



Title	ポリアクリル酸との複合体形成に伴うコラーゲンモデルペプチド三重らせん構造の安定化挙動
Author(s)	喜田, 裕介; 寺尾, 憲; 佐藤, 尚弘
Citation	高分子論文集. 2010, 67(12), p. 686-689
Version Type	AM
URL	https://hdl.handle.net/11094/77679
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

[一般論文]

ポリアクリル酸との複合体形成に伴うコラーゲンモデルペプチド 3 重らせん構造の安定化挙動

喜田 裕介^{*1}・寺尾 憲^{*1}・佐藤 尚弘^{*1}

^{*1} 大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻

(〒560-0043 大阪府豊中市待兼山町1-1)

和文要旨

コラーゲンモデルペプチドの一つである (Pro-Pro-Gly)₅ (以下 PPG5 と略す) が 10mM の LiClO₄ を含むメタノール中でポリアクリル酸 (PAA) と複合体を形成することを見出した。PPG5 の質量濃度を $3.23 \times 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ とした場合、PAA と PPG5 のモル比 C_p/C_c が 0.06 と 0.3 のものについては濁りが見られたのに対し、 $C_p/C_c=3$ の溶液は透明であり、動的光散乱測定からも巨大な会合体はほとんど存在しないことがわかった。この溶液及び、PPG5 単独溶液について円二色性測定を行い、前者の 3 重らせん-1 本鎖の転移温度が後者よりも約 30 K 高いこと、すなわち、少量の PAA 鎖の存在によって、PPG5 の 3 重らせんが著しく安定化されることが見出された。さらに、この現象が PPG5 と PAA 間の解離会合平衡によって説明できることを示した。

1 緒言

(Pro-Pro-Gly)や(Pro-Hyp-Gly)などの繰り返し単位を持つペプチド鎖は、比較的短いものでも水やアルコール中で 3 重らせん - 1 本鎖の可逆的なコンホメーション転移を示す[1,2]ため、コラーゲンのモデルペプチドとして多くの研究がある[3-8]。様々なコラーゲンモデルペプチドの化学構造と 3 重らせんの安定性との相関は、コラーゲンの生化学的な特性を知るためのモデルとして現在でも活発に研究されている。実際、3 重らせん構造の温度に対する安定性は、鎖長や溶媒・濃度に強く依存する。モデルペプチドの片末端を共有結合やそのほかの相互作用によって空間的に束縛した場合にも著しい安定化が報告されている[9-13]。

本研究の予備実験の段階で、我々はコラーゲンモデルペプチドがメタノール溶液中でポリアクリル酸と複合体を形成することを見出した。複合体の形成によりモデルペプチド鎖の局所濃度は単独で分散している場合と大きく異なることが予想されることから、その 3 重らせん構造の安定性にも強い影響を与えることが示唆される。そこで本研究では、メタノール中室温付近で 3 重らせん構造が形成される(Pro-Pro-Gly)₅ (以下、PPG5 と略す) とポリアクリル酸のメタノール溶液を混合し、目視観察より複合体形成を確認した。さらに PAA 濃度を高くして得られた透明な溶液について動的光散乱測定を行い、複合体の分散性を調べると共に、温度を変えて円二色性を測定することにより、複合体形成に伴う PPG5 鎖の 3 重らせん構造の安定性について調べた。

2 実験

PPG5 には (株) ペプチド研究所の試料を、ポリアクリル酸には Polymer Source 社の数平均分子量 $M_n = 20000$ 、重量平均分子量 M_w と M_n の比 $M_w / M_n = 1.09$ (共に添付のデータシートによる)の試料 (PAA323) を用いた。後者の試料について Beckman Optima XL-I 分析用超遠心機を用いた沈降平衡測定を 150 mM の食塩水中 25°Cで行い、波長 $\lambda_0 = 675$ nm の半導体レーザーを用いて得た干渉図形を解析し、 M_w を 2.33×10^4 、 z -平均分子量と M_w の比を 1.04 と決定した。得られた M_w よりこの試料の重量平均重合度を 323 と見積もった。ただし、溶媒に対して透析した PAA323 溶液の示差屈折率増分 ($\lambda_0 = 675$ nm) と密度増分にはそれぞれ予め決定した $0.142 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ と 0.328 を用いた。

