

Title	ピロリジン環パッカーリングがコラーゲン構造の安定性に及ぼす影響の構造学的研究
Author(s)	元岡, 大祐
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59420
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	もと おか だい すけ 元 岡 大 祐
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 25165 号
学位授与年月日	平成24年3月22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	ピロリジン環パッカリングがコラーゲン構造の安定性に及ぼす影響の構造学的研究
論文審査委員	(主査) 教 授 大久保忠恭 (副査) 教 授 宇野 公之 教 授 小比賀 聡 教 授 高木 達也

論文内容の要旨

哺乳動物中に最も多く存在する蛋白質であるコラーゲンは、骨・皮膚・腱などを形成する構造蛋白質や細胞外マトリックスの主要な構成成分として重要な役割を担っている。コラーゲンは、X-Y-グリシン(X-Y-Gly)の繰り返しアミノ酸配列を有する三本のペプチド鎖が絡み合って三重螺旋構造を形成している。また、そのXやYの位置にはイミノ酸であるプロリン(Pro)やProが翻訳後修飾された(2*S*,4*R*)-ヒドロキシプロリン(Hyp^R)が多く存在している。X-Y-Glyの単純な繰り返し配列にも関わらず三重螺旋構造という特徴的な立体構造を形成することから、コラーゲンは会合を含む蛋白質のフォールディング研究の一つの良いモデルとされてきた。また、高次構造を形成し易い性質と生体適合性の高さからハイドロゲル等のバイオマテリアルや温度応答性ドラッグデリバリーシステム(DDS)の担体としての利用が試みられており、その際に、随意的熱安定性を示す合成コラーゲン設計法の確立が重要となってきた。しかし、コラーゲン三重螺旋構造の安定化機構は未だ十分に解明されていない。

天然のコラーゲンは分子量が大きく、また線維を形成して不溶化し易いため、これまで(Pro-Pro-Gly)₁₀や(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀などのモデルペプチドを用い、三重螺旋構造の安定化機構解明に向けて様々な研究が行われてきた。中でもモデルペプチドの構造に関する研究では、(Pro-Pro-Gly)₁₀のX線結晶構造解析によりProの側鎖構造に位置特異性が見出された。Proは、Xの位置ではdownのパッカリングを、Yの位置ではupのパッカリングをとっており、このことから三重螺旋構造の形成には、イミノ酸のピロリジン環パッカリングがdown-up-Glyの組み合わせをとることが重要であるとのモデルが提案された。そして実際に、down-up-Glyの組み合わせをとり易い多くのコラーゲンモデルペプチドが三重螺旋構造を形成することが確認された。しかしながら、低分子結晶構造解析によりdownのパッカリングをとることが知られている(2*S*,4*S*)-ヒドロキシプロリン(Hyp^S)をXの位置に、downとupのいずれのパッカリングもとることができるProをYの位置に含むモデルペプチド(Hyp^S-Pro-Gly)₁₀は、三重螺旋構造を形成しなかった。そのため、Hyp^Sがコラーゲン三重螺旋構造の熱安定性に及ぼす影響について疑問点が残されていた。

そこで申請者は、本学位論文において、Hyp^Sを含むコラーゲンモデルペプチドについて構造学的観点から研究を行なった。まずモデルペプチド(Pro-Pro-Gly)_nの熱安定性が、その重合度(*n*)依存的に上昇するとの過去の報告を参考にして、三重螺旋構造の形成が確認できない(Hyp^S-Pro-Gly)₁₀もその重合度を高めることで熱安定性が向上し、三重螺旋構造を形成しうるのではないかと考え、重合度を高めた(Hyp^S-Pro-Gly)₁₅を新たに合成した。円偏光二色性測定および超速心分析による分子量の算出を行い、Hyp^S-Pro-Glyの繰り返し配列を持つモデルペプチドは三重螺旋構造形成能があることを初めて示した。また示差走査型熱量計を用い、三重螺旋構造から一本鎖状態への構

造転移に伴う熱力学量を調べた。これにより、(Hyp^S-Pro-Gly)₁₅の構造転移の中間温度は22.4 °Cであり、(Pro-Pro-Gly)₁₅の63.1 °Cより40.7 °C低いことがわかった。また、(Pro-Pro-Gly)₁₅に対する(Hyp^S-Pro-Gly)₁₅の熱安定性の低下は、主としてエンタルピー減少の寄与が支配的であり、36.0 kJ/molのエンタルピー的損失があることを明らかにした。

