

アルコール含有水溶液中におけるポリペプチドのコンホメーション

林 知志*, 古賀正晃*, 池田淳*, 神尾克彦**, 米光直志**

Conformation of polypeptide in alcohol inclusion aqueous solution

Tomoyuki HAYASHI*, Masaaki KOGA*, Sunao IKEDA, Katsuhiko KAMIO**

and Tadashi YONEMITSU**

Various alcohol was added to poly-L-glutamic acid aqueous solution. The effect of the structure of the alcohol on the structural change of poly-L-glutamic acid was examined by the circular dichroism equipment(CD). The result showed that the α -helix was easy to be induced at the order of the propanol > ethanol > methanol, when it is compared at the length of the chain length. It was proven that the α -helix was easy to be induced at the order of the t-butanol > isopropanol, when it is compared at the molecular and solid size. It was proven that chain length of alcohol molecule and molecular and solid size affected the α -helix induction.

Keywords: CD, conformation, poly-L-glutamic acid, α -helix, β -sheet, Methanol, Ethanol, Propanol, IsoPropanol, t-Butanol

1. はじめに

タンパク質がその機能を発現するためには、定まった立体構造(コンホメーション)を組み立てなければならぬ。その立体構造が崩壊すると、アミノ酸1次元配列である1次構造に変化がなくても、酵素などのタンパク質の機能は失われてしまう。この定まった立体構造を組み立てるために、この局所的な規則構造である α -ヘリックス構造や β -シート構造が利用されていることはよく知られたことである。この局所的な2次構造は、塩や変性剤、界面活性剤などの添加によって容易に変化する¹⁾⁴⁾。今回、タンパク質モデルとしてポリ-L-グルタミン酸を用いて、ランダムコイル状態から立体規則性を持つ2次構造(α -ヘリックス、 β -シート構造)へ誘導するアルコール種について、特にその疎水基の長さ、分子の大きさに着目し、さらに温度等による影響について検討した。

*工業化学科卒業生

**物質生命化学科

2. 実験

2.1 試料

実験に使用した試薬は、ポリ-L-グルタミン酸(p(Glu))、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、t-ブタノールを用いた。p(Glu)は、ペプチド研究所、アルコール類は、すべて和光純薬工業(株)の特級試薬を使用した。

2.2 円偏光二色性スペクトル測定

0.2mM p(Glu)水溶液2mlにアルコールを0.1mlずつ加えて、コンホメーション変化を円偏光二色性装置(CD)を用いて測定した。また、測定温度を15,25,35°Cに変えて行なった。

3. 結果と考察

15°Cに温度調整したp(Glu)水溶液にメタノールを添加した時のCDスペクトルをFig1に示す。p(Glu)水溶液は、正に極大値を1つもつ典型的なランダムコイルの形をしている(a)。この溶液にメタノールを添加していくと、次第に α -ヘリックスを誘導する変化が見られた(b,c)。メタ

ノール濃度が 16.6mol%で、208nm と 223nm に 2 つの極小値をもつ典型的な α -ヘリックスを形成した(d)。200nm 付近に等モル楕円率点が観察されるので、ランダムコイルから α -ヘリックスへの 2 状態転移であることがわかる。したがって、(a)から(d)へのスペクトル変化は、p(Glu)の α -ヘリックス含有量が増加することに対応している。次に、CD 強度の温度と濃度依存性について検討を行なった。 α -ヘリックスの尺度として極小波長の 1 つである 223nm の CD 強度を用いてモル楕円率を求め、温度(15,25,35°C)を変えてメタノール濃度(mol%)に対する変化を Fig.2 に示した。15°Cの時は、メタノール濃度 16.6mol%まで直線的に変化している。これは、多くの p(Glu)単体がランダムコイルから α -ヘリックス体に急激に構造変化していることを示している。その後、残りの p(Glu)単体が緩やかに α -ヘリックス体を形成し、40mol%ですべての p(Glu)が α -ヘリックス体に構造転移し終わっていることを示している。25°Cの時は、メタノール濃度 16.6mol%まで直線的に変化した。その後、33.4 mol%まで緩やかに変化した後、75.1 mol%まで直線的に変化した。35°Cの時は、メタノール濃度 16.6mol%まで直線的に変化した。その後、56.8mol%まで緩やかに変化した。メタノール濃度 16.6mol%までを

