

モデル小ペプチドのアルコール誘起 α -ヘリックス形成における 溶媒環境の役割

藤永 丈晴¹・中村 智¹・Sergey Krishtal¹・吉田 亨次¹・李 相男¹・
金澤 健治²・根本 直²・山口 敏男^{1,*}

(平成18年11月30日受理)

On the Role of Solvent Environment in Alcohol-induced α -helix Formation of Model Peptides

Takeharu FUJINAGA¹, Satoshi NAKAMURA¹, Sergey KRISHTAL¹,
Koji YOSHIDA¹, Sannum LEE¹, Kenji KANAZAWA², Tadashi NEMOTO², Toshio YAMAGUCHI^{1,*}

(Received November 30, 2006)

Abstract

The role of solvent environment in alcohol-induced α -helix formation of 10 and 17 residues peptides synthesized is discussed in view of the structure of aqueous solutions of methanol (MeOH), ethanol (EtOH), 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) and 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP). The alcohol concentration dependence of molar ellipticity values at 222 nm for both peptides was measured to estimate the amount of the α -helix formation of the peptides in the alcohol-water mixtures. The order of α -helix formation is consistent with the order in solvent structural transition at specific alcohol concentrations. The 2D-NMR spectra for the 10 residues peptide in ethanol-water mixtures were measured to obtain conformational information of the peptide. The NMR results were in good agreement with those of replica-exchange molecular dynamics (REMD) simulation. The detailed solvation structure of the 10 residues fragment in ethanol-water mixtures was revealed by REMD and 2D-NMR.

¹ 福岡大学理学部化学科

Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

² 産業技術総合研究所生物情報解析研究センター

Biological Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8567 Japan

* 連絡先：山口敏男, 福岡大学理学部化学科, 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

tel: 092-871-6631 内線 6224, fax: 092-865-6030, e-mail: yamaguch@fukuoka-u.ac.jp

Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

1. 序 論

アルコールは水と容易に混合する両親媒性溶液であることは良く知られている。アルコール-水混合溶媒は、アルコール濃度に応じて諸物性を連続的に変化させることができるので、クロマトグラフィーやタンパク質の変性溶媒として広く用いられている。我々は、これまでヘキサフルオロイソプロパノール HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol), トリフルオロエタノール TFE (2,2,2-trifluoroethanol), エタノール EtOH (ethanol) やメタノール MeOH (methanol) の各アルコール-水混合溶媒についてX線回折や小角散乱測定によりミクロスコピックやメゾスコピックの構造を決定してきた[1-4]。その結果、アルコールの種類に依存して、特定のアルコール濃度において、四面体状の水クラスター構造から、鎖状のアルコール本来の構造への転移が起こることを明らかにした。例えば、EtOH-水混合溶媒では、EtOH モル分率 $x < 0.2$ では水の四面体類似構造が支配的となり、 $0.2 \leq x < 1.0$ では EtOH 鎖状構造が支配的になる[5]。一方、中性子小角散乱からは、濃度揺らぎの指標である相関長が得られる。その極大の位置はアルコールと水双方のクラスターが最大になることを示す。得られた結果から、HFIP > TFE > EtOH の順序でアルコールの低モル分率側において極大を示すことが明らかになった。また、その極大は同様の順序で鋭くなり、明瞭な濃度揺らぎが起こることを示している。

アルコールは、タンパク質やペプチドに対して、 α -ヘリックス構造を誘起する溶媒として知られている。Hong らは、上記のアルコール-水混合溶媒系において、各アルコールに特有な組成で melittin のランダム構造から α -ヘリックス構造への構造転移が起こることを報告した[6]。 α -ヘリックス構造転移の傾向の強さは HFIP > TFE > EtOH の順序であり、HFIP と TFE では α -ヘリックス生成曲線に顕著な変曲点が見られた。これらの結果は、上記の混合溶媒の中性子小角散乱から得た結果と非常に良い相関があった。このようにアルコール-水混合溶媒系における溶媒構造転移と α -ヘリックス構造転移の誘発における傾向の強さには相関が見られる。このこと

