— 論 文 —

(日本化学会誌, 1987, (5), p.888~893)

© 1987 The Chemical Society of Japan

周期配列グルタミン酸ポリペプチドの円偏光二色性

(1986年5月21日受理)

山本浩之*・西田綾子・早川忠男・西 則雄**

ホスホロアジド酸ジフェニル法により3種類の周期配列ポリ(X-Glu) (X: Ala, Leu, Phe) を合成した。pHを変えた円偏光二色性(CD)スペクトルの測定結果からポリ(Ala-Glu)およびポリ(Leu-Glu)はヘリックス(部分)-ランダムコイルの二次構造転移が認められ、ポリ(Phe-Glu)は β -型の関与する構造転移を引き起こす。

ポリ(X-Glu)と色素アクリジンオレンジ(AO)との不斉相互作用を吸収およびCDスペクトルの測定結果から検討した。可視部領域における吸収スペクトルの変化にともないポリ(X-Glu)-AO複合体はpH4.5~9.2でCDを誘起する。アミノ酸Xの側鎖の種類が誘起CDの形状と強度に影響をおよぼし、側鎖の疎水性(かさ高さ)が増すにつれ誘起楕円率は大きくなった。

1 緒 言

周期配列ポリペプチドの合成法は多岐にわたり研究され、その内で活性エステル法は優れた手法であり多くのポリペプチドの合成に利用されてきた。周期配列グルタミン酸ポリペプチドも α -ニトロフェニルエステル¹⁾²⁾、ペンタクロロフェニルエステル^{3)~5)}、カテコールエステル⁶⁾、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル⁷⁾から合成された。

最近開発されたホスホロアジド酸ジフェニル法(以下DPPA法と略記する)は酸アジド結合を経るC-末端活性化法であり、アミノ酸およびペプチドを直接重縮合できるという手法の簡便さにその特徴がある^{8)~10)}。本報告ではDPPA法により3種類の周期

配列ポリ(X-Glu) (X: Ala, Leu, Phe) を合成し、水溶液中の配座を調べた。ついで、著者らの周期配列ポリペプチド-色素複合体の誘起CD研究^{14)~17)}の一環として、ポリ(X-Glu)と色素アクリジンオレンジ(以下AOと略記する)間の不斉相互作用を誘起CDから検討した。

2 実 験

2.1 ポリペプチド

通常の液相法により合成したジペプチド塩酸塩(300mg)をジメチルスルホキシド(0.6ml)に溶かし、DPPA(1.3モル当量)およびトリエチルアミン(2.3モル当量)を加え、室温2日間反応させた。反応混合物に水を加え生成物を沈殿させ、遠心分離し、エタノールおよびエーテルで洗浄し、乾燥させた¹³⁾。表1にポリ(X-Glu)合成の収率などの結果をまとめた。Gluの側鎖ベンジル保護基はNaOHを用いるけん化により除去した¹⁸⁾。

重合度は表1のジクロロ酢酸(以下DCAと略記する)中の固有粘度からポリ(ベンジル-L-グルタマート)の粘度式 $[\eta]_{DCA}^{25} = 2.78 \times 10^{-5} M_w^{0.87}$ を用いて算出し¹⁹⁾、ポリ(Ala-Glu)(重合度、総アミノ酸残基数、=90)、ポリ(Leu-Glu)(重合度=70)、ポリ(Phe-Glu)(重合度=70)と推定した。これら周期配列ポリペプチドは非解離状態では水に溶けないので、ナトリウム塩として水

