

氏 名	木 村 智 大
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2565 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	ペプチドの側鎖における配座変化の自由エネルギー・エンタルピー・エントロピーの配列位置依存性と水和効果

論文調査委員	(主 査) 教 授 中 原 勝 教 授 寺 嶋 正 秀 教 授 梶 本 興 亜
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

水溶液中のアミノ酸やペプチドについて、その側鎖の配座平衡の問題は生体関連水溶液の重要な研究課題のひとつである。本研究ではアミノ酸モノマーとして側鎖に電離するカルボキシル基を有するアスパラギン酸 (Asp) と電離基を有しないアスパラギン (Asn) を選び、可能な限り広い温度範囲における ^1H NMR スペクトル (ABX パターン) の精密な観測実験を行っている。Asp ペプチド (ジ-からテトラペプチドまで) の側鎖の $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ 軸まわりの二面角に関して、側鎖の $\beta\text{-CO}_2\text{H}$ が $\alpha\text{-CO}$ と互いにトランスである配座 T とゴーシュである配座 G ($\beta\text{-CO}_2\text{H}$ と $\alpha\text{-NH}$ が互いにトランスの配座 G^+ , およびそれらがゴーシュの配座 G^-) 間の配座分布をビシナル $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ 結合定数に対するハミルトニアン解析より求めている。トランスからゴーシュへの配座変化の標準自由エネルギー (ΔG°) を配座分布から決定し、更に、配座分布の温度依存性からエンタルピー (ΔH°) とエントロピー ($-\Delta S^\circ$) の成分を分離して求めることに初めて成功している。また、水和の自由エネルギー ($\Delta G_{\text{hyd}}^\circ$), 水和のエンタルピー ($\Delta H_{\text{hyd}}^\circ$) をトータルの熱力学量から分離して求めるために、気相での配座間エネルギー変化 ($\Delta E_{\text{gas}}^\circ$) の ab initio 計算を行っている。これまで配座平衡の支配因子として考えられてきた分子内静電相互作用と同程度かそれ以上に、水和の効果が重要であることを明らかにしている。静電的水和の効果を見積もるために、溶質の電荷分離の指標として有効極性 μ^+ を導入している。 μ^+ の値がより大きい配座ほど溶媒分子との静電的水和の作用によって安定化され、分子内静電効果はほとんど打ち消されることを明らかにしている。

Asp のモノマーでは、配座 T の占有確率は中性 pH 条件下 (側鎖の CO_2H は電離した状態) で約 60% (T と G^+ あるいは T と G^- の配座間自由エネルギー差は数 kJ mol^{-1} 程度の小ささ) であり、気相での ab initio 計算により求められた数 $+\text{kJ mol}^{-1}$ 程度の大きな配座間エネルギー差 $\Delta E_{\text{gas}}^\circ$ は水和の効果によってほとんど打ち消されている。分子内静電相互作用と競争関係にある水和効果を検討するために、 ΔG° の水和効果の成分 $\Delta G_{\text{hyd}}^\circ$ を分離した。得られた $-\Delta G_{\text{hyd}}^\circ$ と配座変化に伴う有効極性の変化 $\Delta\mu^+$ は相関関係を示し、配座の有効極性が増大すると水和による安定化がより強くなる傾向を認めている。さらに、求められた水和のエンタルピー $\Delta H_{\text{hyd}}^\circ$ の値は $\Delta G_{\text{hyd}}^\circ$ とほとんど同じであり、水和効果はエンタルピーにより支配されていることを示している。トータルのエンタルピー変化 (ΔH°) は分子内静電相互作用の寄与 $\Delta E_{\text{gas}}^\circ$ を含むために有効極性の変化 $\Delta\mu^+$ と相関していない。大きな水和効果を示す典型的な例として、T から G^- への変化の ΔH° について負の値を見出している。

モノマーについての研究を基礎として、ペプチド中のアミノ酸残基について水和効果の配列位置依存性を検討している。まず、分子内効果を評価するために、N 末端、非末端、および C 末端の各配列位置における $\Delta E_{\text{gas}}^\circ$ を MM2 力場を用いて計算し、その値はいずれも対応する ΔG° の実験値より一桁大きいことを示している。つまり、モノマーと同様にペプチド中のアミノ酸残基についても、水和効果を示す $\Delta G_{\text{hyd}}^\circ$ は大きな分子内効果 $\Delta E_{\text{gas}}^\circ$ を打ち消すようにはたらくことを明らかにした。ペプチドについても、水和効果を理解するために、N 末端、非末端、および C 末端残基のモデル化合物を考え、それらの側鎖の各配座について μ^+ を計算している。そこで、水和による配座の安定化の序列が μ^+ の大きさを反映する傾向

