

モデルペプチドの高分解能解析から分かった 天然コラーゲンの分子構造



研究ノート

奥山 健二*

Molecular structure of native collagen based on the single crystal analyses of model peptides at high resolution

Key Words : collagen, triple helix, model peptide, helical twist

1. はじめに

コラーゲンは我々の体に一番多く存在するタンパク質であり、皮膚、骨、血管壁、腱などに分布している。現在では約30種のコラーゲンが知られており、その特徴は特異なアミノ酸配列に基づくtriple helix構造である。これまで分子構造が研究されてきたのは最初に発見されたI型コラーゲンであり、分子は2本の α_1 鎖と1本の α_2 鎖からなる3本鎖構造をしている。 α_1 鎖と α_2 鎖のアミノ酸配列は非常に似ており、どちらも両末端の10~20残基を除き、Gly-X-Yと言う3残基(triplet)が330回以上繰り返す特殊な配列である。XとYの位置には、それぞれProとHyp(4(R)-hydroxyproline)が頻繁に出現する。

このアミノ酸配列の特徴を巧みに説明するtriple helix構造はRamachandranにより最初に提案された。¹⁾しかし、このモデルは立体化学的に無理な水素結合を含んでいるとして、RichとCrickは数ヶ月後に修正したモデルを発表した。²⁾その後の詳細な解析により、³⁾教科書に掲載されているRich & Crickモデルとなつた(図1a)。DNAの二重らせんに続いて、Crickはコラーゲンの三重らせんも決定したことになる。

このモデルはさらにFraserらにより精密化された。⁴⁾

一方、蛋白研の榎原らはモデルペプチド(Pro-Pro-Gly)₁₀を固相合成し、単結晶を得た。この単結晶からのX線回折データは明瞭に纖維周期が2.0 nmの7/2-helixを示しており、天然コラーゲンに対するRich & Crickモデル(纖維周期2.86 nmの10/3-helix)とは異なった。その後、コラーゲンの纖維回折像も定性的には7/2-helixで説明できること、過去には纖維周期として2.0 nmと2.9 nmの両方が提案されていたこともわかり、我々は7/2-helixを新しい構造モデルとして提案した(図1b)。⁵⁾しかし、これまでのところ注目されてはいない。10年前からモデルペプチドを用いたコラーゲンの構造研究が、日本(我々)、アメリカ、イタリアのグループで再び始まり、これまでに20個のペプチドが高分解能で構造解析された。これらの分子構造は基本的には全て7/2-helixであったが、依然として天然コラーゲンの構造とモデルペプチドの構造は違うのだとする見解が世界の研究者の大勢

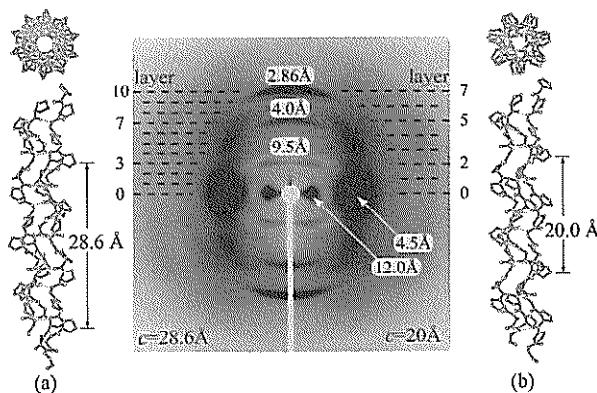


図1 天然コラーゲン(カンガルーの尻尾の腱)のX線回折像と、(a)Rich & Crickの10/3-helix model、(b)我々の7/2-helix model。破線は、2通りの纖維周期に基づく層線を示す。



*Kenji OKUYAMA
1947年1月生
1972年大阪大学大学院理学研究科高分子学専攻修了
現在、大阪大学・大学院理学研究科・高分子科学専攻、教授、理学博士、生体高分子構造
TEL 06-6850-5455
FAX 06-6850-5455
E-mail : okuyamak@chem.sci.osaka-u.ac.jp

