

学位論文題名

Molecular Dynamics of Polypeptides by Solid State ^2H NMR

(固体重水素 NMR によるポリペプチドの分子動力的研究)

学位論文内容の要旨

ポリペプチドはタンパク質のモデル物質として、タンパク質分子の運動や構造の研究に頻繁に用いられている。また生体適合性ポリマーや機能性ポリマーの材料としても近年非常に注目されており、その特性の詳細な解明が急務となっている。ポリペプチドは主鎖と側鎖から成る。主鎖の化学構造はどのようなポリペプチドにおいても共通なので、ポリペプチド分子は側鎖の違いに依存して様々な立体規則構造をとる。従ってポリペプチドの特性を知るためには、側鎖の挙動を正確に評価することが必須である。本論文で用いた poly(γ -benzyl L-glutamate) (PBLG) や poly(γ -methyl L-glutamate) (PMLG) は主鎖が α -ヘリックス構造をとる代表的なポリペプチドであり、以前から様々な方法によりその側鎖の動的挙動の研究が行われてきた。その結果、室温付近で側鎖はガラス転移様振舞いを示し、室温以上では側鎖同士が共同的な運動をしていることが明らかにされている。このような PBLG や PMLG の特性を正確に把握するためには、これらの側鎖の運動をより微視的な立場で評価する必要がある。最近の固体高分解能 ^{13}C NMR により、側鎖の各部位における運動を評価する事がある程度可能となったが、詳細な運動のタイムスケールや、運動のモードについては未だに不明な点が多い。固体重水素 NMR は局所的な運動の情報を得るのには非常に優れた方法であり、この方法を PBLG や PMLG に用いた結果、側鎖の運動の速さとモードに関して今までの方法では得られなかった詳細な情報を得ることができた。これまで固体重水素 NMR が PBLG のような非常に長側鎖のポリペプチドに用いられた例はない。本論文は、固体重水素 NMR を用いて PBLG をはじめとする幾つかのポリペプチド側鎖を分子動力的に研究した結果をまとめたものである。

本論文は全5章から構成されている。

第1章では研究の背景、目的、固体重水素 NMR の理論、及び測定方法等について概説してある。

第2章では PBLG 及び PMLG 側鎖に関する実験結果について記述してある。PBLG の重水素化試料としては、末端のフェニル基を重水素化した PBLG- d_5 、 κ 位を重水素化した PBLG- κd_1 、 ζ -メチレン基を重水素化した PBLG- ζd_2 、及び、 γ -メチレン基を重水素

化した PBLG- γd_2 を用いた。PMLG に関しては γ -メチレン基を重水素化した PMLG- γd_2 を用いた。PBLG- d_5 の測定から、側鎖末端のフェニル基は室温で MHz オーダー以上の 180° flip-flop 運動を行っており、更に高温では側鎖の多重内部回転によって flip-flop 軸自身が大幅の運動をしていることが示された。PBLG- κd_1 及び PBLG- ζd_2 については、計算機によるスペクトルシミュレーション解析から、側鎖末端部の大幅運動の角度や運動の相関時間、及びこれらの分布に関する具体的な値も得られた。PBLG- γd_2 については、二軸の回転モデルを用いたスペクトルシミュレーション解析から、側鎖の C_α - C_β 、 C_β - C_γ 結合軸まわりのそれぞれの運動モードや相関時間が明らかにされた。その結果、側鎖のガラス転移様振舞いは、主に側鎖末端側の局所的運動によってもたらされることが示された。また、PMLG- γd_2 の測定結果は PBLG- γd_2 の結果と比較検討された。

第 3 章では PBLG と poly(γ -benzyl D-glutamate) (PBDG) の混合物であるラセミ poly(γ -benzyl glutamate) (PBG) の固体状態における側鎖の動的挙動について述べられている。ラセミ PBG の側鎖は隣り合う PBLG 分子と PBDG 分子との間で、何等かの規則構造を形成することが知られている。その側鎖規則構造の最も有力なモデルがフェニル環のスタッキングモデルである。本章ではラセミ PBG- d_5 、ラセミ PBG- ζd_2 、及びラセミ PBG- γd_2 の固体重水素 NMR 測定からスタッキングモデルを分子動学的に検討した。スピン-格子緩和時間とスペクトルの解析の結果、ラセミ PBG 中には大幅運動が制限されている側鎖が約 70% 存在し、残り 30% の側鎖は PBLG 中とほぼ同様に運動していることが明らかになった。この割合はスタッキングモデルから導かれる値とほぼ一致する。しかし、スタッキング構造中において、フェニル環はこれまで考えられていたような静的な状態ではなく、かなり高速の 180° flip-flop 運動を行っていること、更に側鎖全体的大幅の運動もある程度の制限は受けるものの依然として存在していることが明らかにされた。

