3P005

合成ペプチドのアルコール誘起変性と溶媒クラスター構造との相関

○中村 智、吉田 亨次、李 相男、山口 敏男（福岡大理）

【序論】 Hongら [1] は、種々のアルコール水溶液において、各アルコールに特有な組成でメリチンの二次構造変化が起こることを報告した。本研究では、Full Sequence Design-1(FSD-1)24 残基の一部 17 残基のペプチドを合成し、種々のアルコール-水混合溶媒中において二次構造変化のアルコール濃度依存性を調べた。

【実験】 目的ペプチドは、433A peptide synthesizer によりパッチ式 F-moc 固相法で合成した。粗ペプチドを HPLC 分取後、TOF-Mass 測定により目的ペプチドの生成を確認した。JASCO-J805 分光偏光計を用いて、種々のアルコールモル分率 χ_A において CD 測定を行い、二次構造変化を調べた。

【結果と考察】 Fig. 1 に種々のエタノールモル分率に対する 222 nm における合成ペプチドのモル楕円率の値を示した。 $\chi_E = 0$ では、ランダム構造が支配的である。溶媒クラスター構造転移が起こる $\chi_E = 0.2$ 付近で α -helix 構造へ転移する変曲点が見られ、それ以上エタノールが増加しても大きな二次構造変化は示さない。当日は、種々のアルコール-水混合溶媒中の結果と合わせて、ペプチドのアルコール変性を溶媒クラスター構造の観点から考察する。

D.-P. Hong, et al., J. Am. Chem. Soc.1999, 121, 8427-8433.

Fig. 1. The molar ellipticity at 222 nm of the peptide as a function of χ_E .

S. Nakamura, K. Yoshida, S. Lee, T. Yamaguchi : Correlation between alcohol induced denaturation of synthetic peptide and structure of solvent clusters

3P007

コラーゲントリプルヘリックス構造の水和状態の解析

○西 義則¹、内山 進^{1,5}、土井 正光²、西内 祐二³、中沢 隆⁴、大久保 忠恭¹、小林 祐次¹（¹阪大院・薬、²和歌山高専、³ペプチド研、⁴奈良女子大・理、⁵阪大院・工）

コラーゲンは、左巻らせんのポリペプチドが三本集まったトリプルヘリックス構造を形成する。コラーゲン中には、他のタンパク質には見られないヒドロキシプロリンが含まれており、トリプルヘリックス構造の熱安定性の上昇に重要な役割を果たす。これまでに、ヒドロキシプロリンによるトリプルヘリックス構造の安定化について、いくつかの仮説が提唱されてきたが、統一した結論が得られていない。そこで我々は、水酸基をもつヒドロキシプロリンのほか、水酸基は電気陰性度の最も高いフッ素原子に置換したフルオロプロリンを含むモデルペプチドを合成し、DSC による熱測定を行ってきた。その結果、ヒドロキシプロリン、フルオロプロリンともにトリプルヘリックス構造の熱安定性を上昇させる働きはあるものの、安定化機構は大きく異なっており、前者はエンタルピー的、後者はエントロピー的な効果によって安定化していることが分かってきた。今回我々は、これらの熱力学量の違いを考察するために、モデルペプチドの部分モル体積と露出面積 (ASA) を求め、モデルペプチドと水分子との相互作用を調べた。その結果、ヒドロキシプロリンを含むモデルペプチドの水和の程度は高かったのに対して、フルオロプロリンを含むものは低かった。ヒドロキシプロリンは、その水酸基と水分子との間に水素結合を形成することが X 線結晶解析より示唆されているが、今回の実験から溶液中でも高度に水和していることを確認した。従って、水和によるエンタルピー増加がトリプルヘリックス構造の熱安定性の上昇に寄与すると考えた。一方、フルオロプロリンのフッ素原子の水素結合能は低いことが知られており、観測された結果は周囲に存在する水分子の自由度の制限が小さくなっていることに対応している。その結果エントロピー変化が小さくなり、高い熱安定性を獲得しているものと考察した。

Y. Nishi, S. Uchiyama, M. Doi, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo and Y. Kobayashi : Hydration states of collagen triple helical structures

