ポリペプチド二次構造の光制御

上野 昭彦

東北大学薬学部 〒980 仙台市荒巻字青葉
昭和58年12月10日 第37回膜研究会 東京大学薬学部にて講演

Photocontrol of Polypeptide Conformation

Akihiko Ueno

Pharmaceutical Institute, Tohoku University, Aobayama, Sendai 980

Photocontrol of polypeptide conformation was attempted by using polyaspartates containing azobenzene moieties in their side chains. It was found by circular dichroism (CD) measurements that trans-cis photoisomerization causes conformational changes such as left-handed α -helix $\rightarrow$ right-handed α -helix and left-handed α -helix $\rightarrow$ random coil. The photoresponsive behavior was remarkably solvent dependent, marked conformational changes being induced in the mixed solvents of adequate solvent compositions. The polyaspartates showed no photoinduced conformational change in the solid films although heating caused conformational transitions.

Key words: Photoisomerization, Circular dichroism, Conformation, Polypeptide, Photocontrol, Solvent effect

はじめに

只今ご紹介いただきました上野でございます。本日お話しする内容は「ポリペプチド二次構造の光制御」であり、目下の時点では膜とあまり関係ないのですが、光応答性膜を目指すための話題提供にはなるかと考えております。これまでのポリペプチドの化学は、主として、酵素機能の理解を深めるためのポリペプチド合成やコンホメーション解析であり、自然界に密着した内容となっております。私どもの研究は、そうした自然界の枠組を離れて、ポリペプチドについて自由に発想することから出発しております。酵素化学においては、酵素は所与のものでありますが、私どもの場合、分子デザイン、合成、on-off 的二次構造変動の実現というストーリーを展開することになります。

1. 分子機能の光制御

現時点で、私達は「分子機能の光制御」という観点か

ら研究を進めております¹⁾。そこで、まず、光制御系あるいは光信号受容系と見なされる天然および合成の主なものを Table 1 に示しました。これらの系は、一般に、光感応基と機能性基の両者から構成されており、光感応基は光の信号を受けるとなんらかの変化を起こし機能性部分に影響を及ぼします。光感応基の変化は、ホトクロミズムと称されるもので次のように示されます。

状態 I, II は、視物質ロドプシンを例にとると、レチナール残基のシス、トランスに相当します。この場合、ロドプシンは、レチナールのシス $\rightarrow$ トランス異性化に伴ってタンパク質部分であるオプシンの構造変化を起こすといわれています。天然と人工の中間のものとして、アミラーゼのような酵素の活性サイト近傍を光感応基で修飾して酵素活性を制御する試みもあります。人工光応答系としては、アゾベンゼン残基を光感応基としたものが多く、その場合、I, II はそれぞれアゾベンゼンのトラ

Table 1 Natural and artificial photocontrol systems

System	Photosensitive group	Functional part
Rhodopsin	retinal	opsin
Phytochrome	tetrapyrrole	protein
Photosensitive modified proteins	spiropyran	protein (amylase etc.)
Artificial photocontrol systems	azobenzene	polypeptide, cyclodextrin, crown ether, membrane

ンス、シス状態に対応することになります。光照射によって生成するアゾベンゼンのシス体は、熱的かあるいは長波長光照射により容易に元のトランス体に戻り、系は可逆系を構成します。機能性部位としては、シクロデキストリン、クラウンエーテル、膜等があり、本研究の場合は、不適切な表現ではありますがポリペプチドとしておきます。将来、ポリペプチド鎖が二次構造変動に影響されるなんらかの機能を示すようにデザインされた時、機能性部位の名にふさわしいものとなるでしょう。

2. 光応答性ポリペプチドのデザイン

光で二次構造が変動するポリペプチド系を創るには、合成デザインを適確に行なわねばなりません。側鎖にアゾベンゼン残基を有する次のポリペプチドについては、Goodman らが既に構造研究していますが、側鎖のトランス-シス光異性化による二次構造変動は認められてい

ません²⁾。私は、らせんの巻く向きが側鎖の種類や溶媒により変動するポリアスパラギン酸エステルに着目しました³⁾。報告によると⁴⁾、クロル置換したポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)の場合、次に示すように、オルトおよびメタクロル体では左巻α-らせん、パラクロル体では右巻α-らせんになります。このようにらせんの

