

界面活性剤によるホモポリペプチドの構造変化

—タンパク質のモデル系として—

竹田 邦雄・森山 佳子

岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科

(2016年10月4日受付、2016年12月5日受理)

1. はじめに

多くのタンパク質は、大体数百個のアミノ酸がつながったものである。タンパク質の多様性は、20種類のアミノ酸が、各生物のDNAに保存されているルールに従ってどういう順番で何個並ぶかによって可能になっている。一方、DNAも大きな分子で同じく多様であるが、それを構成するのは4種類の塩基である。しかも、この4種類は大まかには2種類に分類でき、DNAの構造の解明はタンパク質に比べれば早く進んでいる。そういうDNAに比べれば、20種類のアミノ酸から成るタンパク質の構造は複雑で、その解明はDNAより遅れ、未解決なことが依然多々残っている。

タンパク質の構造の研究において、その初期段階から、同一のアミノ酸だけがペプチド結合でつながったホモポリペプチドがタンパク質の簡単なモデルとして着目された¹⁻¹⁰⁾。ホモポリペプチドは、場合によってポリアミノ酸、ホモポリマーとも呼ばれているようであるが、ホモポリペプチドがもっとも実態に近い呼び方だと思われる。

L-リジンだけがつながったポリ-L-リジン(PLL)、L-リジンに非常に近い構造をした非天然のアミノ酸のL-オルニチンから成るポリ-L-オルニチン(PLO)、L-グルタミン酸だけがつながったポリ-L-グルタミン酸(PLGA)がホモポリペプチドとして今日でもよく使われている。中性pHで、L-リジンとL-オルニチンの側鎖はそれぞれ $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ と $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$ 、L-グルタミン酸の側鎖は $(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$ の状態ですまたは負の荷電をもつ。従って、これらいずれのホモポリペプチドも、中性pHでは主鎖に沿って正または負の荷電をもつ側鎖が並ぶポリマーであり、それらの荷電が相互に反発し、主鎖の構造は不規則な熱運動をするだけのランダムなコイル状態である。

しかし、PLLとPLOは、pHをアルカリ側にすると正の荷電を失い、ペプチド結合でつながった主鎖内で水素結合をすることが可能になり、規則的な α -ヘリックス構造を形成する。 α -ヘリックス構造は、主鎖間の水素結合により3.6個のアミノ酸で1回転するラセン状

の構造である。PLGAは、pHを酸性側にすると側鎖の負の荷電が消え、電荷間の反発がなくなり同様に α -ヘリックス構造を形成する。この現象は、多くの生化学の教科書にも載っていて、これらのホモポリペプチドがタンパク質のモデル物質としてよく取り上げられる所以である。

タンパク質はそれぞれ固有の立体構造をとり、その機能を発揮している。この α -ヘリックス構造は、タンパク質のポリペプチドの部分部分で形成される規則的な構造(二次構造と言う)の代表的なものである。 α -ヘリックス構造は、タンパク質を構成するアミノ酸側鎖の荷電状態だけでなく、他の微妙な影響によって形成されたり、されなかったりする。タンパク質本来の α -ヘリックス構造などの規則的な構造は、第3物質の影響によって崩壊することが多いが、例外も少なくない。このようなタンパク質の構造変化のモデルケースとして、同一のアミノ酸から成るホモポリペプチドの構造変化は注目されてきたわけである。

従って、ホモポリペプチドの構造変化の研究もタンパク質のそれと同じ程度に広範に半世紀以上の長きに渡り行われて来ている。著者らが界面活性剤溶液中のホモポリペプチドの構造変化の研究に携わったのはこの流れの後半の数十年であるが、本稿では著者らが直接手掛けて明らかにしたことを中心に再検討してみる。

2. ホモポリペプチドの α -ヘリックスの熱安定性

界面活性剤溶液中のホモポリペプチドの構造変化について述べる前に、pHの変化だけでPLLとPLGAが簡単に形成する α -ヘリックス構造が全く違う熱の影響を受けることから紹介する。最近、著者らは100℃を越える高温の熱変性における溶液状態のタンパク質の二次構造変化を検討している¹¹⁻¹⁵⁾。PLLとPLGAの α -ヘリックス構造の熱変性による構造変化も検討した¹⁶⁾。25℃では、PLLはpH12.0で、PLGAはpH2.8で α -ヘリックス構造を形成している。これら2つのホモポリペプチドの円偏光二色性(CD)スペクトルの温度上昇に伴う変化を、図1と2に示す。PLLとPLGAのどちらも25℃では典型的な

ダブルミニマムをもつ α -ヘリックス型のCDスペクトルを示している。しかし、PLLのスペクトルは、45°C、50°Cで217nm付近に谷をもつ β -構造型のスペクトルに変わる。一方、PLGAのスペクトルは、80°Cでも α -ヘリックス型を維持している。 α -ヘリックス含量の目安になる222nmの平均残基楕円率 ($[\theta]_{222}$) の負の強度は、PLGAの場合、温度上昇と共に徐々に弱くなるが、120°Cでランダムコイル型に変わっても依然負のままの強度を維持している。