信州大学繊維学部高分子工業研究施設, 386 上田市常田
** 北海道大学理学部高分子学科, 060 札幌市北区

- 1) F. H. C. Stewart, *Aust. J. Chem.*, **18**, 887(1965).
- 2) De Los F. DeTar, T. Vajda, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 998(1967).
- 3) J. Kovacs, R. G. Giannotti, A. Kapoor, *ibid.*, **88**, 2282(1966).
- 4) B. J. Johnson, *J. Chem. Soc., Sect. C*, **1967**, 2638.
- 5) H. Yamamoto, J. Noguchi, *J. Biochem.*, **67**, 103(1970).
- 6) Y. Trudelle, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1973**, 1001.
- 7) H. J. Goren, T. Fletcher, R. M. Epand, *Biopolymers*, **16**, 1513(1977).
- 8) N. Nishi, B. Nakajima, N. Hasebe, J. Noguchi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 53(1980).
- 9) B. Nakajima, N. Nishi, *Polym. J.*, **13**, 183(1981).
- 10) B. Nakajima, K. Hirata, N. Nishi, J. Noguchi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **3**, 46(1981).
- 11) T. Naruse, B. Nakajima, A. Tsutsumi, N. Nishi, *Polym. J.*, **13**, 1151(1981).
- 12) N. Nishi, B. Nakajima, *Int. J. Biol. Macromol.*, **4**, 281(1982).
- 13) 西 則雄, 中島文一郎, 本間雅宏, 萩原 清, 成瀬卓実, 高分子討論会予稿集, **32**, 1307(1983).

- 14) H. Yamamoto, A. Nakazawa, T. Hayakawa, N. Nishi, T. Naruse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 1699(1984).
- 15) H. Yamamoto, A. Nakazawa, T. Hayakawa, N. Nishi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **7**, 167(1985).
- 16) H. Yamamoto, A. Nishida, T. Hayakawa, N. Nishi, R. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 1641(1986).
- 17) H. Yamamoto, A. Nishida, T. Hayakawa, N. Nishi, R. Yamamoto, *Coll. Polym. Sci.*, **264**, 779(1986).
- 18) 武田好史, 奥田 暢, 桜井節二, 日特公, 昭 40-3290, (1970).
- 19) P. Doty, J. H. Bradbury, A. M. Holtzer, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 947(1956).

に可溶化させた。

また、誘起 CD 測定 of 標準試料として、ポリ(L-グルタミン酸)ナトリウム塩 (以下 PLG と略記する) (重合度=90) を Sigma 社から購入した。

2.2 色 素

AO は和光純薬社から購入し、Zanker の方法にしたがいアルミナのカラムを用いて精製し²⁰⁾、塩酸塩に変え、その純度は元素分析で確かめた。AO 塩酸塩は水溶液とし、ポリペプチド水溶液に混合した。AO の最終濃度は $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ であり、グルタミン酸残基と色素分子のモル比 (R/D) は 10 以下を用いた。

2.3 測 定

吸収および CD スペクトルの測定には日本分光社製の UVID EC-1 分光光度計および J-40 A 円二色性分散計を用いた。CD は 1~10 mm 石英セルを用い、窒素ガス流下に 25°C で測定した。実験データは全色素濃度または平均アミノ酸残基濃度に基づき、モル分子吸光係数 ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ 以下 SI 単位表示を用いた) およびモル橢円率 $[\theta]$ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) で表わした。

3 結果と考察

3.1 ポリ(X-Glu) の CD

周期配列ポリ(X-Glu) 中でアミノ酸 X の側鎖は CH_3 (Ala), $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Leu), $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (Phe) の順にかき高さが増し、その疎水性も変化すると報告されている²¹⁾。

周期配列ポリ(X-Glu) の水中での配座を CD により調べた。図 1 にポリ(Ala-Glu) の CD スペクトルの pH による変化を示す。ポリ(Ala-Glu) は pH 6.5~9.4 で 217 nm に正の CD 帯を示し、pH 4.1 では 225 nm 付近 (幅広) と 203 nm に負の CD 帯を示す。これら CD 帯の位置と橢円率の変化を通常のパペチド結合の $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移により解釈すれば²²⁾、電荷反発による伸長構造を部分的に含みいわゆるランダムコイル構造²³⁾²⁴⁾ (側鎖解離時) から部分 α -ヘリックス構造 (非解離時) への二次構造の転移によると考えられる。図 2 にポリ(Leu-Glu) の CD スペクトルの pH による変化を示す。ポリ(Leu-Glu) の pH 6.9 以上での CD スペクトルは基本的にはポリ(Ala-Glu) の中性 pH 域でのスペクトルによく似ている。しかしながら、pH を 4.3 に下げるとスペクトルには大きな変化が生じ、210~223 nm 域での負の橢円率は図 1 よりもはるかに大きい。この pH による二次構造の転移もランダムコイル $\rightarrow$ α -ヘリックスと考えられる。図 3 にポリ(Phe-Glu) の CD スペクトルの pH による変化を示す。このポリペプチドは pH 6.6 以上で 218 nm に正の CD 帯を示し、pH 6 以下では符号が反転し負の CD 帯を示す。ポリ(Phe-Glu) の分子橢円率は濃度依存性 (pH 4.9 および pH 9.5, $2 \times 10^{-5} \sim 10^{-3}$ 残基 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) を示さず、また添加中性塩 (NaCl, 0~2 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) によってもほとんど変わらなかった。pH 4.9 での $[\theta]_{218} = -11800$ は β -型に特徴的な CD 曲線の波形と橢円率に類似し²²⁾,