巻く向きが側鎖構造のわずかな違いで反転するならば、側鎖が光によって構造変化する系を創れば、光によるらせん反転も夢では無いと考えました。そこで、アゾベンゼン残基を側鎖に有する3種類のアミノ酸、*p*-フェニルアゾベンジル-L-アスパルテート(*p*), *m*-フェニルアゾベンジル-L-アスパルテート(*m*), *p*-フェニルアゾフェネチル-L-アスパルテート(*e*)とベンジル-L-アスパルテート(*A*), ベンジル-L-グルタメート(*G*)との共重合体を合成し、得られた共重合体をモノマーの組合せにより, *pA*, *mA*, *pG*, *mG*, *eA* と名づけました。

3. 光による二次構造変動の実現

初期の研究は、溶媒として、1,2-ジクロルエタン(DCE)を用いて行ないました。mの単独重合体の光照射前後のUVとCDスペクトルをFig. 1に示します。光照射前のUVスペクトルでは、側鎖アゾベンゼンの320nm付近の大きな π - π^* 吸収と450nm付近の弱い n - π^* 吸収が観察されます。光照射後には、 π - π^* 吸収の強度が著しく減少します。CDスペクトルでは、222nm近傍にアミド n - π^* の正の二色性が観察され、左巻α-らせんであることを示していますが、光照射によって強

Fig. 1 DCE 中における m-単独重合体の光照射前 (—) と後 (---) の CD (上) および UV (下) スペクトル

Fig. 2 DCE 中の mA 共重合体の光照射前 (●) と後 (○) における $[\theta]_{222}$ とアゾアミノ酸含量の関係

度が減少し、部分的にランダムコイルに変化することが示唆されました。また、このポリマーでは、側鎖アゾベンゼンの $n-\pi^*$ 吸収領域に誘起円偏光二色性が観察されており、これも光照射によって少し変化しています。mA 共重合体のアゾアミノ酸含量と 222nm の分子楕円率の関係を Fig. 2 に示しました。アゾアミノ酸含量が 60% 以上で構造変化が誘起されていることがわかります⁵⁾。さらに興味深い結果が pA 共重合体で観察されました。すなわち、p 残基 50% 以上の共重合体で、光照射によって左巻 α -らせんが右巻 α -らせんになることが見出されました⁵⁻⁶⁾。pA 共重合体における構造変化と p 含量の関係は Fig. 3 に示すとおり、やはり、アゾアミノ酸含量の多い共重合体で光による顕著な構造変化が誘起されています。なお、グルタマートを含む共重合体は、安定な右巻らせんであり、光による構造変化は多くの場

Fig. 3 DCE 中の pA 共重合体の光照射前 (●) と後 (○) における $[\theta]_{222}$ とアゾアミノ酸含量の関係

Fig. 4 DCE で光による構造変化を示すポリペプチドの光照射前 (—) と後 (---) の CD スペクトル

合見られませんでした。例外的に m を 89% 含む mG 共重合体で、光による不完全な右巻らせんからより完全な右巻らせんへの変化が観察されています⁷⁾。DCE 中の mA, pA, mG, pG 共重合体のうち光により比較的大きな構造変化を示したものの CD スペクトルを Fig. 4 に示しておきます。

4. 溶媒効果と光応答性

次に、eA 共重合体の光応答性について DCE 溶液中で得られた結果を Fig. 5 に示します。この場合、CD パターンよりアゾアミノ酸含量の多い共重合体 (46%, 67%) では右巻らせんであり、少ない共重合体では左巻

Fig. 5 DCE 中の eA 共重合体の光照射前 (—) と後 (---) の CD スペクトル

Fig. 6 アゾアミノ酸含量67%の eA 共重合体の光照射前 (—) と後 (---) における HFIP の効果

らせんであることがわかります。興味あることに、この共重合系では、アゾアミノ酸含量が多い共重合体は光照射による構造変動を殆ど示さないのに対し、少ない共重合体で顕著な構造変化が見られました⁸⁾。ポリマー中の光応答性残基量は少ないが顕著な構造変動が見られる系が、高感度光応答系として一番望ましいのですが、この結果はその線に近く、注目すべきものと思われます。この共重合体のもう一つの重要な側面は、光照射の効果が無かったアゾアミノ酸含量67%のポリマーが、ヘキサフ

Fig. 7 アゾアミノ酸含量 8 % の pA 共重合体の光照射前 (—) と後 (---) における TMP の効果

ルオロイソプロパノール (HFIP) の溶媒効果によって光応答性になることです⁹⁾。DCE-HFIP混合溶媒中の HFIP 含量の増大に伴い、このポリマーは Fig. 6 に示すように右巻らせん→左巻らせん→ランダムコイルと変化します。そして、DCE 中では観察されなかった光による二次構造変動が観察されるようになります。すなわち、HFIP 含量 5 % では不完全な右巻らせんがより完全な右巻らせんに、10 % ではわずかではありますが不完全な左巻らせんがより完全な左巻らせんに、26 % では左巻らせんからランダムコイルへの顕著な変化が観察されました。

