


 解説

コラーゲンの三本鎖構造の熱安定性に及ぼす水和の効果

西 義則, 内山 進, 小林祐次

(受取日: 2007年6月30日, 受理日: 2007年7月26日)

Effect of Hydration on the Thermal Stability of the Collagen Triple Helical Structure

Yoshinori Nishi, Susumu Uchiyama, and Yuji Kobayashi

(Received June 30, 2007; Accepted July 26, 2007)

4(*R*)-Hydroxyproline (Hyp^{*R*}) is often found in natural collagen in spite of being a rare amino acid in proteins overall. It has been known that Hyp^{*R*} residue contributes to the thermal stability of the collagen triple helical structure. Intensive studies to investigate the stabilizing mechanism of the collagen triple helical structure have been performed by using a series of polytripeptides (X-Y-Gly)₁₀ [X, Y: Pro, Hyp^{*R*}, or 4-fluoroproline (fPro)]. The thermodynamic parameters determined by DSC analyses of these model peptides indicate that the enthalpy term contributes predominantly to the thermal stability of (Pro-Hyp^{*R*}-Gly)₁₀, whereas the entropy term is primarily responsible for the enhanced stabilities of (Pro-fPro^{*R*}-Gly)₁₀ and (fPro^{*S*}-Pro-Gly)₁₀. Based on the comparison of molecular volumes observed in solution with intrinsic ones from the crystal structure, the difference comes from the difference of hydration on these peptides.

Keywords: collagen, triple helical structure, thermal stability, hydration

1. はじめに

コラーゲンは動物界において最も多く含まれる蛋白質であり、皮膚や骨などを構成する。コラーゲンは、三本のペプチド鎖から構成され、各々のペプチド鎖は、左巻きのらせんを巻き、それらが網のようにあつて右巻きのらせんを形成する。この特異的な三本鎖構造はコラーゲントリプルヘリックスと呼ばれ、その熱安定性が生体組織の維持に重要であると考えられている。コラーゲンには他の蛋白質ではほとんど存在しないヒドロキシプロリンが構成アミノ酸として含まれており、その含有量と生育温度との間には比例関係が見られることから、ヒドロキシプロリンはコラ

ーゲンの三本鎖構造の熱安定性に重要な役割を果たしていると考えられてきた。これまで過去40年間にわたって、コラーゲンの三本鎖構造の熱安定性を説明する試みが盛んに行われたが、幾つかの仮説が提唱されたものの結論には至っていない。そこで筆者らはヒドロキシプロリン及びヒドロキシプロリンの水酸基をフッ素原子に置換したフルオロプロリンを含むモデルペプチドを合成して熱測定を行い、定量的にコラーゲンの三本鎖構造の熱安定性を解析した。その結果、ヒドロキシプロリン、フルオロプロリンともに熱安定性を増す働きがあるものの、両者の安定化機構は熱力学的に大きく異なることを見出し、その要因はペプチドと溶媒との相互作用（水溶液中においては水和）の違いに

よって生じることを部分モル体積測定により明らかにした。本解説では、コラーゲンの三本鎖構造の熱安定性の研究の歴史を紹介すると共に、最近の熱力学的な解析によって得られた安定化機構に関する新しい知見を述べる。