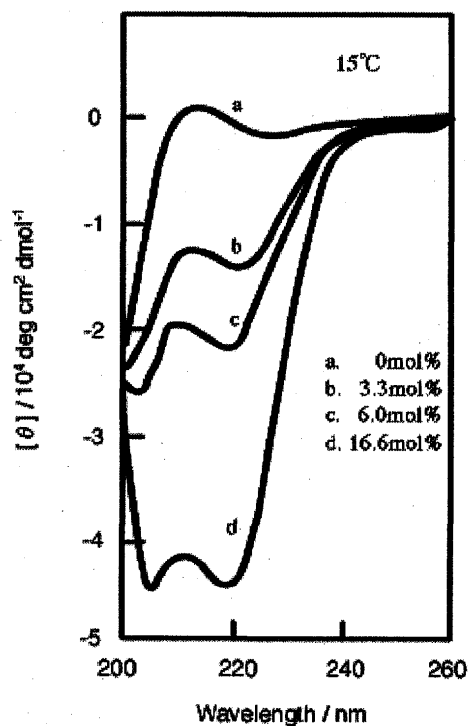


Fig.1 CD spectra of 0.2mM p(Glu) in methanol aqueous solution

比べると温度依存性がでている。メタノール濃度が低濃度で変化するのは、15°C>25°C>35°Cの順番になった。このことから温度が低いほど、p(Glu)が変化しやすいことがわかった。16.6mol%以上では、25°Cと 35°Cに大きな違いは見られなかった。さらに、各温度でメタノール濃度 16.6mol%付近から変化の形が変わる事がわかった。これは、p(Glu)のランダムコイル構造に大きな変化が起きていると考えられる。

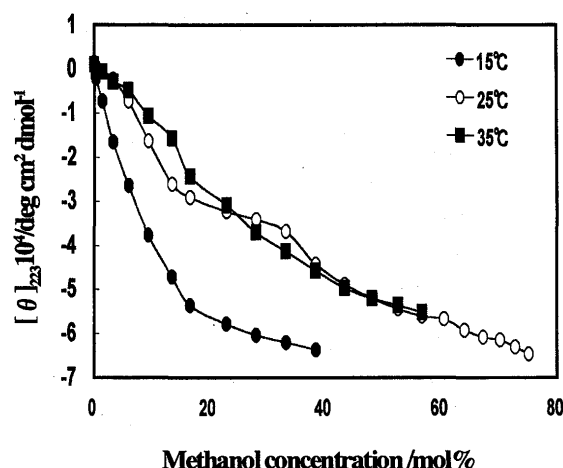


Fig.2 Methanol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu)

15°Cに温度調整した p(Glu)水溶液にエタノールを添加した時の CD スペクトルを Fig.3 に示す。p(Glu)水溶液は、正に極大値を 1 つもつ典型的なランダムコイルの形をしている(a)。この溶液にエタノールを添加していくと、次第に α -ヘリックスを誘導する変化が見られた(b,c)。エタノール濃度が 9.8mol%で、208nm と 223nm に 2 つの極小値をもつ典型的な α -ヘリックスを形成した(d)。200nm 付近に等モル楕円率点が観察されるので、ランダムコイルから α -ヘリックスへの 2 状態転移であることがわかる。したがって、(a)から(d)へのスペクトル変化は、p(Glu)の α -ヘリックス含有量が増加することに対応している。次に、CD 強度の温度と濃度依存性について検討を行なった。 α -ヘリックスの尺度として極小波長の 1 つである 223nm の CD 強度を用いてモル楕円率を求め、温度(15,25,35°C)を変えてエタノール濃度(mol%)に対する変化を Fig.4 に示した。15°Cの時は、エタノール濃度 9.8mol%まで直線的

に変化している。これは、多くの p(Glu) 単体がランダムコイルから α -ヘリックス体に急激に構造変化していることを示している。その後、残りの p(Glu) 単体が緩やかに α -ヘリックス体を形成し、30mol% ですべての p(Glu) が α -ヘリックス体に構造転移し終わっていることを示している。25°C の時は、エタノール濃度 9.8mol% まで直線的に変化した。その後、17.2 mol% まで緩やかに変化した後、43.6 mol% まで直線的に変化した。35°C の時は、エタノール