である。我々は最近、天然コラーゲンの構造解析を行うと共に、モデルペプチドの構造から計算したhelical twistについて考察し、非常に重要な結論を得た。

2. 天然コラーゲン繊維のX線構造解析

カンガルーの尻尾の腱は、そのままの状態でも分子が配向しており、古くから構造研究に用いられてきた。我々もワラビーやカンガルーの尻尾の腱を使い回折実験を行った。図1は典型的な回折像で、放射光(SPring-8)で撮ったものである。バックグラウンド除去後、2.0 nmおよび2.9 nmの纖維周期に基づく層線上(図1の破線上)のX線回折強度からFo(実測の構造振幅)を求めた。一方、2つの分子モデルに対して円筒平均の分子構造因子Fcを計算し、 $(|F_0|-|F_c|)^2$ が最小になるようにモデル構造を精密化した。その際、天然コラーゲン中のイミノ酸の出現頻度を考慮したり、モデルペプチド単結晶中で明確になった結合水を導入するという工夫も行った。その結果、モデルの信頼度を示すR-因子は7/2-helixモデルで0.24、10/3-helixモデルで0.26となった。これにより、これまで天然コラーゲンの回折像は10/3-helixモデルでしか説明できないとされてきたが、7/2-helixモデルでも何ら問題なく説明できることを定量的に証明できた。⁶⁾

3. 単結晶中で見つかったモデルペプチドのヘリカルツイスト

纖維状高分子は固体中で何らかのらせん対称をとっている。纖維周期c nm 中でm個の繰り返し単位がn回回転するらせんをm/n-helixと呼ぶ。単位当たりの回転角(θ , helical twist)は $360^\circ \times n/m$ 、単位当たりのらせん軸方向への進み(h, unit height)は、 c/m で表せる。これまでコラーゲンの分子構造モデルを7/2-helixや10/3-helixと書いてきたが、これは3本のペプチド鎖中のtriplet全体が仮想的な1本のらせんを形成していると考えた時のものであり、現実のペプチド鎖は前者ではc=6 nm の7/1-helix、後者ではc=8.6 nm の10/1-helixとなる。そこで、理想的な7/2-helixではペプチド鎖のhelical twistは $\theta = 360/7^\circ = 51.4^\circ$ となり、理想的な10/3-helixでは $\theta = 360/10^\circ = 36^\circ$ となる。一方、unit heightは、両モデルで本質的な差異はない。

先にも述べたように、この10年間で既に20個のモ

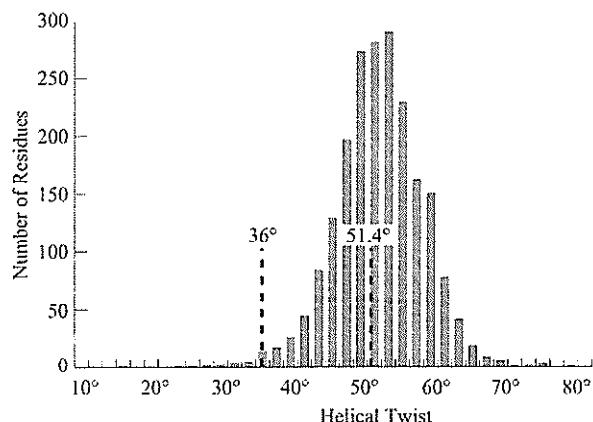


図2 単結晶構造解析されたモデルペプチド中のtripletごとに計算されたhelical twistのヒストグラム。理想的な10/3-helixと7/2-helixのhelical twistは、それぞれ36°と51.4°である。