複合体溶液は以下の手順で調製した。まず、PPG5 のメタノール溶液を調製した後、必要

量の LiClO_4 及び PAA のメタノール溶液を加え、PPG5 の全溶液に対する質量分率 w_{PPG5} が 4.1×10^{-5} (25°Cでの質量濃度 c_{PPG5} で $3.23 \times 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ 、モル濃度 C_c で $25.3 \text{ }\mu\text{M}$ に相当)、 LiClO_4 のモル濃度が 10 mM 、そして PAA の質量分率が $w_{\text{PAA}} = 0 - 2.3 \times 10^{-3}$ の溶液を調製した。得られた溶液の PAA323 の PPG5 に対するモル比 C_p/C_c は $0 - 3.03$ である。

これらの溶液の内、 $C_p/C_c = 0, 0.00149, 0.0588, 3.03$ の溶液について、JASCO-J720WO 円二色性分散計を用い、モル橢円率を温度 (-10 から 55°C) 及び波長 ($210 - 300 \text{ nm}$) の関数として決定した。これらの C_p/C_c ($= 0.00149, 0.0588, 3.03$) に 323 を乗じて得た PPG5 のアクリル酸ユニットに対するモル比はそれぞれ $0.48, 19, 980$ に対応する。ただし、温度調節にはペルチェ型恒温装置を用い、温度変化速度(dT/dt)として $12, 30, 60 \text{ K/h}$ を採用した。また、 $C_p/C_c = 3.03$ の混合溶液と PAA323 単独溶液 (PAA の重量分率は共に 2.3×10^{-3} 、 25°C で $C_p = 76.7 \text{ }\mu\text{M}$ に相当) について動的光散乱測定を 15°C と 45°C で行い、複合体の分散状態を調べた。ただし、光散乱光度計には ALV/DLS/SLS-5000、光子相関計には ALV/5000E/WIN、光源には真空中の波長 $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ の YAG レーザーを用い、散乱角には 30° から 150° までの 13 点を選んだ。

3 結果および考察

本研究で取り扱った濃度領域で、PPG5 及び PAA323 は 10 mM の LiClO_4 を含むメタノールに良く溶解するのに対し、上述の方法で調製した PAA5 と PAA323 の混合溶液の内 $C_p/C_c = 0.0588, 0.303$ のものについては室温で白濁した後沈殿を生じた。またその濁りは PAA 濃度の上昇と共に強くなった。また、 $C_p/C_c = 0.0588$ の上澄み溶液については円二色性がほとんど検出されず、PPG5 はほとんど沈殿したことがわかる。さらに、一見透明に見えた $C_p/C_c = 0.00149$ の溶液についても、 $\lambda_0 = 230 \text{ nm}$ でのモル橢円率 $[\theta]_{230}$ は PPG5 単独溶液の $2/3$ 程度に減少しており、一部の PPG5 鎖は PAA323 鎖と複合体を形成し、沈殿したと考えられる。以上から、メタノール中で PPG5 と PAA323 が複合体を形成したことがわかるが、その駆動力として主に PAA 鎖のカルボキシル基と PPG 鎖の N 末端間の静電的相互作用或いは PAA 鎖のカルボン酸と PPG 鎖の末端アミノ基間の水素結合が挙げられる。これを明らかにするためには、末端の化学構造の異なるモデルペプチドを用いるなどの詳細な検討が必要と考えられる。いずれにせよ PPG5 の濃度がかなり低いにもかかわらず極めて広い混合比の範囲で複合体が形成されることが分かる。