濃度 9.8mol% まで直線的に変化した。その後、43.6mol% まで緩やかに変化した。エタノール濃度が低濃度で変化するの、15°C > 25°C > 35°C の順番になった。このことから温度が低いほど、p(Glu) が変化しやすいことがわかった。さらに、各温度でエタノール濃度 9.8mol% 付近から変化の形が変わる事がわかった。これは、p(Glu) のランダムコイル構造に大きな変化が起きていると考えられる。

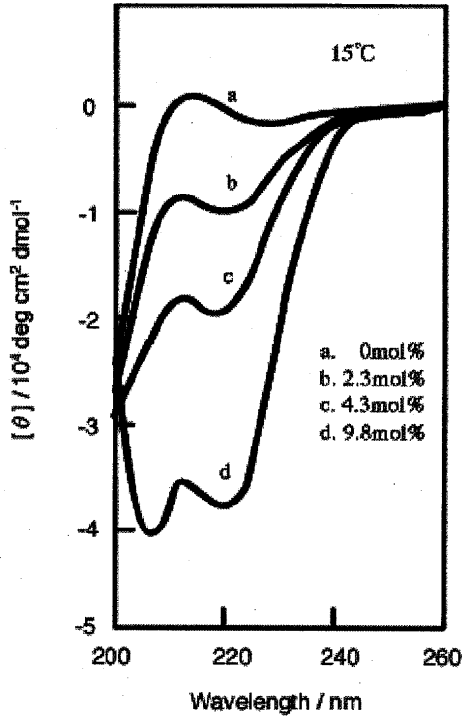


Fig.3 CD spectra of 0.2mM p(Glu) in ethanol aqueous solution

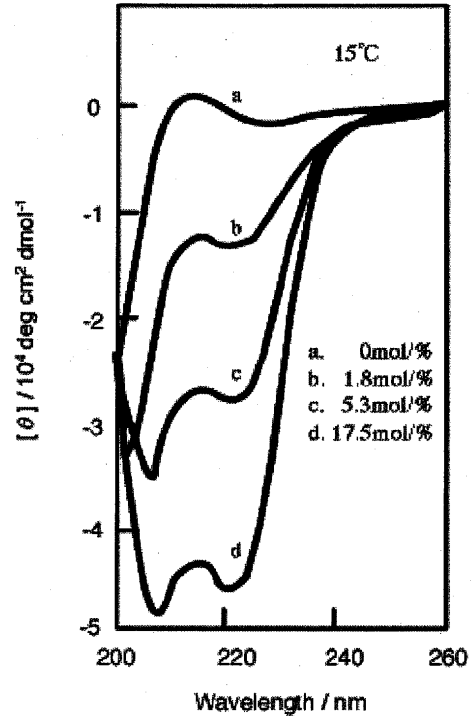


Fig.5 CD spectra of 0.2mM p(Glu) in propanol aqueous solution

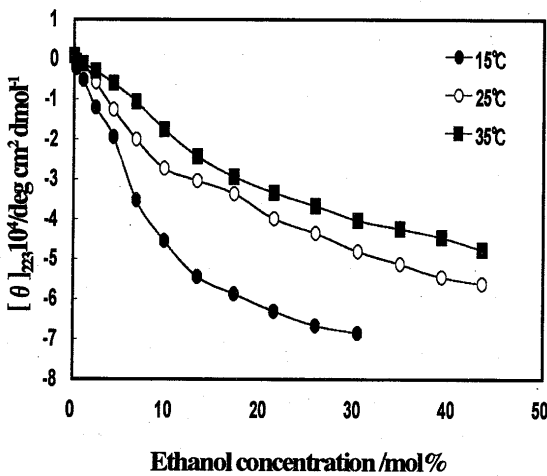


Fig.4 Ethanol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu)