は、末端の残基に関してのみ存在することを認めている。ペプチドの C 末端残基はモノマーと同様に強く分子内相互作用する α -CO₂- と β -CO₂ を含むことを考慮して、ジ-、トリ-、およびテトラペプチド中の各残基について観測された ΔG° , ΔH° , および $-T\Delta S^\circ$ について、水和効果をモノマーの場合と比較した。 ΔG° は似た値を持つが、 ΔH° は C 末端残基の方がモノマーよりも明らかに大きい傾向を認めている。 ΔH° が C 末端残基でより大きいことは α -CO₂ と β -CO₂ の間の斥力エネルギーと競争する水和エネルギーの効果がペプチドの C 末端残基でより弱いことを反映している。モノマーよりもより弱い水和効果は、隣接残基を持つことによる立体障害のために取り囲まれる水和分子がより少ないことによると解釈している。同様の理由から、水和効果と $\mu^\dagger$ の相関が、両隣りの残基によって水和空間を制限された非末端残基については観測されなかったと考えている。

最後に、Asp ペプチドのモデル系から見つかった配座変化の熱力学量の配列位置依存の規則性を、神経細胞の活性化を誘導することで知られるアカチン-I (Gly-D-Phe-Ala-Asp) の C 末端 Asp 残基についても確認している。

論文審査の結果の要旨

水溶液中のアミノ酸やペプチドの側鎖の配座平衡が何によって支配されているか、モノマーについての法則がペプチドにもそのまま適用できるか、どのような修正を経て拡張されるかを解明することは、生体関連水溶液についての経験則を見出し、理論的解析のターゲットを提供する実験の重要な使命のひとつである。これまでは気相でのエネルギー変化の理論計算が行われないまま、配座平衡を分子内の静電的相互作用が支配していると信じられてきた。本論文では、アミノ酸モノマーとしてアスパラギン酸 (Asp) とアスパラギン (Asn) を選んで、気相での配座間エネルギー差の *ab initio* 計算を行い、分子内静電相互作用の大きさをはじめて理論的に求めて、定量的な議論に導いた。この計算値と実験から得られた熱力学量をうまく結びつけて、Asp の側鎖の β -CO₂H が α -CO と互いにトランスである配座 T とゴーシュである配座 G (β -CO₂H と α -NH が互いにトランスの配座 G⁺, およびそれらがゴーシュの配座 G⁻) 間の配座平衡における水和の効果を議論するために、水和の自由エネルギー、エンタルピー、エントロピーを計算し、水和の目安として新たに導入した溶質の電荷分離の指標である有効極性 $\mu^\dagger$ との相関関係を調べることによって、従来の学説 (分子内の静電的相互作用が支配的) を検証し、分子内相互作用と競争的に水和効果が重要であることを明らかにしている。

本研究では、¹H NMR スペクトルの微細構造の解析から求めたビシナル ¹H-¹H 結合定数に基づいて、ねじれ型配座モデル (T, G⁻, G⁺) を用いて、アスパラギン酸 (Asp) ペプチド中の N 末端、非末端、および C 末端の Asp 残基の側鎖の配座平衡に対する水和効果が重要な役割を果たしていることを解明し、従来の分子内静電的相互作用支配説は正しくないことを示した。水和効果の議論に必要であった気相での配座間のエネルギー差を計算し、エネルギー項とエントロピー項の分離に必要な高い精度の温度効果の測定を成功させている。これはこれまでにない新しい成果として評価できる。温度とともに pH を制御した緻密な NMR 実験に基づいて、配座平衡を支配する分子内の電荷間の静電的相互作用を打ち消し、場合によってはそれを圧倒する形で電荷をもった基の水和効果が作用する場合を発見している。モノマーに関する配座変化の水和の熱力学量の特徴は定性的には C 末端に似ているが、C 末端における水和の効果はより小さく、非末端における水和の効果はさらに小さい。これは特定アミノ酸残基の配列の前後に導入されたペプチド鎖による水和空間の制御によるものであると結論している。これは測定の比較的容易なモノマーについての経験則をそのままペプチドに拡張する場合注意が必要であることを教えるものである。拡張にはペプチド鎖の影響の部分を考慮しなければならない。

生体関連の複雑な分子やイオンの水和の熱力学量を積分方程式による方法等の溶液の統計力学によって求める方法はまだ確立されていない。Kirkwood の連続誘電体モデルによる計算も配座平衡のように微妙な現象には適用困難である。本研究では、将来の統計力学的発展への指標を示唆するものとして、電荷分離度を表す有効極性 $\mu^\dagger$ を導入したことは興味深い。Asp モノマーにおける水和効果の重要性がこの量の導入によってはじめて確かなものと認識されている。

最後に、Asp だけからなるペプチドのモデル系を構築し、低溶解度による測定の困難さを高分解能 NMR の感度で乗り越え、アミノ酸残基の配列位置依存性の問題を解明したことも注目に値する。Asp モデル系から見つかった配座変化の熱力学量の配列位置依存の規則性を、神経細胞の活性化を誘導することで知られるアカチン-I (Gly-D-Phe-Ala-Asp) の C 末端 Asp 残基についても確かめ、法則の一般性の確認を行っていることも評価される。

以上の理由によって、本論文は理学（博士）の学位論文として十分な価値があるものとして認める。