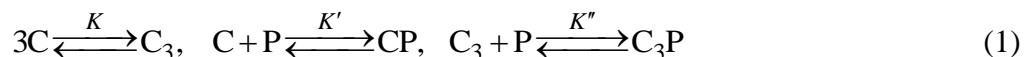
他方、更に高い PAA 濃度を持つ $C_p/C_c = 3.03$ の溶液については目に見える白濁は生じなかった。これは、PAA 過剰の条件では、PAA 鎖に複数の PPG 鎖が結合した、メタノールに対する溶解性の低い複合体が形成される確率が減るためと考えられる。この溶液の動的光散乱測定から見積もったみかけの流体力学的半径は 15℃、45℃共に 8.2 nm であり、PAA 単独溶液からの値 7.8 nm とほとんど変わらなかった。すなわち、PAA が過剰な溶液では、PAA を複数本含む会合体はほとんど存在しないと考えられる。そこで、この溶液に対する円二色性の温度依存性から、PAA323 存在下での PPG5 の転移挙動を調べた。Figure 2 に、この混合溶液の温度変化の速度(dT/dt)を 12 K h^{-1} とした場合の転移曲線を、PPG5 の単独溶液に対するデータと共に示す。低温側と高温側で混合溶液の $[\theta]_{230}$ が PPG5 単独溶液の場合と同じ値に収束しているように見えること、これらの温度での CD スペクトルの形状がほぼ同じであったこと、更には -10℃での波長 235 nm でのモル楕円率が文献[2]中に示されたメタノール中での 3 重らせんの値に近いことから、複合体中においても PPG5 が 3 重らせん - 1 本鎖の転移を示すことが分かる。

得られた転移曲線の低温側と高温側の直線領域 (Figure 2 中の細い実線) から、それぞれ各温度での 3 重らせん及び 1 本鎖に対応する $[\theta]_{230}$ を見積もると、らせん分率 50% に対応する $[\theta]_{230}$ は図中の破線で表され、この破線と転移曲線の交点かららせんの融解温度 T_m と形成温度 T_f を見積もった。PAA 添加により、 T_m は 2℃ から 40℃ に上昇している。PPG5 単独溶液中では、20℃でほぼ全ての鎖が 1 本鎖として存在しているのに対し、混合溶液中ではほぼすべてが 3 重らせん構造を保っていることがわかる。この時の PAA 鎖の重量分率は 2.3×10^{-3} に過ぎないことから、3 重らせん PPG5 は PAA 鎖と複合体を形成した状態で存在していると考えられるべきである。

PPG5 単独溶液のらせんの T_m と T_f がほぼ一致しているのに対し、複合体溶液の T_f は T_m よりも約 9℃低いことから、温度変化速度を変えて実験を行った。図には示さないが低温側及び高温側での $[\theta]_{230}$ は選んだ温度変化速度 (12 – 60 K/h) で、Figure 2 に示した結果とほぼ一致したのに対し、Figure 3 に示すように T_m と T_f の差は温度変化速度の上昇と共により顕著になる。このことは複合体形成に伴ってコンホメーション転移の速度も著しく遅くなることを示す。先に述べたように混合溶液中の 3 重らせんは PAA 鎖と必ず複合体を形成している、すなわち 3 本の PPG5 と PAA 鎖の計 4 本の鎖が集まらないと 3 重らせんが形成されないことが速度の低下の主因であると考えられる。他方、Figure 3 を用いて得た $(dT/dt)=0$ への T_f と T_m の外挿値はともに 36.5℃であり、温度変化を十分遅くすれば、PAA

存在下での PPG5 の転移も準静的に進行しているといえる。このようにして決めた熱平衡状態での $T_m = T_f$ は、単独溶液の 2°C と比較すると 30°C 以上高い。

次に、与えられた実験事実を元に、PAA 存在下での PPG5 の 3 重らせん構造安定化に対する理論的な考察を試みる。3 重らせん状態の PPG5 鎖が PAA 鎖と複合体を形成していること、単鎖 PPG5 も PAA 鎖と複合体を形成しうることを考慮すると、系が平衡状態である場合に、次の 3 種類の解離－会合平衡の存在が推測される。



