

2P022 赤外分光法によるポリペプチドの三重ヘリックス構造形成過程の研究

(関学大院理工) 橋本千尋, 滝川恭子, 尾崎幸洋

【緒言】

ゼラチン水溶液は温度により可逆なゾル-ゲル転移を起こし、低温で形成される三重ヘリックス構造が架橋点となりゲル化が起こることが知られている。三重ヘリックス構造は、ゼラチンのアミノ酸配列 $(X-Y-Gly)_n$ において X にプロリン(Pro) Y にヒドロキシプロリン(Hyp) が多く並ぶという特異性に起因し、本研究ではゼラチンモデル化合物として $(Pro-Pro-Gly)_n$ (PPG) を使用する。PPG はゼラチンと同様に低温で三重ヘリックス構造を形成し、ゼラチンのゾル-ゲル転移に対する基礎的な情報を示すことが期待される。本報告ではその形成に対する濃度及び pH 変化、塩添加の影響を赤外分光法により調べることを目的とする。

【実験】 濃度 0.3 ~ 1.0wt% の $(Pro-Pro-Gly)_{10} \cdot 9H_2O$ (ペプチド研究所) を D_2O に溶解し、55.0 から 24.0 まで 1.0 /6min で降温させながら、1.0 ごとに全反射吸収測定法 (ATR 結晶: ZnSe) により赤外スペクトルを測定した(Nicolet Nexus470)。同様に HCl を加えて pH7~pH2 に調整した 1wt% PPG/ D_2O 、あるいは LiCl を添加した 1wt% PPG/ D_2O の赤外スペクトルを透過法 (窓板: CaF_2 スペース厚さ: 0.6 μm) により測定した。

また、濃度 5.0 ~ 10.0wt% のゼラチン (Aldrich G 9382 TypeB, $M=40,000-50,000$) を D_2O に溶解し、同様に 1.0 /6min で降温させながら赤外スペクトルを測定した。

【結果・考察】 1.0% PPG/ D_2O の赤外スペクトルのアミド I 領域を Fig.1 に示す。高温ではスペクトルはブロードで特徴的なバンドが観測されないが、温度が下がるにつれ $1628cm^{-1}$ 、 $1644cm^{-1}$ 、 $1668cm^{-1}$ の 3 つのバンドが現れる。これらはそれぞれ三重ヘリックス構造に由来し、 $1644cm^{-1}$ は Fig.2 に示すようなイミノの C_2O_2 とアミノの H_1N_1 との分子間水素結合に由来するバンドであり、 1628 、 $1688cm^{-1}$ はそれぞれ C_1O_1 と C_3O_3 に対応する¹。これらのバンド変化から三重ヘリックス形成の度合いを求めるため、スペクトルの二次微分が常に 0 を示す $1640cm^{-1}$ のバンドに対する $1644cm^{-1}$ バンドの強度比を求め、温度に対しプロットしたところ Fig.3 のような

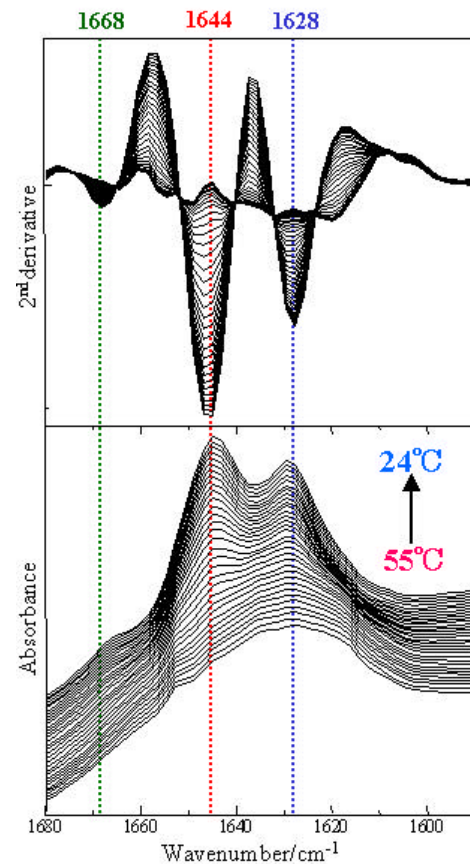


Fig.1 IR spectra of 1.0wt% PPG / D_2O and its 2nd derivatives.

