博士（理　学）　東　南　健　二

学位論文題名

Spectroscopic Study on the Secondary Structure Formation and the Conformational Flexibility of Small Peptides in Various Mixed Solvents

（混合溶媒中の小ペプチドの二次構造および構造の柔軟性に関する分光学的研究）

学位論文内容の要旨

近年、ヒト遺伝子塩基配列の解析が進み、それにともない、重要な生理活性をもつタンパク質のアミノ酸配列情報が明らかにされてきた。また、近年のX線結晶解析やNMRの実験法の進展により、タンパク質の立体構造データのエントリー数も飛躍的に増大した。しかしながら、タンパク質構造の安定性を支配する個々の相互作用の熱力学的詳細は完全には解き明かされていない。とくに、アミノ酸配列に暗号化された情報に従い、ポリペプチドの鎖がタンパク質の特異的三次元構造まで折り畳まれてゆく機構については、いまだ多くの謎に包まれている。

タンパク質の熱力学的諸問題を考える上での最大の難点は、おびただしい数の相互作用の最終結果であるタンパク質の安定立体構造から、個々のアミノ酸配列の構造形成における熱力学的寄与を引き出すことができないことである。また、タンパク質は、自身で、分子表面の親水性環境から分子内部の疎水性環境までにわたる広範囲の溶媒環境をとりそろえる分子である。従って、個々のアミノ酸配列部分の構造形成に及ぼす溶媒の効果は、タンパク質の折り畳み問題を解く重要な鍵であると考えられる。

こうした背景のもと、本研究では2～4残基程度の長さの小ペプチドを多数合成し、タンパク質分子の小領域のモデルとした。また、タンパク質分子内のさまざまな溶媒環境を模倣するために、クロロホルムとジメチルスルホキシドの混合溶媒（$CDCl_3$/DMSO-*d*6）、および、ジメチルスルホキシドと水（DMSO-*d*6/D_2O）の混合溶媒をさまざまな成分混合比で用い、溶液中での小ペプチドの構造をNMRおよび赤外分光により調べた。そして、いくつかのアミノ酸残基について、β-Turn構造（タンパク質の代表的な二次構造のひとつ）を安定化する熱力学的寄与を見積もることに成功した。

第1章では、本研究の背景を述べた。

第2章には、本研究で用いた60種類のペプチドの合成法を記載した。とり得る分子内水素結合構造が7-、10-、および13-員環までの可能性をもつ異なるアミノ酸配列のペプチド、また、*N*-アセチル（Ac-）、*N*-*tert*-ブチルオキシカルボニル（Boc-）、*N*-トリフルオロアセチル（Tfa-）などの立体的あるいは電子的性質が異なるアミノ末端修飾基を有するペプチドを、液相縮合反応により合成した。

第3章では、合成したペプチドの重水素化クロロホルム（$CDCl_3$）溶液の赤外測定結果について言及した。NH基の伸縮振動領域のスペクトルには、分子内水素結合している状態と水素結合していない状態に帰属される吸収バンドがそれぞれ観測された。水素結合バンドの相対強度の比較から、それぞれのペプチドについて、$CDCl_3$中での分子内水素結合構造の種類と安定性を論じた。

第4章では、プロリン残基（Pro）の直前のペプチド結合の*Cis*と*Trans*の異性体の存在割合の溶媒依存的変化を、$CDCl_3$/DMSO-*d*6、$CDCl_3$/acetonitrile-*d*3、$CDCl_3$/methanol-*d*4、$CDCl_3$/acetone-*d*6などの混合溶媒中で、NMR測定により調べた。結果、*Cis*体から*Trans*体への異性化が混合溶媒中の$CDCl_3$成分の割合の増加に従って促進されることがわかった。これは、10-員環および13-員環分子内水素結合構造の形成が、Proの直前のペプチド結合が*Trans*異性を必要とするためと考えられた。また、*Trans*異性を不安定にする溶媒の能力は、溶媒の水素結合受容能と関係づけられた。

第5章では、$CDCl_3$/DMSO-*d*6混合溶媒中でのペプチドのアミドプロトンのケミカルシフトの変化を分析した。この混合溶媒系は、ペプチドのNH基が分子内のC=O基と水素結合しているか、それとも、溶媒のDMSOとの分子間水素結合に関わるかを区別する上でひじょうに有用であった。個々のアミドプロトンのDMSO-*d*6中と$CDCl_3$中とでのケミカルシフトの差が、NH基が分子内水素結合にどの程度関与しているかの定量的な指標となることが、赤外測定の結果との比較から確かめられた。

第6章では、溶液中でのペプチド構造の柔らかさを論じるためのNMRの新しい指標として、グリシン残基（Gly）の2つのα-プロトンに着目した。配列内の（*i*+2）位にGlyが存在するペプチドがβ-Turn型の主鎖コンフォメーションを形成する場合に、Glyの2つのα-プロトンの近傍のC=O基とのそれぞれの位置関係の違いにより、C=O基の磁気異方性効果によるケミカルシフトの大きな違いが観測されることが期待できる。そこで、Glyを含むさまざまなペプチドについて、Glyの2つのα-プロトンのケミカルシフトの差（$\Delta\delta\alpha/\alpha'$）を測定した。結果、安定な10-員環分子内水素結合構造を形成するペプチドは、低極性溶媒中で大きな$\Delta\delta\alpha/\alpha'$の値をもつことが示された。一方、低極性溶媒中においても10-員環の分子内水素結合が不安定なペプチドや、水やその他の極性溶媒の溶液においては、$\Delta\delta\alpha/\alpha'$の値は小さかった。この$\Delta\delta\alpha/\alpha'$の減少は、NMRの時間スケール（数ミリ秒～数100ミリ秒）において、ペプチドの構造が複数のコンフォメーション間で相互に移り換わっているためと考えられ、Glyの2つのα-プロトンの磁気的環境の違いもまた、複数のコンフォメーションで平均化されて小さくなったことを意味するものである。従って、$\Delta\delta\alpha/\alpha'$の指標は、ペプチドの主鎖構造の柔らかさを定量的に評価する上で有用であることが示された。さらに、$\Delta\delta\alpha/\alpha'$の指標を用いて、いくつかのペプチドについて、β-Turn構造形成の熱力学量を見積もり、比較した。

