

棒状から星型への分子形態変化：C末端に結合ドメインをもつ三重らせんペプチドを例として

Conformational Change from Rigid Rod to Star: A Triple Helical Peptide with a Linker Domain at the C-terminal End

寺尾憲*

大阪大学大学院理学研究科高分子科学専攻、〒560-0043 豊中市待兼山町 1-1

Ken Terao*

Department of Macromolecular Science, Graduate School of Science, Osaka University, Toyonaka, 560-0043, Japan

1 はじめに

直鎖の合成高分子や生体高分子の分子形態は、熱擾乱によってゆらいでおり、その記述にみみず鎖モデルが有用であるのに対し、 α らせんや β シートのように分子運動が制限されている領域の構造は、X線結晶構造解析や NMR によってかなり精密に決まる。蛋白質中にも比較的揺らぎの大きい部分は存在しており、ランダムな構造と理解されているが、その長さはガウス鎖の極限とみなすには短すぎ、また、 α らせんや β シートなどとの相互作用も分子形態に影響している可能性があるため、それらの寄与を考慮しなければ、鎖の描像を正しく得ることはできない。

本研究では、図1に模式図を示す、三重らせん形成部と三量体形成ドメインからなるペプチドを用いた。この分子は水溶液中室温付近で三重らせん部分のみが変性を起こし、棒状から星型高分子様の分子形態変化を起こすことが予想されるため、上記のドメイン付近の比較的ランダムな鎖の振る舞いを知る上で有用であると考えられる。そこで本稿では、このペプチドについて三重らせんペプチド部の温度変性を円二色性で検出すると共に、希薄溶液の放射光小角 X 線散乱 (SAXS) 測定を変性温度前後で行い、変性に伴う分子形態の変化を分岐高分子に対するみみず鎖モデルを適用することにより決定した、我々の最近の研究[1]について概説する。

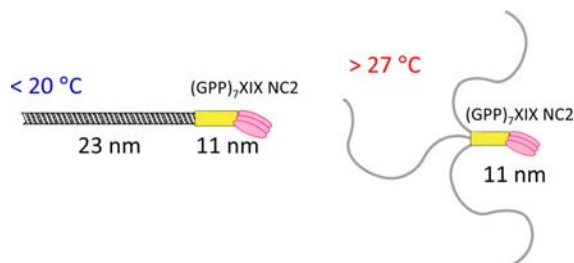


図1：本研究に用いたペプチド試料のコンホメーション変化の模式図。

2 実験

大腸菌合成により調製したペプチド鎖を精製し、ゲル電気泳動より単一のバンドが見られることを確認した。得られたペプチド 138 残基からなり、内 83 残基が可逆的に三重らせん一本鎖のコンホメーション変化を起こす。透析法により濃縮したペプチド水溶液を、適切に希釈し 4 つの異なる濃度の溶液を得た。なお、これらの溶液には 200 mM の NaCl と 20 mM の Tris-HCl (pH 7.0) が含まれる。これらの溶液について、円二色性測定を行い、三重らせん分率 $F(T)$ 、そして温度上昇に伴う三重らせんの崩壊温度を決定した。また、KEK-PF の BL-10C にて SAXS 測定を行い、得られた散乱強度データを無限希釈に外挿して、平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle$ 及び粒子散乱関数 $P(q)$ を温度の関数として決定した。なお、実験の一部には SPring-8 の BL40B2 も用いた。

3 結果および考察

図2に示すようにらせん分率 $F(T)$ は 20°C 付近で急激に減少し、 25°C 以上では一定値になる。この温度領域で測定した $\langle S^2 \rangle$ は $F(T)$ の変化に沿って減少し、低温では 10 nm となる。この値は図1左の形態から計算される値にほぼ一致している。これに対し、高温側の 6.7 nm は 3 本のペプチド鎖がすべて変性ペプチドと同じ鎖の剛直性 (Kuhn の統計セグメント長で 2 nm [2]) とした場合に比べ有意に大きいことがわかった。

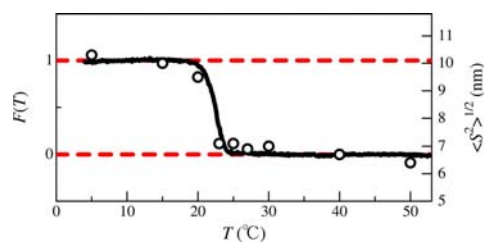


図2：200mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 水溶液中におけるペプチドの三重らせん形成部分のらせん分率 $F(T)$ (実線)と根平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ (白丸)の温度依存性。

