

称号及び氏名	博士（工学）柿木佐知朗
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日
論文名	「Conformation Study of Proline-Related Polypeptides」 (プロリン関連ポリペプチドのコンホメーションに関する研究)
論文審査委員	主査 教授 河野 健司 副査 教授 白井 正充 副査 教授 長岡 勉

### 論文要旨

タンパク質はアミノ酸配列に対応した立体構造を形成することによって、その分子機能を発現している。したがって、アミノ酸配列と立体構造との対応関係を明らかにすることは、基礎科学としての生命現象の解明、および応用科学としての機能性分子の設計という視点から、重要な研究課題のひとつとなっている。近年、分光学的方法によるタンパク質の構造解析は急速に進展し、また、理論的方法の基盤も確立されつつある。しかしながら、未だその立体構造の形成原理の解明には至っていない。プロリンはタンパク質を構成している 20 種類の天然のアミノ酸の中で、立体構造形成において特異な役割をすることが知られている。そのプロリンをアミノ酸配列中に特徴的に有するタンパク質（プロリン関連タンパク質）には、コラーゲンやエラスチンのように特定の反復アミノ酸配列部分を有するプロリン型周期性タンパク質と、耳下腺唾液タンパク質のようにプロリンに富む非周期性アミノ酸配列部分を有するプロリンリッチタンパク質があり、その特徴的なアミノ酸配列により形成される立体構造が、プロリン関連タンパク質の分子機能との関連において注目を集めている。

本研究では、プロリン関連タンパク質のプロリンを含むアミノ酸配列部分のコンホメーション特性を系統的に明らかにすることを目的として、一連のプロリンを含むポリペプチド（プロリン関連ポリペプチド）を合成し、円二色性 (CD)

スペクトル測定等の分光学的方法と、分子力学・分子動力学を用いた理論的方法によるコンホメーション解析を試みた。また、ポリプロリンの温度応答性の機能性材料への展開も視点においた  $\gamma$  線照射によるコポリペプチドの架橋についても検討を試みた。本論文は9章から構成される。

第1章では、本論文の背景と目的についてまとめた。

第2章では、ポリ(プロリン)が形成するポリプロリン-I構造とポリプロリン-II構造の安定性に関する基礎的知見を得るため、残基数13、6、4のプロリンオリゴペプチドを固相法で合成し、水、トリフルオロエタノール(TFE)、メタノール、1-プロパノール中でのCDスペクトル測定を行った。また、構造最適化アルゴリズムを用いた分子力学計算と水媒体中における分子動力学計算も試みた。ポリ(プロリン)はアルコールに不溶であるため、プロリンオリゴペプチドについても純粋なアルコールには不溶という先入観から、水との混合溶媒系でのみ研究が行われてきた。本研究においては、この先入観を覆し、残基数13のプロリンオリゴペプチドが、メタノール、および1-プロパノールの純粋なアルコール系において、ポリプロリン-II構造からポリプロリン-I構造へ、通常のヘリックス-コイル転移に比べて極めて長い時間スケールで、構造転移することを初めて見出した。また、溶媒の極性の低下、および残基数の増加により、ポリプロリン-I構造の相対的安定性が増加することを明らかにした。この実験で見出した残基数依存性は、分子力学計算により求めた残基数依存性に一致した。さらに、水媒体中における分子動力学計算により、ポリプロリン-I構造に比べて残基間相互作用の小さいポリプロリン-II構造の方が、コンホメーションの揺らぎが大きいことを明らかにした。

第3章では、ポリプロリン-I構造とポリプロリン-II構造の特性をさらに詳細に検討するため、(Pro) $m$ -Xaa-(Pro) $n$ 型オリゴペプチド(Xaa=Ala, Gly, Lys)を固相法で合成し、実験的、理論的コンホメーション解析を行った。水、TFE中におけるポリプロリン-II構造はXaa残基部分で不連続になっていることを示すCDスペクトルが得られた。このことは分子力学により支持された。さらに、水溶液系における分子動力学計算の結果から、2つのポリプロリン-II構造がXaa残

基部分でヘアピン型に折れ曲がっていることも明らかになった。また、メタノール、および 1-プロパノール中における構造転移を示す CD スペクトルも、ポリプロリン-II 構造は Xaa 残基部分で不連続になっていることを支持した。