3P006

デノボデザインペプチドおよびタンパク質の α -ヘリックスに及ぼす圧力効果

竹田 直弘¹、○竹清 貴浩¹、奥野 明¹、清水 昭夫²、磯貝 泰弘³、加藤 稔¹、谷口 吉弘¹（¹立命館大・理工、²創価大・工、³理研・生体物理化学）

水溶液中のタンパク質は数百 MPa (数千気圧) 以上の高圧力下で変性することがよく知られている。しかしながら、圧力変性したタンパク質の二次構造は、完全にアンフォールドしたものから、1GPa 以上の高圧力下でも α -ヘリックス等が native like に残存するものまで様々であり、その変性機構は未だ十分に解明されていない。本研究は、タンパク質の立体構造を単純化したモデルを用い、ポリペプチド鎖の基本構造の一つである α -ヘリックスの圧力安定性に関する理解を深めることを目的に検討を行った。今回使用したタンパク質モデルは、水溶液中において、単体で α -ヘリックスを形成する Ala をベースにした 16 残基のペプチド (AK16) と 4 本の α -ヘリックスがバンドル構造を有するデノボデザインタンパク質 (4HB) の 2 種類である。高圧力下における α -ヘリックスの挙動はダイヤモンドアンビルセルと組合した FT-IR 分光法によって追跡した。観測されたアミド I バンドの変化から、驚くべきことに、AK16 は、1GPa までの加圧により、そのヘリックス含量を増大させた。一方、4HB は、疎水性残基間の van der Waals 相互作用によって安定化されているヘリックス間が加圧に伴って緩み、部分的に分子内部に埋もれていたヘリックスが溶媒側に露出するもの（つまり、二次構造より高次のレベルでは構造破壊が促進されるものの）、1.3GPa 以上でさえ、その α -ヘリックスは AK16 と同様にアンフォールドしなかった。以上のことから、水溶液中において、 α -ヘリックスは、本質的には高圧力によってアンフォールドするものではなく、ある種のタンパク質中の α -ヘリックスが圧力変性に伴ってアンフォールドするのは、その固有の立体構造自体に何らかの要因があることを示唆するものと考察した。

N. Takeda, T. Takekiyo, A. Okuno, A. Shimizu, Y. Isogai, M. Kato and Y. Taniguchi : Pressure effects on the α -helix of de novo designed peptide and protein

3P008

質量分析法によるポリ-L-グルタミン酸ヘリックスの H/D 交換の研究

○山本 竜也¹、泉 俊輔^{1,2}、月向 邦彦²（¹広大・QULiS、²広大院・理）

我々はこれまで質量分析法により蛋白質の H/D 交換を調べ、構造の揺らぎに二次構造が大きく関与していることを明らかにしてきた。特に α ヘリックスの H/D 交換は、その部位や周辺環境、またリガンドの結合に大きく依存し、その揺らぎが機能発現に関わっている可能性が示唆された (Yamamoto et al. J. Biochem. (2004), 135, 17-24)。揺らぎに及ぼす α ヘリックスの鎖長依存性を知ることは、蛋白質の揺らぎを理解する上での基礎として重要である。本研究では、モデルポリペプチドとしてポリ-L-グルタミン酸を用い、様々な鎖長を有する α ヘリックスの H/D 交換反応を質量分析法により追跡し、 α ヘリックスの鎖長と揺らぎの関係について調べた。

ポリ-L-グルタミン酸 (M.W.750~4,000) 水溶液に 10 倍量の重水を混合することにより H/D 交換反応を開始し (pH4.8, 15 °C)、各時間ごとに pH を 2.8 まで下げ液体窒素で凍結することにより反応をクエンチし、MALDI-MS を用いて質量を測定した。その結果、試料に含まれる 8~43 残基からなるすべての鎖長のポリペプチド鎖について H/D 交換を観測することができ、一次反応式でフィッティングすることにより速度論的パラメータを算出した。短いペプチドは高い交換量と交換速度を示しており、特に 8 残基のペプチドは初期の段階で完全に交換していることから、安定なヘリックスを形成していないことがわかった。また、鎖長が長くなるにつれ交換量・交換速度ともに減少するが、その鎖長依存性は単調ではなく、20 残基と 38 残基前後に変曲点が存在することがわかった。このことはポリグルタミン酸のヘリックス構造がこれらの鎖長で変化していることを示している。これらの結果をもとに、蛋白質内における α ヘリックスと揺らぎの関係について考察する。

T.Yamamoto, S.Izumi, and K.Gekko : Mass spectrometry on H/D exchange of poly-L-glutamic acid in helix form