5. 高感度光応答系の構築

このように、光による構造変動の程度は溶媒によっても異なることが示されました。そこで、ポリ-β-ベンジル-L-アスパルテートに対して、右巻らせんを形成させる溶媒として知られているトリメチルホスフェート (TMP) の効果について検討しました。Fig. 7 に、アゾアミノ酸をわずか 8 % しか含まない pA 共重合体の DCE-TMP 溶媒系での結果を示しました¹⁰⁾。このポリマーは、TMP 含量の増大に伴い左巻らせんから右巻らせんに変化します。光照射の効果は TMP 0-20 % 領域の左巻らせんや 50 % 以上の右巻らせんではほとんど観察されず、

Fig. 8 アゾアミノ酸含量8%のpA共重合体の光照射前(—)と後(---)における $[\theta]_{222}$ のTMP依存性

Fig. 9 アゾアミノ酸含量32%のmA共重合体の光照射前(—)と後(---)におけるTMPの効果

両者の中間の TMP 含量で顕著であることがわかります。Fig. 8 に 222nm の分子橢円率 $[\theta]_{222}$ と TMP% の関係を示しましたが、光照射前と光照射後で、TMP% の増大による左巻らせんと右巻らせん間の構造変化のカーブが少しずれています。両曲線に囲まれる狭い TMP 範囲で顕著な光による左巻らせんから右巻らせんへの変化が起こることになります。

この溶媒系で、mA 共重合体も同様の光応答挙動を示します¹¹⁾。m 残基32%の共重合体について、TMP% を増大させた時の CD パターンの変化を Fig. 9 に示しました。TMP 40~55%で光照射による顕著なスペクトル変化が観察されました。ここで、TMP 40%の光照射後のスペクトルに注目しましょう。それは、特徴あるパターンを示しております。次に、このパターンが左巻らせんと右巻らせんの混合として解析できることを次に示します。TMP 含量の両極端で得られる典型的な左巻らせんおよび右巻らせんの CD パターンを用いて、計算機解析により得られた様々な左巻、右巻比の CD スペクトルを Fig. 10 に示しました。そして、TMP 40%の光照射後のスペクトルは左巻らせん/右巻らせんが 65/35 に対応したパターンであることが明らかとなりました。この標準パターン図を用いて任意のスペクトルの左巻、

Fig. 10 左巻らせん (LH), 右巻らせん (RH) 混合の計算スペクトル

Fig. 11 DCE-TMP 混合溶媒中で顕著な構造変化を示す mA 共重合体の例.

アゾアミノ酸含量と TMP% : a (9.7%, 25%); b (9.7%, 30%); c (49%, 60%); d (67%, 60%); e (92%, 60%); f (92%, 70%).

— 光照射前; ... 光照射後

Fig. 12 アゾアミノ酸含量 67%, 92% の mA 共重合体の光照射前 (—) と後 (···) の 222nm 近傍のピーク楕円率 $[\theta]_m$ の TMP% 依存性

右巻組成比を求めることができます。

mA の様々な共重合体について、適切な TMP 含量を選んで得られる顕著な構造変化を Fig. 11 に示しました。共重合体のアゾアミノ酸含量の多少にかかわらず左巻らせんから右巻らせんへの変化が実現しています。横軸に TMP 含量、縦軸に 222nm 近傍のピークにおける分子楕円率 $[\theta]_m$ をとりますと、共重合体中のアゾアミノ酸含量が少ないものについては、Fig. 8 で pA について示したような光照射前後でわずかにずれた変化曲線が得られます。共重合体中のアゾアミノ酸含量の多いものについては、Fig. 12 に示す曲線が得られました。この場合、TMP 含量の大なる溶媒領域の広い範囲について、光照射による構造変化が可能となっています。しかし、TMP が 100% に近い溶媒組成では、光照射しなくても右巻らせんに変化してしまうので、光照射による変化の程度は小さくなります。

これまで、主として、アミド $n-\pi^*$ CD について示してきましたが、次に側鎖アゾベンゼンの吸収領域に見られる二色性スペクトルの例を Fig. 13 に示します。このポリマーは、mA 共重合体でアゾアミノ酸含量が 49% のものです。光照射前には、TMP 含量の増大に伴い 400 ~ 500nm のアゾベンゼンの $n-\pi^*$ 吸収領域の二色性が正

