



Title	コラーゲン三重螺旋構造の熱安定性とフォールディング機構の解明
Author(s)	河原, 一樹
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49669
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	かわ 河	はら 原	かず き 樹
博士の専攻分野の名称	博 士（薬 学）		
学 位 記 番 号	第 2 2 8 7 3 号		
学 位 授 与 年 月 日	平 成 21 年 3 月 24 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	コラーゲン三重螺旋構造の熱安定性とフォールディング機構の解明		
論 文 審 査 委 員	(主査) 准教授 大久保忠恭 (副査) 教 授 宇野 公之 教 授 小比賀 聡 教 授 小林 資正		

論 文 内 容 の 要 旨

コラーゲンは、皮膚や骨などの結合組織を構成する主要な蛋白質であり、三重螺旋構造を形成することで組織維持に必要な強度と弾力性を獲得している。三重螺旋構造中の各ポリペプチド鎖はX-Y-Glyのトリプレットから構成され、X、Yの位置の多くはProなどのイミノ酸が占める。特に、Yの位置のProは、翻訳後修飾によって、4(R)-ヒドロキシプロリン(Hyp^R)に変換されることが知られ、生育温度が高い動物のコラーゲンほどHyp^Rの含有率が高い傾向があることから、Hyp^Rは三重螺旋構造の安定性獲得に重要な役割を果たしていると考えられている。コラーゲンの繊維性から、これまでの研究は主にモデルペプチドを使用して行われ、(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀が低温で三重螺旋構造を形成し、同じく三重螺旋構造を形成する (Pro-Pro-Gly)₁₀に比べて一本鎖状態への転移温度が約30°C上昇することから、Hyp^Rは三重螺旋構造の熱安定性を増加させることが実験的に証明された。以来、Hyp^Rの安定化機構を説明する為に様々な説が提案され、その中でも、(Pro-Pro-Gly)₁₀の結晶構造中においてProが配列中の位置により特徴的なピロリジン環のパッカリングを持つことが観測されたことから提唱された「三重螺旋構造の形成にはイミノ酸のパッカリングがX位でdown型、Y位でup型になる必要がある」とする説が注目された。この説に従えば、ヒドロキシル基の電子求引効果のためにHyp^Rはup型の傾向が強くなるとする量子化学計算の結果と併せて、Y位におけるHyp^Rの三重螺旋構造の安定化機構はパッカリングの固定であると説明できる。

本学位論文において、申請者は先ず(Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀の合成を行った。このペプチドはX位にHyp^Rを導入した場合に、上記の説から不安定化が起こることを期待して合成された。しかし、円二色性 (CD) スペクトルの結果から、(Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀は(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀と同程度の熱安定性を持つという予想に反した結果が得られた。この結果はパッカリングの組み合わせがX位でup型、Y位でup型であっても安定な三重螺旋構造が形成可能であることを示している。その事を構造学的に証明する為、X線単結晶構造解析による立体構造の決定を行った。その結果、1.5 Åの高分解能で (Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀の立体構造を決定することに成功し、X位でup型、Y位でup型のパッカリングをとることを実験的に証明することで、パッカリングの組み合わせが三重螺旋構造形成に必須ではないことを始めて示すことが出来た。加えて、(Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀の三重螺旋構造のヘリックス様式は(Pro-Pro-Gly)₁₀と同じであることも示された。

高分解能の結晶構造が得られると、溶媒とペプチドとの水素結合を介した相互作用を観測することができる。その結果を、(Pro-Pro-Gly)₁₀、(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀、そして(Hyp^R-Hyp^R-Gly)₁₀の構造間で比較することにより、Hyp^Rを含むモデルペプチドの三重螺旋構造の安定化機構は、溶媒との相互作用によって説明できるという結論を得た。即ち、(Pro-Pro-Gly)₁₀に比べ、他の二種類のペプチドは溶媒分子を介した水素結合のネットワークの数が増加しており、そのことが三重螺旋状態を安定化させていると考えた。この結論に定量性を持たせる為、各ペプチドの溶

液中における密度測定の結果から水和の量を算出した。その結果、 $(\text{Hyp}^R\text{-Hyp}^R\text{-Gly})_{10}$ は $(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}$ に比べ水和量が大きいが、 $(\text{Pro-Hyp}^R\text{-Gly})_{10}$ と同程度であることがわかり、結晶構造中で観測された水素結合ネットワークの比較の結果との相関も認められた。しかし、上記の結果は、 $(\text{Hyp}^R\text{-Hyp}^R\text{-Gly})_{10}$ が $(\text{Pro-Hyp}^R\text{-Gly})_{10}$ に比べて転移時の熱力学量変化 ΔH と ΔS が明らかに小さくなるとする示差走査熱量計(DSC)の測定結果を説明することが出来なかった。つまり、三重螺旋構造の安定化を議論するためには、変性状態などの三重螺旋構造以外の状態の物性も考慮する必要があることが示唆された。そこで、CD測定の結果を参考に、各ペプチドの転移は単純な二状態反応で表され、変性状態はランダムコイル状態であるとする仮定の基に、変性状態の水和の程度を求めたところ $(\text{Hyp}^R\text{-Hyp}^R\text{-Gly})_{10}$ のみ有意に水和の程度が高いとする結果を得ることに成功し、溶媒との相互作用の違いから各ペプチドの熱力学データの差を説明することが出来た。但し、各ペプチドに対して上記の仮定が成立する保証はなく、その妥当性を検討する必要がある。