から α -ヘリックス構造転移に溶媒環境が深くかかわっていることが示唆される。そこで本研究では、モデルペプチドを用いて両者の関係を詳細に調べることとした。モデルペプチドとしては、物理化学的なポテンシャル関数と立体化学的な拘束とに基づく計算アルゴリズムをもとに、 $\beta\beta\alpha$ 型のジंकフィンガー領域構造をとる 28 残基人工小タンパク質 Full Sequence Design-1 FSD-1 (QQYTAKIKGRTRNEKELRDFIEKFKGR) (PDB ID :1FSD) を選んだ。そのタンパク質の溶液中での構造は、目標とする折りたたみ構造をとることが示されている[7]。我々はこの小タンパク質のうちの FSD-1 の一部 10 (ELRDFIEKFK) および 17 残基フラグメント (KGRTFRNEKELRDFIEK) を合成し、HFIP, TFE, EtOH, MeOH の各水混合溶媒に対して円偏光二色性 (CD) スペクトルのアルコール濃度依存性を測定し、両フラグメントの二次構造変化と溶媒構造転移との相関を考察した。さらに、CD 測定では得られない立体構造情報を得るために 2D-NMR 測定を EtOH-水混合溶媒中で行った。我々はすでに、レプリカ交換分子動力学 (REMD) シミュレーション法により、28 残基の α -ヘリックスの一部である 10 残基フラグメントが水中においてランダム構造を示すのに対して、EtOH 中ではターンと α -ヘリックス構造を示し、コンパクトな構造になることを報告している[8]。そこで、EtOH-水混合溶媒で行われた REMD 計算と 2D-NMR 測定の結果の比較から α -ヘリックス構造転移における溶媒環境の役割を考察した。

2. 実 験

2.1 10,17 残基ペプチドの合成と精製

10 残基ペプチドの合成は、バッチ式 Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相合成法で行った。装置は 433A peptide synthesizer (Applied Biosystems) を使用した。Fmoc-Lys (tBoc)-PEG-PS 樹脂を出発物質とし、結合剤として HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl) 1,1,3,3-tetramethyluoromium hexafluorophosphate), HOBT (1-Hydroxybenzotriazole), 脱 Fmoc 試薬として DIEA (N,N-Diisopropylethylamine) を用いた。樹脂は Applied Biosystems より購入し、

各種アミノ酸, 結合剤, DIEA は渡辺化学工業より購入した. バッチ式 Fmoc 固相合成法では, Fmoc 基と呼ばれる保護基を C 末端側に導入した樹脂に, 順次アミノ酸を導入しポリペプチド鎖を構築した. バッチ式では, 各ステップにおいてろ過と再膨潤を繰り返し行った. 合成終了後, ペプチドを減圧乾燥させた. ペプチド (0.25 mmol) に対して結晶フェノール (0.75 g), 1,2-エタンジチオール (0.25 ml), チオアニソール (0.5 ml), トリフルオロ酢酸 (8.25 ml), 水 (0.5 ml) を加えて室温で 2 時間攪拌した. ろ過して得られた溶液にエーテルを加えデカンテーションによって粗ペプチド粉末を得た. 得られた粗ペプチドを三次水に溶解し, 分析用 C18RP-HPLC カラム (内径 4.6 mm, カラム長 250 mm) を用いて, 0.1% トリフルオロ酢酸含有アセトニトリルおよび三次水を展開溶媒として, ペプチドがどの溶媒組成で溶出するかを調べた. その確認は MALDI-TOF 質量分析法によって行った. 装置は, Voyager-DE STR (PerSeptive Biosystems) を用いた. 目的ペプチドの溶出位置を確認後, 調製用 C18RP-HPLC カラム (内径 20 mm, カラム長 250 mm) を用いて精製を行った. 同様の手法で 17 残基ペプチドの合成も行った. ただし, 粗ペプチド粉末化後に SephadexG-25 ゲルクロマトグラフィーを用いて, 30% (v/v) 酢酸溶液中でゲルろ過, その後 RP-HPLC による精製を行った.

2.2 円偏光二色性 (CD) 測定

全ての CD スペクトルは, JASCO-J-805 分光偏光計でセル長 10 mm の石英セルを用いて得られた. ペプチドの濃度は, 10 残基ペプチドが $60 \mu\text{M}$ で 17 残基ペプチドは $50 \mu\text{M}$ で測定した. 溶媒は, MeOH, EtOH, TFE, HFIP を用いた. MeOH と EtOH は上野化学工業から, TFE は Aldrich から, HFIP は和光純薬工業からそれぞれ購入し, そのまま使用した.

2.3 NMR 測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルは, Varian INOVA600 分光計を用いた. 溶媒は EtOH-水混合溶媒 (エタノールモル分率 $x_{\text{EtOH}} = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$) でロック溶媒として 5% (v/v) の重水を含んで

いる. ペプチドの濃度は, 2 mM (水中, $x_{\text{EtOH}} = 0.1$) と 1 mM ($x_{\text{EtOH}} = 0.2, x_{\text{EtOH}} = 0.3, x_{\text{EtOH}} = 0.4$) で行った. TOCSY 測定は, 150 ms のミキシングタイムで行った. NOESY 測定は, 100, 300, 500, 700 ms のミキシングタイムで行った. 残留水の除去は, Watergate プログラムによって行った. 全ての 2 次元スペクトルは, 8 kHz のスペクトル幅, 2048×256 データポイントで測定した. スペクトル解析には, MESTRELAB RESERCH 社の Mest ReC を用いた.