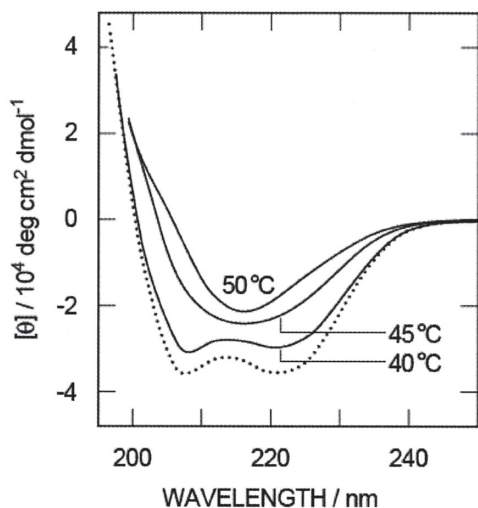


図1 PLLのCDスペクトルの温度上昇に伴う変化
(点線は25°Cで最大に α -ヘリックス構造を形成している状態のスペクトルを示す)

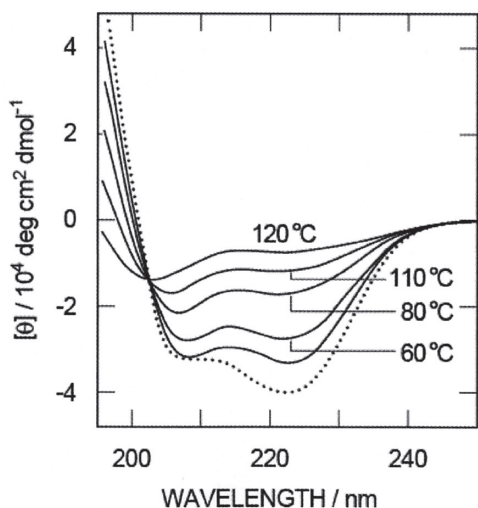


図2 PLGAのCDスペクトルの温度上昇に伴う変化
(点線は25°Cで最大に α -ヘリックス構造を形成している状態のスペクトルを示す)

加熱によって、PLLは α -ヘリックス構造が β -構造に転移し、PLGAは α -ヘリックス構造がランダムコイル構造に転移する。図3と4は、種々の温度に加熱したときのPLLとPLGAの $[\theta]_{222}$ の変化を示す。また、これらの図は、種々の温度(横軸の温度)に加熱後25°Cに冷却したときの $[\theta]_{222}$ も示す。PLLの $[\theta]_{222}$ の強度は、40°Cから50°Cの狭い範囲の温度上昇で急激に減少し、図1のスペクトル変化が示すように α -ヘリックス構造が β -構造に転移している。35°Cまでの加熱後25°Cに冷却すると、 $[\theta]_{222}$ は元の強度に回復するが、40°C以上で加熱後は冷却しても回復しにくくなり、50°C以上で加熱後は冷却しても全く回復しなくなる。PLLは α -ヘリックス構造から β -構造に完全に転移すると、その構造は冷却しても全く変化しない。

このようなPLLの熱変性に対して、PLGAの $[\theta]_{222}$ の強度は、35°Cから140°Cにかけて温度上昇に伴いゆるやかに減少し、図2からも分かるように α -ヘリックス構造がランダムコイル構造に徐々に転移している。また、PLGAの $[\theta]_{222}$ の強度は、90°C以下での加熱後25°Cに冷却すると元の強度に完全に回復する。すなわち、冷却によって、ランダムコイル構造が α -ヘリックス構造に完全に再転移している。PLGAの $[\theta]_{222}$ の強度は、140°Cにおける加熱後でさえ25°Cに冷却するとかなり回復し、冷却によってかなりの α -ヘリックス構造の再形成が見られる。これは、50°C付近の加熱で β -構造に完全に転移後は冷却しても全く構造が変化しないPLLとは対照的である。このように、加熱によって α -ヘリックス構造から β -構造に転移するPLLとランダムコイル構造に転移するPLGAには、熱変性で明らかな違いが見られる。

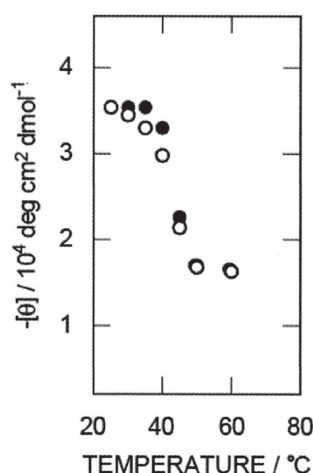


図3 熱変性におけるPLLの $[\theta]_{222}$ の変化

(○: 横軸の温度で加熱したとき、●: 横軸の温度で加熱後25°Cに冷却したとき。65°Cを越えると、PLL溶液が濁るため、測定していない)

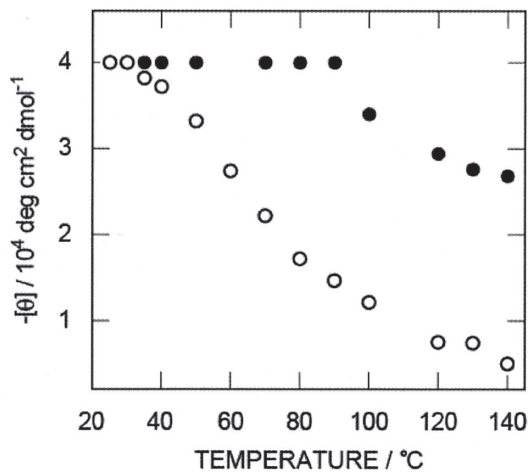


図4 熱変性におけるPLGAの $[\theta]_{222}$ の変化
(○：横軸の温度で加熱したとき、●：横軸の温度で加熱後25℃に冷却したとき)