Fig. 1 CD spectra of poly(Ala-Glu) in water at different pH's and 25°C

pH :
— ; 4.1, --- ; 6.5, ... ; 9.4

Fig. 2 CD spectra of poly(Leu-Glu) in water at different pH's and 25°C

pH :
— ; 4.3, --- ; 6.9, ... ; 9.2

20) V. Zanker, *Z. Physik. Chem.*, **199**, 225(1952).

21) G. Némethy, *Angew. Chem.*, **79**, 260(1967).

22) 浜口浩三, 武貞啓子, “蛋白質の旋光性”, 東京大学出版会 (1971) p. 28.

23) M. L. Tiffany, S. Krimm, *Biopolymers*, **11**, 2309 (1972).

24) M. L. Tiffany, S. Krimm, *ibid.*, **12**, 575(1973).

β -型が関与した二次構造の転移を示唆しているが、試料の重水中への溶解度の不足のため、溶液赤外吸収スペクトルから直接確かめることはできなかった。これに関連して、Phe-X の周期配列

Fig. 3 CD spectra of poly(Phe-Glu) in water at different pH's and 25°C

pH :

— ; 4.9, --- ; 6.0, - · - ; 6.6, ··· ; 9.0-9.9

Fig. 5 Induced CD spectra of the PLG (DP=90)-AO complex in water at $R/D=10$

pH :

— ; 4.5, --- ; 6.5, ··· ; 9.2

Fig. 4 pH Dependence of the magnitude at $[\theta]_{218}$ of poly(X-Glu) in water at 25°C

○ : Poly(Ala-Glu), ● : Poly(Leu-Glu), △ : Poly(Phe-Glu)

Fig. 6 Induced CD spectra of the PLG (DP=90)-AO complex in water at pH 4.5

R/D :

— ; 1, --- ; 5, ··· ; 10

をもつポリペプチドが水中で β -構造を形成しやすいことは、より水溶性に富むポリ(Phe-Lys) で詳しく研究されているが、報告されている CD スペクトルの楕円率には少し相違がある¹⁷⁾²⁵⁾。図 4 にポリ(X-Glu) の楕円率の pH 変化の結果をまとめた。

3.2 ポリ(X-Glu)-AO 系の誘起 CD

PLG と AO との不斉相互作用による誘起旋光性には 20 有余年にわたる多くの知見があるが^{26)~33)}、周期配列グルタミン酸ポリペプチドを用いた研究報告はないようである。PLG を含む同程度重合度の 4 種類のグルタミン酸ポリペプチド共存および非共存下における AO の吸収および CD スペクトルを pH, R/D および複合体濃度を変え測定した。AO 自身は pH 6~7 で可視部領域の 492 nm に $\epsilon=43000$ の吸収ピークと 470 nm に約 $\epsilon=36000$ の肩を示す ($2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)。PLG (重合度=90) が AO と複合体を形成すると、可視部吸収スペクトルはブルーシフトし (pH 6.6, $R/D=10$ では $\epsilon_{455}=19300$)、誘起 CD が観察される。PLG (重合度=90)-AO 複合体の誘起 CD スペクトルの pH および R/D による変化を図 5, 6 に示す。図 5 の、たとえば、pH 4.5 ($R/D=10$) の誘起 CD の楕円率 $[\theta]_{520}=8300$, $[\theta]_{465}=-11300$, $[\theta]_{435}=5300$ の値が以前に報告されている高重合度 PLG-AO 複合体の楕円率²⁷⁾³⁰⁾³¹⁾ (重合度 650 試料では $[\theta]_{520}=21000$, $[\theta]_{465}=-111000$, $[\theta]_{435}=63000$) にくらべて小さいのは本研究で用いた PLG の重合度が低いことによると思われる。これに関し、著者らはカチオン性のポリペプチドと色素の系の誘起 CD の強度には重合度依存性があり、低重合度試料を用いた系の誘起 CD は小さいことを報告した³⁴⁾³⁵⁾。