Fig. 13 アゾアミノ酸含量 49% の mA 共重合体の光照射前 (—) と後 (···) の側鎖アゾベンゼン吸収領域の CD スペクトル

Fig. 14 側鎖アゾベンゼンの $n-\pi^*$ (●, ○) および $\pi-\pi^*$ (■, □) 二色性の照射前 (●, ■) と後 (○, □) の TMP% 依存性

から負へと逆転し、250-350nm の $\pi-\pi^*$ 吸収領域では、初めは観察されなかった二色性がついには正の方向に現われます。照射後の二色性挙動も、TMP% の増大に伴い $n-\pi^*$ 領域では正から負、 $\pi-\pi^*$ 領域では負から正へと複雑に変化しております。Fig. 14 には、3種類の mA 共重合体について、アゾベンゼンの $n-\pi^*$ 、 $\pi-\pi^*$ 二色性の TMP 依存性を示しました。側鎖アゾベンゼンの二色性が主鎖のポリペプチドの左巻、右巻変化にきれいに対応した変化曲線を与えることがわかります。かくして、これらの系では、側鎖色素の二色性の符号が主鎖の二次構造によって決定されることが示されました。

次に、側鎖アゾベンゼンの異性化の進行の程度と構造変化の関係を Fig. 15 に示しました。mA 共重合体のアゾアミノ酸含量67%のポリマーは、シス%の増大にほぼ比例して構造変化するのに対して、アゾアミノ酸含量9.7%のポリマーは、シス50%で左巻から右巻への構造

Fig. 15 アゾアミノ酸含量9.7% (■, □, TMP 30%) および67% (●, ○; TMP 60%) の mA 共重合体についてのアミド $n-\pi^*$ 二色性の分子橢円率のシス%依存性
●, ■ トランス→シス過程; ○, □ シス→トランス過程

変化をほぼ完了しており、それ以上のシス%の増大は主鎖構造に影響しません。これは、アゾアミノ酸含量のポリマーでは、ポリマー鎖中の全アミノ酸残基のうち、4.9%がトランスからシスへ異性化しただけで、ポリペプチド全体の二次構造が、左巻から右巻に変化することを意味しており、きわめて高感度な光応答系が実現したことになります。

6. ep 共重合体の光応答性

次に、2種類のアゾアミノ酸の共重合体である ep 共

ep 共重合体

重合体について、光応答性を検討しました¹²⁾。DCE 中で、ポリマー鎖中の p は左巻、e は右巻らせんを巻く

Fig. 16 DCE 中における ep 共重合体の照射前 (—) と後 (···) の CD スペクトル

傾向があります。そういうわけで、ep 共重合体は100% アミノ酸から成っており、その共重合比率のどこかの点で、左巻らせんから右巻らせんに変わることが期待されます。結果は Fig. 16 に示しましたが、期待に反して、p 含量の多い共重合体は不完全な左巻らせんに、e 含量の多い共重合体はランダムコイルになりました。側鎖アゾベンゼン残基はかさ高く、側鎖間の立体反発があるためこのような結果になったものと思われます。

私どもの研究の途中、Pieroni らによる側鎖にアゾベンゼン残基を有するポリグルタミン酸の光による右巻らせんから β -構造への変化が報告されました¹³⁾、その変化の程度はわずかで、私どもの光応答系の大きな構造変化とは対照的な結果になっています。

7. フィルム状態における光応答性

これまで述べてきましたのは溶液中の結果についてですが、最近、私達はフィルム状態についての研究を始めました^{14,15)}。フィルム状態では ω -らせん、 π -らせん、 β -構造など溶液中と異なった構造が見出される可能性があり、光による新しい種類の構造変化が起こるかも知れません。そこで、まず、ep 共重合体のフィルムについて赤外スペクトルによる研究を行ないました。そして、照射前のフィルムが加熱処理によって共重合組成に依存する次の構造変化を示すことを見出しました。

ここで、 α_L は左巻 α -らせん、 ω_L は左巻 ω -らせん、 π_L は左巻 π -らせん、 α_R は右巻 α -らせん、 β は β 構

Fig. 17 e 59% の ep 共重合体のフィルムの加熱前 (a) と後 (b) の IR スペクトル

造を示しています。e 含量41%の ep 共重合体についての加熱処理前後の赤外スペクトルを Fig. 17 に示しました。加熱後には、アミドA吸収帯 (図には示してありません) は 3327cm^{-1} であり、 π_L -らせんの報告値に対応しています¹⁶⁾。このように、様々な種類の構造が見い出されたのですが、いずれの構造も照射によっては変化しません。しかし、トランス-シスの光異性化は進行します。光による構造変化が見られないのは、固体状態でポリマー鎖全体の動きがかなり制限されていることに関係しているものと考えております。他のポリマー系のフィルム状態における光応答性の研究は現在進行中です。