3. 結果と考察

3.1 CD 測定によるモル楕円率のアルコール依存性

Fig. 1 に EtOH-水混合溶媒系における 10, 17 残基ペプチドの CD スペクトルを示す. その水中におけるスペクトルは, 200 nm 付近に極小値を持ち, 典型的なランダム構造であることを示す. EtOH-水混合溶媒系では, EtOH モル分率の増加と共に 208, 222 nm 付近に極小値を示すスペクトルへの連続的な変化が観測された. このことはランダム構造から α -ヘリックス構造への構造の移行を示し, 205 nm 付近で等吸収点が見られることから 2 相転移であることを示す. そこで, 10, 17 残基ペプチドそれぞれに対して MeOH, EtOH, TFE, HFIP-水混合溶媒系で CD 測定を行った.

次に, ランダム構造 \rightarrow α -ヘリックス構造転移のアルコール濃度依存性を調べるために, 222 nm におけるモル楕円率をアルコールモル分率に対してプロットした (Fig. 2). 10, 17 残基ペプチド共にアルコールモル分率の増加に伴って α -ヘリックス構造の増加が見られた. その変曲点の位置は, HFIP, TFE, EtOH の順序で低モル分率側において観測された. また, HFIP と TFE では顕著な変曲点が観測された. これらの結果は, 混合溶媒の中性子小角散乱によって得られたデータと良い相関が見られる. 次に, CD 測定で得られない立体構造情報を得るために 2D-NMR 測定を行った.

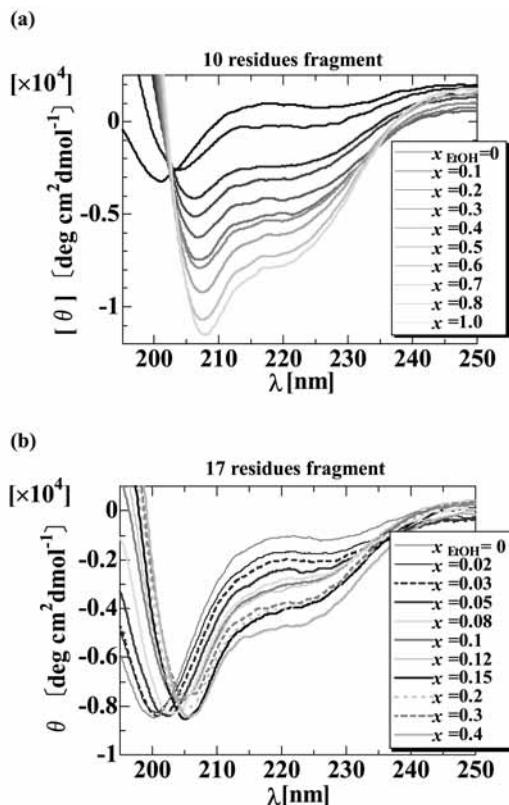


Fig.1. Far UV CD spectra of (a) 10 residues fragment and (b) 17 one in ethanol-water mixtures

3.2 2D-NMR 測定による三次構造の決定

3.2.1 ペプチド主鎖に特有なシグナルの帰属

2D-NMR 測定は, EtOH-水混合溶媒系 ($x_{\text{EtOH}} = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$) において測定した. CD 測定の結果から, 水中では典型的なランダム構造を示し, EtOH モル分率の増加と共に α -ヘリックス構造転移が起こることが示されている.

最初に, TOCSY 測定により主鎖構造のシグナルの帰属を行った. Fig. 3 に水中における部分的な TOCSY スペクトルを示す. 重水素で置換されてしまう N 末端側の Glu 残基を除く 9 種類の NH 基からのシグナルを得た. 同様にして EtOH-水混合溶媒のシグナルの帰属も行った. この TOCSY から得られた主鎖のシグナルの結果を用いて, H-H 間距離に依存してシグナルを得られる NOESY スペクトルの帰属を行うことが出来る.