ここで、C は PPG5 単一鎖、 C_3 は PPG5 の 3 重らせん、P は PAA 単一鎖、CP は PPG5 単一鎖と PAA 複合体、そして C_3P は PPG5 の 3 重らせんと PAA 複合体を表す。PAA が過剰に存在するため、1 本の PAA 鎖に複数の 1 本鎖または 3 重らせん PPG5 が結合した複合体の存在は無視する。3 つの平衡定数 K 、 K' 、 K'' の定義式と物質保存則を利用すると、

$$\begin{aligned} K &= [C_3]/[C]^3 \\ K' &= [CP]/[C][P] \\ K'' &= [C_3P]/[C_3][P] \\ C_c &= [C] + 3[C_3] + [CP] + 3[C_3P] \\ C_p &= [P] + [CP] + [C_3P] \end{aligned} \quad (2)$$

なる 5 元の連立方程式を立てることができ、それらを解くと 5 種類の高分子成分のモル濃度を計算できる。また、円二色性強度に比例するらせん分率 f は、次式から見積もられる。

$$f = \frac{3[C_3] + 3[C_3P]}{C_c} \quad (3)$$

C から C_3 への転移に伴うエンタルピー変化を ΔH 、また複合体 CP の形成に伴うエンタルピー変化を $\Delta H'$ とすると、平衡定数 K と K' の温度依存性は

$$K = K^{\circ} \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right), \quad K' = K'^{\circ} \exp\left(-\frac{\Delta H'}{RT}\right) \quad (4)$$

で与えられる。ここで、 R は気体定数、 T は絶対温度、 K° と K'° は比例定数である。さらに、 C_3 と P から C_3P が形成されるときのエントルピー変化が PPG5 鎖末端と PAA 鎖の相互作用に基づくと考え、 C と P から CP が形成される際の約 3 倍の自由エネルギー変化が期待され、 $K'' = K'^3$ なる関係が近似的に成立する。

PAA を含まない PPG5 だけの溶液に対する転移曲線は、 C_c と ΔH と K° を与えると計算できる。いま、 $C_c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 $\Delta H = -200 \text{ kJ/mol}$ 、 $K^{\circ} = 2.9 \times 10^{-29} \text{ M}^{-2}$ とすると、Figure 4 の一点鎖線が得られ、Figure 2 の PPG5 単独溶液に対する一点鎖線から得られる f に関する転移曲線をほぼ再現している。これに対して、PPG5 溶液に PAA を添加したときの転移曲線の計算には、さらに C_p と $\Delta H'$ と K'° を与える必要がある。Figure 4 の実線は、 $C_p/C_c = 3.03$ 、 $\Delta H' = -10 \text{ kJ/mol}$ 、 $K'^{\circ} = 10.5 \text{ M}^{-1}$ とした場合の f に関する転移曲線の計算結果である。ただし、 C_c と ΔH と K° の値は、PPG5 単独溶液のときと同じ値を用いた。転移温度および転移の鋭さに関して、Figure 2 の実線とよく対応している。また、この条件下では、 $[CP] \ll [C]$ であるが、 $[C_3P] \gg [C_3]$ であった。したがって、PAA 存在下での PPG5 の 3 重らせん安定化に、3 本の PPG 鎖と 1 本の PAA 鎖の複合化が必要であるという実験事実が、この理論で説明できることがわかる。

4 まとめ

本研究では、コラーゲンのモデルペプチドの一つである PPG5 がメタノール中でポリアクリル酸と複合体を形成すること、その形成に伴い、PPG5 の 3 重らせんが著しく安定化されることを見出した。そして、ポリアクリル酸添加による PPG5 の 3 重らせんの安定化を、式(1)に示した解離－会合平衡によって説明できることを示した。しかしながら、理論で用いたいくつかの仮定には、実験で直接証明されていないものが含まれており、現段階では提案した解離－会合平衡が、PPG5 の 3 重らせんの安定化の唯一の解釈であると断言はできない。この点をより明確にするためには、複合体形成の駆動力及び結合箇所、更には複合体の構造（モル質量・形態）についての直接的な実験的情報を得る必要がある。本研究で用いた系では複合体の分散性は必ずしも高くないことから、 C_p/C_c の範囲が限られ、円二色性以外の測定が困難であった。今後は、モデルペプチド・高分子・溶媒の組み合わせ