3. 界面活性剤によるホモポリペプチドの構造変化

陰イオン性の界面活性剤sodium dodecyl sulfate (SDS) は、一般的な変性剤のグアニジンや尿素などの約1000分の1の濃度でタンパク質の構造を変える変性剤でもある。1960年代半ば、SarkerとDotyは、SDSがPLLにβ-構造を形成すること⁴⁾、GourkeとGibbsはSDSがPLOにα-ヘリックス構造を形成すること⁷⁾を発見した。SDSが規則構造を壊すのではなく、規則構造を形成するという彼らの発見は注目された。これをきっかけに、界面活性剤によるホモポリペプチドの構造変化の研究は加速された。

これらのホモポリペプチドは近紫外部の光を吸収しないため通常紫外分光法が使えず、これらの構造の研究は初期には旋光分散法、その後はCDによっている。しかし、数十年前CDが使われるようになってからも、

構造変化の検討は定性的、せいぜい半定量的レベルを出ていなかった。また、これらの速度論的な研究も全くされていなかった。

溶液の状態のタンパク質やホモポリペプチドの構造、中でも二次構造に関しては、今日でもCDがもっともよく使われ、そのデータの信頼性ももっとも高い。数十年前、著者らはあらゆる波長の平均残基構円率($[\theta]_{obs}$)に対して次の関係¹⁷⁾を想定して、α-ヘリックス構造、β-構造、ランダムコイルを形成している割合、それぞれ、 f_α 、 f_β 、 f_c ($f_\alpha + f_\beta + f_c = 1$) を求めることを独自に試みた^{10, 18, 19)}。

$$[\theta]_{obs} = f_\alpha [\theta]_\alpha + f_\beta [\theta]_\beta + f_c [\theta]_c$$

ここで、 $[\theta]_\alpha$ 、 $[\theta]_\beta$ 、 $[\theta]_c$ は、α-ヘリックス構造、β-構造、ランダムコイルをそれぞれ100%とったときの任意の波長における固有の平均残基構円率である。この関係を使って、実際に測定によって得られる50nmくらいの波長範囲のCDスペクトルにもっとも近似するスペクトルを1nmきざみで合成して、最適の f_α 、 f_β 、 f_c を求めた^{10, 18, 19)}。

この手法では、 $[\theta]_\alpha$ 、 $[\theta]_\beta$ 、 $[\theta]_c$ をどう選ぶかによって当然結果もある程度異なるが、種々の組み合わせで検討した。その結果、著者らは界面活性剤によってホモポリペプチドはα-ヘリックス構造を100%形成することはなく、β-構造も100%形成するのは限定的な条件下に限られることを明らかにした。

図5は、PLOの二次構造の割合のSDS濃度依存性を示す^{10, 19)}。先に、GourkeとGibbs⁷⁾がSDSによってPLOにα-ヘリックス構造が形成されることを発見したと述べたが、彼らが見つけたのは図5のSDS濃度が高い方の領域の結果に相当する。この図から、α-ヘリックス構造

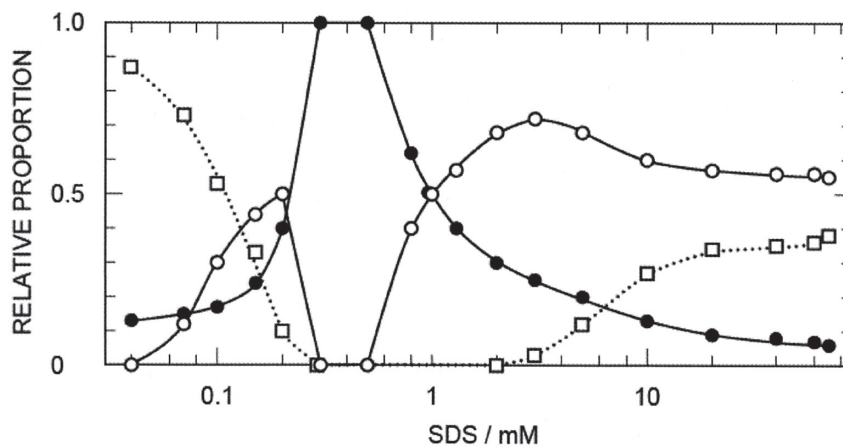


図5 PLOの二次構造の割合のSDS濃度依存性 (25℃)
(○：α-ヘリックス構造、●：β-構造、□：ランダムコイル)

が形成されるSDS濃度でもその割合は70%程度で、30%程度の β -構造と共存していることが分かる。SDS濃度がさらに高くなると、 α -ヘリックス構造が60%程度まで減少し、 β -構造はほぼ消失して、残りはほとんどランダムコイル構造になることが分かる。図5は正確には混合直後の結果で、SDS低濃度域で、PL0とSDSの混合直後 α -ヘリックス構造が形成されていることに注目すべきである。この α -ヘリックス構造は不安定で、GourkeとGibbsは見落としていたと思われる。この不安定な α -ヘリックス構造は時間が経過すると β -構造に転移する^{10, 19)} (後述)。

図6に、PLLに対するSDSの添加効果^{10, 18)}を示す。PLLはSDS溶液中で β -構造だけを形成し⁴⁾、 α -ヘリックス構造は全く形成しない。SDSのdodecyl sulfate (DS)イオンがPLLのリジン側鎖に結合している状態を模式的に図7に示す。DSイオンの結合によってPLLは α -ヘリックス構造を形成しないが、この図では側鎖に結合したDSイオン鎖の長さが α -ヘリックス構造の直径(~ 0.44 nm)に比較して長いことを強調するために、PLLの主鎖をあえてラセン構造状に描いてある。図7に見られるように、ポリペプチドの主鎖がラセン構造をとると、その側鎖がその構造の外側に放射状に並ぶ。もし、DSイオンが α -ヘリックス構造のPLLの側鎖に結合すると、DSイオンはその主鎖の構造の外側に放射状にその疎水基を突き出すことになる。一方、主鎖が2本以上並列に並ぶ形になる β -構造をとると、側鎖は主鎖が並ぶ面に対して各主鎖に沿って交互に上下に突き出した状態になる。結果的に、 β -構造のPLLの側鎖に結合したDSイオンは、 β -構造状の主鎖が並ぶ面の上下にその疎水基を並べる状態になる。このように主鎖の構造を比較すると、側鎖に結合しているDSイオンの疎水基同士の相互作用には、 α -ヘリックス構造より β

