〔総合報告〕

オリゴペプチド結晶中の2次構造

名大工 芦田玉一, 山根 隆, 田中 勲

Tamaichi ASHIDA, Takashi YAMANE and Isao TANAKA: Structural Characteristics of Oligopeptides-Secondary Structures.

Many oligopeptides with two or more peptide units fold into the so-called secondary structures, which give several rules and accurate parameters of protein foldings.

β -turn: Type I is frequently found in the oligopeptides having three or more peptide units. The $\text{NC}^\alpha\text{C}'$ angles at the second site are 113 – 116° . The mean length of the intramolecular $4 \rightarrow 1$ hydrogen bonds is $3.03 \text{ \AA}$. Val and Ile having two C' atoms are not usually accommodated at the third site.

β -sheet structure: Several peptides show the (ideally) parallel β -sheet structures, while at present only tri(L-Ala) crystallizes in an infinitely extended antiparallel β -sheet structure. In some peptide crystals two molecules are linked to a dimer by a pair of hydrogen bonds of the antiparallel β -structure type. Several peptides crystallize in "twisted" β -sheets, and their conformational angles are close to those of the collagen group peptides.

poly (L-proline) II helix: Tri- and tetra-prolines are in a poly(L-proline) II helix with the trans peptide bonds. Several others containing Pro and Gly have similar conformations.

Cis peptide bond: Cis prolines have been found in Z-Gly-Pro-Leu and a few cyclic oligopeptides. The bond angles around the N atom are: $\text{C}'\text{NC}^\alpha(\text{cis}) = \text{C}'\text{NC}^\delta(\text{trans}) = 126^\circ$, $\text{C}'\text{NC}^\delta(\text{cis}) = \text{C}'\text{NC}^\alpha(\text{trans}) = 121^\circ$, and $\text{C}^\alpha\text{NC}'(\text{trans, cis}) = 113^\circ$. [J. Cryst. Soc. Japan, 22, 187 (1980)].

1. はじめに

オリゴペプチドの構造解析には2つの目的がある。第1はそれ自身生物活性をもつ化合物が多く、その機能と構造の関係を探ろうというものである。

第2はたんぱく質あるいはペプチド鎖の構造原理の確立という点である。そのためには多くのルールやパラメーターが必要であるが、Pauling と Corey の α らせん¹⁾や β 構造^{2,3)}はその最も重要なものの一つである。たんぱく質単結晶では個々の原子を分離して見ることができるほどの高分解能で解析できるものは、2~3の例外的に結晶性のよい、かつ分子量数千の小さいものに限られる。一般には条件がよいもので $2 \text{ \AA}$ 分解能が限度であり、多くはずっと低い分解能で満足しなければならない⁴⁾。 $2 \text{ \AA}$ 分解能では原子は分離しては見えないし、一次構造が分かっているなければ、60%くらいの側鎖が同定できるにすぎない。このような低分

解能の解析から信頼できるモデルをつくるために用いられる精密化方法が Diamond の実空間精密化⁹⁾と Levitt らのエネルギー精密化¹⁰⁾である。これらの方法は理想構造からの空間的あるいはエネルギー的安定性のずれを最小にしようとする束縛条件下での精密化方法であるが、この束縛条件(理想または標準構造)の設定には正確なパラメーターや信頼できる構造ルール(ペプチド鎖の形・寸法、二次構造ルール、側鎖の形・寸法、非結合原子間力の評価法など)が必要である。これらはまた理論的なモデル作成、反応過程や溶液中の構造研究、あるいは多くの繊維状たんぱく質の構造研究などにとっては、さらに重要不可欠な基礎データである。幸いオリゴペプチドを解析すると、いろいろな構造上の特徴がみられ、さらに所謂二次構造(β シート構造、 β ターンなど)をもつものが多く、第2の目的によく適応している。

このようにオリゴペプチドの精密構造解析は非常に重要な意義をもっているが、興味ある試料の入手が難しいことと、またそのほとんどが結晶化しにくいという大きな障害があって、従来は解析の数も少く、系統的な解析の例はほとんど見られなかった。われわれが前に行なった酵素コラゲナーゼ基質ペプチド Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro およびそのオリゴマーの研究が唯一の例であった。そこでこの2~3年上記の趣旨に沿った研究をより広く系統的にすすめてきた。合成から始めたものも多い。このようにして得られたオリゴペプチドの構造上の特徴をたんぱく質の構造と対比しながら解説する。環状オリゴペプチドも興味あるが、それを含めると構造・機能の上から複雑多岐に渉るので、ここでは割愛する。

既に述べたように、オリゴペプチドは一般に結晶化が難しい。これはアミノ酸の結晶性がよいのと対照的である。ペプチドはあまりエネルギー差のないいろいろな構造をとり得ることが一つの原因であろう。天然に存在するもの、あるいは生理活性をもつものなどは単なる合成ペプチドより結晶化しやすいようである。

なお結晶が得られても、一般に見かけの温度因子が大きく、CuK α で $2\theta=100\sim120^\circ$ くらいまでしか実質的な強度測定ができない。120 $^\circ$ としてCuK α の限界球の65%の測定ができるにすぎず、構造解析の成否と精度にとって非常に不利な条件ではある。

本論に入る前に、まず原子や内部回転角などのIUPAC-IUBの命名法⁷⁾を第1図に示す。以下すべてこの命名法を用いる。アミノ酸残基は3文字記号で表し、特記しないかぎりL-体とする。その他本論文でよく用いる修飾基の略号は脚註*に示す。

第1図 IUPAC-IUB 命名法⁷⁾

2. ペプチドの構造の基本

まず最初に Pauling と Corey がまとめたペプチド鎖の構造の基本原則⁸⁾を示す。(1) ペプチド鎖の基本的な結合距離と結合角(第2図)。(2) C'-N 結合は約40%の二重結合性をもち、