15°C に温度調整した p(Glu) 水溶液にプロパノールを添加した時の CD スペクトルを Fig.5 に示す。p(Glu) 水溶液は、正に極大値を 1 つもつ典型的なランダムコイルの形をしている(a)。この溶液にプロパノールを添加していくと、次第に α -ヘリックスを誘導する変化が見られた(b,c)。エタノール濃度が 17.5mol% で、208nm と 223nm に 2 つの極小値をもつ典型的な α -ヘリックスを形成した(d)。200nm 付近に等モル楕円率点が観察されるので、ランダムコイルから α -ヘリックスへの 2 状態転移であることがわかる。したがって、(a) から (d) へのスペクトル変化は、p(Glu) の α -ヘリックス含有量が増加することに対応している。次に、CD 強度の温度と濃度依存性について検討を行なった。

α -ヘリックスの尺度として極小波長の 1 つである 223nm の CD 強度を用いてモル楕円率を求め、温度(15,25,35°C)を変えてプロパノール濃度(mol%)に対する変化を Fig.6 に示した。15°Cの時は、プロパノール濃度 3.4mol%まで直線的に変化している。これは、多くの p(Glu)単体がランダムコイルから α -ヘリックス体に急激に構造変化していることを示している。その後、残りの p(Glu)単体が緩やかに α -ヘリックス体を形成し、25.3mol%ですべての p(Glu)が α -ヘリックス体に構造転移し終わっていることを示している。25°Cの時は、プロパノール濃度 3.4mol%まで直線的に変化した。その後、10.7 mol%まで急激に変化した後、41.6 mol%まで緩やかに変化した。35°Cの時は、プロパノール濃度 5.3mol%まで直線的に変化した。その後、41.6mol%まで緩やかに変化した。プロパノール濃度が低濃度で変化するのは、15°C>25°C>35°Cの順番になった。このことから温度が低いほど、p(Glu)が変化しやすいことがわかった。さらに、各温度でプロパノール濃度 3.4mol%付近から変化の形が変わる事がわかった。これは、p(Glu)のランダムコイル構造に大きな変化が起きていると考えられる。

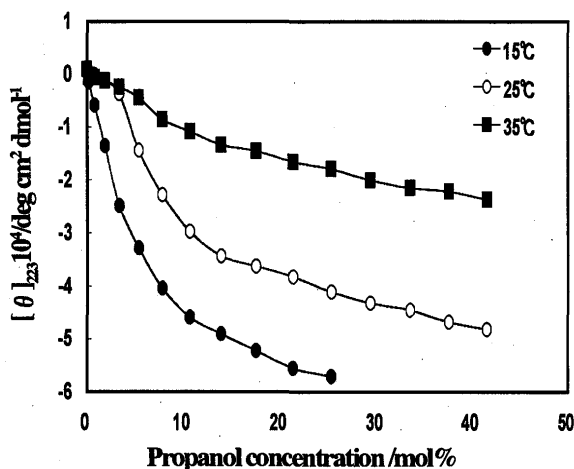


Fig.6 Propanol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu)

15°Cに温度調整した p(Glu)水溶液にイソプロパノールを添加した時の CD スペクトルを Fig.7 に示す。p(Glu)水溶液は、正に極大値を 1 つもつ典型的なランダムコイルの形をしている(a)。この溶液にイソプロパノールを添加していくと、次第に α -ヘリックスを誘導する変化が見られた(b,c)。イソプロパノール濃度が1.66mol%で、208nm と 223nm に 2 つの極小値をもつ典型的な α -ヘリックス