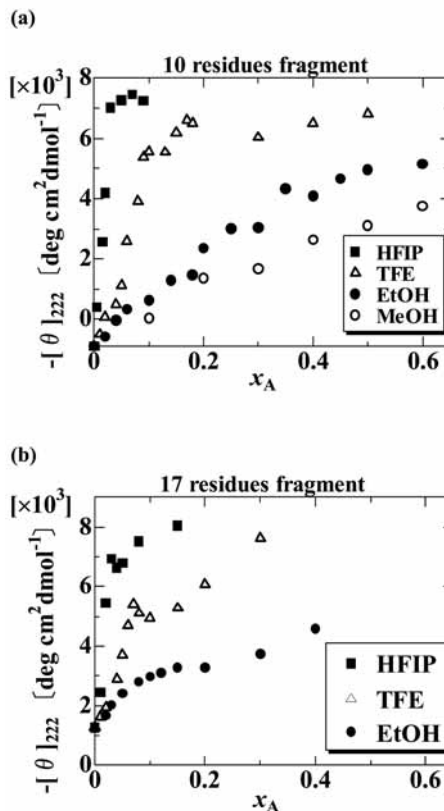


Fig.2. Alcohol concentration dependence of CD ellipticity at 222 nm for (a) 10 residues fragment and (b) 17 one in MeOH, EtOH, TFE, HFIP-water mixtures.

3.2.2 C^αH ケミカルシフト分析

ペプチドやタンパク質の C^αH のケミカルシフトは, その立体構造に対して非常に繊細な反応を示す. 特に α -ヘリックス構造を形成している場合, ランダム構造の時のケミカルシフトから高磁場シフトをするという特徴がある [9]. そこで, 10 残基ペプチドの水中における C^αH のケミカルシフトから EtOH-水混合溶媒中でのケミカルシフトを差し引いたのが Fig. 4 である. $x = 0.1$ においては変化が見られなかったが, $x \geq 0.2$ では 3 ~ 5 残基の R₃-D₄-F₅ において高磁場シフト観測された. C^αH ケミカルシフトからは R₃-D₄-F₅ を中心とした α -ヘリックス構造転移が示唆される.

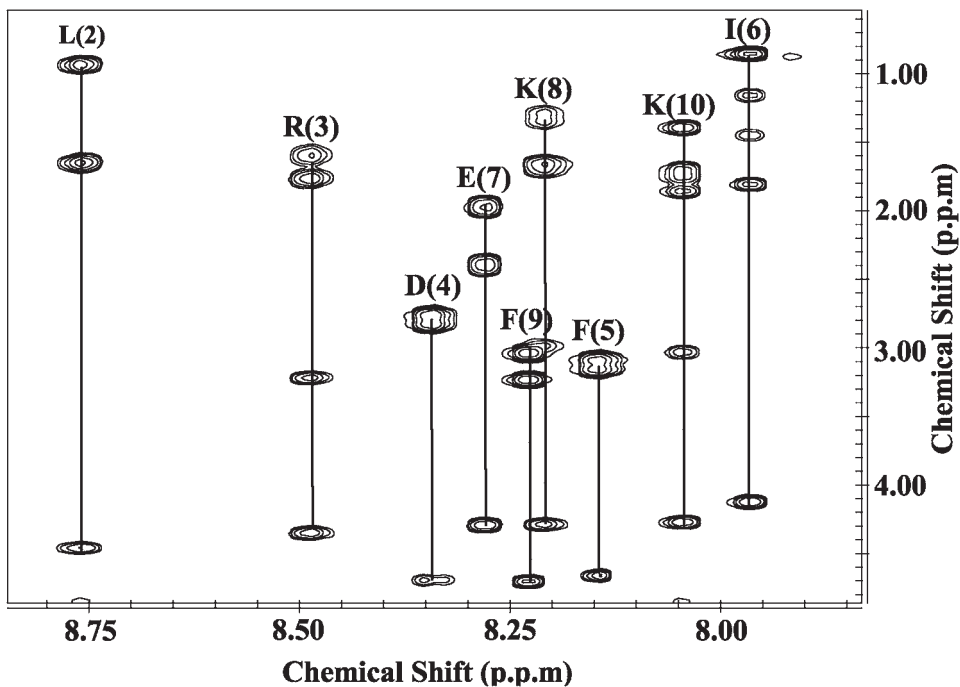


Fig. 3. Partial TOCSY spectrum ($C^{\alpha}H-NH$) of 10 residues fragment in water at 298 K. Peptide concentration was 2 mM. The text in parentheses is residue number.