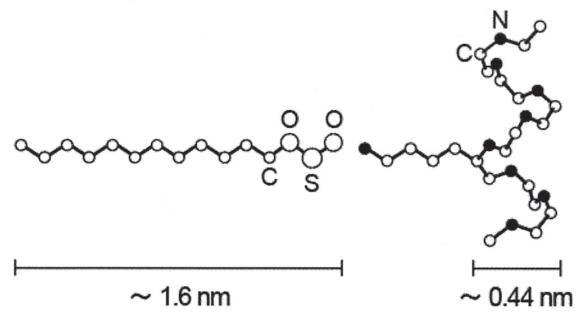


図7 SDSのdodecyl sulfate (DS)イオンがPLLのリジン側鎖に結合している模式図

-構造を形成する方が相対的に好都合であると思われる。DSイオンの結合によって、PL0は α -ヘリックス構造を形成し、SDSが高濃度になっても β -構造をほとんど形成しない。PL0よりメチレン基を1つ多くもつPLLは、SDS溶液中で β -構造のみを形成する。このように、PL0とPLLの側鎖のメチレン基1つの違いでDSイオンが誘起する構造の違いが見られる。界面活性剤の方の疎水基が短いsodium decyl sulfateを使っても、効果はSDSと変わらない。疎水基の長さがさらに短いsodium octyl sulfate (SOS)を使うと、PLLも α -ヘリックス構造を形成するようになる^{10, 18, 20, 21)}。図8に、SOS溶液中のPLLの二次構造変化を示す。この図に見られるように、限定的なSOS濃度で50%程度安定な α -ヘリックス構造を形成する。しかし、SOS濃度が高くなると、 α -ヘリックス構造は消え、 β -構造を形成する。図6のSDS溶液中の結果と比べて、SDSよりわずかに高いSOS濃度域で β -構造を形成している。

6mM SOS溶液中で α -ヘリックス構造を形成しているPLLにオクタノールをmMオーダーで添加したときの二次構造変化を図9に示す。オクタノールを2mMくらい

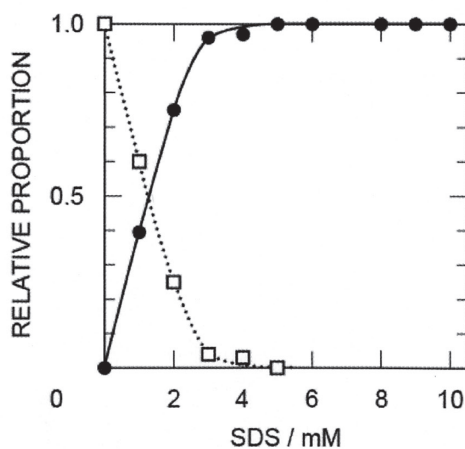


図6 SDS添加によるPLLの β -構造形成 (●: β -構造、□: ランダムコイル)

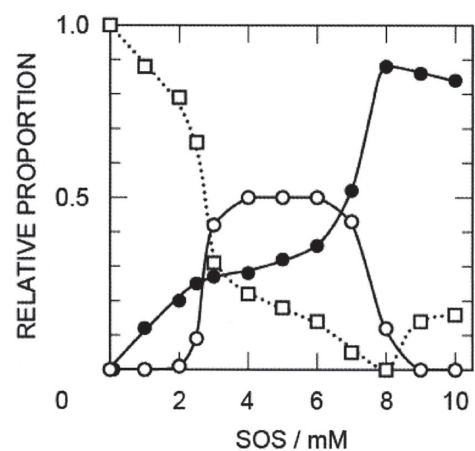


図8 SOS溶液中のPLLの二次構造変化 (○: α -ヘリックス構造、●: β -構造、□: ランダムコイル)

まで添加して疎水性を上げるとPLLの α -ヘリックス構造の割合は60%を超える程度まで増える。しかし、オクタノールをさらに添加すると、PLLは β -構造を形成するようになる。界面活性剤の疎水性の微妙な違いによるPLLの二次構造に対する影響の大きな違いは未だ明快には説明できない。

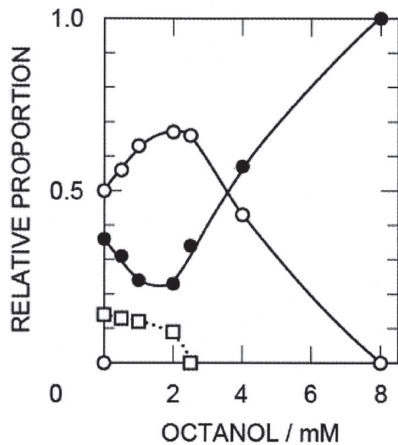


図9 6 mM SDS溶液中のPLLの二次構造に対するオクタノールの添加効果 (○: α -ヘリックス構造、●: β -構造、□: ランダムコイル)