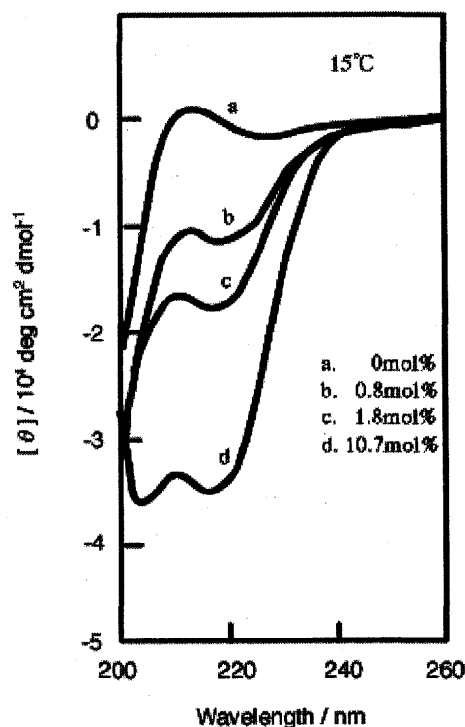


Fig.7 CD spectra of 0.2mM p(Glu) in iso-propanol aqueous solution

を形成した(d)。200nm 付近に等モル楕円率が観察されるので、ランダムコイルから α -ヘリックスへの 2 状態転移であることがわかる。したがって、(a)から(d)へのスペクトル変化は、p(Glu)の α -ヘリックス含有量が増加することに対応している。次に、CD 強度の温度と濃度依存性について検討を行なった。 α -ヘリックスの尺度として極小波長の 1 つである 223nm の CD 強度を用いてモル楕円率を求め、温度(15,25,35°C)を変えてイソプロパノール濃度(mol%)に対する変化を Fig.8 に示した。15°Cの時は、イソプロパノール濃度 3.4mol%まで直線的に変化している。これは、多くの p(Glu)単体がランダムコイルから α -ヘリックス体に急激に構造変化していることを示している。その後、残りの p(Glu)単体が緩やかに α -ヘリックス体を形成し、25.4mol%ですべての p(Glu)が α -ヘリックス体に構造転移し終わっていることを示している。25°Cの時は、イソプロパノール濃度 3.4mol%まで直線的に変化した。その後、41.7 mol%まで緩やかに変化した。35°Cの時は、3 つの階段状の変化が見られた。1 段目は、イソプロパノール濃度 3.4mol%、2 段目は、7.8mol%、3 段目は、21.4mol% で変化が緩やかになった。このことから、p(Glu)のコンホメーションは、多段的に変化して α -ヘリックス体へ誘導

する事がわかった。また、イソプロパノール濃度が低濃度で変化するのは、 $15^{\circ}\text{C} > 25^{\circ}\text{C} > 35^{\circ}\text{C}$ の順番になった。このことから温度が低いほど、p(Glu)が変化しやすいことがわかった。

拡散があまり広がらず、p(Glu)への影響が弱くなったためと考えられる。

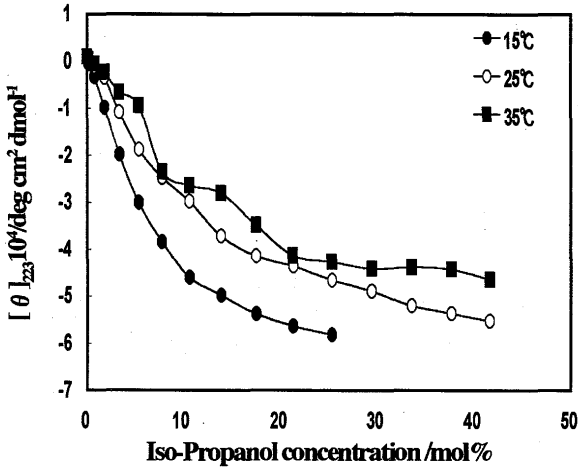


Fig.8 iso-Propanol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu)