得られた熱力学量を解釈するために、Hyp^S-Pro-Glyの繰り返し配列を含むモデルペプチド(Pro-Hyp^R-Gly)₄(Hyp^S-Pro-Gly)₂(Pro-Hyp^R-Gly)₄の立体構造をX線結晶構造解析により1.36 Åの分解能で決定した。Hyp^S-Pro-Gly配列は、三重螺旋構造の熱安定性を大きく低下させるにもかかわらず、他のモデルペプチドと同様の主鎖構造を維持していることが明らかとなった。一方で側鎖構造について、Hyp^Sは約70%(126残基中89残基)が浅いdownのバックリングを、残りがupのバックリングをとっていることを明らかにした。このHyp^Sのバックリングは、これまでにX線結晶構造により明らかにされてきた他のモデルペプチドのXの位置における典型的なバックリングとは異なる構造であった。典型的なdownバックリングをとったHyp^Sを用いて三重螺旋構造モデルを組み立ててみると、Hyp^Sは隣接するペプチド鎖と立体障害を起こす。この立体障害を避けるためには、Hyp^Sのバックリングは、浅いdownやupをとらざるを得ないということがわかった。Hyp^Sのバックリングが三重螺旋構造に適したバックリングからずれたことが、熱安定性を低下させている原因の一つであることが示唆された。

詳細な構造情報を得る上でX線結晶構造解析法は非常に有効な手法であるが、一般に繊維蛋白質の結晶化は難しく、多数のモデルペプチドの構造情報を得るには時間がかかることが問題となる。そこで、モデルペプチドの詳細な立体構造情報を得るための異なるアプローチも必要であると考え、計算科学的手法による安定構造の探索に取り組んだ。バックリングを考慮したHyp^Sの分子力場作成と分子動力学シミュレーションにより、(Pro-Pro-Gly)₁₅および(Hyp^S-Pro-Gly)₁₅の安定構造の探索を行った。シミュレーションにより明らかにしたバックリングは、両モデルペプチド共にXの位置ではdown、Yの位置ではupを主にとっていた。またHyp^Sは、Xの位置のProよりも浅いdownのバックリングをとり易い傾向があることがわかった。これらの傾向は、X線結晶構造解析より明らかにしたモデルペプチドのバックリングの傾向をよく反映しており、本手法がコラーゲン三重螺旋構造やその安定化機構を探るための有効な手法となり得ることが示された。さらに、三重螺旋構造の安定性に重要な主鎖間水素結合の数が、(Pro-Pro-Gly)₁₅よりも(Hyp^S-Pro-Gly)₁₅の方が少ないことがわかった。(Hyp^S-Pro-Gly)₁₅の主鎖間水素結合数の減少が、三重螺旋構造の熱安定性の低下に寄与していることを示唆する結果が得られた。

本研究により、ピロリジン環バックリングがコラーゲン三重螺旋構造の安定性に及ぼす影響について、従来の研究の疑問点を解消することができた。これらの研究成果は、コラーゲンまたはコラーゲン模倣分子の構造安定性を調整するために活用でき、より有用なバイオマテリアルを設計するといった応用が期待される。また、他の蛋白質についても、各アミノ酸が立体構造、機能や熱安定性に及ぼす寄与を解明する際に重要な手がかりを与えるだろう。

論文審査の結果の要旨

本研究で申請者はコラーゲン構造の安定性研究のために系統的にコラーゲンモデルペプチドの合成を行い、生物物理学的研究及び構造生物学的研究手法を駆使して、ピロリジン環のバックリングがコラーゲン三重螺旋構造の形成に果たす役割を解明した。コラーゲンはハイドロゲル等のバイオマテリアルや温度応答性ドラッグデリバリーシステムの担体としての利用が試みられており、その際に、随意の熱安定性を示す合成コラーゲン設計法の確立が重要となってきたが、しかし、コラーゲン三重螺旋構造の安定化機構は十分に解明されていなかった。そこで申請者はコラーゲンを構成する主要アミノ酸であるプロリン(Pro)とヒドロキシプロリン(Hyp)、その立体異性体である(2S,4S)-Hyp(HypS)を系統的に組み合わせた複数のモデルペプチドを化学合成した。円偏光二色性測定および超遠心分析による分子量の算出を行い、HypS-Pro-Glyの繰り返し配列を持つモデルペプチドは三重螺旋構造形成能があることを初めて示すとともに、示差走査型熱量計を用いて三重螺旋構造から一本鎖状態への構造転移に伴う熱力学量を明らかにした。得られた熱力学量を詳細に解釈するために、HypS-Pro-Glyの繰り返し配列を含むモデルペプチドの立体構造をX線結晶構造解析により高分解能で決定することに成功した。鎖間の立体障害を回避するためにピロリジン環のバックリングが適度に変化して三重螺旋構造を安定化していることが明らかとなった。さらに、計算科学的手法を導入してモデルペプチドの安定構造を新規に探索する

手法を確立した。本手法により静的立体構造情報だけでなく動的に分布する立体構造情報も得ることが可能となり、ピロリジン環のバックリングがコラーゲン三重螺旋構造の形成に果たす役割の解明に成功した。

上記成果はコラーゲンの関与するバイオマテリアルの開発に関して有用な知見を与えるものであると考えられ博士(薬学)の学位論文として相応しいものと認める。