* Aoc t-アミルオキシカルボニル, Boc t-ブトキシカルボニル, Ac アセチル, Z ベンジルオキシカルボニル, -OBz ベンジルエステル, -OEt エチルエステル, -OMe メチルエステル, -NH₂ アミド, -NMe メチルアミド, -N(Me)₂ ジメチルアミド, -NPr イソプロピルアミド, -NEt エチルアミド

したがってペプチドグループ(第2図で点線で囲んだ6原子)は平面状である。(3) C'-N 結合に関して両端の2つの C α はトランス型である。(4) N-H と C'-O はできるだけ多くの水素結合をつくる。N...O は一般に 2.8Å くらい(実際には 2.9Å⁸⁾)であり, <NHO は 180 $\pm$ 30 $^\circ$ で, N-H...O は直線状に近い。

このうち2と3の原則があるために, N-C α と C α -C' の二つの単結合の内部回転角(ϕ, ψ) がたんぱく質の構造を多様なものにする。一本のペプチド鎖で全残基の(ϕ, ψ)

 第2図 ペプチド鎖の基本寸法⁸⁾

 第3図 Ramachandran プロット⁹⁾

実線は完全許容領域, 破線は準許容領域.

β ターン第2位(黒丸)と第3位(白丸)

第1表 ポリペプチドらせんの内部回転角

	ϕ	ψ	ω	文献
α_R らせん(右まき)*	-57 $^\circ$	-47 $^\circ$	180 $^\circ$	10
α_L らせん(左まき)	57	47	180	10
平行 β_P 構造	-119	113	180	11
逆平行 β 構造**	-139	135	-178	12
3_{10} らせん	-75	-4	180	13
ポリグリシン II	-80	150	180	14
ポリ-L-プロリン I	-83	158	0	15
ポリ-L-プロリン II	-78	149	180	16
コラーゲン	~-60	~160	180	17

* α -ポリ-L-アラニン ** β -ポリ-L-アラニン

が同じであれば、らせん構造になる。一方任意の内部回転角の組み合わせが可能なのではなく、Ramachandran ら⁹⁾ は非結合原子の接触距離から判定して、完全許容領域と、制限をやや緩和した準許容領域を定義した。第3図で実線で囲んだ領域が前者であり、破線で囲んだのが後者である。第1表と第3図に典型的な二次構造の内部回転角を示した。

3. オリゴペプチドと二次構造

初めに述べたように、ペプチド結合を2つ以上もつオリゴペプチドの多くが β シート、 β ターン、ポリ-L-プロリンII型などの構造パターンをもっている¹⁸⁾。これは所謂二次構造がポリマーで安定というだけではなく、オリゴマーでも安定な構造であることを示している。 α らせんだけは得られていないが、安定に存在し得るほどの α らせんならば、すくなくとも2まきは必要であり、解析されたものが短かすぎる故にまだ得られていないだけであろう。すくなくとも7~8量体より長いペプチドの解析が必要であろう。

4. β ターン

Type I : Boc-Pro-Leu-Gly (19)^{*,**}, Boc-Pro-Pro-Gly-NH₂ (20), Z-Gly-Pro-Leu-Gly (21), (p-Br) Z-Gly-Pro-Leu-Gly (22), Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro (23), (o-Br) Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro (24), (S-benzyl) Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ (25)。

第4図 立体図。上 : Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro²³⁾。下 : Boc-Pro-Leu-Gly¹⁹⁾

* 本論文ではゴシック数字は化合物と文献の両方を示す。

** 下線で示した部分がターンの第2・3位である。

Type II : Pro-Leu-Gly-NH₂ (26), N-isobutyl-Pro-Ala-NPr (27a), N-isobutyl-Pro-D-Ala-NPr (27b).

Type I' : Tyr-Gly-Gly-Phe (28), Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (29).

球状たんぱく質では必然的にペプチド鎖の折れ曲がりやUターンが多くなるが, そのなかで最も頻繁に見られるパターンが β ターン(β bend, 3_{10} bend, reverse turn, U folding などとも呼ばれる)である. 例えばキモトリプシン⁸⁰⁾やエラスターゼ⁸¹⁾では全体の約40%が β ターンに関係している. 最初は環状6量体ペプチドのシクロヘキサグリシル⁸²⁾やフェリクロムA⁸³⁾でみられたが, 当時はまだその重要性が認識されなかった. ついで線型ペプチド22と24の構造が解析されて, N-H...O=C 分子内水素結合で安定化したペプチド鎖の折り返ししの部分が重要な構造パターンであることが初めて認識された. その例を第4図に示す. Venkatachalam は理論的なモデルの検討を行なった⁸⁴⁾. 第5図のモデルで見られるように第2位と第3位を結ぶペプチド結合面はほぼ紙面に垂直になるが, C₂'=O₂ が下向きで, R₂とR₃がともに上向きの(図に示した)ものがType I, C₂'=O₂ も上向きのものをType II と呼ぶ. Type III はType I がそのまま続けて, 3_{10} らせんになったものである. Type I' はType I の鏡像で, 第2および3位がGly かDアミノ酸の場合にだけ可能である. Type II で第3位がLアミノ酸であればO₂とR₃の接触が短かすぎるので, 一般には第3位にはGly かDアミノ酸だけが収容される. ただし例外もあって, 27a は第3位にL-Alaがあるが, II型である. また実際のたんぱく質でも, 例えばエラスターゼ⁸¹⁾ではAsn がII型の第3位を占めているものがある. 一般に最も頻繁に見られるものはType I である.

第5図 β ターンモデル

さてオリゴペプチドではその後引き続いて一群の同族体ペプチド(21-25)で発見された. なかでも21-24はLeuの側鎖も含めて全く同じと言えるほどよく似た構造をもっている. 19と21-24の5つのペプチドで, 4 $\rightarrow$ 1水素結合でできた環状部分を重ね合せてみると, 最大のずれでも0.1Åくらいであることが分かった.