せを変え、複合体の分散性がより高い系に対して種々の実験を行い、複合体形成に伴う 3 重らせん構造の安定化の機序について、さらに詳細に調べる予定である。

文 献

- 1) Y. Kobayashi, R. Sakai, K. Kakiuchi, and T. Isemura, *Biopolymers*, 9, 415 (1970).
- 2) J. Engel, H. T. Chen, and D. J. Prockop, *Biopolymers*, 16, 601 (1977).
- 3) K. Okuyama and T. Kawaguchi, *Kobunshi Ronbunshu*, 67, 229–247 (2010).
- 4) K. Okuyama, *Connect. Tissue Res.*, 49, 299–310 (2008).
- 5) R. Berisio, A. De Simone, A. Ruggiero, R. Improta, and L. Vitagliano, *J. Pept. Sci.*, 15, 131–140 (2009).
- 6) B. Brodsky and A. V. Persikov, in “Advances in Protein Chemistry”, D. A. D. Parry and J. M. Squire, eds., Elsevier Academic Press, Amsterdam (2005), Vol. 70, p. 301.
- 7) K. Terao, K. Mizuno, M. Murashima, Y. Kita, C. Hongo, K. Okuyama, T. Norisuye and H. P. Bächinger, *Macromolecules*, 41, 7203 (2008).
- 8) T. Shikata, A. Minakawa, and K. Okuyama, *J. Phys. Chem. B.*, 113, 14504 (2009).
- 9) Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, and M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 10351 (1996).
- 10) S. Boudko, S. Frank, R. A. Kammerer, J. Stetefeld, T. Schulthess, R. Landwehr, A. Lusing, H. P. Bächinger, and J. Engel, *J. Mol. Biol.*, 317, 459 (2002).
- 11) S. Frank, S. Boudko, K. Mizuno, T. Schulthess, J. Engel, and H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.*, 278, 7747 (2003).
- 12) C. Kojima, S. Tsumura, A. Harada, and K. Kono, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 6052 (2009).
- 13) T. Suehiro, C. Kojima, S. Tsumura, A. Harada, and K. Kono, *Biopolymers*, 93, 640 (2010).

Stabilization of the Triple Helical Structure of a Collagen Model Peptide by Complexation with Polyacrylic Acid in Methanol

Yusuke KITA,*¹ Ken TERAOKA,*¹ and Takahiro SATO*¹

*¹ Department of Macromolecular Science, Graduate School of Science, Osaka University (1-1, Machikaneyama-cho, Toyonaka, Osaka 560-0043, Japan)

A collagen model peptide (Pro-Pro-Gly)₅ (PPG5) was complexed with polyacrylic acid (PAA) in methanol including 10 mM LiClO₄. While PPG5 solutions of a concentration $3.23 \times 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ were turbid at the molar ratios of PAA to PPG5 $C_p/C_c = 0.06$ and 0.3 , the solution was transparent at $C_p/C_c = 3$. Circular dichroism measurements on PPG5 solutions showed that the addition of PAA up to $C_p/C_c = 3$ increases the triple helix–coil transition temperature by ca. 30 K, indicating that the triple helical structure is significantly stabilized in the presence of small amounts of PAA. An association–dissociation equilibrium between PPG5 and PAA was proposed to explain the stabilization of the PPG5 triple helix by PAA.

Key Words: Collagen / Model Peptide / Complex /Triple Helix / Helix-Coil Transition

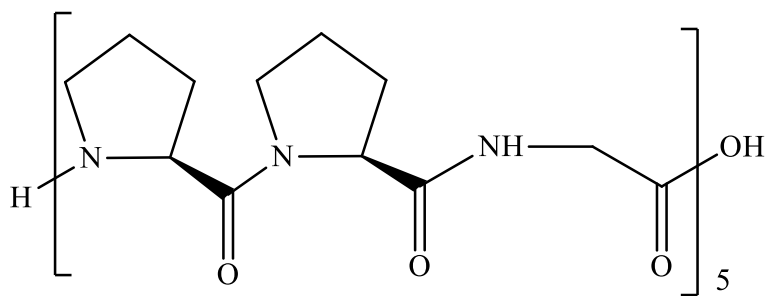
Figure captions

Figure 1. Chemical structures of PPG5 and PAA323.