2. 溶液内で三本鎖構造を形成するコラーゲンモデルペプチドの発見

昭和40年代、筆者の一人である小林が所属していた大阪大学蛋白質研究所では、大学や民間会社の研究所などから持ち込まれるサンプルの超遠心分析の測定サービスが行われており、小林もその解析の手伝いをしていた。そのような中、当時蛋白質研究所のペプチドセンターの榊原より興味ある分析の依頼を受けた。当時はMerrifieldによってペプチド固相合成法が発表されて間もない頃であり、榊原はペプチド固相合成の過程で必要な樹脂からのペプチドの切断と保護基の除去の操作を同時にフッ化水素を用いて行う手法を開発していた。²⁾ 固相法は従来の液相法とは異なり、中間体の単離や精製の操作が無く、簡便で短時間でできるが、少しでも不完全な反応箇所があると樹脂上に欠損物が残るため、最終生成物の精製が困難になる。この問題を解決するため、アミノ酸単位ではなく、フラグメント単位で固相法を行うことが考えられた。アミノ酸単位での重合において一残基抜けると平均的に分子量が100小さくなるが、例えばトリペプチド単位の場合には300程度小さくなるので、目的物と欠損物の分子量の差が大きくなり、精製が容易になることが期待される。そこで榊原はこの方法の有用性を示すため、血圧降下作用を有する9残基の生理活性ペプチドBradykinin^{3,4)}に含まれる配列Pro-Pro-Glyを有するトリペプチドを原材料として重合した(Pro-Pro-Gly)₁₀と(Pro-Pro-Gly)₂₀の分子量分布がどの程度かを超遠心で確かめてほしいと小林に依頼したのである。ところが、得られた分子量は小さくなるどころか、実験条件によっては予想値の2倍近くになった。この実験結果の解釈を考えていたところ、3残基毎にGlyが来るアミノ酸配列はコラーゲンに特有なこと、コラーゲンにはイミノ酸含量が高いこと、さらに分子量が2倍近くになることから、ひょっとしたら三本鎖を形成しているのではないかとのアイデアが頭に浮かんだ。幸運にも小林はコラーゲンの構造転移をやっていたので、早速(Pro-Pro-Gly)₂₀の旋光度の温度依存性を測定した。その結果、予想通りシグモイド状の転移曲線が得られた。⁵⁾ こうなれば何としてでも分子量的に三本鎖の存在を証明する必要がある。そこで小林は榊原に(Pro-Pro-Gly)_n (n = 10, 15, 20)の合成を依頼し、さまざまな温度でこれらのペプチドの超遠心分析を行い、転移温度の重合度依存性を確かめることにした。低温や高温での測定は非常に苦労したが、Fig.1に示すように初めて分子量で三

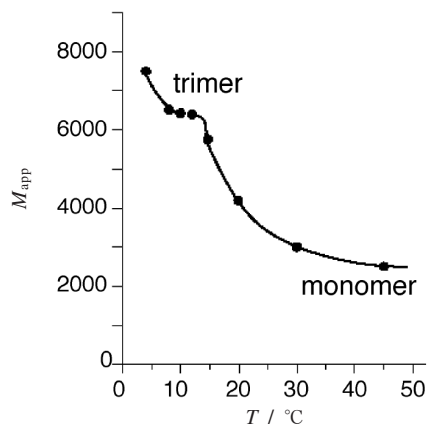


Fig.1 Temperature dependence of apparent molecular weight of (Pro-Pro-Gly)₁₀.

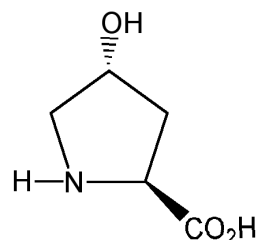


Fig.2 Structure of 4(R)-hydroxyproline (Hyp^R).

本鎖から一本鎖の転移を示すことができた。⁶⁾ (Pro-Pro-Gly)₁₀は現在もコラーゲンモデルペプチドのスタンダードとして広く引用されている。

3. コラーゲンに存在するユニークなアミノ酸「ヒドロキシプロリン」

コラーゲンの三本鎖構造に特徴的なX-Y-Glyのトリプレットの繰り返し配列において、XとYの位置はそれぞれ主にイミノ酸であるプロリン(Pro)や4-ヒドロキシプロリン(Hyp)が占める。HypはFig.2に示すように、Proの4位に水酸基を1個持った構造をしており、酵素プロリル4-ヒドロキシラーゼによるProのヒドロキシ化反応によって生じる。また、4-ヒドロキシプロリンには4(R)-ヒドロキシプロリン(Hyp^R)と4(S)-ヒドロキシプロリン(Hyp^S)の2種類が考えられるが、自然界には前者のみが存在し、生育温度が高い動物のコラーゲンほどHyp^Rの含有率が高い傾向がある。⁷⁾ そこで、Hyp^Rの働きを詳しく調べるために、前章で述べた化学合成ペプチド(Pro-Pro-Gly)₁₀のY位のProをHyp^Rに置換した(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀が合成された。⁸⁾ その結果、(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀の三本鎖から一本鎖への転移