ペプチド19で β ターンをつくるためにはBoc-Proの結合でC'=OとProのN-C ^{δ} がトランス型であることが必要であるが, 解析された例ではすべてシス型であった. 解析の結果, 19では部分的にはややエネルギー的に不安定なトランス型を取り, β ターンをつくっていた. また20はポリ-L-プロリンII型らせんを期待していて, N端側は予想通りであったが, C端側ではアミド基が分子内水素結合供与体となりやはりType Iの β ターンをつくっていた. この2つの実験事実は β ターンが空間的にコンパクトな折り返ししで, さらに4 $\rightarrow$ 1水素結合で安定化された構造であって, オリゴペプチドでもとくに安定な構造パターンであることを示している.

第2表 β ターンの内部回転角*

化 合 物	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3	4 $\rightarrow$ 1 水素結合長
(Type 1)					
19	-65°	-21°	-111°	27°	2.95Å
20	-65	-23	-89	6	3.08
21—24	-63	-27	-108	11	3.03
25	-67	-23	-73	-10	3.05
環状5量体**	-62	-26	-98	8	2.90
環状6量体***	-69	-25	-102	12	3.05
環状10量体****	-76	-12	-92	2	3.13
α -キモトリプシン ³⁰⁾	-60	-25	-91	-18	
(Type 2)					
26, 27a, 27b	-59	132	73	—	3.01
α -キモトリプシン ³⁰⁾	-62	141	89	-10	
(Type 1')					
28	59	25	97	-7	
29	74	11	90	0	

* 平均値

** cyclochlorotin³⁵⁾, tuberactinomycin O³⁶⁾, tuberactinomycin N³⁷⁾*** cyclohexaglycyl³²⁾, ferrichrome A³³⁾, cyclo(Gly₄-(D-Ala)₂)³⁸⁾**** Li-antamanide³⁹⁾, Na-antamanide⁴⁰⁾

5~10 量体の環状ペプチドでも β ターンはよく見られるが、このような短い線型ペプチドでとくに頻繁に見られることは、 β ターンのようなコンパクトな安定な構造をとりやすいものがよい結晶を与えやすく、それを解析しているのであるから当然の結果であるという見方もある。それにしても β ターンがオリゴペプチドでとくに有利な構造パターンであることを示している実験結果である。

β ターンの第2および3位の主鎖の内部回転角などを第2表に示した。そのうち Type I の (ϕ, ψ) をプロットしたのが第3図である。環状オリゴマーも含めてある。この内部回転角の図示法を Ramachandran プロットという。内部回転角はほぼ $\psi = (-\phi - 90)$ で表わされる勾配 -1 の直線に沿って広く分布している。とくに第3位のその広がりが大きい。このとき (ϕ_2, ψ_2) と (ϕ_3, ψ_3) は独立ではなく、4 $\rightarrow$ 1 分子内水素結合をこわさないように、相互のずれを相殺するように連動している²⁰⁾。内部回転角のばらつきは側鎖の種類と順序および結晶場の影響を受けるが、一見剛体のようにみえる β ターンにもかなりの柔軟性があることが分かる。実際のとたんばく質で例えば Chou ら⁴¹⁾ は C₁ α ...C₄ α 距離が 7Å 以下のものを β ターンの可能性ありとしたが、この距離は線型ペプチドではもっと狭い範囲 4.98~5.71Å に納まっている。

つぎに β ターンで注意すべき構造上の特徴を挙げよう。Type I で第2位の結合角 $\angle \text{NC}\alpha\text{C}'$ の平均値は Pro では 115.1°, 一般のアミノ酸では 113.6° となる。他の構造ではこの角度は Pro で 110.5°⁴²⁾、一般のアミノ酸で 111°⁴⁸⁾ であるから、かなり大きい変形である。モデル作成に際して十分注意する必要がある。Type II ではこの現象は見られない。また水素結合距離は表に示したように、平均 3.03Å で、明らかに一般の主鎖間の水素結合 (平均 2.90Å) より長いことが分かる。この折れ曲がりの部分は原子が密に充填しているが、過度の原子間接触を避けたものであろう。環状5量体は環が小さく、伸ばす余裕がないもののようである。なお水素結合の方向性を見ると、N-H は O の sp^2 の電子対を向いているのではなく、むしろ $p_z(\pi)$ 電子を指向していることは注意すべきことである。

さて一連の X-Pro-Leu-Gly が好んで Type I の構造をとることが分った。Pro はそのピロリジン環のために、ターンの第2位を占めるのに最も適している。ところが第3図の Ramachandran プロットでみると、第3位の内部回転角は完全許容領域からかなりずれた領域に分布し、ポテンシャルエネルギーが高く、必ずしも有利なコンホメーションであるとはいえない。そこで側鎖の種類によっては第3位を占めることが難しいものがあるはずである。Pro も勿論無理であるが、 β 炭素に枝分かれのある Val と Ile もこの位置を占めることが難しいと期待される。そこでわれわれは X-Pro-Y-Gly で、Yに種々の側鎖を含むペプチドを合成して構造を解析した。確かに Pro 以外にも、Y=Val, Ile, Ala をもつものは β ターンとはならなかった。この3つはほぼ同形の β シート構造となった。即ち「 γ 炭素が2つある側鎖は第3位を占めることが難しい」ことが明らかになったのである。Ala が β ターンにならなかったのは別に例外ではなく、枝分かれのないものが β ターンとなる必然性はないわけである。Thr についてはまだ実験していないが、たんぱく質の例ではよく第3位に見られる。これは O γ の van der Waals 半径が小さく、Val などの CH₃ と同列に論じるのが不適当であることを示している。

5. 平行 β シート構造

Gly-Phe-Gly (43), Br-Ac-Phe-Phe-OEt (44a), Cl-Ac-Phe-Phe-OEt (44b), Boc-(S-benzyl) Cys-Gly-OMe (45), Boc-Met-Gly-OBz (46), Ac-Phe-NMe (47a), Ac-Val-NMe (47b), Ac-D, L-Met-NMe (47c), Ac-D, L-Phe-NMe (48).

