

塩水溶液中におけるコラーゲンモデルペプチドと高分子電解質の複合体形成 Complex Formation of Collagen Model Peptides and Polyelectrolytes in Saline Solution

寺尾憲*, 金永亮子, 吉田祐

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*, Ryoko Kanenaga, and Tasuku Yoshida

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

1 はじめに

三残基ごとにグリシン、そしてその他がプロリンやヒドロキシプロリンからなるペプチドは、比較的短い鎖でも水溶液中や結晶中で、三重らせん構造を形成するため、コラーゲンのモデル物質としてこれまで多く研究されてきた。最近我々は、この三重らせん-1本鎖のコンホメーション変化が小角X線散乱測定によって定量的に評価できること[1]、そしてこれらのペプチド溶液をアニオン性高分子電解質溶液と混合すると、ペプチドが三重らせん構造をとる低温で複合体を形成するのに対し、三重らせんが完全にほどける高温では複合化が解消し分子分散することを見出した[2-3]。この複合化は三重らせんの片末端の三つのN末端と高分子電解質鎖との静電的引力に起因すると考えられている。このような複合体を調査することは、蛋白質の精製法の一つであるイオン交換法の最適化、さらには分子クラウディング環境におけるタンパク質分子について調べる手段にもなりうると思われる。

本稿では、この複合体の構造について小角X線散乱法によって調べ、文献[3]に報告した内容について概説すると共に、三重らせん融解温度付近での複合化挙動と複合体の構造について調べた結果についても報告する。

2 実験

ペプチド試料として H-(Gly-Pro-4-(R)-Hyp)₉-OH と H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH を、高分子電解質として重量平均分子量 M_w が $3.04 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ と $2.57 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ のポリアクリル酸ナトリウム試料（それぞれ NaPAA323, NaPAA267 と呼ぶ）と M_w が $2.67 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$ で置換度が 0.64 のカルボキシメチルアミロスナトリウム塩 NaCMA26K を用いた。塩濃度 10 から 150 mM の食塩水を溶媒として高分子電解質の電解質基数に対するペプチド鎖の本数の比 α が異なる数種類の混合溶液を調製した。これらの混合溶液について KEK-PF の BL-10C にて小角 X 線散乱測定をトータルの質量濃度 c を変えて行い、過剰散乱光強度 $\Delta I(q)$ を散乱ベクトルの絶対値 q の関数として決定した。実験の一部には SPring-8 の BL40B2 も用いた。

3 結果および考察

NaPAA と H-(Gly-Pro-4-(R)-Hyp)₉-OH は水溶液中 15 °C で塩濃度によらず複合体を形成した。他方、NaCMA と H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH のそれは 10 mM の低塩濃度食塩水溶液中では複合体を形成したのに対し、100 mM の溶液中では複合体の形成はほとんど観測されなかった。NaPAA の線電荷密度が 3.8 nm^{-1} と見積もられるのに対し、NaCMA のそれは約半分の 1.9 nm^{-1} であることから複合体形成に高分子電解質の電荷密度が重要であることが明らかにされた。さらに、後者の組み合わせで複合体形成能に顕著な塩濃度依存性があったのは、複合体形成の駆動力がペプチドと高分子電解質間の静電的引力であること、そしてその引力がイオン強度の増加によって遮蔽されることによって著しく弱くなることを裏付けている。

図 1 に 20 mM 塩水溶液中における NaPAA と H-(Gly-Pro-4-(R)-Hyp)₉-OH ($\alpha = 10$) の円二色性測定より決めたらせん分率を示す。三重らせんは 40 °C から 60 °C にかけて徐々にほどけてゆくのがわかる。同じ図に、散乱強度から決定された α と複合化した NaPAA のカルボキシル基の分率 F の積（複合化したペプチド分子の分率に相当）を中抜き丸でプロットする。低温側でほぼすべてのペプチドが複合化しているのに対し、三重らせんの融解温度付近で複合化率が低下し、75 °C では 0 に近くなるのがわかる。類似した結果は NaCMA26K と H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH の混合溶液にもみられた。これらの結果は、三重らせん構造の形成が高分子電解質との複合体形成に必須の条件であることを示している。ただし、温度上昇に伴う複合化率の低下はらせん分率の低下に比して幾分高温側にずれているようにも見える。部分的にほどけたあるいは緩んだ三重らせんの一部も複合体を形成していることが考えられる。