温度は (Pro-Pro-Gly)₁₀ より約30℃高い60℃であり、⁸⁾ 天然のコラーゲンと同様に、Hyp^Rが三本鎖構造を安定化することが示された。この要因としてHyp^Rの水酸基が水素結合の形成に関与することが考えられた。ところが、Hyp^RのジアステレオマーであるHyp^Sを含むモデルペプチドである (Pro-Hyp^S-Gly)₁₀ や (Hyp^S-Pro-Gly)₁₀ は4℃でも三本鎖構造を形成しないほか、⁹⁾ 天然とは異なるX位にHyp^Rを含むモデルペプチドである (Hyp^R-Pro-Gly)₁₀ も4℃では三本鎖を形成せず一本鎖として存在すること、¹⁰⁾ さらには非水溶媒中での (Pro-Pro-Gly)₁₀ や (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ の三本鎖構造の熱安定性は水溶液中より増すこと¹¹⁾が報告され、水素結合がコラーゲンの三本鎖構造を安定化するという説に疑問を抱く研究者が現れた。その中の一人がアメリカ人研究者のRainesである。

4. フルオロプロリンを含むモデルペプチドの登場

Rainesらは、水酸基の酸素原子は電気陰性度が高いことに注目し、Hyp^Rの水酸基を電気陰性度が最も高いフッ素原子に置換した4(R)-fluoroproline (fPro^R) をYの位置を含む (Pro-fPro^R-Gly)₁₀ を合成し、熱安定性を調べた。その結果、(Pro-fPro^R-Gly)₁₀ の転移温度は (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ よりさらに高くなること示された。fProは弱い水素結合しか形成しないことから、彼らはコラーゲンの三本鎖構造の安定化には水素結合ではなく、4位の置換基の電気陰性度が重要であるとする説を提唱した。^{12,13)} 後に、彼らはfPro^RのジアステレオマーであるfPro^SをY位を含む (Pro-fPro^S-Gly)₁₀ は4℃では三本鎖を形成しないことを示した。¹⁴⁾

5. ピロリジン環のパッカリングに着目した安定化機構仮説

このように、Hyp、fProはともに三本鎖構造の熱安定性を増す働きがあるが、立体異性や配列上の位置によっては大きく低下する。この実験事実に対して、X線結晶解析を専門とするZagariらは、コラーゲンモデルペプチドの結晶構造解析より、三本鎖構造の熱安定性にはピロリジン環のパッカリングの方向が関与することを提唱した。¹⁵⁾ Proは両方のパッカリング (upまたはdown) をとることができるが、水酸基やフッ素原子といった電気陰性の置換基による立体電子の効果によってHypやfProのピロリジン環のパッカリングの方向は偏ることが知られており、4位の立体異性がRのものはup、Sのものはdownのパッカリングが安定である。¹⁶⁾ また、モデルペプチドのX線解析より、三本鎖構造においてXの位置はdown、Yの位置はupのパッカリングであることが確かめられている。^{15,17-20)} よって、彼らは「Xの位置にはdownのパッカリング、Yの位置にはupのパッカリングを採用できるものが挿入されたときの

	X	Y	
up	×	○	R
down	○	×	S

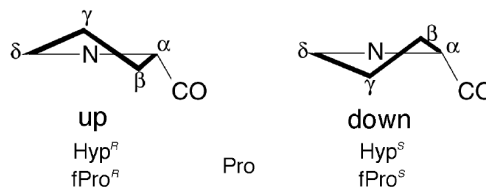


Fig.3 A proposed model of the conformation of the pyrrolidine ring desirable for stabilizing the triple helix by Zagari and co-workers.¹⁵⁾