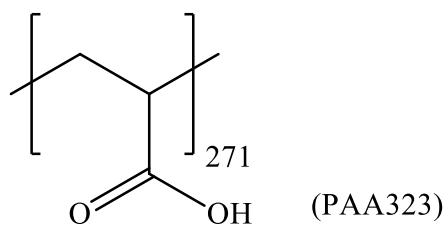
Figure 2. Temperature induced transition curves of PPG5 in MeOH including 10 mM LiClO₄ ($C_c = 25.3 \mu\text{M}$ at 25 °C) with (solid curve) and without (dot-dashed curve) PAA323 ($C_p = 76.7 \mu\text{M}$ at 25 °C).

Figure 3. Heating and cooling rate dependence of T_m (filled circles) and T_f (open circles) for PPG5 in MeOH containing 10 mM LiCO₄ and PAA ($C_p = 76.7 \mu\text{M}$ at 25 °C).

Figure 4. Theoretical triple helix-coil transition curves for PPG5 solutions with and without PAA ($C_c = 25.3 \mu\text{M}$).



H-(Pro-Pro-Gly)₅-OH (PPG5)



(PAA323)

Figure 1. Kita et al.

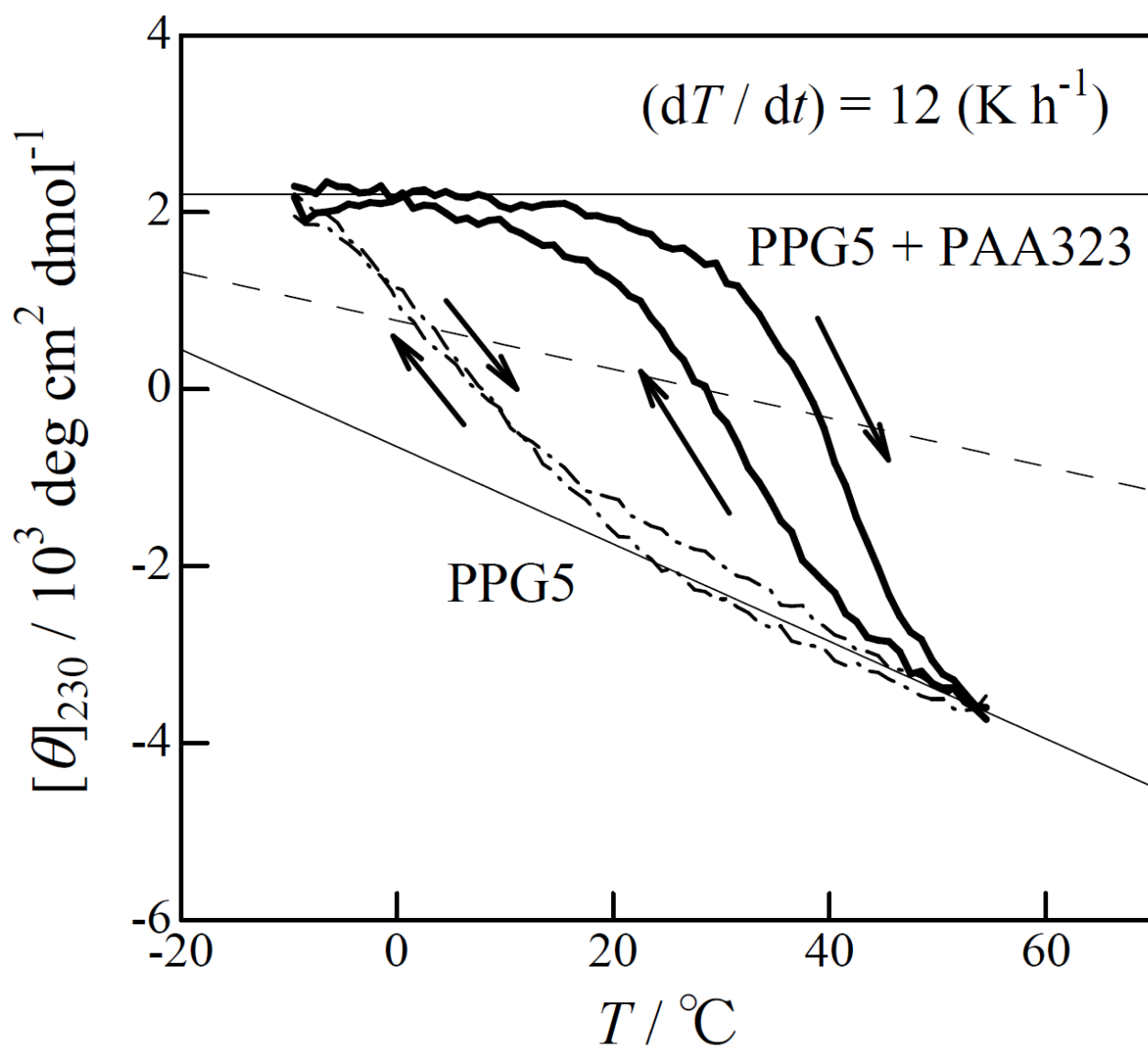


Figure 2. Kita et al.

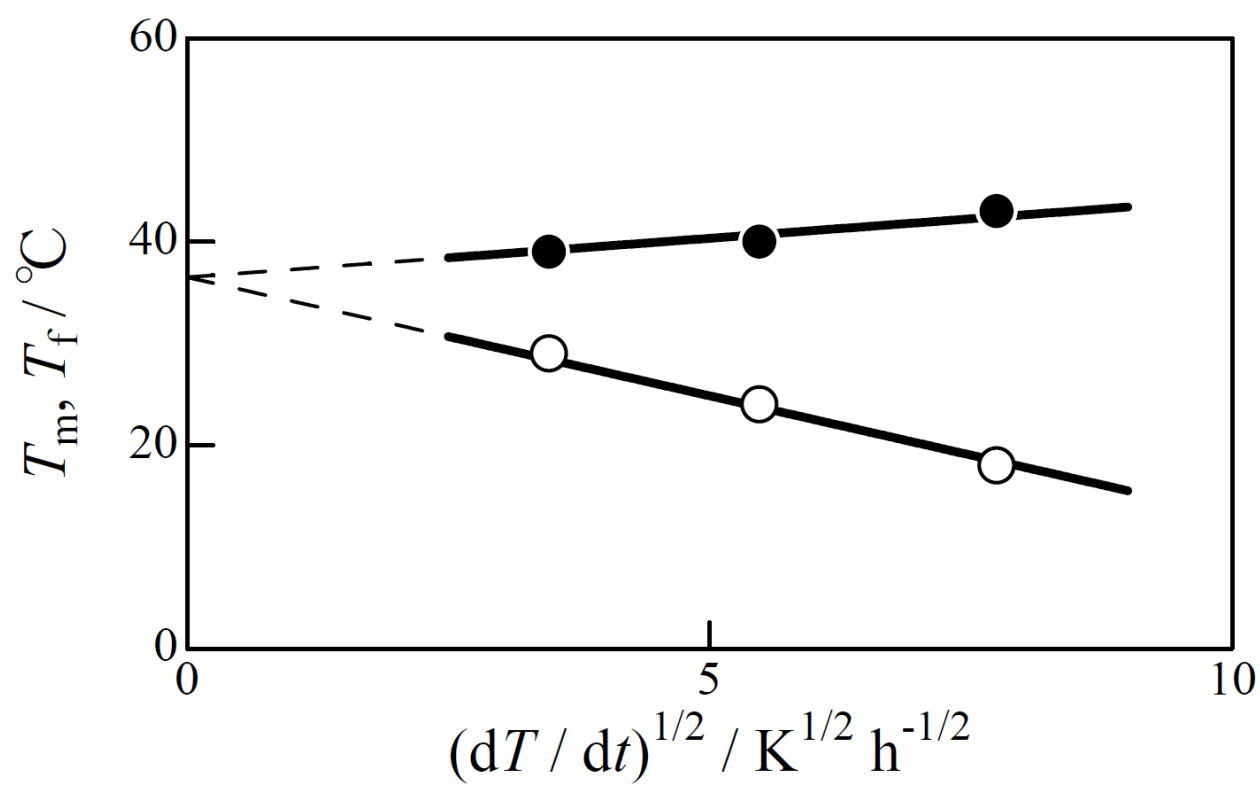


Figure 3. Kita et al.