(ねじれ型) Benzoyl-D, L-Leu-Gly-OEt (49), Ac-D, L-Ala-NMe (50), Ac-Leu-NPr (51).

平行 β シート構造をもつペプチドの構造パラメーターを第3表にあげる。シート内の分子が理想的(結晶学的)に平行なもの(43~48)と、大きく振れたもの(49~51)の二つのグループに分けられる。平行 β シート構造をもつ1本のペプチドのモデルを第6図に、また46のシート内の配列を第7図に示す。

理想的に平行なものには大きな特徴がある。いずれも一つの結晶軸が $5.0 \pm 0.1 \text{ \AA}$ と短く、これがシート内の周期で水素結合している隣接分子間の距離である(逆は成立しない)。分子

第3表 平行 β シート構造

	ϕ	ψ	水素結合長	繊維周期	ペプチド面 間 二面角	シート内分 子間距離
β_p^{83}	-119°	113°	2.87 Å	6.50 Å	118°	4.85 Å
43	-126	132	3.00, 2.89	6.74	126	4.90
44a	-102	106	2.74, 2.96	6.06	106	4.95
44b	-100	110	2.78, 2.90	6.09	106	4.93
45	-124	103	2.92, 3.02	(6.28)	116	5.02
46	-111	108	2.96, 2.90	(6.30)	112	5.08
47a	-107	104	2.96, 2.81	6.19	110	4.97
48	-106	108	2.95, 2.80	6.20	111	4.98
(ねじれ型)						
49A	-65	143	2.87, 2.86			
B	-94	151	2.94, 2.97			
50a A	-76	150	2.94			
B	-81	152	2.80			
51	-90	158	2.75, 3.10

第6図 β シート型の一本のペプチド鎖（ひだつき構造） 第7図 Boc-Met-Gly-OBz⁴⁶⁾ の平行 β シート

はこの短い軸に垂直で、即ちいわゆる繊維軸はこの軸に垂直である。なかでも43~46の5つの結晶は細い針状晶で、針状軸はその短い軸に対応する。即ち水素結合を結んでシートをつくるのがそのまま結晶化になるわけである。これは平行 β シート構造が小さなペプチド分子の集合様式としても優秀なものであることを示すものである。

第8図のRamachandranプロットで、回転角は2つのグループに分かれている。左下の β_P の周辺の9つの黒丸がこのグループの回転角であり、ほぼ $\phi = -\phi$ の直線周辺に分布している。PaulingとCorey³⁾のモデルと比較すると、43はより伸びた形であるが、その他は折れ曲がり深く、やや収縮した形であることが分かる。一方シート内の分子間距離は平均4.97Åで、モデルの4.85Åより長い。これは分子の折れ曲がり大きいことと、水素結合がモデルより長いことに対応している。とくに45と46が大きい。これはBoc基をもつためか、側鎖にSを含んでいるためかは明らかではない。水素結合長は次の逆平行型も含めて平均2.90Åで、MarshとDonohueの値⁹⁾と一致する*。

大きく振れたグループは第8図のプロットではむしろコラーゲン類ペプチドに近い内部回

* $-\text{NH}_3^+ \cdots \text{O}$ は一般に2.80~2.85Åであり、 $>\text{NH} \cdots \text{O}$ との間には明らかに差がある。

転角をもっている。即ち主鎖の構造はむしろポリ-L-プロリンⅡ型に近いのであるが、 β 構造状の一对の水素結合でねじれたシートをつくっている。このグループではシート内の隣接分子はほぼ直交するほど振れが大きい。これはたんぱく質とは異なった特徴である。

球状たんぱく質にみられる β 構造は平行、逆平行を問わず、理想化されたモデルからはかなりずれていて、理想的な構造が再現されている部分は少ない。オリゴペプチドでは理想的に平行なものと、ほぼ直交する両極端の構造が見られるが、実際のたんぱく質ではその中間のものが多く、シート内で隣接したペプチド鎖がすこしづつ左に振れている。振れは小さく、カルボキシペプチダーゼでは8本のペプチド鎖のシートで 120° 振れているだけで、隣り合ったものでは平均 17° ということである⁵²⁾。第8図では一見して β 構造とコラーゲン類の2群に分かれているようであるが、実際のたんぱく質では内部回転角は $\phi < 0$, $\phi > 0$ の完全許容領域の中ではほぼ均一に分布しており、必ずしも典型的な二次構造の周辺にのみ集中しているわけではないのはこの故である。

第8・ β 構造とポリ(L-プロリン)らせん型のペプチドの内部回転角

6. 逆平行 β シート構造

(Ala)₃ (53), Boc-Pro-Ile-Gly (54), Boc-Pro-Val-Gly (55), Aoc-Pro-Ala-Gly (56).
 (ねじれ型) Z-Gly-Pro (57), Ac-Ala-NMe (50b), Ac-D, L-Leu-NMe (58).