みに三本鎖構造を形成することができる」と考えた。その概要をFig.3に示す。この法則に従えば (Hyp^S-Pro-Gly)₁₀ は三本鎖構造を形成するはずだが、上述したように既に筆者らは三本鎖構造を形成しないことを報告していた⁹⁾ので、彼らはHyp^Sの水酸基が隣のペプチド鎖のピロリジン環と立体障害が生じるための例外であると説明した。

6. X位にfProを含むコラーゲンモデルペプチドの合成と物性解析

水酸基の酸素原子とフッ素原子のファンデルワールス半径はそれぞれ1.57、1.47 Åであり、ほぼ同じであることから、(fPro^S-Pro-Gly)₁₀ は (Hyp^S-Pro-Gly)₁₀ と同様に三本鎖を形成しないと予想できる。この予想が正しいかどうかを確かめるために、筆者らは天然に存在するHyp^Rを出発物質として非天然アミノ酸fProが高収率で得られる方法を開発し、²¹⁾ 固相法により (fPro^R-Pro-Gly)₁₀ と (fPro^S-Pro-Gly)₁₀ を合成し、CDや超遠心によりそれらの物性を測定した。その結果、(fPro^R-Pro-Gly)₁₀ は予想通り三本鎖を形成しなかったが、(fPro^S-Pro-Gly)₁₀ は予想に反して温度上昇に伴って三本鎖から一本鎖へと転移し、その転移温度は58℃であることが分かった。²²⁾ この結果と既知のモデルペプチドの三本鎖構造の熱安定性をTable 1に記す。このことから、Zagariらの説のようにパッカリングのみで三本鎖構造の熱安定性を説明するのは困難であり、定量的に熱安定性を解析する必要があると考えた。そこで、示差走査型熱量計 (DSC) を用いてコラーゲンモデルペプチドの転移に伴う熱力学量を求めることとした。

7. DSCによるコラーゲンモデルペプチドの転移に伴う熱力学量の決定

DSC測定は、三本鎖から一本鎖への転移が存在する

Table 1 Summary of the structures of collagen model peptides.

peptide	structure ^a	T _{1/2} ^b /°C	ref	peptide	structure ^a	T _{1/2} ^b /°C	ref
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	t	34	5	(Pro-fPro ^R -Gly) ₁₀	t	80	12
(Pro-Hyp ^R -Gly) ₁₀	t	61	8	(Pro-fPro ^S -Gly) ₁₀	s	<2	14
(Pro-Hyp ^S -Gly) ₁₀	s	<4	9	(fPro ^R -Pro-Gly) ₁₀	s	<4	22
(Hyp ^R -Pro-Gly) ₁₀	s	<4	10	(fPro ^S -Pro-Gly) ₁₀	t	58	22
(Hyp ^S -Pro-Gly) ₁₀	s	<4	9				

^a At 4 °C; t = triple helix, s = single chain.

^b T_{1/2} is defined as the temperature where the transition is half-completed.

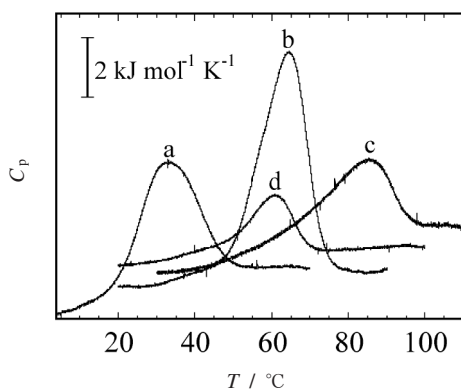


Fig.4 Molar heat capacity curves of (a) (Pro-Pro-Gly)₁₀, (b) (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀, (c) (Pro-fPro^R-Gly)₁₀, and (d) (fPro^S-Pro-Gly)₁₀ as a function of the temperature.

