The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Synthesis and Characterization of Collagen Model Peptides
Author(s)	土井, 正光
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46529
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

【7】

氏　　名	土井正光（どい まさみつ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　19682　号
学位授与年月日	平成17年4月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Synthesis and Characterization of Collagen Model Peptides （コラーゲンモデルペプチドの合成と物性研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　小林　祐次 （副査） 教　授　小林　資正　　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、骨、皮膚、そして腱などの結合組織の構成要素であり、三本のポリペプチド鎖が、らせん状により合わさったトリプルヘリックス構造を形成している。それぞれのペプチド鎖は、X-Y-Gly の繰り返し配列からなり、X と Y 位にはそれぞれ Pro や 4*R*-hydroxyproline（Hyp^R）がしばしば出現する事が知られている。

化学合成された$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ や$(Pro\text{-}Hyp^R\text{-}Gly)_{10}$ は、低温ではトリプルヘリックスを形成し、温度の上昇に伴い一本鎖へ転移する性質を持つコラーゲンモデルペプチドとして知られている。$(Pro\text{-}Hyp^R\text{-}Gly)_{10}$ の転移温度は、$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ よりも高く、この安定化の理由は現在も議論の的になっている。X 位を Hyp^R に置換した$(Hyp^R\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ や 4(*S*)-hydroxyproline（Hys^S）を含む$(Pro\text{-}Hyp^S\text{-}Gly)_{10}$ や$(Hyp^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ も合成され、何れもトリプルヘリックスを形成しない事も知られている。最近では、Hyp^R の水酸基をフッ素に置換した 4(*R*)-fluoroproline（$fPro^R$）を含む$(Pro\text{-}fPro^R\text{-}Gly)_{10}$ が合成され、$(Pro\text{-}Hyp^R\text{-}Gly)_{10}$ よりも高い熱安定性を持つ事が報告された。また、4(*S*)-fluoroproline（$fPro^S$）を含む$(Pro\text{-}fPro^R\text{-}Gly)_{10}$ はトリプルヘリックスを形成しない事も分かった。

著者は、これらのモデルペプチドにおいて、Hyp と同様に fPro でも Y が *R* 体の場合にはトリプルヘリックスの安定性が増し、*S* 体の場合には低下するという傾向が見られる事に興味を持った。そして、未だ分かっていないトリプルヘリックス構造の安定化の機構解明を目的に、種々の Hyp や fPro を含むモデルペプチドを合成し、熱力学的な解析を行った。

モデルペプチドの合成に当たり、$fPro^R$ および $fPro^S$ の誘導体の合成が先ず必要で、従来法では特に $fPro^R$ の収率が低いため、量的確保の点で問題があった。Hyp の水酸基のフッ素化は、S_N2 型で進行するため、$fPro^R$ の合成には希少で入手困難な非天然型の Hyp^S が必要となった。そこで、Hyp^R から光延反応により Hyp^S 誘導体を合成し、$fPro^R$ 誘導体の合成に用いた。Hyp^R 誘導体の保護基、そしてフッ素置換の反応溶媒を検討することにより、Hyp^R から $fPro^R$ に至るまでの収率を従来法に比べ大幅に改善することができた。

そして、$fPro^R$ および $fPro^S$ 誘導体を利用して$(fPro^R\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ および$(fPro^S\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ を合成し、CD スペクトルや超遠心による沈降平衡の測定を行い、前者は低温でも一本鎖で存在するのに対し、後者はトリプルヘリックスを形成する事を明らかにした。そして、既知のモデルペプチドと合わせ、Hyp および fPro の置換体の構造を比較すると、それぞれ対応する配列をもつ置換体は、前者がトリプルヘリックスであれば後者も、と言う様に同じ構造である

が、$(Hyp^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ と今回合成した$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ は、それぞれ１本鎖とトリプルヘリックスと言うように構造に相関の無い事が分かった。そして、CD の転移曲線から転移に伴う ΔH と ΔS を見積もったところ、Hyp を含むペプチドは ΔH の増大により熱安定性が増すのに対し、fPro は ΔS の減少により熱安定性を獲得している、つまり Hyp と fPro では構造安定化の機構が異なる事を指摘した。