第 4 章では、poly(β -phenethyl L-aspartate) (PPLA) 側鎖に関する実験結果について記述してある。PPLA は PBLG と類似した化学構造をもつが、PBLG には無い非常に興味深い性質をもつ。固体状態で主鎖が右巻ヘリックスであるものが、温度上昇に伴い約 130°C で不可逆的に左巻ヘリックスにヘリックスセンス反転する。本実験では ζ -メチレン基を重水素化した PPLA- ζd_2 、及び β -メチレン基の水素を一つ重水素置換した PPLA- βd_1 を用い、右巻ヘリックス、左巻ヘリックスのそれぞれの状態と、側鎖の運動性との関係を固体重水素 NMR で検討した。また PBLG との違いについても述べている。実験の結果、側鎖末端の運動に関してはヘリックスセンスの違いによる影響はそれほど大きくないが、 C_α - C_β 結合軸まわりの運動については、右巻、左巻ヘリックス状態間で運動のモード、速さ共に著しい差がみられた。この結果から右巻ヘリックス状態の方が、左巻ヘリックス状態よりも側鎖と主鎖間の相互作用が大きいことが示された。

第 5 章では、本論文の結論として、これまで得られた研究成果の総括を行う。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 堤 耀 広
副 査 教 授 前 晋 爾
副 査 教 授 田 中 啓 司
副 査 助 教 授 平 沖 敏 文

学位論文題名

Molecular Dynamics of Polypeptides by Solid State ^2H NMR

(固体重水素 NMR によるポリペプチドの分子動力学的研究)

ポリペプチドはタンパク質のモデル物質として、タンパク質分子の分子運動や構造の研究に頻繁に用いられている。また生体適合性ポリマーや高機能性ポリマーとしても注目されており、現在物性面での精度の高い情報が必要とされている。本論文は、固体重水素NMRを用いて幾つかの代表的ポリペプチド側鎖のダイナミックスを詳細に研究した結果をまとめたものである。

重水素NMR法では選択的に重水素化された分子の特定部位の構造とダイナミックスについての情報が得られるため、分子の局所的挙動を研究する手段として注目されている。本研究では、ポリペプチドの固体中でのダイナミックスを調べるために、側鎖を系統的に重水素化した試料の重水素NMRスペクトルを広い温度範囲で測定すると共に、多くの分子運動モデルに基づくスペクトルの理論的解析を精密に行い、他の方法では検出が困難な有益な情報を得ている。その主なものは、

1) 定性的な特性が明らかになっているpoly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG)について、その側鎖の各部位を重水素化した試料を用い側鎖のダイナミックスを検討した結果、側鎖末端のフェニル基は室温でMHzオーダー以上の180° flip-flop運動を行い、高温では多重内部回転によってflip-flop軸自身が大振幅運動をしていることが示された。また、この試料の特徴であるガラス転移様振舞いは、側鎖全体の形体変化を伴う協同的大振幅運動によることが確認された。

2) 右巻ヘリックスのPBLGと左巻ヘリックスのpoly(γ -benzyl D-glutamate)(PBDG)の混合物であるラセミ体(PBG)の動的挙動を詳細に検討した結果、隣り合うL体分子とD体分子との間でのフェニル環のスタッキング構造中において、フェニル環はこれまで考えられていたような静的な状態ではなく、高速の180° flip-flop運動を行っていること、更に大振幅運動もかなり存在していることが明らかにされ、従来の考えを大幅に修正したモデルが提案された。

3) 固体状態で主鎖が温度上昇に伴い約130°Cで不可逆的に右巻から左巻にヘリックスセンス反転するpoly(β -phenethyl L-aspartate)(PPLA)について側鎖の運動性を検討した結果、側鎖末端ではヘリックスセンスの影響は大きくないが、主鎖に直結したC α -C β 結合軸まわりについては、左巻の方が右巻よりも運動性が高いこと、側鎖と主鎖間の相互作用が小さいことが示され、ヘリックスセンス反転のメカニズムを解明する上で重要な知見が得られた。

これを要するに著者は、固体重水素NMR法によりポリペプチド固体の側鎖ダイナミックスについて多くの有益な新知見を得ており、応用物理学、生物物理学に寄与すること大である。

よって著者は北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。