第 4 章では、プロリン連鎖間に介在する Xaa 残基数をさらに増やした (Pro)*m*-(Xaa)*k*-(Pro)*n* 型オリゴペプチド (Xaa=Ala, Gly) を固相法で合成し、実験的、理論的コンホメーション解析を行った。Xaa 残基部分におけるポリプロリン-II 構造の不連続性が、CD スペクトル測定と分子力学計算によりさらに明確になった。また、Xaa 残基数の変化、あるいは、Xaa 残基の違いにより、CD スペクトルは変化し、Xaa 残基連鎖部分、および、連結部分において Xaa 残基の特性に依存した折れ曲がり構造等の多様な局所構造の形成を示唆する結果となった。このことは水溶液系における分子動力学計算によっても支持された。プロリンリッチなアミノ酸配列部分は、これまで単純なポリプロリン-II 構造を形成していると思われてきた。しかしながら、第 3 章と第 4 章の結果より、ポリプロリン-II 構造を基本としつつも、配列特有の局所的構造をも包含する実に多様なコンホメーションを形成していることを明らかにした。

第 5 章では、プロリン関連ポリペプチドを機能性材料へと応用展開するための基礎研究として、縮合重合法によりプロリンとアラニンのランダム共重合体を合成し、低温臨界共溶温度以上における  $\gamma$  線照射による架橋生成を試みた。ポリプロリンと同様に、ランダム共重合体も低温臨界共溶温度を示し、アラニン組成の増加と共に上昇した。また、アラニン組成の大きい場合  $\gamma$  線照射によって低温臨界共溶温度は低下することが示された。

第 6 章では、反復アミノ酸配列における Pro 残基含率の変化により周期性ポリペプチドのコンホメーションがどのように変化するかを明らかにするために、Glu 残基と Pro 残基からなる poly(Glu-Pro-Pro-Pro)、poly(Glu-Pro-Pro)、および poly(Glu-Pro) を固相法と液相法により合成し、実験的、理論的コンホメーション解析を行った。水中では、poly(Glu-Pro-Pro-Pro) は局所的なポリプロリン-II 構造の存在を示唆する CD スペクトルを示したが、Pro 残基含率の減少によりポリプロリン-II 構造の安定性は低下し、poly(Glu-Pro) においては、ポリプロリン-II 構

造とは明確に異なるスペクトルとなることを明らかにした。この結果は水媒体中の分子動力学計算における poly(Glu-Pro-Pro-Pro)、poly(Glu-Pro-Pro)、および poly(Glu-Pro)の動的挙動の違いに一致した。また、メタノール中においても、Pro 残基含率の減少によりポリプロリン-II 構造の安定性は大きく低下した。さらに、TFE 中では、poly(Glu-Pro)において、折れ曲がり構造を基本とする新規の二次構造の存在を示唆する CD スペクトルが得られた。このことは poly(Glu-Pro)の分子力学計算の結果に一致した。

第 7 章では、反復アミノ酸配列中の Pro 残基含率がより小さい poly(Xaa-Xaa-Pro) (Xaa=Glu, Asp, Lys, Val, Leu)を固相法で合成し、実験的、理論的コンホメーション解析を行った。TFE 中では、すべての poly(Xaa-Xaa-Pro)が、またメタノール中では、poly(Glu-Glu-Pro)、poly(Asp-Asp-Pro)、poly(Val-Val-Pro)、poly(Leu-Leu-Pro)が、既存のすべての二次構造の CD スペクトルとは異なる特徴的なスペクトルを示した。さらに、分子力学計算により、反復アミノ酸配列に対応して、特有の新しい二次構造が安定な極小構造として存在することを明らかにした。