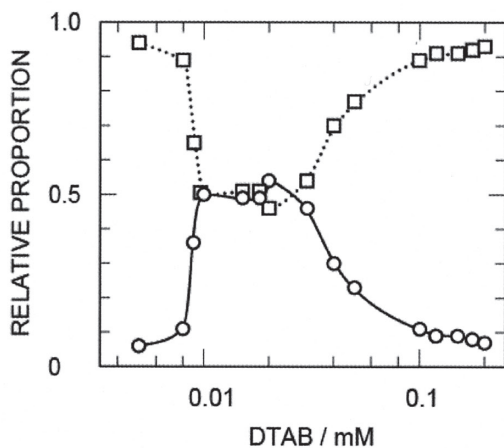


図10 DTAB溶液中におけるPLGAの α -ヘリックス構造形成 (○: α -ヘリックス構造、□: ランダムコイル)

陽イオン性界面活性剤のdodecyltrimethylammonium bromide (DTAB) 溶液中で、PLGAが α -ヘリックス構造を形成する様子を図10に示す¹⁰⁾。陰イオン性界面活性剤SDS溶液中のPLLと違って、DTAB溶液中のPLGAは最大で50%程度まで α -ヘリックス構造を形成するが、 β -構造は全く現れない。PLGA-DTAB系の場合、陽イオン

性のdodecyltrimethylammonium (DTA) イオンの疎水基が α -ヘリックス構造を形成しているPLGAのラセン構造の外側に放射状に突き出ることになる。SDS溶液中のPLLと違い、PLGAは、界面活性剤濃度が高くなっても β -構造を形成せず、ランダムコイルになる。DTAB高濃度で、PLGAが β -構造をとらないのは、DTAイオンの親水基がDSイオンに比べかさばっていることもあるかもしれないが、PLGAは熱変性でもランダムコイルに転移する特性をもつためかもしれない。

4. これらの構造変化の速度論的側面

ホモポリペプチドやタンパク質と界面活性剤の系に著者が注目したのは、これらの系の速度論がされていないからであった。しかし、結果的にホモポリペプチドやタンパク質の界面活性剤による構造変化の速度論は、著者ら^{10, 19-21)}が着手した後、誰も手をつけなかった。図11は、図5で示したSDS低濃度域におけるPL0の不安定な α -ヘリックス構造の β -構造への転移に伴う3種類の二次構造の割合の経時変化を示す^{10, 19)}。時間の経過に伴い、 α -ヘリックス構造の割合は減り、わずかにあったランダムコイルも減って、その代わり β -構造の割合が増加する。このような経時変化(実際は、特性波長の楕円率の経時変化)から得られる見かけの速度定数は、SDS濃度の増加に伴い速くなる。PL0の場合、 α -ヘリックス構造またはランダムコイルから β -構造への転移が大がかりになるほど、反応速度は速くなる。界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの様々な構造変化が大がかりになるほどその反応速度が速くなることは、後述の構造変化のメカニズムを考える上で重要である。

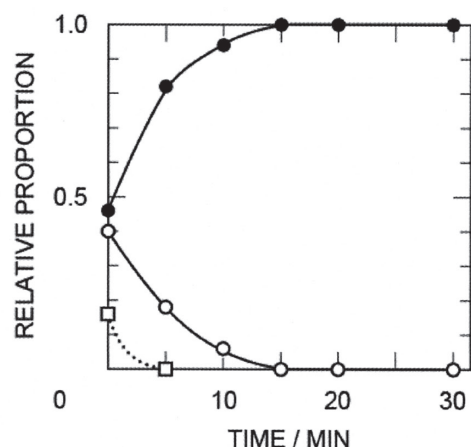


図11 SDS溶液中におけるPL0の不安定な α -ヘリックス構造の β -構造への転移に伴う二次構造の割合の経時変化 (○: α -ヘリックス構造、●: β -構造、□: ランダムコイル)

溶液中で起こる高速反応は、緩和法やストップフロー法などで測定され、通常1秒以下で反応は完結する。通常のそういう反応に比べると、界面活性剤によるタンパク質やホモポリペプチドの構造変化はかなり遅い。タンパク質の場合、界面活性剤によるヘリックス構造の崩壊は数十ミリ秒で、界面活性剤によるヘリックス構造の形成は秒オーダーの時間で起こる²²⁻²⁷⁾。PL0の α -ヘリックス構造から β -構造への転移(図11)は分オーダーで起こっている。また、繰り返しになるが、これらの構造変化のいずれの速度も界面活性剤の濃度が高くなり構造変化も大がかりになる程速くなる²²⁻²⁸⁾。逆に、界面活性剤による構造変化の程度が小さい方が、その速度は遅い。この事実は、界面活性剤の結合量が多くなると、タンパク質やホモポリペプチドの構造は、結合量が少ない段階の構造を中間体として経由せずに変化することを強く示唆するものである。なぜなら、結合量が少ない段階の構造を中間体として経由すると、構造変化が大がかりになるほど遅くなってしまふからである。

界面活性剤のタンパク質やホモポリペプチドへの結合速度は、界面活性剤のミセル形成・崩壊の時間オーダー^{29, 30)}と同程度、遅くともミリ秒以下であると予想される。従って、タンパク質やホモポリペプチドは、すでに結合している界面活性剤と共に、つまり複合体の状態では構造を変えることになる。界面活性剤イオンは結合場所を移動しながら界面活性剤イオン間の疎水的相互作用もし続けるため、反応に時間がかかると思われる²²⁻²⁷⁾。別な表現をすれば、このような界面活性剤の再配列を伴うタンパク質やホモポリペプチドの構造変化は、重い手かせ足かせをつけられたような状態での動きになるに違いない。