おわりに

これまで、ポリペプチド二次構造の光による変化に関して、溶液中およびフィルム状態の研究結果を述べてきました。こうしたポリペプチドの構造変化をなんらかの機能の制御に連結させることを今後の課題と考えております。光信号によって物質の透過が制御できるような膜系の構築も魅力あるターゲットであると思います。

以上, まとまりのない話になりましたが, 話題提供させていただきます。

ご静聴どうもありがとうございました。

参考文献

- 1) 上野, 長: 有機合成協会誌, **38**, 207 (1980)
- 2) M. Goodman, M. L. Falxa: *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3863 (1967)
- 3) V. Giancotti, F. Quadrioglio, V. Crescenzi: *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 297 (1972)
- 4) E. H. Erenrich, R. H. Andreatta, H. A. Scheraga: *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1116 (1970)
- 5) A. Ueno, J. Anzai, T. Osa, Y. Kadoma: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 549 (1979)
- 6) A. Ueno, J. Anzai, T. Osa, Y. Kadoma: *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.*, **15**, 407 (1977)
- 7) A. Ueno, J. Anzai, T. Osa, Y. Kadoma: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 2995 (1977)
- 8) A. Ueno, J. Anzai, K. Takahashi, T. Osa: 高分子論文集, **37**, 281 (1980)
- 9) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai, T. Osa: *Macromolecules*, **13**, 459 (1980)
- 10) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai, T. Osa: *Chem. Lett.*, 113 (1981)
- 11) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai, T. Osa: *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6410 (1981)
- 12) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai, T. Osa: *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **182**, 693 (1981)
- 13) O. Pieroni, J. L. Houben, A. Fissi, P. Constantino, F. Ciardelli: *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5915 (1980)
- 14) A. Ueno, Y. Morikawa, J. Anzai, T. Osa: *Chem. Lett.*, 1453 (1984)
- 15) A. Ueno, Y. Morikawa, J. Anzai, T. Osa: *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, in press.
- 16) S. Sasaki, Y. Yasumoto, I. Uematsu: *Macromolecules*, **14**, 1797 (1981)

文 献 抄 録

高分子量のヒト黒色腫関連抗原の研究

Studies of a High Molecular Weight Human Melanoma-associated Antigen

I. Hellström, H. J. Garrigues, L. Cabasco, G. H. Mosely, J. P. Brown, K. E. Hellström: Department of Microbiology/Immunology and Pathology, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA
J. Immunol., **130**, 1467-1472 (1983)

著者らは、黒色腫の腫瘍関連抗原を明らかにする目的で、培養したヒト黒色腫細胞で、マウスを免疫し、その脾細胞と、マウス骨髄腫細胞とでハイブリドーマを作成し、HAT 培養した、ハイブリドーマの一つは、IgG 1 タイプの抗体 (48.7) を分泌した。この抗体を、¹²⁵I で標識し、各種の培養細胞や、細胞膜抽出物との結合をみると、主として、黒色腫細胞と反応し、非標識抗体により、結合は抑制された。さらに、組織切片や培養細胞を、抗体と反応させ、peroxidase anti-peroxidase 法により、免疫組織学的に染めてみると、複式母斑や、黒色腫の原発部位、転移部位に抗原が存在した。血管内皮と思われる細胞も、弱い、染色された。それ以外のメラニン細胞などの正常細胞や、黒色腫以外の腫瘍細胞とは、反応がみられなかった。培養細胞は、元の組織と比較して、

抗体との反応性が低下しており、培養の間に、抗原の細胞表面への出現が、低下すると思われた。この抗体48.7は種々の黒色腫細胞株との反応性の差からハイブリドーマから作成した別の抗体96.5とは異なる抗原を認識していると考えられた。この抗体の標的抗原を明らかにするため、免疫沈降法を用いた。すなわち、標識した黒色腫細胞の lysate と抗体とを反応させ、抗原抗体複合物を作成し、さらに *S. aureus* と反応させて沈降させる。沈降物を SDS-PAGE (8% acrylamide) により分析した。標的抗原は、みかけの分子量25万と40万ダルトン以上の二つのペプチドからなっていた。このパターンは、既に報告された proteoglycan を含む抗原と類似していた。同様の抗原は、Imai らも報告しており、同一のものかどうかは、さらに調べる必要があろう。(池田 有成)