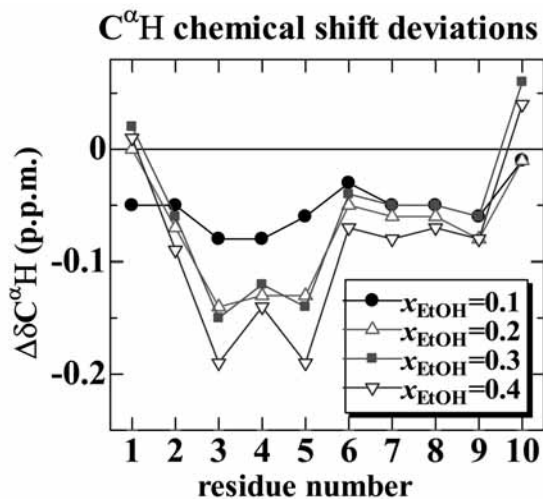


Fig. 4. The $C^{\alpha}H$ chemical shift deviations from the random structure values for 10 residues fragment in EtOH-water mixtures at $x_{EtOH} = 0.1, 0.2, 0.3$ and 0.4 and 298 K.

3.2.3 核オーバーハウザー効果 (NOE)

Fig. 5 は, $x_{\text{EtOH}} = 0.4$ 中の側鎖の CH と NH 間の NOE と NH-NH 間の NOE を示した. また, Fig. 6 には CH-NH 間の NOE の数と NH-NH 間の有無を示した. CH-NH シグナルの数を見ると, $x_{\text{EtOH}} = 0, 0.1$ においては隣接した残基間での NOE しか観測されなかった. しかしながら, EtOH モル分率の増加に伴い, 2~3 残基先の側鎖との相互作用が観測された. また, $x_{\text{EtOH}} = 0.1$ では

隣接した NH-NH 間の NOE だけであったが, $x_{\text{EtOH}} = 0.4$ では特徴的な残基間 NOE が観測された. $E_7(\text{NH}) \rightarrow D_4(\text{C}^\alpha\text{H})$, $D_4(\text{NH}) \rightarrow E_1(\text{C}^\gamma\text{H})$, $E_7(\text{C}^\beta\text{H})$, $D_4(\text{NH}) \leftrightarrow E_7(\text{NH})$ のシグナルは, Asp 残基を中心とした α -ヘリックスへの構造転移を示唆する. このことは, C^αH ケミカルシフト偏差から得られた R_3 - D_4 - F_5 を中心とした構造転移の結果と一致する.