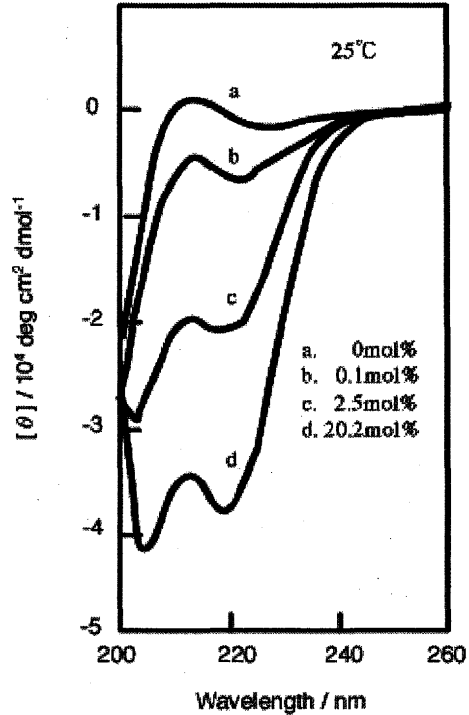


Fig.9 CD spectra of 0.2mM p(Glu) in t-butanol aqueous solution

25°C に温度調整した p(Glu)水溶液に t-ブタノールを添加した時の CD スペクトルを Fig9 に示す。p(Glu)水溶液は、正に極大値を 1 つもつ典型的なランダムコイルの形をしている(a)。この溶液に t-ブタノールを添加していくと、次第に α -ヘリックスを誘導する変化が見られた(b,c)。t-ブタノール濃度が 20.2mol%で、208nm と 223nm に 2 つの極小値をもつ典型的な α -ヘリックスを形成した(d)。200nm 付近に等モル楕円率点が観察されるので、ランダムコイルから α -ヘリックスへの 2 状態転移であることがわかる。したがって、(a)から(d)へのスペクトル変化は、p(Glu)の α -ヘリックス含有量が増加することに対応している。次に、CD 強度の温度と濃度依存性について検討を行なった。 α -ヘリックスの尺度として極小波長の 1 つである 223nm の CD 強度を用いてモル楕円率を求め、温度 ($25, 35^{\circ}\text{C}$)を変えて t-ブタノール濃度(mol%)に対する変化を Fig.10 に示した。 25°C の時は、t-ブタノール濃度 4mol%まで直線的に変化している。これは、多くの p(Glu)単体がランダムコイルから α -ヘリックス体に急激に構造変化していることを示している。その後、34.7mol%まで緩やかに変化した。 35°C の場合も 25°C と同様の変化が見られた。しかし、低濃度で変化したのは、 $35^{\circ}\text{C} > 25^{\circ}\text{C}$ の順番になった。これは、t-ブタノールの融点が 25.6°C のため分子の

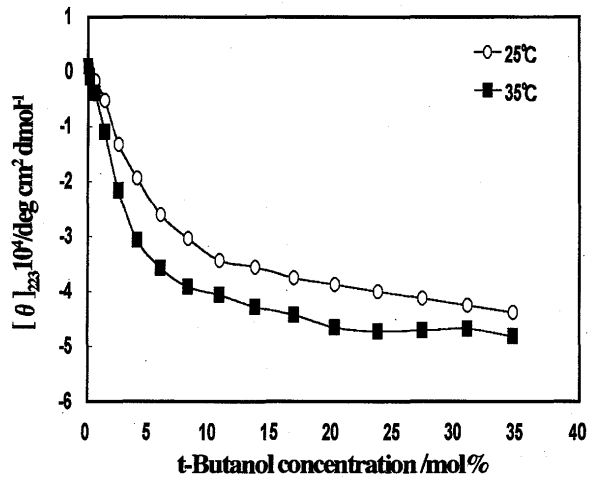


Fig.10 t-Butanol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu)

Fig.11 は、15°Cにおける各アルコール濃度に対するモル楕円率変化を示している。アルコール濃度 10mol%までを比較すると、低濃度で α -ヘリックスに誘導しているアルコールは、プロパノール>イソプロパノール>エタノール>メタノールの順になった。完全に α -ヘリックスに誘導する濃度は、プロパノール、イソプロパノール:25.4mol%, エタノール:30.3mol%, メタノール:38.5mol%であった。次に、Fig.12 は、25°Cにおける各アルコール濃度に対するモル楕円率変化を示している。アルコール濃度 10mol%までを比較すると、低濃度で α -ヘリックスに誘導しているアルコールは、*t*-ブタノール>イソプロパノール>プロパノール>エタノール>メタノールの順になった。完全に α -ヘリックスに誘導する濃度は、*t*-ブタノール:34.7mol%, イソプロパノール:41.7mol%, プロパノール:41.6mol%, エタノール:43.6mol%, メタノール:75.1mol%であった。さらに、Fig.13 は、35°Cにおける各アルコール濃度に対するモル楕円率変化を示している。アルコール濃度 10mol%までを比較すると、低濃度で α -ヘリックスに誘導しているアルコールは、*t*-ブタノール>イソプロパノール>エタノール>メタノール>プロパノールの順になった。完全に α -ヘリックスに誘導する濃度は、*t*-ブタノール:34.7mol%, イソプロパノール:41.7mol%, エタノール:43.6mol%, メタノール:75.1mol%であった。しかし、プロパノール:41.6mol%では、モル楕円率が他のアルコールに比べ半分くらいなので、まだ完全に α -ヘリックスに誘導されていないと考えられる。