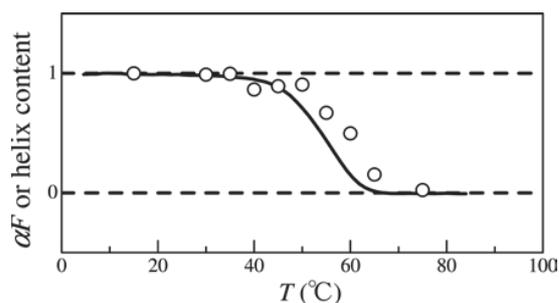


図1：らせん分率 (helix content) とペプチドの複合化率 αF の温度依存性。

次に、複合体の散乱関数の一例として、100 mM 食塩水溶液中 15 °C における NaPAA 及び NaPAA と H-(Gly-Pro-4-(R)-Hyp)₉-OH の混合溶液の解析例を図2に示す。NaPAA の散乱関数が、直鎖高分子のモデルとして確立されているみみず鎖でほぼ定量的に説明できることがわかる。さらに我々は中村一則未らが楕形鎖に拡張したみみず鎖モデルに対する散乱関数の理論式を、主鎖、側鎖が異なる化学種からなる楕形鎖に拡張し、すべてのペプチド鎖が高分子電解質と複合化しているとして散乱関数を計算した。得られた実線は実験値をよく再現していることから、図3に模式図を示すように、複合体はペプチドの片末端が高分子電解質と接触しているような形態をとっていることが示された。

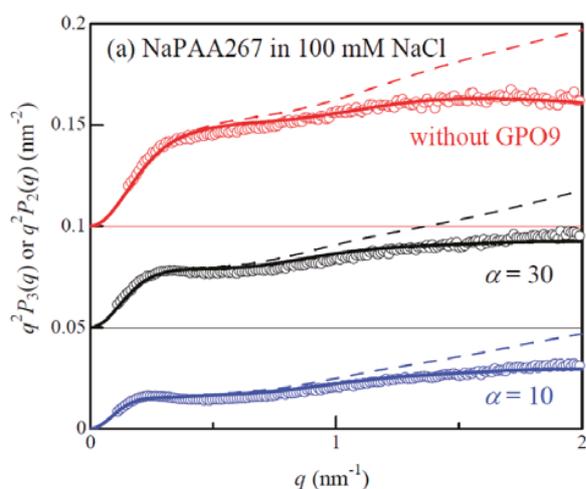


図2：100 mM NaCl 塩水溶液中 15°C における NaPAA267 (赤) と NaPAA267 に H-(Gly-Pro-4-(R)-Hyp)₉-OH (GPO9) を混合した溶液 (黒、青) についての散乱関数。実線はみみず鎖 (赤) 及び側鎖を三重らせんペプチド、主鎖を NaPAA とした楕形みみず鎖に対する理論値。破線は鎖の太さを考慮しなかった場合の理論値。[3]

他方、ペプチド鎖の長さが高分子電解質鎖のそれと比べ 1/10 程度しかないのに対し、複合体について得られた回転半径は α と共に増加した。複合化したペプチドの末端部以外と高分子電解質鎖間の斥力的

相互作用によって NaPAA 主鎖が見かけ上堅くなったためと考えられる。これらはポリスチレンなどの楕形高分子についても知られる現象である。なお、ここには示さないが、三重らせんの融解温度付近では複合化率の低下に伴い、散乱関数の形状も変化するが、これらは複合体と遊離ペプチドの散乱関数の和で再現できることもわかった。



図3：高分子電解質 (青) と三重らせんペプチド (赤) の複合体の模式図[3]。

4 まとめ

一般に生体高分子複合体を散乱法で計測するのは容易ではないが、本研究で用いたコラーゲンモデルペプチドと高分子電解質の系では複合化の転移温度領域も含め、良好な散乱データの取得が可能であり、定量的に解析することができた。天然の蛋白質との複合体の研究に展開することも可能であると考えられ、冒頭に述べた蛋白質の精製法としてのイオン交換法や分子クラウディング状態下におけるタンパク質の挙動について調べる手段として有望であると期待される。

4 謝辞

有益な議論をしていただいた大阪大学の佐藤尚弘教授、ペプチド試料の一部をご提供頂いた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; M. Murashima; Y. Kita; C. Hongo; K. Okuyama; T. Norisuye; H. P. Baechinger *Macromolecules* **41**, 7203-7210, (2008).
- [2] 喜田裕介; 寺尾憲; 佐藤尚弘 *高分子論文集* **67**, 686-689, (2010).
- [3] K. Terao; R. Kanenaga; T. Sato; K. Mizuno; H. P. Baechinger *Macromolecules* **45**, 392-400, (2012).

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