PLG-AO 複合体にくらべると、同程度重合度ポリ(X-Glu)-AO 系の誘起 CD の強度は小さい。ポリ(Ala-Glu)-AO 系については AO 濃度 $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ およびポリペプチド残基濃度 $2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol 残基} \cdot \text{dm}^{-3}$ ($R/D=1 \sim 10$) では pH を変えても誘起 CD は観察されなかった。しかしながら、AO を $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以上の濃度にする、きわめて小さい誘起 CD が現われ、さらに色素濃度を増しても AO 分子あたりの誘起 CD の強度は変わらなかった。pH 7, $R/D=5$, AO 濃度 $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ での楕円率は $[\theta]_{470}=1500$, $[\theta]_{452}=0$, $[\theta]_{430}=-1200$ であった。図 7 に、一例として、ポリ(Leu-Glu)-AO 複合体の

Fig. 7 Absorption spectra of the poly(Leu-Glu)-AO complex in water at $R/D=5$

pH :
— ; 4.5, --- ; 6.4, ... ; 9.1

Fig. 8 Induced CD spectra of the poly(Leu-Glu)-AO complex in water at $R/D=5$

pH :
— ; 4.5, --- ; 6.4, ... ; 9.1

- 25) G. Seipke, H. A. Arfmann, K. G. Wagner, *Biopolymers*, **19**, 189(1980).
- 26) L. Stryer, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1411 (1961).
- 27) R. E. Ballard, A. J. McCaffery, S. F. Mason, *Biopolymers*, **4**, 97(1966).
- 28) B. C. Myhr, J. G. Foss, *ibid.*, **4**, 949(1966).
- 29) K. Yamaoka, R. A. Resnik, *J. Phys. Chem.*, **70**, 4051 (1966).
- 30) E. J. Eyring, H. Kraus, J. T. Yang, *Biopolymers*, **6**, 703(1968).
- 31) M. Hatano, M. Yoneyama, Y. Sato, *ibid.*, **12**, 895 (1973).
- 32) T. Imae, S. Ikeda, *ibid.*, **15**, 1655(1976).
- 33) Y. Sato, M. Hatano, *Makromol. Chem.*, **183**, 997 (1982).
- 34) H. Yamamoto, A. Nakazawa, T. Hayakawa, M. Mitsuishi, *Polym. J.*, **16**, 791(1984).
- 35) H. Yamamoto, *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 130 (1986).

Table 1 Synthesis of sequential glutamyl polypeptides^{a)}

Monomer peptide	Solvent	Base	Yield (%)	$[\eta]_{DCA}^{25}$
HCl H-Ala-Glu(OBzl)-OH ^{b)}	DMSO	TEA	56	0.11
HCl H-Leu-Glu(OBzl)-OH	DMSO	TEA	35	0.10
HCl H-Phe-Glu(OBzl)-OH	DMSO	TEA	83	0.10

a) Abbreviations used: DMSO, dimethyl sulfoxide; TEA, triethylamine; DCA, dichloroacetic acid.

b) IUPAC nomenclature.

Fig. 9 Far-ultraviolet CD spectra of the poly(Leu-Glu)-AO complex in water at different pH's and 25°C

pH: —; 4.5, ---; 6.4, ···; 9.1

pH を変えたときの吸収スペクトルを示す。複合体の吸収スペクトルの pH 変化に対応して図 8 の誘起 CD が観察されるが、pH 4.5, 6.4, 9.1 のいずれの誘起 CD スペクトルも特徴的でその楕円率もたかだか -6300 程度と小さかった。図 9 にポリ(Leu-Glu)-AO 複合体の 250 nm 以下の CD スペクトルを示す。まず、複合体形成により pH 6.4 でも部分ヘリックス構造が形成されていることがわかり、ついで図 2 のポリ(Leu-Glu) の CD スペクトルにくらべ楕円率が減少していることが認められる。これらの結果は既報の PLG-AO 複合体の挙動と同様であった³¹⁾。図 10 にポリ(Phe-Glu)-AO 複合体の pH を変えたときの誘起 CD スペクトルを示す。系の pH を 5.1→6.8→9.2 へと上げてゆくと可視部波長域の誘起 CD の正負の極値の波長がブルーシフトする。楕円率は 11300~-9000 程度と重合度 90 の PLG-AO 複合体とはほぼ同じであるが、その符号はまったく逆転している。このポリ(Phe-Glu)-AO 複合体は pH 5.0 以下で沈殿する。