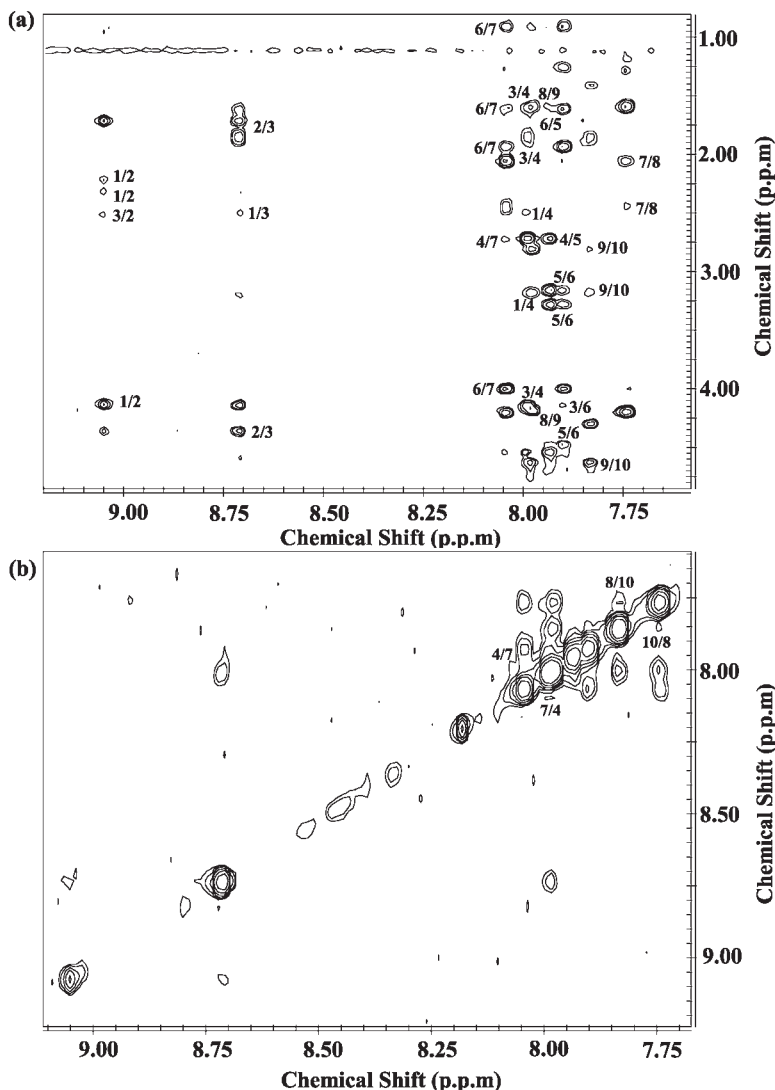


Fig. 5. Partial NOESY spectra of 10 residues fragment in EtOH-water mixture at $x_{\text{EtOH}} = 0.4$ and 298 K to show NOE contacts of (a) CH / NH and (b) NH / NH NOE connecting. A mixing time of 700 ms was used to measure these NOESY spectra.

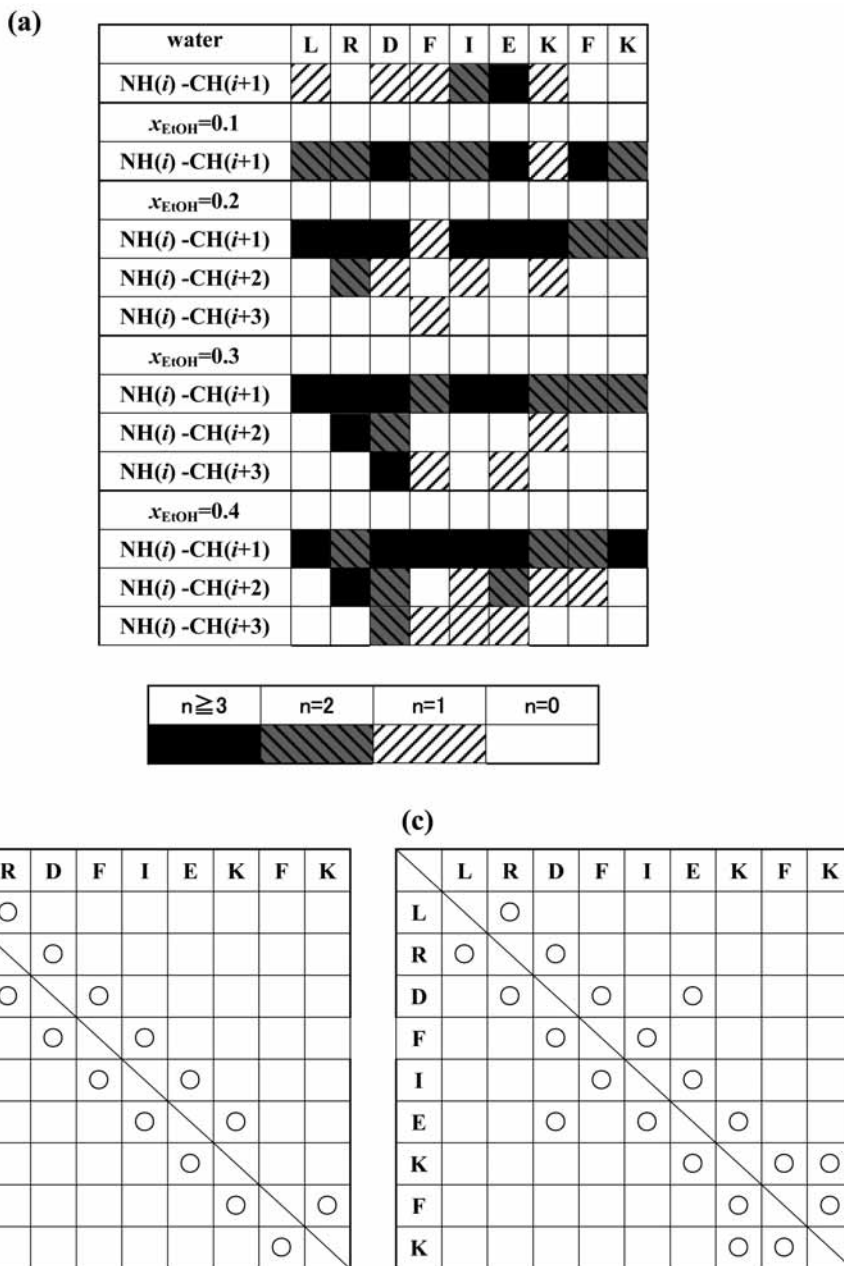


Fig. 6. Summary of observed NOEs (NH-CH) for 10 residues fragment in EtOH-water mixtures at $x_{\text{EtOH}}=0, 0.1, 0.2, 0.3$ and 0.4 (a). The amino acid sequence is shown at the top. The number of the NOEs (n) are categorized as $n \geq 3$, $n=2$, $n=1$ or $n=0$ and marked according by different shades. Summary of observed NOEs (NH-NH) at $x_{\text{EtOH}}=0.1$ (b) and 0.4 (c). The amino acid sequence is shown at the top and side. The NOEs are indicated by circles (○).