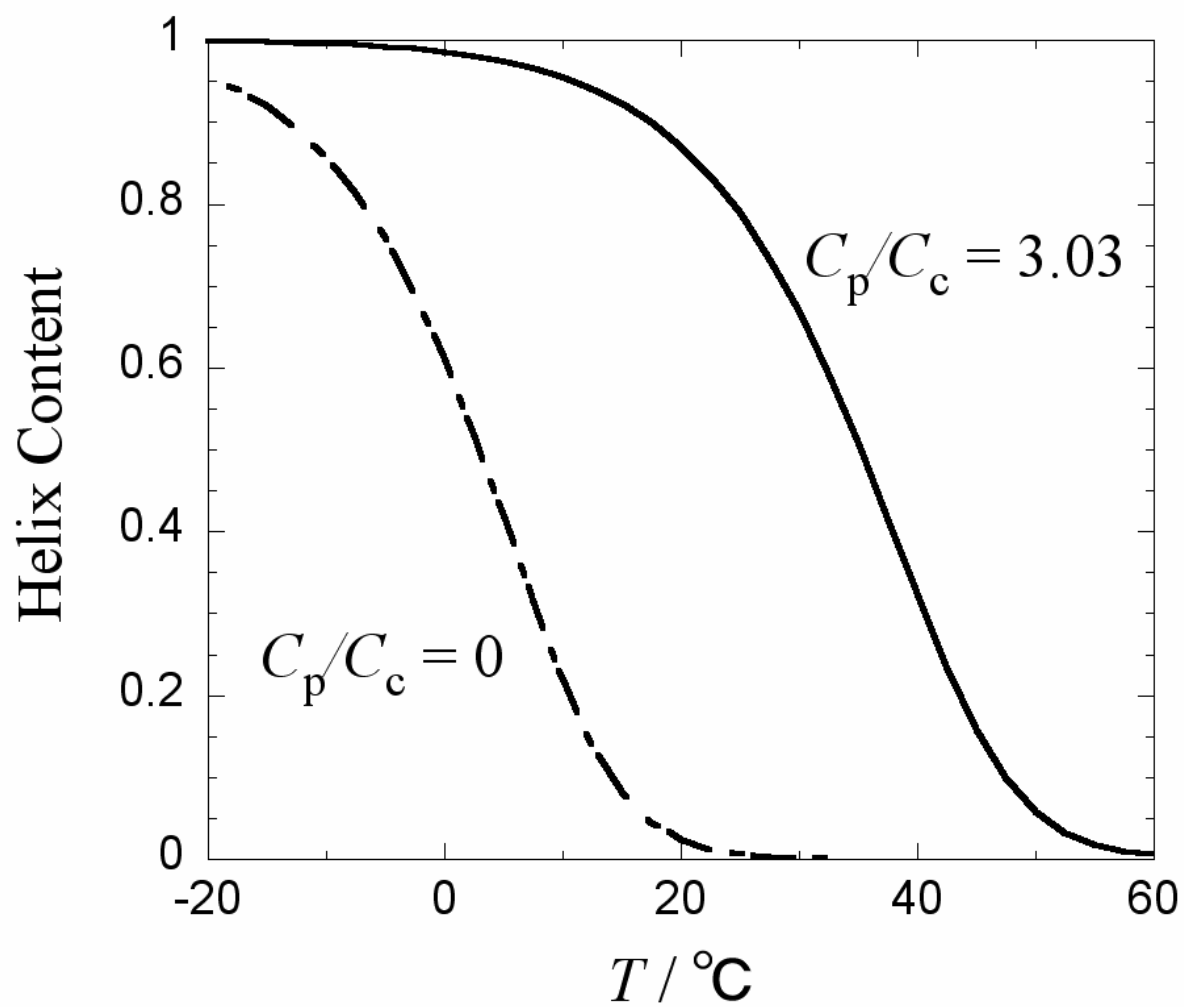


Figure 4. Kita et al.