以上のように 3 種類のポリ(X-Glu) の CD および AO と複合体を形成したときの誘起 CD について述べたが、誘起 CD の結果の解釈は予想以上に困難であった。ここで若干の考察を試みる。今までに著者らはカチオン性の周期配列ポリペプチドを合成

Fig. 10 Induced CD spectra of the poly(Phe-Glu)-AO complex in water at $R/D=5$

pH: —; 5.1, ---; 6.8, ···; 9.2

し、アゾ色素メチルオレンジとの間の不斉相互作用による誘起 CD を研究してきた。その現象論的な結論はおもに二つある。第一に、色素が静電的に結合するカチオン基間の距離が長くなるにつれて誘起 CD の強度が減少することである^{14)~17)}。第二に、周期配列ポリペプチド内の共存アミノ酸の側鎖の疎水性により誘起 CD スペクトルの形状および符号が変わり、疎水性の強いポリペプチドほど楕円率の大きい CD を誘起することである¹⁷⁾。本研究の目的は上に述べた第二の結論と関係しており、誘起 CD の研究対象としてもっとも知見の多い PLG の周期配列ポリペプチドを系として選びその側鎖をメチル→イソブチル→フェニルとかさ高さおよび疎水性を変え誘起 CD の基礎データを集積しようとする点にあった。その意味では用いた 3 種類のポリ(X-Glu) と AO 間の誘起 CD の結果(図 8, 10)はかさ高さ(疎水性)の順にその楕円率が大きくなり、既報のポリ(Lys-X)-メチルオレンジ系の結果をよく支持したが¹⁷⁾、全般的に誘起 CD の強度が小さく広範な測定条件の設定が困難であった。

生体高分子と中程度分子間の不斉相互作用を研究する上で集積データのもっとも多い PLG の系を避けることはできない。それゆえ、重合度の高かつ一定(〜1000)のポリ(X-Glu) シリーズを他の縮重合法を用いて合成し、色素との不斉相互作用の詳細を解明する予定である。

Circular Dichroism of Sequential Glutamic Acid Polypeptides

Hiroyuki YAMAMOTO*, Ayako NISHIDA, Tadao HAYAKAWA
and Norio NISHI**

*Institute of High Polymer Research, Faculty of Textile Science and Technology,
Shinshu University; Tokida, Ueda-shi 386 Japan*

*** Department of Polymer Science, Faculty of Science, Hokkaido University;
Sapporo-shi 060 Japan*

Three sequential glutamic acid polypeptides, $\text{poly}(\text{X-Glu})$ ($\text{X} : \text{Ala, Leu, Phe}$), were synthesized by the diphenylphosphorazidate method. The conformations of these polypeptides were studied by means of circular dichroism (CD) spectroscopy in water. The conformations depended on the amino acid sequence and the ionization state of the side chain. When pH was changed, the conformational transition was from a helix (partial) to a random coil in $\text{poly}(\text{Ala-Glu})$ and $\text{poly}(\text{Leu-Glu})$, while a β -structure participated in the transition of $\text{poly}(\text{Phe-Glu})$.

Chiral interaction between $\text{poly}(\text{X-Glu})$ and a dye (Acridine Orange) was first examined from the absorption and induced CD spectra. On complexation with the dye, the sequential polypeptides exhibited induced CD at the visible wavelengths corresponding to the blue-shifted absorption bands in a wide pH range of 4.5~9.2. The shape and magnitude of the induced CD were affected by the bulkiness and/or hydrophobicity of the side chains in $\text{poly}(\text{X-Glu})$. The increased bulkiness exhibited the larger ellipticity in induced CD of the complex.

~~~~~