逆平行 β シート構造型のペプチドを第4表に示す。このうち上の4つが理想的モデルに近い主鎖構造と水素結合系をもっている。このうち53は第9図に示すように、結晶学的に非等価な2種の分子A, Bが集まり、理想的モデルに近いシート構造をつくっている。このようなシート構造をもつものはまだこの一例だけである。アラニン側鎖が小さく、またそのポ

第4表 逆平行 β シート構造

	ϕ	ψ	水素結合長	繊維周期	ペプチド面 間二面角
β -ポリ-L-アラニン ¹²⁾	-139°	135°	2.77 Å	6.95 Å	~140°
53 A	-146	146	{2.92, 2.92	6.99	139
B	-147	172	{2.99, 3.07	7.20	150
54	-133	118	2.83	6.42	115
55 A	-135	123	{2.92	6.52	121
B	-138	142	{2.95	6.92	139
56 A	-133	132	{2.85	6.87	133
B	-138	135	{2.85	6.94	137
(ねじれ型)					
57	-108	176	2.91		
50b A	-84	159	{2.80, 2.73		
B	-88	155	{2.92, 2.72		
58	-94	140	2.86, 2.89

第9図 (Ala)₈の β シート (Fawcett, Camerman and Camerman, Acta Cryst. **B31**, 658 (1975))

第10図 上 : Boc-Pro-Ile-Gly
下 : Boc-Pro-Val-Gly

リマーは α らせんと β 構造のいずれをもとり得るので、そのオリゴマーは二次構造研究のためのモデル化合物として考えられるが、結晶性が悪く、あとは2量体^{59,60}が解析されているだけである。

54~56の3つの化合物は、解析終了後に分かったことであるが、結晶水の数も、厳密な対称も違うが、ほぼ isostructural ともいえるほどお互いよく似た構造をもっており、水素結合網やパッキング様式も酷似している。結晶中ではいずれも2回軸あるいは擬似2回軸を中心にして2分子が集まり、一对の逆平行 β 型水素結合で2量体ができている(第10図)。また Aoc-Pro-Val-Gly⁵⁵ は解析はしなかったが、格子定数などから 55 と isostructural と考えられる。このグループの結晶化に際しては、先の平行 β 構造と異なり、まず2量体ができ、それが集合して結晶化するということができる。一方 53 は針状軸が 5.33 Å と短く、シートはこの軸にほぼ垂直である。即ちシートの積み重なりが結晶化そのものであるということが出来る。

以上4つのペプチドの捩れ角(第8図)は Pauling と Corey のモデルを中心にしてはいるが、やはり $\phi = -\phi$ の直線に沿ってやや広い範囲に分布している。繊維周期やペプチド面間の二面角などを見てもやはりばらつきが大きい。例が少いので明確ではないが、側鎖が大きいもの、とくに C β に枝分かれのある側鎖をもつものが、C α における折れ曲がりが多いという傾向を示している。これは側鎖と主鎖の間の立体障害によるものである。一方平行 β 構造では元来逆平行より折れ曲がりが多いのでそのような必要はないわけである。

平行型の場合と同様に、ここでもシート内の分子が大きく捩れたもの 50b, 57, 58 がある。また主鎖の構造が理想的なモデルから大きくずれているが、54 などとよく似た2量体構造を示すものがある。それには 57 以外に、Z-Gly-D, L-Pro⁶¹), Pivalyl-Gly-NPr⁶²), (Et)₂Ac-Gly-NPr²⁷), Ac-D, L-Val-N(Me)₂⁶³), Ac-D, L-Leu-NEt⁶⁴) などがある。

第4図の 23 で β ターンで折り返した逆平行の2本のペプチド鎖が1対の分子内水素結合で結ばれているが、相対した2つの Gly の C α が一つは水素結合面の上に、片方は下にあって、厳密な意味のシートにはなっていない。2本のペプチド鎖だけの場合にはこの構造も安定であろうが、シートの積み重ねなどを考えると、能率的なパッキングが難しく、特殊な場合を除くと有利な形とは言えないであろう。24 と 29 にも同じ形がみられる。

7. コラーゲン類ペプチド

ポリ-L-プロリン I 型: Z-Gly-Pro-Leu (65), Boc-Pro-Sar-OBz (66).

ポリ-L-プロリン II 型: Boc-(Pro)₄-OBz (67), Aoc-(Pro)₃ (68), Boc-Sar-Gly-OBz (69), Pivalyl-Pro-Gly-NMe₂ (70), Boc-Pro-Leu-OEt (71).

第5表 コラーゲン類ペプチド

		(ϕ , ψ)
(ポリ-L-プロリン I 型)		
65	Gly, Pro	(-79, 174) (-72, 145)
66	Pro	(-71, 170)
(ポリ-L-プロリン II 型)		
67	Pro 1, Pro 2, Pro 3	(-68, 152) (-70, 165) (-61, 152)
68	Pro 1, Pro 2	(-59, 155) (-66, 139)
69	Sar, Gly	(-72, 154) (-81, 174)
70	Pro, Gly	(-71, 157) (-76, 175)
71	Pro, Leu	(-63, 171) (-56, 148)

コラーゲン類ペプチドにはポリグリシンⅡ(PGⅡ)型とポリ-L-プロリンⅠ(PPⅠ)およびⅡ(PPⅡ)型がある。いずれも 3_2 の左巻らせんである。PPⅠではペプチド結合はシス型であり、PPⅡよりやや不安定である。

上に挙げた主なものの内部回転角を第5表に示す。65ではGly-Pro、66ではPro-Sar結合がシス型である。

溶液中のプロリンオリゴマーのNMRなどによる研究では5量体以上はすべてPPⅡ型構造であり、一方2~4量体ではシス型ペプチド結合の可能性も指摘されていた*。しかしながら構造解析してみると3量体⁶⁸⁾も4量体⁶⁷⁾もPPⅡ構造であることが分かった(第11図)。即ちより安定なPPⅡらせんのみが集って結晶化したものである。