(Pro-Pro-Gly)₁₀, (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀, (Pro-fPro^R-Gly)₁₀ 及び (fPro^S-Pro-Gly)₁₀ について行った。測定にはMicrocal社のVP-DSCを用いた。三本鎖と一本鎖の間の平衡を完全にするために、ペプチド溶液を90 °C（ただし(Pro-Pro-Gly)₁₀は60 °C）に1時間加熱した後、室温まで放冷し、4 °Cで3日間放置した後測定を行った。DSC測定は昇温速度0.1 K min⁻¹で行った。^{23,24} Fig.4は各モデルペプチドのDSC曲線である。

DSC曲線の解析は以下のように行った。三本鎖をt、一本鎖をsとすると、三本鎖と一本鎖の平衡(式(1))においては、平衡定数Kは式(2)のように表せる。



$$K = \frac{[s]^3}{[t_3]} \quad (2)$$

平衡定数KとGibbs自由エネルギー変化量ΔGの間には式

(3)の関係があり、ΔGはエンタルピー変化量ΔH、定圧モル比熱の変化量ΔC_pとエントロピー変化量ΔSを用いると式(4)のように記述できる。

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H(T_m) + \Delta C_p(T - T_m) - T[\Delta S(T_m) + \Delta C_p \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)] \quad (4)$$

ここでT_mはΔG=0となる絶対温度である。

Table 2に各モデルペプチドの転移に伴う熱力学量を示す。ここで、T_m^{*}は(Pro-Pro-Gly)₁₀におけるT_mであり、ΔΔH、ΔΔSはそれぞれ(Pro-Pro-Gly)₁₀のΔHとΔSの差である。これによると、(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀は(Pro-Pro-Gly)₁₀に比べてΔHとΔSがともに値が大きくなっていったのに対し、(Pro-fPro^R-Gly)₁₀及び(fPro^S-Pro-Gly)₁₀はΔHとΔSがともに小さくなっていった。これは、HypとfProでは三本鎖構造の安定化機構が異なることを表している。これらの熱力学量を解釈するために、筆者らはモデルペプチドと溶媒との相互作用に着目した。

8. コラーゲンモデルペプチドの部分モル体積の測定と熱力学量の解釈

ある物質1モルを溶媒に溶解させたときに増加する体積は部分モル体積と呼ばれ、通常はその物質単独の体積とは異なる。これは、溶質分子と溶媒分子との間に分子間力が存在するためである。溶媒が存在すると部分モル体積は小さくなる一方、モデルペプチド分子と水分子の間に斥力が働く場合は部分モル体積が大きくなる。溶質1グラムが占める体積は部分比容*v*と呼ばれ、溶質の濃度*c*と溶液の密度*ρ*との間には式(5)のような関係がある。

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial c}\right)_{m,p} = 1 - \bar{v}\rho_0 \quad (5)$$

Table 2 Thermodynamic parameters of the transition of collagen model peptides.

peptide	$T_{1/2}^a$ / °C	T_m^b / °C	$\Delta H(T_m^*)^c$ / kJ mol ⁻¹	$-T_m^* \Delta S(T_m^*)^c$ / kJ mol ⁻¹	$\Delta \Delta H(T_m^*)^d$ / kJ mol ⁻¹	$-T_m^* \Delta \Delta S(T_m^*)^d$ / kJ mol ⁻¹
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	31.4	71.9	108.1	-108.1	0	0
(Pro-Hyp ^R -Gly) ₁₀	62.2	92.3	147.1	-138.8	39.0	-30.7
(Pro-fPro ^R -Gly) ₁₀	77.0	126.7	85.7	-72.0	-22.4	36.1
(fPro ^S -Pro-Gly) ₁₀	54.5	116.7	65.9	-58.0	-42.2	50.1

^a $T_{1/2}$ is the temperature where the transition is half-completed.

^b T_m is the temperature where Gibbs free-energy change associated with the transition (ΔG) equals zero.

^c T_m^* is the T_m of (Pro-Pro-Gly)₁₀.

^d $\Delta \Delta H(T_m^*)$ and $\Delta \Delta S(T_m^*)$ are estimated by subtracting $\Delta H(T_m^*)$ and $\Delta S(T_m^*)$ for (Pro-Pro-Gly)₁₀ from those for each peptide, respectively.