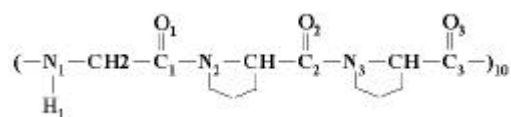


Fig.2 Structural formula of PPG

S 字曲線が得られた。この S 字曲線の変曲点を転移温度とすると、転移温度は PPG 濃度が低くなるにつれ低下した。このとき三重ヘリックス形成が $3A \leftrightarrow B$ のような化学平衡で書き表されると仮定し、Eldrich らの考え方を参考に² この平衡定数を Van't Hoff の式に代入すると以下の式が得られる。

$$\ln \frac{f}{(1-3f)^3} = -\frac{DH}{RT} + const \quad (1)$$

は PPG のモル濃度、H は三重ヘリックス構造形成に伴うエンタルピー変化、R 気体定数、T 転移温度、a 定数である。Fig. 4 に示すように転移温度と PPG 濃度の関係は式(1)でよく表され、フィッティングの結果得られた PPG/D₂O の H は 136kJ/mol (= 50J/g) であり、DSC 測定により得た値 103 kJ/mol (= 38.4 J/g) とほぼ一致した。一方、ゼラチン/D₂O について同様の実験を行ったところ、Fig. 4 に示すように PPG と同様に式(1)の関係で表され、

H=130kJ/mol(= 2.6-3.2 J/g) が得られた。DSC では H=15~24J/g となり、赤外・DSC 共に PPG の方がゼラチンよりも三重ヘリックス構造形成に伴うエンタルピー変化が大きいことが示唆された。

また、PPG 重水溶液に HCl 及び LiCl を加えた場合、アミド I 領域での赤外スペクトル変化は特に観測されなかった。しかし上述した方法で同様に赤外スペクトルから求めた PPG の転移温度は pH が低くなるほど上昇し、LiCl を加えると急激に下がった。これは HCl、LiCl といった添加イオンが架橋構造自身に変化は与えないものの、三重ヘリックス形成に伴う水和に影響を与えていることを示唆している。PPG の三重ヘリックス形成に水が積極的に関与していることは PPG フィルムに対する赤外分光及び X 線回折の結果からも示唆されており、本実験ではさらに他の塩などの添加に伴うスペクトル及び転移温度変化について調べ、その系統性について議論を行う。

1. Y.A.Lazarev et al., Biopolymer, 32, 189 (1992)
2. Eldridge, J.E.; Ferry, J.D., J.Phys.Chem. 58, 992 (1954)

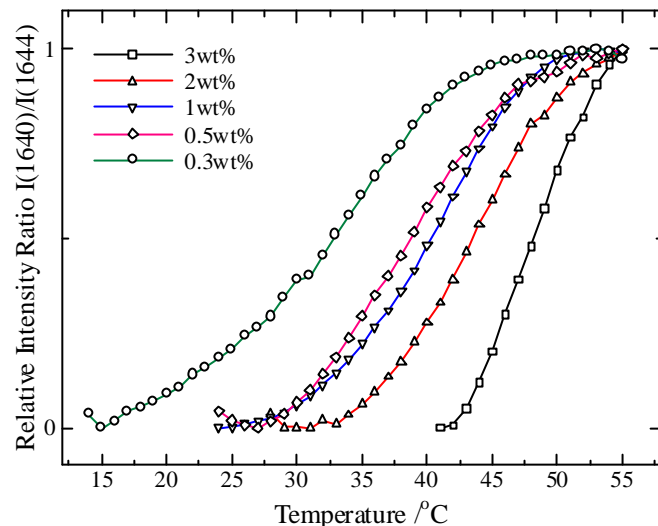


Fig.3 Plot of relative intensity ratio of 0.3 – 3.0 wt% PPG/D₂O against temperature

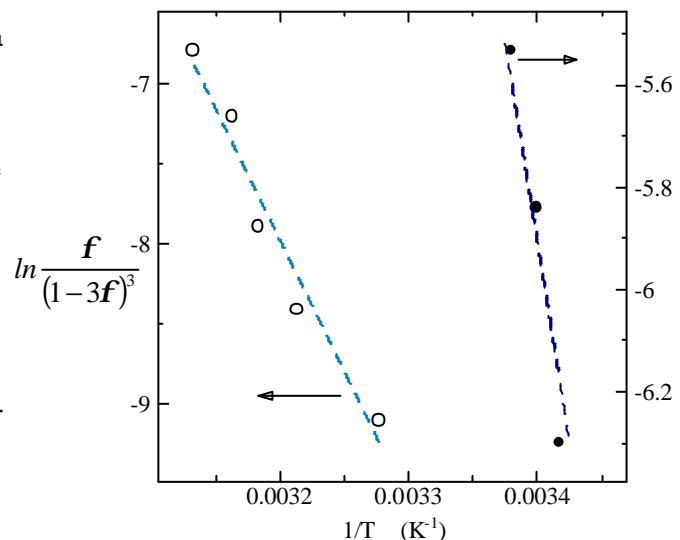


Fig.4 Plot of transition temperature T vs. concentration . :PPG :Gelatin ---:Eq. (1)