5. 構造変化のメカニズム

次のようなモデルが、一般的なタンパク質の変性や構造変化に長年よく使われて来て、今も何の躊躇もなく使われている¹⁶⁾。



ここで、Nというのはnative状態ということで天然の状態または構造、Dというのはdenatured状態ということで変性した状態または天然状態とは違う構造を示す。ちなみに、“変性”という用語はタンパク質や酵素の本来の性質や構造が変わることを広く指して使われている。この $N \rightleftharpoons D$ の平衡は“2状態転移(two-state model)”と呼ばれたりもしている。タンパク質の三次構造が立体的には折りたたまれていることに主眼をおいて、Nの代わりにfoldingのF、Dの代わりに“ほだけ

た”という意味でunfoldingのUを使う表現も使われている。また、中間体のD'を想定して、 $N \rightleftharpoons D' \rightleftharpoons D$ と表す反応モデル(three-state model)もある。

これらのモデルは、著者らがこの分野に興味をもったころには既にあった。しかし、上述のような研究を続ける中で、著者らはこれらのモデルに大きな疑問をもたざるをえなくなった^{16, 22-27)}。まず、大問題は、中間体を想定してもしなくても、スタートのNとゴールのDは変わっていないことである。例えば、PL0はSDS溶液中で主として α -ヘリックス構造から β -構造へ転移する。 α -ヘリックス構造から β -構造への転移のプロセスとして考えられる2つのパターンを図12に示す¹⁶⁾。この模式図では、左右の端っちは完全に α -ヘリックス構造と β -構造になっていて、左右それぞれが上述のモデルのNとDに相当するように描かれている。問題は、完全に α -ヘリックス構造でも β -構造でもない中途半端な条件下でどういう構造になるかである。パターン1では、そういう中途半端な条件下で完全に α -ヘリックス構造をとっている分子と完全に β -構造をとっている分子が混在し、変性条件の進行と共に β -構造をとっている分子の割合が増加するとしている。一方、パターン2では、中途半端な条件下で各ポリペプチド分子が α -ヘリックス構造と β -構造を部分的にとり、変性条件の進行と共に各分子で β -構造をとっている部分の割合が増加するとしている。N \rightleftharpoons Dと表記したモデルは、パターン1を前提としている。なぜなら、そのモデルでは、一定のNと一定のD以外の化学種は想定していないからである。中間体を挟み両端にNとDを可逆的に想定しているモデルでも同様に、NとDの他にD'という一定の中間体の存在しか想定していない。しかしながら、加熱によってPLLが α -ヘリックス構造から β -構造に転移する際(図3)、途中の加熱温度で一部のPLL分子は完全に β -構造を形成し、残りの分子は完全に α -ヘリックス構造のまま共存することがありうるだろうか。 α -ヘリックス構造からランダムコイル構造に転移するPLGAの熱変性で、途中の温度である量のPLGA分子は完全にランダムコイル構造になり、残りのPLGA分子は完全に α -ヘリックス構造のまま共存することは想定し難い。やはり、パターン2のように、同じ条件下では各ポリペプチド分子が均等に影響を受け、各分子が同じように構造変化をして進むと考えるべきであろう。また、例えば、PLGA(図4)が、50℃で熱変性したときと100℃で熱変性したときとD状態が同じであるはずがない。さらに100℃で熱変性したときに、必ず50℃で熱変性したときのD状態を中間体D'として経由するかも甚だ疑問である。

パターン2のように考える傍証として、SDSとタンパク質の複合体の光散乱電気泳動測定³¹⁾とキャピラリー

電気泳動測定³²⁾の明快な結果がある。それらによると、タンパク質単体とSDSが飽和結合した複合体はたしかに単一の状態として検出されるが、飽和結合しないSDSの濃度域では、SDSの結合量が違う複数の状態の複合体が共存し、NやDに相当するタンパク質単体とSDSが飽和結合した複合体は全く存在しない。これは、変性前の条件下ではD状態はもちろん中間状態の複合体も存在しないこと、ある程度以上変性する条件下ではN状態に相当するものは存在しないこと、最大に変性する条件下ではN状態も中間状態の複合体も存在しないことを明らかに示している。界面活性剤によるタンパク質の構造変化のD状態も構造変化の過程も界面活性剤の濃度すなわち結合量によって明らかに異なる^{16, 22-27)}。界面活性剤以外の尿素やグアニジンのような変性剤による構造変化においても、同様のことが言えるはずである。結局、いかなる条件下でも一定のNと一定のDが共存するはずはなく、 $N \rightleftharpoons D$ の平衡を想定することは到底無理である。

$N \rightleftharpoons D$ のような可逆的な化学平衡がタンパク質やホモポリペプチドの変性や構造変化の議論に登場したきっかけは、タンパク質の再生 (renaturationまたはrefolding) の実験であったかもしれない。タンパク質の再生の実験は、変性剤濃度を希釈したり、熱変性後冷却したりして行われる。変性剤でタンパク質を変性させた後変性剤濃度を希釈すると、熱変性なら冷却すると、タンパク質がどの程度元の状態に再生するか、

これはこれで興味あるところで、今も活発に研究されてもいる。このようなタンパク質の再生の研究で、“可逆的 (reversible)” という単語がむやみに使われてもいる¹⁶⁾。しかし、条件を変えることによるタンパク質の再生は、一定の条件下で平衡関係にある通常の反応の“可逆性 (reversibility)” とは全く違う性質のものである。また、先のある温度で加熱後冷却したときのPLL、PLGAの回復さえ、違いはあるがそれぞれ限定的な温度範囲でしか成立していない (図3と4)。タンパク質の再生は、あくまで“再生”か“回復”であって、“可逆性”ではない。