Table 3 Observed partial specific (\bar{v}), observed partial molar (\bar{V}_{obs}), calculated (V_{calc}), and hydration volumes (V_{hyd}) of the triple helical collagen model peptides at 10 °C.

peptide	\bar{v} / cm ³ g ⁻¹	\bar{V}_{obs} / cm ³ mol ^{-1 a}	V_{calc} / cm ³ mol ^{-1 a}	V_{hyd} / cm ³ mol ^{-1 a}
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	0.6692	169.4	179.0	-9.6
(Pro-Hyp ^R -Gly) ₁₀	0.6120	164.7	183.3	-18.6
(Pro-fPro ^R -Gly) ₁₀	0.7337	199.4	181.5	17.9

^a Expressed per tripeptide unit.

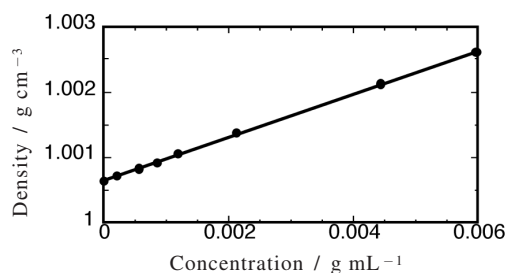


Fig. 5 Concentration dependency of the density for (Pro-Pro-Gly)₁₀ at 10 °C.

ここで、 ρ_0 は溶媒の密度である。筆者らは、振動式密度計を用いて溶液の密度を正確に決定し、密度の濃度依存性より溶質の部分比容 \bar{v} を求めた。溶液の濃度はアミノ酸分析により決定した。**Fig. 5**は10°Cにおける (Pro-Pro-Gly)₁₀ 溶液の密度の濃度依存性を表したものである。また、部分モル体積 \bar{V} は、溶質の分子量を M とすると、 \bar{v} との間には式(6)の関係が成立する。

$$\bar{V} = \bar{v} M \quad (6)$$

モル体積の計算値 V_{calc} を求めるには、原子座標データを用

いてペプチド単独の原子体積や露出表面積を算出する必要があり、(Pro-Pro-Gly)₁₀ と (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ については既知の構造情報を用いて計算した。(Pro-fPro^R-Gly)₁₀ については構造解析が成功しておらず原子座標データが手に入らなかったため、(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ の Hyp^R の水酸基をフッ素原子に置換することによって計算した。各ペプチドについて実測した部分モル体積 \bar{V}_{obs} と V_{calc} の値を **Table 3** に示す。両者の値の差は水和に関する項 V_{hyd} に相当すると解釈できる²⁵⁾ことから、モデルペプチドによってこの値が大きく異なるのは、水和状態が違うためであると考えられる。水和の程度が高いほど、ペプチドのまわりの水分子が強く引き付けられて V_{hyd} の値が小さくなることから、(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ は (Pro-Pro-Gly)₁₀ より水和の程度が高く、逆に (Pro-fPro^R-Gly)₁₀ は低いことが分かる。(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ は、Hyp^R に水酸基を有することから、水分子と水素結合を形成しやすくなり、水和の程度が高くなっていると考えられる。このような水分子は水素結合のネットワークを形成することによって、ペプチド鎖同士の相互作用をより強くすることが考えられる。X線結晶解析においても Hyp^R の水酸基と水分子との間に水素結合を形成することが示唆されている¹⁷⁾ことから、筆者らは (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀ は水素結合のネットワークを形成するために水素結合の数が (Pro-Pro-Gly)₁₀ より多くなり、それによる ΔH の増大が