第11図 Aoc-(Pro)₃のポリ(L-プロリン)型らせん⁶⁸⁾

同じらせんでも α らせんは繊維軸方向の分子内N-H...O=C水素結合が重要な役割を果たしているが、コラーゲン類ペプチドでは、水素結合はあっても繊維軸と垂直な分子間のものであり、独立ならせんの安定性には大きな寄与はしていない。PPⅠ、PPⅡなどでは対称よく配列した大きな疎水性のピロリジン環が安定性の主因である。これがプロリンオリゴマーで1まきくらいの短いらせんでも安定な形であり得ること、一方 α らせんの短いものは存在しないことを説明している。

初めに挙げたもののほかにも、部分的なPPⅡあるいはPGⅡ型構造をもつものが多いが、前に述べたように β 構造と厳密な区別ができないものもある。第8図にはその内部回転角もプロットしてある。ばらつきが大きい、その分布の重心は明らかにPPⅡより有意に右上方向にずれている。またねじれ型の β 構造からもずれている。この一群の化合物(PPⅡ型)は: Tosyl-Pro-Hypro⁷²⁾, Leu-Pro-Gly⁷³⁾, Boc-(Pro)₂-Gly-NH₂²⁰⁾, Boc-Pro-Sar⁷⁴⁾, Boc-Ala-Gly⁷⁵⁾, Cl-Ac-Gly-Gly⁷⁶⁾, Ac-Gly-NMe⁷⁷⁾, Ac-Gly-NPr⁷⁸⁾, Boc-Pro-Leu-OBz⁷¹⁾, Boc-Gly-Pro⁷⁹⁾, Boc-Gly-Pro-OBz⁷⁹⁾。

8. ペプチド結合

8.1 シス型ペプチド結合

一般のペプチド結合はトランス型である。これはシス型では C_i^α , R_i と C_{i+1}^α , R_{i+1} の間

* 論文⁶⁸⁾に挙げた文献参照のこと。

の立体障害が大きく、トランスでは約 8 kcal/mol も安定化するためである⁸⁰⁾。実際に結晶状態では例外的な環状 2 量体を除くと、一般のアミノ酸のペプチド結合ではシス型は認められていない。しかしながら Pro や, Sar も含めた N メチルアミノ酸がつくる N 置換ペプチド結合では両型のエネルギー差は小さく、シス型の存在も期待される。構造の (ポテンシャル) エネルギーを計算すると、Pro ではまだトランス型がやや安定であるが、その差は 1~2 kcal/mol にすぎない⁸⁰⁾。Sar (N メチルグリシン) では差はさらに小さく、ほとんど 0 に等しいようである⁸¹⁾。したがって立体配置は非結合原子間力や水素結合が決定することになる。溶液中でのシス型プロリンの存在確率は約 5 % と見積もられている⁸⁰⁾。結晶中ではこの確率はもっと小さい。

第12図 シス型ペプチド結合, Z-Gly-Pro-Leu⁶⁵⁾

球状たんぱく質でシス型ペプチド結合がみられるのはリボヌクレアーゼ⁸²⁾、炭酸脱水酵素⁸³⁾、BJ-REI⁸⁴⁾ など多くはないが、立体構造形成で特に重要な役割を演じているので、その信頼できる構造パラメーターを得ることが重要な課題となる。環状のオリゴペプチドでは環形成という立体的要請からシス型ペプチド結合がよく見られる (アンタマニド^{39,40)}、イラマイシン⁸⁵⁾、アクチノマイシン⁸⁶⁾ など生物活性をもつものが多い)。われわれは線型ペプチドの Z-Gly-Pro-Leu (第12図) で Gly-Pro 結合がシス型であることを見出した⁶⁵⁾。これは現在でも大きな立体的束縛が考えられない線型ペプチドでシス型ペプチド結合が見られる唯一の例である。そこでさらにシス型の確率が高い Sar を含むペプチドを合成・解析し、うち Boc-Pro-Sar-OBz で期待に違わずシス結合を見出した⁶⁶⁾。一方同族の Boc-Pro-Sar ではトランスであった⁷⁴⁾。即ち Sar ではシス・トランスのエネルギー差が非常に小さいことを実験的に示したことになる。

第13図 トランス型とシス型プロリンの結合角

シス型とトランス型ではNの結合角が変化する(結合距離は変らない). X-Pro の結合で C^α と C^δ の大きさがほぼ等しいから, トランス型の C^α と C^δ を入れ替えればそのままシス型の構造になる¹⁸⁾. 即ち $\angle C'NC^\alpha$ (トランス) = $\angle C'NC^\delta$ (シス) = 121° , $\angle C'NC^\delta$ (トランス) = $\angle C'NC^\alpha$ (シス) = 126° , $\angle C^\alpha NC^\delta$ = 113° となる(第13図).

Sar の場合も Pro の場合と同様の傾向を示している⁶⁶⁾. ほかに線型ペプチドでは Ala-(O, N-dimethyl)-Tyr-Ala-OMe のN置換ペプチドがシス型である⁶⁷⁾. その結合角は環状オリゴマーにみられるNメチルペプチド結合も含めて Sar のそれとよく似ている. また Boc-Cys-Cys-OMe では Cys-Cys ペプチド結合がシス型であるが⁶⁸⁾, これは S-S 橋による小さな8員環形成から要請されたものであろう.

8.2 ペプチド結合の平面性

ペプチド結合は実際にはかなり平面からずれている場合がある. $C'-N$ の回転角 ω が大きくずれている例では, トランス型で 180° からのずれが, Boc-Pro-Leu-OBz 23° ⁷¹⁾, Ac-Phe-Tyr 18° ⁸⁹⁾, Boc-Pro-Val-Gly 14° ⁵⁵⁾, 一方シス型では 0° からのずれが, Boc-Pro-Sar-OBz 7° ⁶⁶⁾ などがある. 平面からのずれの大小は側鎖の種類とは必ずしも強い相関はないようである. 環状オリゴマーでは環形成という束縛のためにトランス型, シス型ともに $15^\circ \sim 20^\circ$ のずれが珍しくはなく, Sar の環状オリゴペプチドでは平均して 7° ものずれを示している¹⁸⁾.