最近、トリプルヘリックスの安定性とイミノ酸のピロリジン環のパッカリングとの関係が注目されている。低分子誘導体の結晶データから、Hyp や fPro の場合、R 体では up に、S 体では down にと言う様にパッカリングに偏りがあり、Pro は偏りの無い事がわかり、モデルペプチドの X 線解析の結果と合わせ、安定なトリプルヘリック構造を形成するには、X に down、Y に up のパッカリングの傾向を持つアミノ酸配列となる必要があると言う一般則が見出された。これで、$(Hyp^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ を除く全てのモデルペプチドについて構造の安定性は説明できた。

著者はこの説に興味を持ち、パッカリングに偏りの無い Pro の代わりに、X には Hyp^{S} または $fPro^{S}$、そして Y 位には Hyp^{R} または $fPro^{R}$ を置換したモデルペプチドを合成すれば、さらに熱安定性の高いモデルペプチドが得られるものと考えた。そこで、次に$(Hyp^{S}\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$ や$(fPro^{S}\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ の合成を行った。また、組み合わせの異なる$(Hyp^{R}\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$ や$(fPro^{R}\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ の合成も比較のため行った。そして、$(fPro^{R}\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ を除く３種の二置換体を得ることができた。$(fPro^{R}\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ は目的物が得られず、これは fPro のパッカリングの影響による立体障害が関係しているものと考察した。

得られた３種の二置換体は、何れも低温でトリプルヘリックスを形成するが、一般則の予想とは異なり$(Hyp^{S}\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$ と$(fPro^{S}\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ は、それぞれ$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$ と$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ よりも不安定で、一方$(Hyp^{R}\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$ は、$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$ と同等の熱安定性を示す事がわかった。これらの結果は、先の一般則によるトリプルヘリックスの安定性の説明には普遍性の無い事を示した。さらに、今回合成した Hyp の二置換体は一置換体と同様に、fPro の二置換体よりも ΔH および ΔS が大きい傾向を持つ事が分かった。我々は、一置換体の$(Pro\text{-}Hyp^{R}\text{-}Gly)_{10}$、$(Pro\text{-}fPro^{R}\text{-}Gly)_{10}$ および$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{10}$ の転移に伴う熱力学量と部分モル体積を求め、熱力学量を水和の観点から説明する研究を既に行っており、ここでの二置換のモデルペプチドの熱安定性についても、同様に熱力学量と水和との関係を今後検討する必要があるものと考える。

論文審査の結果の要旨

土井正光君はコラーゲン分子の三本鎖ヘリックス構造の安定化要因を合成化学ならびに物理化学の両面から解析した。すでにコラーゲンと同様に低温で三本鎖ヘリックス構造をとり高温では一本鎖ランダム構造をとることが知られている$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_{n}$ において Pro をヒドロキシプロリン（Hyp）やフルオロプロリン（fPro）に置換したとき、その熱安定性に大きな変化が生じることが示されていた。まず、土井君はこの置換の位置および立体化学特異性に興味を持ち、今まで合成されていなかった$(fPro^{R}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{n}$ や$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{n}$、両者の Pro を Hyp や fPro で置換した一連の誘導体の合成を試みた。そのために、原料である $fPro^{R}$ と $fPro^{S}$ の合成法を種々検討し、両者を効率よく得る手法を確立した。次に、$(Hyp^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{n}$ と$(fPro^{S}\text{-}Pro\text{-}Gly)_{n}$ の場合、前者は三本鎖を形成しないが、後者は三本鎖を形成するといった、Hyp と fPro による置換の影響に差があることを実証した。さらに$(Hyp^{R}\text{-}Hyp^{R}Gly)_{n}$ や$(Hyp^{S}\text{-}Hyp^{R}Gly)_{n}$ のような Hyp による２置換体や、$(fPro^{S}\text{-}fPro^{R}Gly)_{n}$ のような fPro による２置換体が三本鎖構造をとるが、その安定性に加成性が存在しないという事実を見出した。さらに、これら一連の誘導体について熱力学的考察を行い、三本鎖安定化に及ぼすエンタルピーの寄与と、エントロピーの寄与を分離して考察できる可能性を示した。このように土井君の本論文は、コラーゲン分子の三本鎖構造の安定化原理の解明に寄与するのみならず、アミノ酸側鎖の水酸化の寄与といった蛋白質の翻訳後修飾の意義を明らかにするといった生命科学の重要な現象解明に貢献するもので、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認められる。