(Pro-Hyp^R-Gly)₁₀の高い熱安定性の要因であると結論付けた。²⁶⁾

これに対して、(Pro-fPro^R-Gly)₁₀は、分子表面のfProのフッ素原子の低い水素結合能のために三本鎖の水和の程度が低くなっていると考えられる。水和の程度が低いと、ペプチド鎖の周囲に存在する水分子の自由度が制限を受けないと考えることができ、三本鎖状態におけるエントロピーは(Pro-Pro-Gly)₁₀に比べて大きくなると予想される。ここで一本鎖状態における(Pro-Pro-Gly)₁₀と(Pro-fPro^R-Gly)₁₀のエントロピーが同じであると仮定すると、(Pro-fPro^R-Gly)₁₀の ΔS は(Pro-Pro-Gly)₁₀に比べて小さくなる。よって、(Pro-fPro^R-Gly)₁₀は(Pro-Pro-Gly)₁₀に比べて高い熱安定性を獲得しているものと考察した。²⁶⁾

9. おわりに

以上、コラーゲンのユニークな三本鎖構造の熱安定性の研究について解説した。蛋白質の特異的な機能はその構造によって規定されていることから、生命現象を解明するためには蛋白質の構造構築原理を知ることは大変重要である。Anfinsenのドグマによれば、蛋白質の立体構造は予測可能であると考えられるが、このような単純なアミノ酸配列をもった三本鎖構造でさえも未だその構造構築原理を説明できていない。筆者らはXとYの両方の位置をHypまたはfProに置換した新規モデルペプチドの合成²⁷⁾やそのX線結晶構造解析²⁸⁾を報告するなど、引き続きこのテーマに取り組んでいる。このような単純な系における構造の安定化機構の研究を進展させることにより、一般的な蛋白質の構造構築原理を解明する手がかりを得ようと努力している。

謝 辞

一連の研究は、土井正光博士（和歌山高専物質工学科）、西内祐二博士（株式会社ペプチド研究所）、中沢 隆博士（奈良女子大学理学部化学科）、河原一樹氏、吉田卓也博士、大久保忠恭博士（以上、大阪大学大学院薬学研究所）との共同研究である。この場を借りて敬意を表する。

文 献

- 1) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).
- 2) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **40**, 2164 (1967).
- 3) M. Rocha, E. Silvia, W. T. Beraldo, and G. Rosenfeld, *Am. J. Physiol.* **156**, 261 (1949).
- 4) D. F. Elliott, G. P. Lewis, and E. W. Horton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 87 (1960).
- 5) S. Sakakibara, Y. Kishida, Y. Kikuchi, R. Sakai, and K. Kakiuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **41**, 1273 (1968).
- 6) Y. Kobayashi, R. Sakai, K. Kakiuchi, and T. Isemura, *Biopolymers* **9**, 415 (1970).
- 7) T. V. Burjanadze, *Biopolymers* **32**, 941 (1992).
- 8) S. Sakakibara, K. Inouye, K. Shudo, Y. Kishida, Y. Kobayashi, and D. J. Prockop, *Biochim. Biophys. Acta* **303**, 198 (1973).
- 9) K. Inouye, S. Sakakibara, and D. J. Prockop, *Biochim. Biophys. Acta* **420**, 133 (1976).
- 10) K. Inouye, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku, Y. Kishida, S. Sakakibara, and D. J. Prockop, *Arch. Biochem. Biophys.* **219**, 198 (1982).
- 11) J. Engel, H. Chen, D. J. Prockop, and H. Klump, *Biopolymers* **16**, 601 (1977).
- 12) S. K. Holmgren, K. M. Taylor, L. E. Bretscher, and R. T. Raines, *Nature* **392**, 666 (1998).
- 13) S. K. Holmgren, L. E. Bretscher, K. M. Taylor, and R. T. Raines, *Chem. Biol.* **6**, 63 (1999).
- 14) L. E. Bretscher, C. L. Jenkins, K. M. Taylor, M. L. DeRider, and R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 777 (2001).
- 15) L. Vitagliano, R. Berisio, L. Mazzarella, and A. Zagari, *Biopolymers* **58**, 459 (2001).
- 16) R. Improta, C. Benzi, and V. Barone, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12568 (2001).
- 17) J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, and H. M. Berman, *Science* **266**, 75 (1994).
- 18) R. Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, and H. M. Berman, *J. Mol. Biol.* **280**, 623 (1998).
- 19) R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, and A. Zagari, *Biopolymers* **56**, 8 (2001).
- 20) R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella, and A. Zagari, *Protein Sci.* **11**, 262 (2002).
- 21) M. Doi, Y. Nishi, N. Kiritoshi, T. Iwata, M. Nago, H. Nakano, S. Uchiyama, T. Nakazawa, T. Wakamiya, and Y. Kobayashi, *Tetrahedron* **58**, 8453 (2002).
- 22) M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, and Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 9922 (2003).
- 23) K. Kajiyama, T. Tomiyama, S. Uchiyama, and Y. Kobayashi, *Chem. Phys. Lett.* **247**, 299 (1995).
- 24) S. Uchiyama, T. Kai, K. Kajiyama, Y. Kobayashi, and T. Tomiyama, *Chem. Phys. Lett.* **281**, 92 (1997).
- 25) T. V. Chalikian, M. Totrov, R. Abagyan, and K. J. Breslauer, *J. Mol. Biol.* **260**, 588 (1996).
- 26) Y. Nishi, S. Uchiyama, M. Doi, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, and Y. Kobayashi,