なおNに置換基のある Pro や Sar では, Nを中心にした3本の結合の平面性の悪いことが多い. これは sp^3 混成軌道の寄与も無視できないことを示している.

この研究は阪大蛋白研在籍中から始めたものである. 角戸正夫教授の御支援に深く感謝します. 多くの試料を提供して頂いた蛋白質研究奨励会榊原俊平博士, 阪大蛋白研下西康嗣博士に感謝します. 最後に名大工学部のわれわれの研究室の職員, 卒業生, 学生諸君の御協力に感謝します.

文 献

- 1) L. Pauling, R. B. Corey and H. R. Branson : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **37**, 205 (1951).
- 2) L. Pauling and R. B. Corey : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **37**, 729 (1951).
- 3) L. Pauling and R. B. Corey : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **39**, 253 (1953).
- 4) 芦田玉一, 田中信夫 : 新実験化学講座 6, 基礎技術 5, 構造解析. p.257, 丸善 (1977).
- 5) R. Diamond : Acta Cryst. **A27**, 435 (1971).
- 6) M. Levitt and S. Lifson : J. Mol. Biol. **46**, 269 (1969).
- 7) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature : J. Mol. Biol. **52**, 1 (1970).
- 8) R. E. Marsh and J. Donohue : Adv. Protein Chem. **22**, 235 (1967).
- 9) G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan and V. Sasisekharan : J. Mol. Biol. **7**, 95 (1963).
- 10) S. Arnott and S. D. Dover : J. Mol. Biol. **30**, 209 (1967).
- 11) J. A. Schellman and C. Schellman : *The Proteins* ed. H. Neurath, vol.2. p1. Academic Press (1964).
- 12) S. Arnott, S. D. Dover and A. Elliot : J. Mol. Biol. **30**, 201 (1967).
- 13) J. Donohue : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **39**, 470 (1953).
- 14) G. N. Ramachandran, V. Sasisekharan and C. Ramakrishnan : Biochem. Biophys. Acta **112**, 168 (1966).

- 15) G. N. Ramachandran and V. Sasisekharan : *Adv. Protein Chem.* **23**, 283 (1968).
- 16) S. Arnott and S. D. Dover : *Acta Cryst.* **B24**, 599 (1968).
- 17) A. Yonath and W. Traub : *J. Mol. Biol.* **43**, 461 (1969).
- 18) T. Ashida, I. Tanaka, T. Yamane and M. Kakudo : *Int. Symp. on Biomolecular Structure, Conformation, Function and Evolution, Madras* (1978).
- 19) T. Ashida, I. Tanaka, Y. Shimonishi and M. Kakudo : *Acta Cryst.* **B33**, 3054 (1977).
- 20) I. Tanaka, T. Ashida, Y. Shimonishi and M. Kakudo : *Acta Cryst.* **B35**, 110 (1979).
- 21) Y. Matsuura : private communication.
- 22) T. Ueki, T. Ashida, M. Kakudo, Y. Sasada and Y. Katsube : *Acta Cryst.* **B25**, 1840 (1969).
- 23) S. Bando, N. Tanaka, T. Ashida and M. Kakudo : *Acta Cryst.* **B34**, 3447 (1978).
- 24) T. Ueki, S. Bando, T. Ashida and M. Kakudo : *Acta Cryst.* **B27**, 2219 (1971).
- 25) A. D. Rudko and B. W. Low : *Acta Cryst.* **B31**, 713 (1975).
- 26) L. L. Reed and P. L. Johnson : *J. Amer. Chem. Soc.* **95**, 7523 (1973).
- 27) A. Aubry : Ph. D. Thesis, Univ. of Nancy (1976).
- 28) M-C. Fournie Zaluski, T. Prange, C. Pascard and B. P. Roques : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 1199 (1977).
- 29) G. D. Smith and J. F. Griffin : *Science* **199**, 1214 (1978).
- 30) J. J. Birktoft and D. M. Blow : *J. Mol. Biol.* **68**, 187 (1972).
- 31) L. Sawyer, D. M. Shotton, J. W. Campbell, P. L. Mendell, H. Muirhead, H. C. Watson, R. Diamond and R. C. Ladner : *J. Mol. Biol.* **118**, 137 (1978).
- 32) I. L. Karle and J. Karle : *Acta Cryst.* **16**, 969 (1963).
- 33) A. Zalkin, J. D. Forrester and D. H. Templeton : *J. Amer. Chem. Soc.* **88**, 1810 (1966).
- 34) C. M. Venkatachalam : *Biopolymers* **6**, 1425 (1968).
- 35) H. Yoshioka, K. Nakatsu, M. Sato and T. Tatsuno : *Chem. Lett.* 1319 (1973).
- 36) H. Yoshioka, T. Aoki, H. Goko, K. Nakatsu, T. Noda, H. Sakakibara, T. Take, A. Nagata, J. Abe, T. Wakamiya, T. Shiba and T. Kaneko : *Tetrahedron Lett.* 2043 (1971).
- 37) H. Yoshioka and K. Nakatsu : private communication.
- 38) I. L. Karle, J. W. Gibson and J. Karle : *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 3755 (1970).
- 39) I. L. Karle : *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 4000 (1970).
- 40) I. L. Karle : *Biochem.* **13**, 2155 (1974).
- 41) P. Y. Chou and G. D. Fasman : *J. Mol. Biol.* **115**, 135 (1977).
- 42) T. Ashida and M. Kakudo : *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **47**, 1129 (1974).
- 43) R. E. Marsh and J. P. Glusker : *Acta Cryst.* **14**, 1110 (1961).
- 44) C. H. Wei, D. G. Doherty and J. R. Einstein : *Acta Cryst.* **B28**, 907 (1972).
- 45) S. Kashino, T. Ashida and M. Kakudo : *Acta Cryst.* **B30**, 2074 (1974).
- 46) T. Yamane, T. Umemura and T. Ashida : to be published.
- 47) Y. Harada and Y. Iitaka : *Acta Cryst.* **B33**, 247 (1977).
- 48) Y. Harada and Y. Iitaka : *Acta Cryst.* **B30**, 726 (1974).
- 49) P. A. Timmins : *Acta Cryst.* **B31**, 2240 (1975).
- 50) Y. Harada and Y. Iitaka : *Acta Cryst.* **B30**, 1452 (1974).
- 51) A. Aubry, M. Marraud, M. T. Cung and J. Protas : *C. R. Acad. Sci. Paris* **C281**, 861 (1975).
- 52) W. N. Lipscomb, J. A. Hartsuck, G. N. Reeke, F. A. Quiocho, P. H. Bethge, M. L. Ludwig, T. A. Steitz, H. Muirhead and J. C. Coppola : *Brookhaven Symp. Biol.* **21**, 24 (1968).