今日でも、残念ながら、多くの研究者がタンパク質の構造変化などの温度依存性から然ると $N \rightleftharpoons D$ の平衡をベースにもっともらしく議論している¹⁶⁾。こういう議論の前提は、50℃でも100℃でもタンパク質のD状態は同じで、NとDの間に可逆性もあるということであるが、そんなはずがなく、そういう前提で議論しても全く無意味と著者らは思っている。本稿の作成中、あるアメリカのジャーナルに投稿された論文の審査依頼が3件来た。まさに、これらの論文が何の躊躇もなく two-state model、three-state model をベースに記述している。本稿に書いているようなことの一部をかいつまんで審査意見に書かざるをえないが、その論文の著者は簡単には理解してくれないだろう、いや、できないだろう。それくらい、これらのモデルは過信され、当然のごとく使われて来ている。

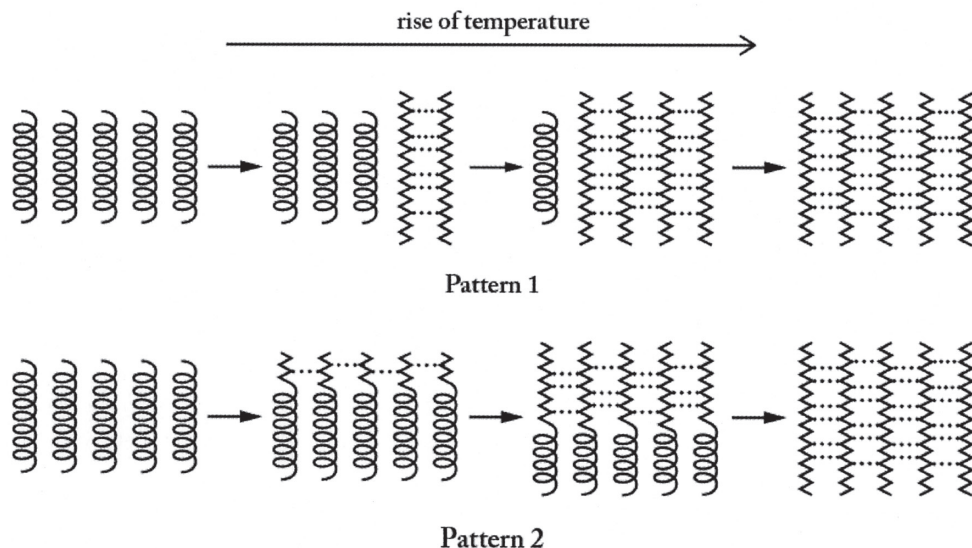


図12 α -ヘリックス構造から β -構造への転移プロセスの模式図

2つのパターンとも、左右の端っちは完全に α -ヘリックス構造と β -構造をとり、NとDに相当する。パターン1では、中途半端な変性条件下で完全に α -ヘリックス構造をとっている分子と完全に β -構造をとっている分子が混在し、変性条件の進行と共に β -構造をとっている分子の割合が増加する。パターン2では、中途半端な条件下で各ポリペプチド分子が α -ヘリックス構造と β -構造を部分的にとり、変性条件の進行と共に各分子の β -構造をとっている部分の割合が増加する。

タンパク質が完全に変性しない、あるいは最大に構造変化しない条件下では、 $N \rightleftharpoons D$ の状態まで進まずに、 N でも D でもない状態、その条件下での変性状態または構造とすべきである。一定の条件下での揺らぎ程度の構造変化を除いて、タンパク質の変性や構造変化は逆反応のない一方向だけの反応として取り扱う方がより現実的であると思う。

6. ホモポリペプチドの意外な効用

ここで述べて来た側鎖に電荷をもつホモポリペプチドが、ある種のタンパク質や酵素の反応場になることに簡単にふれる。

ミツハチの毒成分として含まれるタンパク質のメリチンは、たった26個のアミノ酸から成る^{33,34}。メリチンの26個のアミノ酸中には、プラスに帯電したアミノ酸が6個あるが、マイナスに帯電したアミノ酸はない。このメリチンはSDSミセルのマイナスの電荷をもつ表面上でヘリックス構造を形成する^{33,34}。SDSのミセル表面のマイナス電荷がメリチンのプラスに帯電したアミノ酸残基とうまく静電的な相互作用をし、ヘリックス構造を形成していると思われる。それで、著者らは中性pHでマイナスの電荷をもつPLGAの鎖上ではどうか検討した³⁴。その結果、PLGAの鎖上でも、D-グルタミン酸ばかりがつかあったポリ-D-グルタミン酸 (PDGA) の鎖上でも、メリチンはヘリックス構造を形成することが明らかになった。メリチンの構造変化は起こっているが、PLGAとPDGAの方には一切構造変化は起こらず、ランダムコイルのまま場で提供しているだけである。

これらの結果は、電荷をもつホモポリペプチドの鎖上が電荷をもつミセル表面と同じようにある種のタンパク質や酵素の独特の反応場になることを示唆している。界面活性剤のミセルはある種の反応に対して触媒としての機能も発揮し、その研究も一時期盛んであった³⁵。反応は、反応するもの同士が接触・衝突することによって起こる。そういう反応場をホモポリペプチドもミセルと同じように提供できる反応があるかもしれない。