デルペプチド構造がProtein Data Bankに登録されている。単結晶構造解析で原子座標が得られれば、各triplet毎に、そのtriplet構造が繰り返した時にとるであろうhelical twistは、菅田と宮沢の式に従って計算できる。我々はこれまでに構造解析された全てのモデルペプチドのtripletごとのhelical twistを計算し、そのヒストグラムを作製した(図2)。⁷⁾これらのペプチドは、triple helixが形成し易いようにイミノ酸を多く含んでいる。そのため構造は自由度が少なく剛直であろうと考えていたが、helical twistの分布は幅広く、30°～75°にもよんだ。また、分布の中心(52.6°)は7/2-helixの値に極めて近く、一方、10/3-helixの値である36°近辺には小さなピークすらなかった。天然コラーゲンからのX線回折像が7/2-helix、10/3-helixの両方で解釈可能ることは分かったので、⁶⁾このヒストグラムは、コラーゲンの分子構造として半世紀にわたって教科書に掲載してきたRich & Crickのモデルは間違っており、我々が提案している7/2-helixモデルが正しいことを明確に示していると言える。

4. おわりに

Rich & Crick モデルは、天然コラーゲンのX線回折から導かれる2つの可能なモデルの内の1つではあるが、それ以外にこのモデルを支持する科学的なデータはない。イミノ酸が少ない箇所でのコンフォメーションは10/3-helixに近いと主張する研究者もいるが、もともとRich & CrickモデルはPro-Hyp-Glyと言う

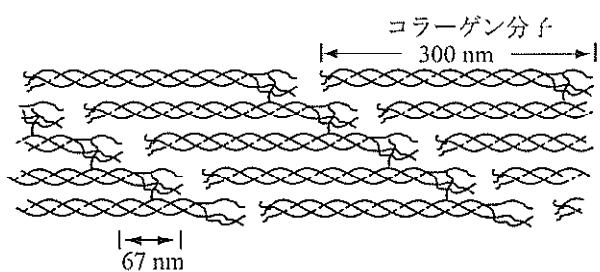


図3 分子長300 nmのコラーゲン分子5本で形成されたミクロフィブリル構造。隣の分子間は67 nmだけ軸方向にずれている。

イミノ酸の多い配列に対して作られたモデルであり、その構造がイミノ酸の多い部分のコンフォーメーションでなく、イミノ酸の少ない部分のコンフォーメーションと似ているというは矛盾している。

コラーゲン分子はミクロフィブリルを形成する際に厳密に67 nmだけ分子軸方向にずれて会合することが小角X線回折や電子顕微鏡観察から知られている。このずれにより、分子長300 nmのコラーゲンは何万倍もの長さを持つミクロフィブリルとなる(図3)。コラーゲン分子の平均構造が $7/2\text{-helix}$ か $10/3\text{-helix}$ であるかにより、ショートレンジでの違いは少ないが、分子表面のアミノ酸の分布状態などのロングレンジ

では大きな違いが生じる。周期構造をとるミクロフィブリルの形成には、分子表面にあるアミノ酸間の相互作用が重要な役割をしているはずで、らせん対称の違いは重大な問題である。今後はコラーゲン分子からミクロフィブリルへの形成機構が重要な課題となろう。

参考文献

- 1) Ramachandran, G.N. ; Kartha, G.. Nature (London) 1955, 176, 593-595.
- 2) Rich, A. ; Crick, F.H.C. Nature(London) 1955, 176, 915-916.
- 3) Rich, A. ; Crick, F.H.C. J Mol Biol 1961, 3, 483-506.
- 4) Fraser, R. D. B. ; MacRae, T.P. ; Suzuki, E. J Mol Biol 1979, 129, 463-481.
- 5) Okuyama, K. ; Takayanagi, M. ; Ashida, T. ; Kakudo, M. Polymer J 1977, 9, 341-343.
- 6) Okuyama, K. ; Xu, X. ; Iguchi, K. ; Noguchi, K. Biopolymers 2006, 84, 181-191.
- 7) Okuyama, K. ; Wu, G. ; Jiravanichanun, N. ; Hongo, C. ; Noguchi, K. Biopolymers 2006, DOI 10.002/bip 20499.

この記事をお読みになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。

事務局で著者と日程を調整して、お知らせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2カ月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6944-0604 E-mail seisan@maple.ocn.ne.jp

必要事項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に添えない場合もありますので、予めご了承ください。