3.3 REMD シミュレーション計算結果との比較

最後に CD 測定, 2D-NMR 測定で得られた結果と本研究室で行われた REMD シミュレーション計算結果との比較を行い, α -ヘリックス構造転移に対する溶媒効果を考察する. 今回, $x_{\text{EtOH}} = 0, 0.4, 1.0$ の組成で計算が行われた[10]. 計算条件は, 以下の通りである. 水のモデルは TIP 3P で 910 分子 ($x_{\text{EtOH}} = 0$), EtOH のモデルは GAFF (General Amber Force Field) で 698 分子 ($x_{\text{EtOH}} = 1$), 385 水分子と 578 EtOH 分子 ($x_{\text{EtOH}} = 0.4$), ペプチドは 10 残基ペプチド (E^- -L-R $^+$ -D $^-$ -F-I-E $^-$ -L $^+$ -F-L $^+$), 力場は FF03 (Duang ら), パッケージプログラムは Amber8 (カリフォルニア大学), 温度は 250 ~ 650 K (32 レプリカ), 経過時間は 1 ns ($\Delta t = 1$ fs) で行った.

水中における計算結果は, 実験と同様にランダム構造であることがわかる (Fig. 7a). EtOH 中においては, N 末端側で α -ヘリックスへの構造転移が観測された (Fig. 7c). α -ヘリックスへの構造転移に伴う E $_1$ -D $_4$ -E $_7$ の接近が見られる. このことは, 2D-NMR 測定の結果と良い相関がある. $x_{\text{EtOH}} = 0.4$ においては, EtOH 中ほどではないがランダム構造から α -ヘリックス like な構造へと変化しているのがわかる. また, EtOH の計算結果と同様に E $_1$ -D $_4$ -E $_7$ の接近が見られる. 2D-NMR 測定と REMD 計算結果には良い相関が見られた.

ここで, EtOH-水混合溶媒中のペプチド近傍の溶媒環境に注目する (Fig. 8). N,C 両末端では水分子が多く存在しているのがわかる. これは, 両末端, E $_1$ (CO $_2^-$), K $_{10}$ (NH $_3^+$) 基により親水性を示すためだと考えられる. 逆に Phe 基近傍や, Ile などの疎水性の領域では EtOH 分子が多く存在している. このように, ペプチド近傍において選択的溶媒和が観測された. 次にペプチド各残基と 6 Å 以内にある溶媒との水素結合数の変化を Fig. 9 に示した. ペプチド中心部において EtOH の添加に伴い水素結合数の減少が見られる. このことから, α -ヘリックスへの構造転移はペプチド近傍で選択的溶媒和が起こり, それに伴いペプチド中心部で溶媒との水素結合数が減少してペプチド分子内での水素結合が有利になって起こることが示唆される.

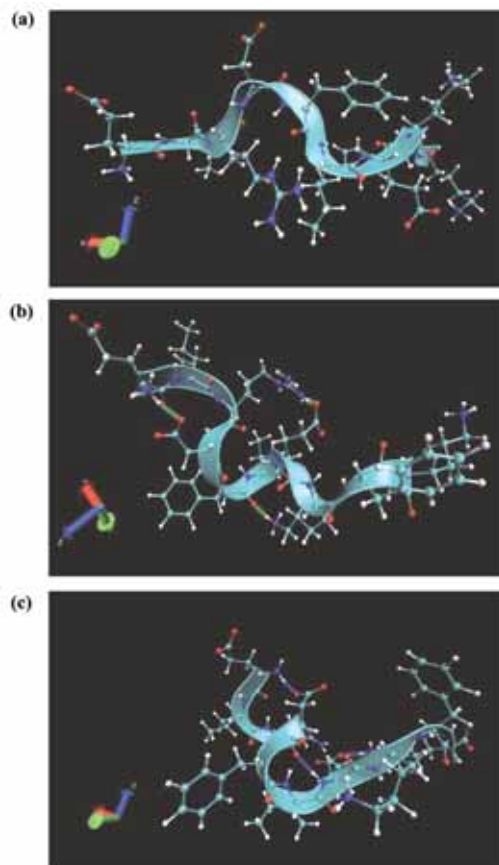


Fig. 7. Averaged structure of 10 residues fragment in EtOH-water mixtures at $x_{\text{EtOH}} = 0$ (a), 0.4 (b) and 1.0 (c) obtained from REMD simulations.

