The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Stabilizing mechanism of collagen triple helical structure
Author(s)	西, 義則
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44799
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【4】

氏　　名	西（にし）　義（よし）　則（のり）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　18630　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	Stabilizing mechanism of collagen triple helical structure **（コラーゲンのトリプルヘリックス構造の安定化機構に関する研究）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小林　祐次 （副査） 教　授　今西　　武　　教　授　高木　達也　　教　授　土井　健史

論　文　内　容　の　要　旨

コラーゲンは、皮膚や骨などを構成している繊維状タンパク質であり、トリプルヘリックス構造を形成する。各ペプチド鎖は、X-Y-Gly の繰り返し配列を持ち、X と Y の位置にはそれぞれ主に Pro や 4*R*-ヒドロキシプロリン（Hyp^R）が占める。Hyp^R はトリプルヘリックス構造の安定化に重要であると言われており、この働きを詳しく調べるために $(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ や $(Pro\text{-}Hyp^R\text{-}Gly)_{10}$ が合成された。これらはコラーゲンモデルペプチドとして知られており、溶液中で低温ではトリプルヘリックスを形成し、温度の上昇に伴って三本鎖から一本鎖へ転移する。$(Pro\text{-}Hyp^R\text{-}Gly)_{10}$ の転移温度は $(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ より高く、天然のコラーゲンと同様に、Hyp^R がトリプルヘリックス構造を安定化することが示され、その要因として Hyp^R のヒドロキシル基による水素結合が考えられた。しかし、我々は Hyp^R の立体異性体である Hyp^S を Y の位置に含む $(Pro\text{-}Hyp^S\text{-}Gly)_{10}$ や、X の位置に Hyp^R、Hyp^S を含む $(Hyp^R\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$、$(Hyp^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ を合成し、いずれもトリプルヘリックスを形成しないことを示した。一方、Raines らは Hyp^R の水酸基をフッ素原子に置換した 4*R*-フルオロプロリン（$fPro^R$）を Y の位置に含む $(Pro\text{-}fPro^R\text{-}Gly)_{10}$ を合成し $(Pro\text{-}Hyp^R\text{-}Gly)_{10}$ より高い熱安定性を持つことを報告した。fPro は弱い水素結合しか形成しないことから、彼らはトリプルヘリックスの安定化には、水素結合ではなく、4位の置換基の電気陰性度が重要であるとする説を提唱した。後に彼らは $fPro^R$ の立体異性体である $fPro^S$ を Y の位置に含む $(Pro\text{-}fPro^S\text{-}Gly)_{10}$ はトリプルヘリックスを形成しないことを示した。このように fPro は Hyp と同様に、Y の位置の立体異性が *R* のものはトリプルヘリックスの熱安定性が増し、*S* のときは低下するという傾向がみられた。

本論文では、トリプルヘリックス構造の安定化機構を解明することを目的とし、はじめに X の位置に fPro を含むペプチド $(fPro^R\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ と $(fPro^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ の熱安定性を測定した。溶液内における両者の分子量を沈降平衡法により求めたところ、前者は単量体で、後者は三量体で存在することが分かった。次に、それぞれの CD を4℃で測定した結果、両者のスペクトルには大きな違いは見られなかったが、前者は温度上昇に伴いモル楕円率が直線状に減少したのに対し、後者はシグモイド状の転移を示した。以上の結果から、$(fPro^R\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ は一本鎖で存在し、$(fPro^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ は温度上昇に伴ってトリプルヘリックスから一本鎖へ転移し、その転移温度は 58℃であることが明らかになった。$(Hyp^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ は一本鎖で存在するので、$(fPro^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ がトリプルヘリックスを形成することは予想外であった。近年 Zagari らは、これらのモデルペプチドのトリプルヘリックスの熱安定性にはピロリジン

環のパッカリングの方向が関与し、「Xの位置にはdown、Yの位置にはupのパッカリングをとることができるものが挿入されたときのみにトリプルヘリックスを形成することができる」という説を提唱した。ただし、我々が$(Hyp^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$がトリプルヘリックスを形成しないことを報告していたので、彼らは$(Hyp^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$を$Hyp^{S}$のヒドロキシル基が隣のペプチド鎖のピロリジン環と立体障害が生じるための例外であるとした。ヒドロキシル基とフッ素原子の原子半径はほぼ同じであることから、彼らの説に従うと$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$は$(Hyp^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$と同様にトリプルヘリックスを形成しないことが予想される。ところが、今回上述したように我々は$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$がトリプルヘリックスを形成することを示したため、パッカリングのみでトリプルヘリックスの安定性を説明しようとするZagariらの説は不完全であることが分かった。

