が 5 および 9 の $(\text{Gly-Pro-Hyp})_n$ (GPOn), $(\text{Gly-Hyp-Pro})_n$ (GOPn), $(\text{Gly-Hyp-Hyp})_n$ (G00n), $(\text{Gly-Pro-Pro})_n$ (GPPn) 計 8 試料を固相法により合成して研究に使用した。まずそれぞれの水溶液について円二色性測定を行い、3重らせん—1本鎖転移温度を調べた。次にすべてのモデルペプチドが水溶液中で完全に一本鎖となる 75°C および $(\text{Gly-Pro-Hyp})_n$ と $(\text{Gly-Hyp-Hyp})_n$ が三重らせん構造をとる 15°C を含むいくつかの温度で SAXS 測定を行った。SAXS 測定には SPring-8 の小角散乱用ビームライン BL40B2 (Proposal No. 2006A1055) を用いた。さらに 3重らせん—1本鎖転移に伴う水和挙動の変化について調べるため温度を変えて密度測定を行った。

【結果と考察】 円二色性測定と SAXS 測定の結果より、15°C で $(\text{Gly-Pro-Hyp})_9$ と $(\text{Gly-Hyp-Hyp})_9$ のみ Triple Helix 構造をとることがわかった。図 1 に SAXS 測定より得られた第二ビリアル係数 A_2 を表す。75°C では、すべてのモデルペプチドが 1本鎖として溶液中に存在することがわかっているが、この温度では試料や鎖長によらずすべて正の A_2 を持つことがわかる。一方 15°C では、3重らせん構造をとるものについては正の値をとるのに対し、3重らせん構造をとらないものの A_2 はすべて負になる。これはコラーゲンモデルペプチドが 3重らせんを巻く温度付近で分子間の相互作用が斥力から引力的に変化することを意味する。

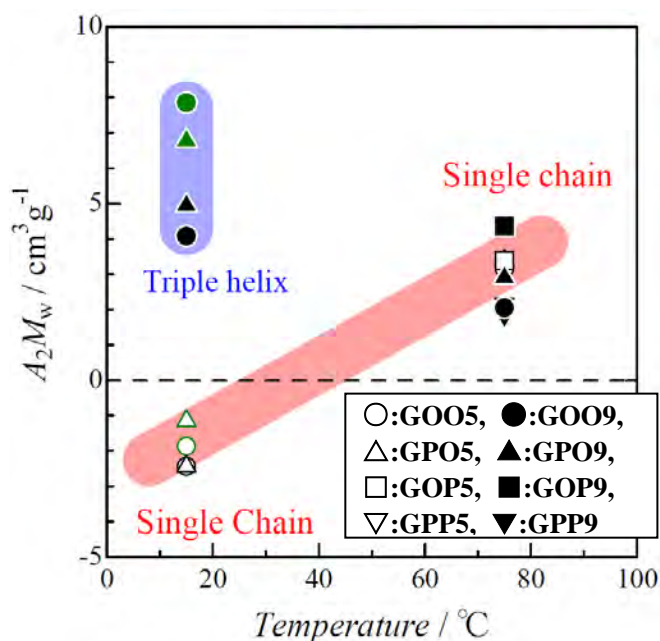


図 1. 種々のコラーゲンモデルペプチドの第二ビリアル係数 A_2 。

次に図2に75°Cでの(Gly-X-Y)_nの回転半径 $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ を示す。 $n = 5$ および 9のそれぞれの連鎖長に対する $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ はそのシーケンスに依存しないこと、またその絶対値は変性たんぱく質について知られる値に非常に近いことが分かる。遠紫外領域での円二色性が75°Cでもペプチドのシーケンスに幾分依存したことからペプチド主鎖の内部回転角の分布はある程度Hypの有無に依存するが、その違いは分子全体の広がりにはほとんど影響しないと言える。さらに低温で三重らせん構造をとる(Gly-Pro-Hyp)₉とコイル状態を保つ(Gly-Hyp-Pro)₉の75°Cでの散乱強度の角度分布が実験誤差内で一致したのに対し、(Gly-Hyp-Hyp)_nの散乱強度は高角側でかなり小さくなったことから、吸着水量が異なる可能性が示唆された。