第7章では、第3章の赤外吸収バンド強度の解析、および、第5章と第6章のNMRのそれぞれ異なる指標を用いた解析より得た各ペプチドのβ-Turn形成についてのギブス自由エネルギー変化（ΔG）を比較した。さらに、本研究のクロロホルム溶液中での各アミノ酸残基のβ-Turn構造安定化能力の実験結果を、タンパク質のX線結晶解析から得られている各アミノ酸残基のβ-Turn構造への出現頻度の統計値と比較し、両者の間で良い一致を見た。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　井　川　駿　一
副　査　教　授　小　中　重　弘
副　査　教　授　辻　　孝
副　査　教　授　稲　辺　　保

学位論文題名

Spectroscopic Study on the Secondary Structure Formation and the Conformational Flexibility of Small Peptides in Various Mixed Solvents

(混合溶媒中の小ペプチドの二次構造および構造の柔軟性に関する分光学的研究)

タンパク質分子が示す独特な３次構造の熱力学的安定性やその形成過程については、これまでの多くの研究にもかかわらず、不明の点が多く残されている。特に、一本のポリペプチド鎖が折り畳まれて３次構造が形成されてゆくフォールディングの機構は依然として謎に包まれており、現在もタンパク質分野における一つの大きな課題として活発に研究されている。フォールディングの過程において、ペプチド鎖の個々のセグメントは、親水性から疎水性まで広範囲に変化する溶媒環境の中でその二次構造を様々に変化させていると想像される。その際、各セグメントの構造が溶媒環境によってどのように変化するのか、またその安定性がアミノ酸配列によってどのように異なるのかなどの問題については、これまでごく限られた断片的な研究が報告されているだけで、未知の点が多く残されている。これらの問題に系統的に取り組むために、申請者はタンパク質分子の小セグメントのモデルとして６０種の残基数２～４のペプチドを合成し、種々の混合溶媒中でNMRおよび赤外スペクトルを測定し解析した。

本論文は７章から構成されている。第１章では、本研究の背景としてタンパク質分子の構造の安定性および形成過程に関する現在までの研究について概説し、小モデルペプチドの分光研究の意義について述べている。

第２章では、本研究に用いた６０種のペプチドの合成法について記述している。液相Boc法によって段階的に縮合し、両末端を種々に修飾したペプチドを合成した。これに

より、分子内水素結合によって７、１０、および１３員環構造を形成し得る種々のペプチドを得た。ここで、７および１０員環はタンパク質の２次構造におけるγターンとβターンの最小単位に相当し、１３員環はα-ヘリックスのひと巻に相当するものである。

第３章では、ペプチドの重水素化クロロフォルム溶液の赤外スペクトルの測定と解析の結果について論じている。赤外NH伸縮領域の吸収帯の解析により、７、１０、および１３員環構造の安定性とアミノ酸配列の関係を調べた。その結果、７および１０員環のターン構造の安定化には特にプロリン残基の寄与が格段に大きいことを明らかにした。

第４章では、NMR測定に基づいて、プロリン残基直前のペプチド結合（プロリンイミド結合）のシス／トランス異性体の割合が溶媒によって変化する様子を明らかにした。プロリンイミド結合のシス→トランス異性化はタンパク質のフォールディングにおける律速過程と考えられている。種々の混合溶媒の組成比を変えて測定した結果、溶媒の極性が減少するにつれてトランス体の割り合いが増加すること、また１０および１３員環水素結合形成がシス→トランス異性化を促進することを明らかにした。

第５章では、クロロフォルムとジメチルスルフォキシドの混合溶媒中で測定したアミドプロトンの化学シフトを解析した。第３章の赤外分光の結果との比較から、溶媒組成による化学シフトの変化が分子内水素結合に関与するアミドプロトンを特定するうえで有用であることを明らかにした。

第６章では、タンパク質中のグリシン残基の二つのαプロトンの化学シフトが、互いに大きく異なる場合があることに着目し、これを本研究の小ペプチドのNMRスペクトルについて吟味した。その結果、二つのαプロトンの化学シフト差が混合溶媒の組成比によって顕著に変化することを見い出した。理論的考察に基づいて、この化学シフト差が特に１０員環のβターン構造の安定性の指標となることを示した。

第７章では、第３章から第６章までの実験結果から得たクロロフォルム中におけるβターン構造形成の熱力学量を比較検討し、種々のアミノ酸２残基配列のβターンの安定化に対する寄与の大小関係を求めた。これは、タンパク質のX線構造解析から得られている統計的出現頻度とよく一致していることが分かった。この結果は、タンパク質中での２次構造が、小ペプチドにおけるアミノ酸残基配列の特性によって理解できることを示すものである。

以上の研究成果はタンパク質のフォールディング機構を解明する上で重要な手がかりを与えるものとして意義深い。また本論文の内容の一部は既に国際的に権威ある学術雑誌に掲載され、高い評価を受けている。よって審査員一同は申請者が博士（理学）を受けるに十分な資格を有するものと認める。