4. まとめ

p(Glu)を α -ヘリックスに誘導しやすい温度は、15°C>25°C>35°Cであることがわかった。鎖長の長さで比べると15°C, 25°Cの時は、プロパノール>エタノール>メタノールの順で α -ヘリックスを誘導しやすいことがわかった。しかし、35°Cの時は、エタノール>メタノール>プロパノールになった。この点について今後、検討する必要がある。分子の大きさで比べると25°C,35°Cの時は、*t*-ブタノール>イソプロパノールであった。分子の大きさが大きいほど α -ヘリックスを誘導しやすいことがわかった。

参考文献

- 1) C.Tanford,adv.Protein Chem.,23,121(1968).
- 2) K.Hayakawa,Chem.Lett.,647(1980).
- 3) K.Kamio,Colloid Polym Sci,280,78(2002).
- 4) K.Kamio,Colloid Polym Sci,281,608(2003).

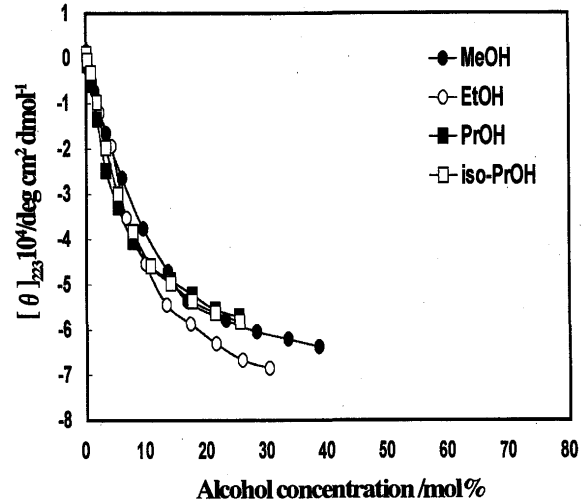


Fig.11 Alcohol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu) at 15°C

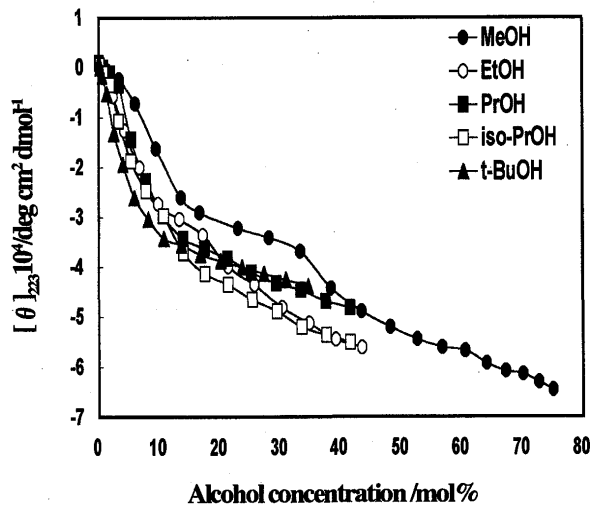


Fig.12 Alcohol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu) at 25°C

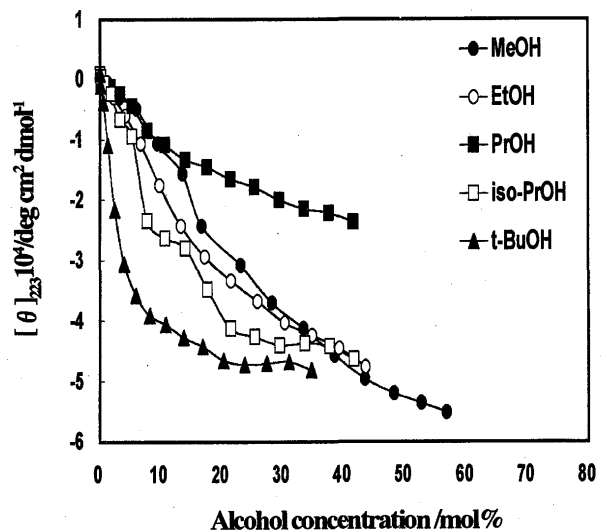


Fig.13 Alcohol concentration dependence of CD intensity at 223 nm for p(Glu) at 35°C