図3に(Gly-Pro-Hyp)_nと(Gly-Hyp-Hyp)_nの部分比容の温度依存性を示す。低温でも1本鎖状態を維持する5回繰り返しペプチドの温度依存性が温度の上昇とともに単調増加するのに対し、(Gly-Pro-Hyp)₉は転移点でより強い温度依存性を持つことがわかる。これは3重らせんを巻く際に吸着水量が増加すると考えると説明できる。一方で(Gly-Hyp-Hyp)₉の温度依存性は弱く、1本鎖状態での水和数が多く、3重らせんを巻く際に吸着水の一部が減少する必要があることを示す。

これらのことから、(Gly-Hyp-Hyp)₉3重らせんの解離のエンタルピーが(Gly-Pro-Hyp)₉のそれに比べて小さいことは一本鎖のコンホメーションの違いによるのではなく3重らせん形成に伴う水和挙動の違いであると論じたKawaharaら[4]の予言を強く支持する。

【参考文献】

- (1) Engel et al. Biopolymers, 16, 601 (1977).
- (2) Mizuno et al. J. Biol. Chem., 279, 282 (2004); ibid. 279, 38072 (2004).
- (3) Kohn et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101, 12491 (2004).
- (4) Kawahara et al. Biochemistry, 44, 15812 (2005).

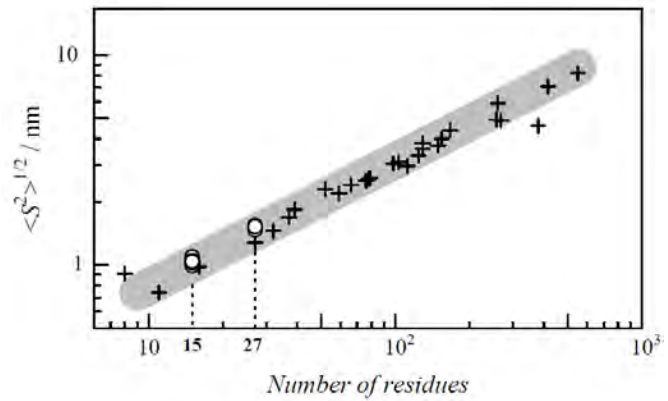


図2. 1本鎖のコラーゲンモデルペプチド(○)の回転半径の分子量依存性。+は変性蛋白質に対する文献値。

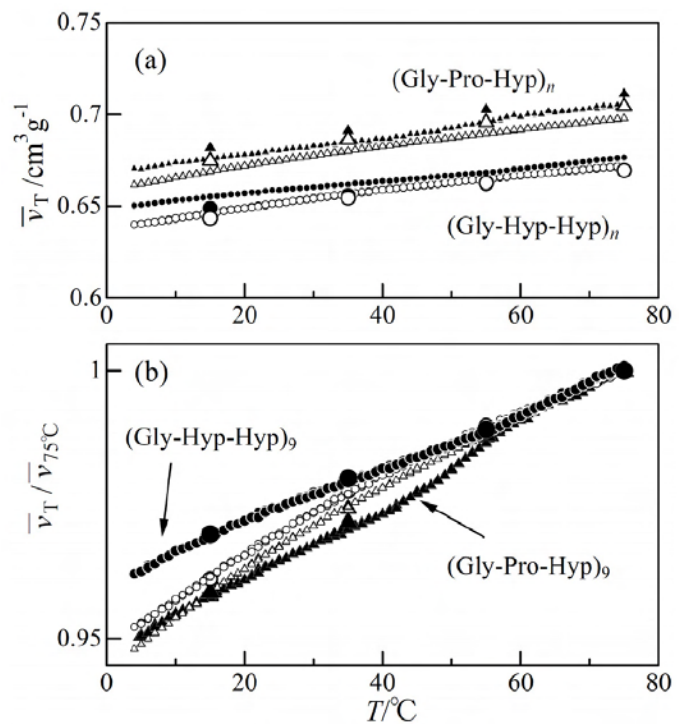


図3. (Gly-Pro-Hyp)_n(三角)と(Gly-Hyp-Hyp)_n(丸)の部分比容の温度依存性。塗りつぶしは9回繰り返し、白抜きは5回繰り返しペプチドを表す。