- 53) J. K. Fawcett, N. Camerman and A. Camerman : Acta Cryst. **B31**, 658 (1975).
- 54) Y. Yamada, I. Tanaka and T. Ashida : Acta Cryst. to be published.
- 55) I. Tanaka and T. Ashida : to be published.
- 56) Y. Yamada, I. Tanaka and T. Ashida : to be published.
- 57) I. Tanaka, T. Kojima, T. Ashida, N. Tanaka and M. Kakudo : Acta Cryst. **B33**, 116 (1977).
- 58) T. Ichikawa and Y. Iitaka : Acta Cryst. **B25**, 1824 (1969).
- 59) R. J. Fletterick, C.-C. Tsai and R. E. Hughes : J. Phys. Chem. **75**, 918 (1971).
- 60) Y. Tokuma, T. Ashida and M. Kakudo : Acta Cryst. **B25**, 1367 (1969).
- 61) T. Kojima, T. Yamame and T. Ashida : Acta Cryst. **B34**, 2896 (1978).
- 62) A. Aubry, M. Marraud, J. Protas and J. Neel : C. R. Acad. Sci. Paris, **C276**, 1089 (1973).
- 63) A. Aubry, M. Marraud, J. Protas and J. Neel : C. R. Acad. Sci. Paris, **C278**, 853 (1974).
- 64) A. Aubry, M. Marraud, J. Protas and J. Neel : C. R. Acad. Sci. Paris, **C278**, 697 (1974).
- 65) T. Yamane, T. Ashida, Y. Shimonishi, M. Kakudo and Y. Sasada : Acta Cryst. **B32**, 2071 (1976).
- 66) T. Kojima, T. Kido, H. Itoh, T. Yamane and T. Ashida : Acta Cryst. to be published.
- 67) T. Matsuzaki : Acta Cryst. **B30**, 1029 (1974).
- 68) G. Kartha, T. Ashida and M. Kakudo : Acta Cryst. **B30**, 1861 (1974).
- 69) H. Itoh, T. Yamane, T. Ashida, T. Sugihara, Y. Imanishi and T. Higashimura : Acta Cryst. **B32**, 3355 (1976).
- 70) A. Aubry, M. Marraud and J. Protas : C. R. Acad. Sci. Paris **C280**, 509 (1975).
- 71) H. Sugino, T. Tanaka and T. Ashida : Bull. Chem. Soc. Jpn. **51**, 2855 (1978).
- 72) M. N. Sabesan and K. Venkatesan : Acta Cryst. **B27**, 1879 (1971).
- 73) Y. C. Leung and R. E. Marsh : Acta Cryst. **11**, 17 (1958).
- 74) H. Itoh, T. Yamane and T. Ashida : Acta Cryst. **B34**, 2640 (1978).
- 75) I. Tanaka, T. Yamagami and T. Ashida : to be published.
- 76) S. T. Rao and M. Mallikarjunan : Cryst. Struct. Comm. **2**, 257 (1973).
- 77) F. Iwasaki : Acta Cryst. **B30**, 2503 (1974).
- 78) A. Aubry, M. Marraud, J. Protas and J. Neel : C. R. Acad. Sci. Paris **C278**, 163 (1974).
- 79) R. E. Marsh, M. R. Murthy and K. Venkatesan : J. Amer. Chem. Soc. **99**, 1251 (1977).
- 80) S. S. Zimmerman and H. A. Scheraga : Macromolecules **9**, 408 (1976).
- 81) A. W. Burgess, Y. Paterson and S. L. Leach : in *Peptides, Polypeptides and Proteins* eds. E. R. Blout, F. A. Bovey, M. Goodman and N. Lotan. p.79. Wiley (1974).
- 82) H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson and F. M. Richards : J. Biol. Chem. **242**, 3984 (1967).
- 83) K. K. Kannan, B. Notstrand, K. Fridborg, S. Lövgren, A. Ohlsson and M. Petef : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **72**, 51 (1975).
- 84) R. Huber and W. Steigeman : Febs Lett. **48**, 235 (1974).
- 85) Y. Iitaka, H. Nakamura, K. Takada and T. Takita : Acta Cryst. **B30**, 2817 (1974).
- 86) S. C. Jain and H. M. Sobell : J. Mol. Biol. **68**, 1 (1972).
- 87) R. B. Bates, V. J. Hruby and G. R. Kriek : Acta Cryst. **B35**, 188 (1979).
- 88) Y. Hata, Y. Matsuura, N. Tanaka, T. Ashida and M. Kakudo : Acta Cryst. **B33**, 3561 (1977).
- 89) R. E. Stenkamp and L. H. Jensen : Acta Cryst. **B29**, 2872 (1972).