第 8 章では、反復アミノ酸配列中の Pro 残基含率を 0.25 まで小さくした poly(Xaa-Xaa-Xaa-Pro) (Xaa=Glu, Asp, Lys)を固相法で合成し、実験的、理論的コンホメーション解析を行った。メタノール、TFE-水の混合溶媒中では、poly(Glu-Glu-Glu-Pro)と poly(Asp-Asp-Asp-Pro)が、既存のすべての二次構造の CD スペクトルとは異なる特徴的なスペクトルを示した。また、分子力学計算により、反復アミノ酸配列に対応して、特有の新しい二次構造が安定な極小構造として存在することを明らかにした。さらに、この結果は、アミノ酸配列における含率 0.25 の Pro 残基の介在によって、通常合成ポリペプチド poly(Glu)の安定な二次構造である  $\alpha$ -ヘリックスが大きく不安定化することを意味しており、タンパク質の立体構造形成における Pro 残基の特徴的な役割を、アミノ酸配列の明確な周期性ポリペプチドにおいて初めて確認する結果となった。また水中において、3種類の周期性ポリペプチドはそれぞれ異なる CD スペクトルを示した。これまで荷電状態にあるポリペプチドのコンホメーションについては、

荷電型ランダムコイルという状態にあると考えられてきた。しかしながら、今回の実験結果より、荷電型ランダムコイルのコンホメーション集団としての特徴は、ポリペプチドを構成する個々の残基のコンホメーション特性を強く反映したものとなることが明らかになった。このことは、分子動力学計算における3種類の周期性ポリペプチドの動的挙動の違いからも支持された。第6章、第7章、第8章の結果を通じて、周期性ポリペプチドの安定なコンホメーションが反復アミノ酸配列中の Pro 残基含率、Xaa 残基の特性、および溶媒の種類に依存して大きく変化することが初めて系統的に明らかになり、タンパク質のアミノ酸配列と立体構造の対応関係解明における重要な基礎的知見が得られた。また、それぞれの新規の二次構造は、側鎖原子団の特徴ある空間配置を示し、機能性人工タンパク質分子の機能発現部位を支える基本骨格構造として、今後の応用展開という視点からも興味ある構造であることが明らかになった。

第9章では、本研究で得られた結果をまとめた。

## 審査結果の要旨

本論文は、タンパク質分子の立体構造形成において重要な役割をするアミノ酸であるプロリンに着目し、プロリンを含む種々のポリペプチドを合成し、そのコンホメーション特性について、分光学的手法による実験的検討と、分子力学の手法による理論的検討を行った結果をまとめたものであり、つぎのような結果を得ている。

- 1) ポリプロリン-Ⅱ構造からポリプロリン-Ⅰ構造への転移現象を純粋なアルコール系において初めて見いだした。また、鎖長と溶媒に依存して、2つの構造の相対的安定性が大きく変化することを明らかにし、さらに、コンホメーションの揺らぎについての分子論的検討を加えた。
- 2) プロリンリッチなアミノ酸配列部分は、ポリプロリン-Ⅱ構造を基本としつつも、

配列特有の局所的構造をも包含する多様なコンホメーションを形成していることを実験的理論的に示し、「プロリンリッチなアミノ酸配列部分は単一のポリプロリン-II構造を形成している」という既存の仮説に代わる新しい構造モデルを提案した。

- 3) プロリンとアラニンとからなるランダム共重合体の水溶液が下限臨界共溶温度を示し、この共重合体の水溶性が特定の温度において急激に変化すること、またこの共重合体の温度応答性挙動がγ線照射により変化することを明らかにし、機能性材料への応用展開へとつながる基礎的知見を得た。
- 4) プロリンを含む反復アミノ酸配列からなる種々のポリペプチドについて、反復アミノ酸配列に対応して、既存の二次構造とは異なる新規の二次構造が安定構造として存在することを円二色性スペクトルにより明らかにした。さらに、存在の予測される二次構造の相対的な安定性と反復アミノ酸配列との対応関係について、理論計算による評価を加えた。

以上の諸結果は、プロリン関連ポリペプチドのコンホメーション、および分子機能についての有用な知見を与え、タンパク質科学を始めとする基礎科学分野と、機能性材料の開発等の実用化をめざす研究分野において貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うに当たって十分な能力と学識を有することを証したものである。

### 3. 最終試験結果の要旨

審査委員会は、平成17年2月7日、委員全員の出席のもとに、申請者に論文内容の説明を行わせ、関連する諸問題について試問を行った結果合格と判定した。

4. 公聴会の日時

平成 17 年 2 月 7 日、午後 3 時 30 分～5 時 00 分

5. 審査委員会の所見

本委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、申請者に対して博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。