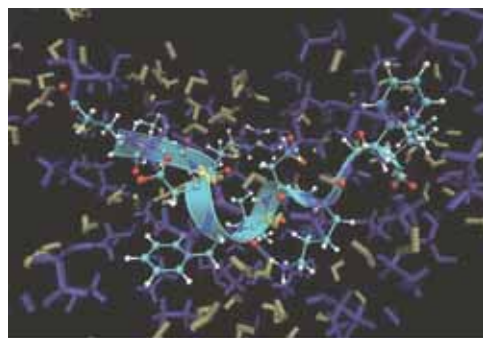


Fig. 8. Averaged structure of 10 residues fragment, EtOH and H $_2$ O molecules in EtOH-water mixtures at $x_{\text{EtOH}} = 0.4$. Blue and yellow sticks indicate EtOH and water molecules, respectively.

number of H-bond changes for each residue

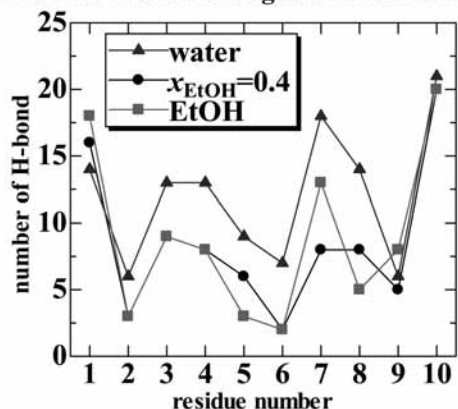


Fig.9. The number of H-bonding events between solvents and each residue of 10 residues fragment in EtOH-water mixtures at $x_{\text{EtOH}} = 0, 0.4$ and 1.0 during the simulation time. The distances between the atom of solvents and peptide are within 6 Å.

4. 結論

CD測定により水中におけるモデルペプチドはランダム構造であることが分かった。しかし、アルコールの添加に伴い α -ヘリックスへの構造転移が観測された。 α -ヘリックスへ形成の傾向の強さは HFIP > TFE > EtOH である。また、HFIPと TFE では変曲点がシャープであった。これらの結果は、中性子小角散乱の結果と良い相関が見られる。2D-NMR測定は、EtOH-水混合溶媒中で行った。C^αH偏差の結果からは、N末端側の R₃-D₄-F₅において高磁場シフトが観測された。また、E₁⇌D₄⇌E₇で特徴的なNOEが観測された。2D-NMR測定では、D₄残基を中心とした α -ヘリックスへの構造転移が示唆される。REMD計算結果は、2D-NMRの結果と良い相関が見られた。また、ペプチド近傍においては選択的溶媒和が観測された。この選択的溶媒和によりペプチド内部の水素結合が増加して α -ヘリッ

クスへの構造転移が誘発されることが示された。

5. 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金 (15076211, 17550023, 16GS0417), 文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業 (平成17年度~平成19年度), 福岡大学研究推進部の研究経費によるものである。

参考文献

- [1] T. Takamuku, T. Yamaguchi, M. Asato, M. Matsumoto and N. Nishi, *Z. Naturforsch.* **55 a**, 513-525 (2000).
- [2] M. Matsumoto, N. Nishi, T. Furusawa, M. Saita, T. Takamuku, M. Yamagami and T. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 1775-1783 (1995).
- [3] T. Takamuku, T. Kumai, K. Yoshida, T. Otomo and T. Yamaguchi, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 7667-7676 (2005).
- [4] K. Yoshida, T. Yamaguchi, T. Adachi, T. Otomo, D. Matsuo, T. Takamuku and N. Nishi, *J. Chem. Phys.*, **119**, 6132-6142 (2003).
- [5] T. Yamaguchi, *Pure Appl. Chem.*, **71**, 1741-1751 (1999).
- [6] D. Hong, M. Hoshino, R. Kuboi and Y. Goto, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8427-8433 (1999).
- [7] Bassil I. Dahiya and Stephen L. Mayo, *Science*, **278**, 82-87 (1997).
- [8] K. Yoshida, T. Yamaguchi and Y. Okamoto, *Chem. Phys. Lett.*, **412**, 280-284 (2005).
- [9] D.S. Wishart, B.D. Sykes and F.M. Richards, *J. Mol. Biol.*, **222**, 311-333 (1991).
- [10] S. Krishtal, K. Yoshida and T. Yamaguchi, unpublished.