Biochemistry **44**, 6034 (2005).

- 27) M. Doi, Y. Nishi, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, H. Nishio, T. Nakazawa, T. Ohkubo, and Y. Kobayashi, *J. Pept. Sci.* **11**, 609 (2005).
- 28) K. Kawahara, Y. Nishi, S. Nakamura, S. Uchiyama, Y. Nishiuchi, T. Nakazawa, T. Ohkubo, and Y. Kobayashi, *Biochemistry* **44**, 15812 (2005).

要 旨

4(*R*)-Hydroxyproline (Hyp^R) は蛋白質全体では稀なアミノ酸であるにも関わらず、天然のコラーゲンには頻繁に存在する。Hyp^Rはコラーゲンの三本鎖構造の熱安定性に貢献することが知られている。これまでに一連のポリトリペプチド (X-Y-Gly)₁₀ [X, Y: Pro, Hyp^R, or 4-フルオロプロリン (fPro)] を用いてコラーゲンの三本鎖構造の安定化機構を調べる研究が精力的に行われてきた。DSC解析によって三本鎖から一本鎖への転移に伴う熱力学量を求めることにより、エンタルピー項が主として (Pro-Hyp^R-Gly)₁₀の熱安定性に寄与しているのに対して、(Pro-fPro^R-Gly)₁₀や (fPro^S-Pro-Gly)₁₀ではエントロピー項が主に高い熱安定性の要因であることが示された。溶液内で実測された分子体積と結晶構造より得られる固有体積の値との比較から、この違いはペプチドの水和の違いに起因することを明らかにした。



西 義則 Yoshinori Nishi
大阪薬科大学, Osaka Univ. of Pharmaceutical Sciences, TEL. 072-690-1080, FAX. 072-690-1081, e-mail: ynishi@gly.oups.ac.jp
研究テーマ：コラーゲンの三本鎖構造の安定化機構の解析。構造生物学と熱力学を融合したドラッグデザインの方法論の開発
趣味：旅行, 音楽鑑賞



内山 進 Susumu Uchiyama
大阪大学大学院工学研究科, Graduate School of Engineering, Osaka Univ, TEL. 06-6879-4215, FAX. 06-6879-7442, e-mail: suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp
研究テーマ：生体高分子の溶液物性, 分子間相互作用。ヒト染色体のプロテオミクスおよび高次構造解析。医療用モノクローナル抗体の開発
趣味：料理, 麻雀



小林祐次 Yuji Kobayashi
大阪薬科大学, Osaka Univ. of Pharmaceutical Sciences, TEL. 072-690-1080, FAX. 072-690-1081, e-mail: kobayasi@gly.oups.ac.jp
研究テーマ：蛋白質の構造・活性相関。蛋白質の構造構築原理
趣味：仏像鑑賞, 園芸