

Title	Study on the thermal transition of collagen model peptides in solution
Author(s)	内山, 進
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3155321">https://doi.org/10.11501/3155321</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	うちやますすむ 内山進
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第14567号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科薬品化学専攻
学位論文名	Study on the thermal transition of collagen model peptides in solution (コラーゲン様構造の熱安定性に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次  (副査) 教授 大森 秀信 教授 今西 武 教授 小林 資正

#### 論文内容の要旨

コラーゲンは動物界に広く分布する構造タンパク質のひとつであり、このコラーゲンの特徴の一つとしてトリプルヘリックス構造を形成することがあげられる。このトリプルヘリックス構造は、右向きスーパーヘリックス(超らせん)で、ポリプロリンII型に似た左巻きのヘリックス(らせん)構造を持つ一本鎖が三本集まり、束になることにより形成されている。コラーゲタンパク質が腱、骨や血管などにおいて、物理的な外力に対する強度を保持しているのは、このようなトリプルヘリックス構造を採っている事に起因している。一般にコラーゲタンパク質中にはグリシンが多く含まれており、I型コラーゲンの場合には全アミノ酸の1/3をグリシンが占めている。これはトリプルヘリックス構造を形成するときのアミノ酸配列が(X-Y-Gly)というトリプレットの繰り返し構造になっているからであり、XやYの位置にはイミノ酸であるプロリンやプロリンの $\gamma$ 位が水酸化されたヒドロキシプロリンが存在していることが多い。そして驚くべき事に、コラーゲンは温度の上昇とともに三本鎖がほどけて一本鎖へと転移するが、この転移する温度はそのコラーゲンを持つ動物が生息している環境の温度と一致していて、一般に転移温度の高いコラーゲンはYの位置にヒドロキシプロリンを多く含んでいる傾向がある。

1970年に小林らは固相合成法により化学合成され鎖長の揃ったポリペプチドである(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>は溶液中において三本鎖を形成し、温度の上昇に伴い三本鎖から一本鎖へと転移するコラーゲンのモデル物質であることを見出した。また、化学合成された(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>も三本鎖を形成し、このYの位置にヒドロキシプロリンを含む(Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>の三本鎖から一本鎖への転移温度は、(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub>のそれよりも30°C高い60°Cであることを同時期に解明している。しかしながら、現在まで溶液中におけるコラーゲンの三本鎖の安定化機構についての知見はあまり得られておらず、例えばプロリンの水酸化による熱安定性の上昇についての解明はなされていない。また三本鎖から一本鎖への転移について詳細に研究された例は少なく、そのためにこの転移の機構についてはあまり知られていない。以上の状況を鑑みて、本研究ではコラーゲンモデル物質について、熱測定、密度測定、超遠心測定などの物理化学的手法を主に用い、これら巨視的観点からの情報とNMR測定などの微視的観点からの情報とを得ることにより、コラーゲンの三本鎖形成機構を解明することを目的とし研究を行った。

まず断熱型示差走査熱量計を用い熱測定を行った。その結果、コラーゲンモデル物質の三本鎖から一本鎖への熱転移は、三本鎖溶液から一本鎖溶液への相転移現象であると解釈できることを提示した。またこの転移は昇温速度に依存した現象であるものの、熱容量曲線の昇温速度依存性について詳細に研究することにより、平衡条件下での転移に

伴う熱力学関数を見積もることに成功した。そして得られた熱力学関数から (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> の熱安定性の上昇は、主にエンタルピーの寄与によることが分かった。また遅い昇温速度における熱測定から、(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> 及び (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> は、三本鎖から一本鎖へ転移する温度より低い温度にも吸熱を伴う転移をするということを見出した。

次に、振動型密度計を用いて異なる温度における溶液の密度測定を行うことにより、コラーゲンモデル物質の溶液中における部分モル容積の温度依存性を算定した。その結果、多くの球状タンパク質の天然状態から変性状態への熱転移の場合とは異なり、三本鎖から一本鎖への熱転移に伴って部分モル容積が大きく変化し、その変化量は (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> の方が (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> より大きいことが分かった。この様に熱転移に伴ってモル容積が大きく変化する現象が観測されたことから、溶液中におけるコラーゲンモデル物質の三本鎖から一本鎖への転移の際には、溶媒和の程度が変化しているということを実験的に知ることができた。

更にコラーゲンモデル物質溶液の NMR 測定からは三本鎖の状態には二種類あり、温度の上昇に伴って低温状態の三本鎖から高温状態の三本鎖へと転移した後に、一本鎖へと転移するということを見出した。

以上、本研究により溶液中におけるコラーゲンモデル物質の三本鎖から一本鎖への熱転移に伴う種々の熱力学量を見積もることができ、三本鎖の安定化には溶媒が関与していることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究では構造蛋白質の一種であるコラーゲンの高次構造の安定化機構に興味を持ちモデルペプチド (Pro-Pro-Gly)<sub>n</sub> と (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub> を用いてその解明を試みた。両ペプチドの三本鎖ヘリックスから一本鎖コイルへの構造転移を NMR や CD 測定より解析した。さらに転移に伴う熱容量、偏比容の変化の両ペプチドの差異の解析から安定化への水和の寄与を考察した。本研究はコラーゲンのみならず、蛋白質の構造安定化機構の解明に新しい視点をあたえるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。