そこで、単なる経験則から判断するのではなく、定量的にトリプルヘリックス構造の安定性を解析するためにモデルペプチドの熱測定を行った。解離会合を考慮しながら熱容量曲線を解析し、転移に伴う熱力学量を決定した。その結果、$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$は$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$に比べて$\Delta H$と$\Delta S$がともに値が大きくなっていたのに対し、$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$及び$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$は$\Delta H$と$\Delta S$がともに小さくなっていた。これは、HypとfProではトリプルヘリックス構造の安定化機構は異なることを示しており、トリプルヘリックスの熱安定性には、Zagariらが提唱したパッカリングの向きだけではなく、他の重要な因子も関係するということが分かった。

次に、熱測定より求めた転移に伴う熱力学量を解釈するために、モデルペプチドの部分モル体積を測定した。$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$のモル体積の計算値は$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$より大きくなっていたのに対し、実測値は小さくなった。一方、$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$及び$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$の部分モル体積は計算値・実測値ともに$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$より大きくなり、その差は実測値の方が大きかった。これより、$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$は$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$より水和の程度が高いのに対し、$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$及び$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$は$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$より水和の程度が低いことが示された。$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$は、$Hyp^{R}$にヒドロキシル基を有し、水和の程度が高いことから、水分子と水素結合を形成しやすくなり、ペプチド鎖間の相互作用をより強くしていると考えられる。このような水素結合の数の増大が$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$の$\Delta H$の増大をもたらし、高い熱安定性を獲得していると考察した。これに対して、$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$及び$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$は、fProのフッ素原子の低い水素結合能のために、水和の程度が低くなり、トリプルヘリックスの周囲に存在する水分子の自由度の制限が小さくなってトリプルヘリックス状態のエントロピーの絶対値が$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$より大きくなると考えられる。一本鎖状態におけるエントロピーの絶対値がモデルペプチドの種類によらず同じであると仮定すると、$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$及び$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$の$\Delta S$は$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$に比べて小さくなるので、これによって高い熱安定性を有すると考察した。

以上のように、申請者は、本論文においてHypとfProではトリプルヘリックスの安定化機構が異なることを初めて明らかにし、その要因はペプチドと溶媒との相互作用の違いによって生じると考えた。

論文審査の結果の要旨

動物界において最も多く含まれる蛋白質はコラーゲンである。このコラーゲンは非常に特異な三本鎖ヘリックス構造をとる。この特異な構造を構成アミノ酸の特異性から説明する試みはこの三十年間絶え間なく行われてきたが未だ結論を得ていない。コラーゲンは他のタンパク質には見られないヒドロキシプロリンを含んでおり、そのコラーゲンのトリプルヘリックス構造の熱安定性に重要な役割を果たしていると考えられてきた。その安定化のメカニズムについては、これまでいくつか仮説が提唱されているものの、やはり未だ結論が得られていない。本研究では、ヒドロキシプロリンの水酸基の働きを究明するべく、電気陰性度が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た。炭素原子に結合したフッ素原子は水酸基と較べて水素結合能が格段に低いことも、水酸基による水素結合形成を通した三本鎖安定化の機構解明に有効と考えられた。プロリン、ヒドロキシプロリン、フルオロプロリンを含むそれぞれのモデルペプチドの物性を比較した。特に系統だった精度の高い熱測定を行い、初めて定量的にトリプルヘリックス構造の熱安定性を解析した。その結果、西君はヒドロキシプロリンとフルオロプロリンはどちらもコラーゲンのトリプルヘリックス構造の熱安定性を増す働きがあるものの、熱力学的に見ると安定化機構は

大きく異なっており、その要因はペプチドと溶媒との相互作用の違いによって生じることを明らかにした。すなわち、ヒドロキシプロリンを含むペプチドの安定化は主にエンタルピー項が寄与し、フルオロプロリンを含むそれには主にエントロピー項が寄与することを明らかにした。これら西君の得た知見は、コラーゲンのみにとどまらず、蛋白質の熱安定化機構の解明に大きく貢献するものである。よって、本研究は博士（薬学）の授与に値するものと認める。