三重螺旋状態の構造はX線単結晶構造解析法により調べることが出来るが、変性状態の構造情報やそれがどのような機構で三重螺旋構造を形成するかという上記の仮定の検証に必要な動的情報を議論するには、核磁気共鳴(NMR)法などを使う必要がある。しかしながら、コラーゲンの物性研究にNMR法を適用した場合、配列に多く含まれるイミノ酸のシス/トランス異性化反応を反映した多くのコンフォメーション状態から生じる多数の信号がスペクトル上で複雑に重なり合ってしまう為、 ^1H 、 ^{13}C 、そして ^{15}N などの一般的な観測核では解析が困難であった。この信号の重なりの問題を解決する為、申請者は4(R)-フルオロプロリン(fPro^R)を導入したモデルペプチド $(\text{Pro-fPro}^R\text{-Gly})_n$ 及び $(\text{Pro-Hyp}^R\text{-Gly})_m\text{-(Pro-fPro}^R\text{-Gly)-}(\text{Pro-Hyp}^R\text{-Gly})_{6-m}$ ($m=0\sim 6$)を合成し ^{19}F -NMR法によるアプローチを試みた。 ^{19}F 核の化学シフトは、核周辺の小さな環境変化に敏感であり化学シフトが広範囲に分散する傾向を持つ為、信号の分離が期待できる。その結果、 ^1H -NMRに見られる重複した信号パターンとは対照的に、 ^{19}F 核の化学シフトが広範囲に分散することを観測することに成功し、温度変化実験、異種核相関実験、そして緩和測定を組み合わせることで観測された各信号には三重螺旋状態や一本鎖状態だけでなく中間状態に由来する信号も含まれていることが示された。更に、 ^{19}F - ^{19}F 二次元交換実験を行い各構造状態間の平衡関係を解析することで、コラーゲン三重螺旋構造の中間状態を含むフォールディング機構のモデルを初めて提案した。

興味深いことに、 ^{19}F -NMR測定の結果から、コラーゲン三重螺旋構造のフォールディングは従来まで仮定されていた単純な二状態モデルで表されるのではなく、より複雑なものであることが明らかになった。今後、様々な配列のモデルペプチドに構造プローブとして fPro^R を部位選択的に導入し、今回提案したフォールディング機構が各ペプチドに共通のものかどうかを検討する必要があるものの、上記の結果から、 ^{19}F -NMR法がモデルペプチドの変性状態及びそれが三重螺旋構造に至るフォールディング機構を研究する為の優れた手法であることを見出した。

以上、本学位論文で用いられた手法は、今後、コラーゲンの熱安定性の研究を更に進展させることが予想されるだけでなく、他の蛋白質やペプチドの熱安定性を解明する際にも、非常に重要な情報を与えることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者はX線結晶解析及びNMRを主とした構造生物学的アプローチにより、皮膚や骨などの結合組織の主要成分である蛋白質コラーゲンの三重螺旋構造の熱安定性とフォールディング機構の解明を行った。コラーゲン中のPro残基は翻訳後修飾によって Hyp^R 残基に変換され三重螺旋構造は安定化するが、その安定化機構は解明されていなかった。申請者はX線結晶解析法により1.5 Åの高分解能でコラーゲンモデルペプチド $(\text{Hyp}^R\text{-Hyp}^R\text{-Gly})_{10}$ の立体構造を決定することに成功した。その結果、イミノ酸のバックリングの組み合わせが三重螺旋構造形成に必須ではないことを示し、 Hyp^R 残基を含むモデルペプチドの三重螺旋構造の安定化に溶媒との相互作用が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、三重螺旋構造の安定化を議論するためには、変性状態などの三重螺旋構造以外の状態の物性も考慮する必要があることを示し、溶媒との相互作用の違いから各ペプチドの熱力学データの差を説明した。フォールディング機構の解明に関しては、 fPro^R 残基を導入したコラーゲンモデルペプチドを合成し ^{19}F -NMR法によるアプローチを行った。その結果、コラーゲン三重螺旋構造のフ

ォールディングは従来まで仮定されていた単純な二状態モデルで表されるのではなく、より複雑なものであることを明らかにした。そして、 ^{19}F -NMR法を用いてこれまでに解析困難であった変性状態及びフォールディング機構を解明する手法を新たに開発した。

上記の成果はコラーゲンの熱安定性とフォールディング機構の解明に向けた基盤となるもので、生体材料や医薬品として用いられているコラーゲンの作用に関して有用な知見を与えるものと考えられ博士(薬学)の学位論文として相応しいものと認める。