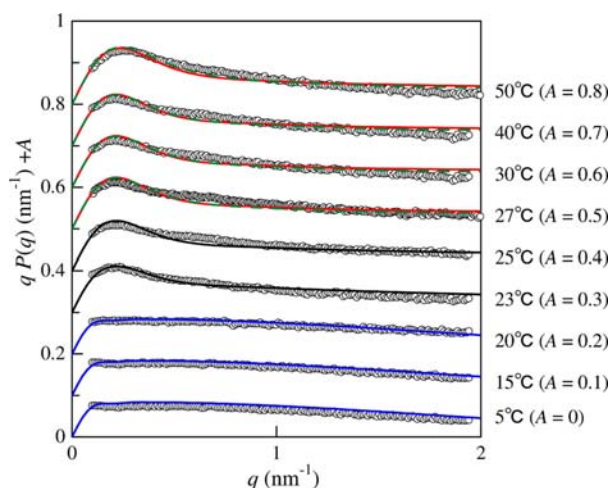


図3：200mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 水溶液中におけるペプチドの Holtzer プロット。

次に、これらの温度での散乱関数 $P(q)$ に散乱ベクトルの絶対値 q を乗じたものを、 q に対してプロットした Holtzer プロットを図 3 に示す。低温では、小角側に平坦領域がみられるのに対し、高温では 0.2 nm^{-1} 付近にピークが出現する。20 °C 以下での散乱関数が、剛直棒でほぼ定量的に再現されるのに対し、高温での実験値は三量体形成ドメインを考慮した三本腕星型高分子に対する計算値が実験値をかなり正確に再現する。ただし、計算に用いた鎖の剛直性は、変性ペプチドに期待されるものの約 2 倍を選んだ。この剛直性は先に述べた回転半径もほぼ定量的に説明する。また、中間的な温度 (23°C、25°C) では、剛直棒状鎖と星型鎖を適度な割合で足し合わせた散乱関数により、ほぼ定量的に実験値が再現される。このことは、三重らせんから星型鎖への変化が all-or-none 型で起こっていることを示唆する。得られた星型鎖の剛直性パラメータは一本鎖コラーゲンモデルペプチドの約 2 倍であり、三量体形成ドメインとモデルペプチド、そしてモデルペプチド部分鎖間の相互作用によってペプチド鎖がより広がった

分子形態をとることがわかる。この分子パラメータは回転半径も定量的に説明する。他方、星型鎖のペプチド部分鎖については、散乱関数は分岐点での結合角を変えても顕著には変化しない、すなわち、分岐点での結合角が分子全体のサイズに影響するほどペプチド部分鎖は短くないことが明らかになった。

4 まとめ

本研究では、構造形成ドメインとランダム構造の両方を持つペプチド鎖の分子形態の解析に、溶液中での小角 X 線散乱法と高分子鎖の揺らぎを正確に取り扱うことができる理論である、分岐みみず鎖を併用することで精密な解析が可能であることを示した。我々のグループでは、三重らせんペプチドと高分子電解質の複合体の解析にも分岐みみず鎖が有効であることを示しており [3,4]、これらの手法が、より複雑なペプチドや生体高分子複合体の溶液中での形態解析に有用であることを示している。

謝辞

SAXS の測定は PF のスタッフの協力の下で行われた。また、有益な議論をしていただいた大阪大学の佐藤尚弘教授、ペプチド試料の合成にご尽力いただいた(株)ニッピの水野一乗博士およびシュライナーズリサーチセンターの Hans Peter Bächinger 教授に感謝する。

参考文献

- [1] K. Terao, K. Mizuno, H. P. Bächinger, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 3714 (2015).
- [2] K. Terao, K. Mizuno, M. Murashima, Y. Kita, C. Hongo, K. Okuyama, T. Norisuye, H. P. Bächinger, *Macromolecules*, **41**, 7203 (2008).
- [3] K. Terao, R. Kanenaga, T. Sato, K. Mizuno, H. P. Bächinger, *Macromolecules*, **45**, 392 (2012).
- [4] K. Terao, R. Kanenaga, T. Yoshida, K. Mizuno, H. P. Bächinger, *Polymer*, **64**, 8 (2015).

* kterao@chem.sci.osaka-u.ac.jp