7. おわりに

冒頭でも述べたように、ホモポリペプチドは、タンパク質の構造の初期の研究段階から、タンパク質の簡単なモデル系として注目された。従って、ホモポリペプチドの界面活性剤との相互作用も結構早い時期から研究され始めた。

著者らは、界面活性剤によるホモポリペプチドの構造変化の速度論に興味があり、この系に取り組むようになった。その頃、著者らと同じ界面活性剤のミセル形成反応の速度論をやっていたグループが、速度論的

には未開拓のこの系に流れて来るのではないかと競争心もあつたりしたが、結局そういうことはなかった。これは、ミセル形成反応等には有効だった検出法のほとんどが、本文中でも述べたように、ホモポリペプチドに対しては使えなかったことも事情の1つであろう。本稿のデータはほとんどがCDによるものであるが、著者らはこのCD装置を割と早い時期に自由に使えるようになった。そのおかげで、速度論的な現象以外にも、界面活性剤によるホモポリペプチドの構造変化の新たな面も見いだすことができたと思っている。

この分野への新規流入者が少なかった事情は、他に時代の流れもあったかもしれない。1980年代、ここで扱ってきたようなホモポリペプチドを対象とする研究は、アメリカでは研究資金がとれない時代が変わっていった。残念ながら、最近はホモポリペプチドを使った論文をほとんど目にしなくなった。

しかし、最後に簡単に述べたように、ホモポリペプチドは構造変化以外にもユニークな現象も引き起こす。ホモポリペプチドはそれほど高価でもない。この紀要で本稿を目にさせていただいた読者の中に、一人でもこのホモポリペプチドに関心をもってもらえれば幸いである。

ここで扱ったもう一つの物質、界面活性剤は、「しゃぼん」と呼ばれて1600年頃鉄砲といっしょに日本に入ってきた。「しゃぼん」という名称は、その積出港であったイタリアの「サボナ」という地名が訛ったものとされている。その時代、「しゃぼん」は、洗濯等には全く使用されず、便秘などの医薬品として重宝され、徳川家康の財産目録に「しゃぼん十壺」という記録もあるそうである。界面活性剤はドイツで1928年初めて化学的に合成されたとされている。それから約90年たった現在、界面活性剤は、洗剤やシャンプーなどは別として、製品になったらその製品の主役になることは少ないが、製造過程では黒子的に重要な役割をしている。そのため、界面活性剤は薬品・化粧品・食品などの製造業はもとより、はた目にはちょっと想像できないようなものの製造過程でも使われている。界面活性剤は、両親媒性物質とも呼ばれ、独特の物性を発揮する。この界面活性剤にも、大いに興味や関心をもっていただきたいと願うものである。

参考文献

- 1) K. Imahori, K. and J. Tanaka, *Ultraviolet Absorption Spectra of Poly-L-Glutamic Acid*. J. Mol. Biol. 1, 359-364 (1959).
- 2) K. Rosenheck, and P. Doty, *The Far Ultraviolet Absorption Spectra of Polypeptide and Protein Solutions and their Dependence on Conformation*. Biochemistry 47,1775-1785 (1961).

- 3) G. Holzwarth and P. Doty, *The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides*. J. Am. Chem. Soc. 55, 218-228 (1965).
- 4) P. K. Sarkar and P. Doty, *The Optical Rotatory Properties of the β -Configuration in Polypeptides and Proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. 55, 981-989 (1966).
- 5) R. Townend, T. F. Kumonsiski, S. N. Timasheff, G. D. Fasman, and B. Davidson, *The Circular Dichroism of the Conformational Transitions of Uncharged Poly-L-Lysine. α Helix-Random Coil- β Structure of Poly-L-Lysine*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 163-169 (1966).
- 7) M. J. Grouke and J. H. Gibbs, *Transition from Random Coil to α -Helix Induced by Sodium Dodecyl Sulfate*. Biopolymers 586-588 (1967).
- 8) B. Davidson and G. D. Fasman, *The conformational transitions of uncharged poly-L-Lysine: α Helix-Random Coil- β Structure*. Biochemistry 6, 1616-1629 (1967).
- 9) I. Satake and J. T. Yang, *Effect of Chain Length and Concentration of Anionic Surfactants on the Conformational Transitions of Poly(L-Ornithine) and Poly(L-Lysine) in Aqueous Solution*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 930-936 (1973).
- 10) 竹田邦雄, “蛋白質や合成高分子のコンフォメーションは界面活性剤溶液中で実際どう変わるのか—Conformational Changes of Proteins and Synthetic Polymers in Surfactant solutions; Conformational Analysis and Kinetics”, 表面, 23, pp.351-368 (1985).
- 11) Y. Moriyama, Y. Kawasaka, and K. Takeda, *Protective Effect of Small Amounts of Sodium Dodecyl Sulfate on the Helical Structure of Bovine Serum Albumin in the Thermal Denaturation*. J. Colloid Interface Sci., 257, 41-46 (2003).
- 12) Y. Moriyama, E. Watanabe, K. Kobayashi, H. Harano, E. Inui, and K. Takeda, *Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in the Thermal Denaturation up to 130°C and Protective Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change*. J. Phys. Chem. B, 112, 16585-16589 (2008).
- 13) Y. Moriyama, Y. Tanizaki, and K. Takeda, *Protective Effect of Gemini Surfactant on Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in Thermal Denaturation up to 130°C*. J. Oleo Sci., 58, 573-579 (2009).
- 14) Y. Moriyama and K. Takeda, *Critical Temperature of Secondary Structural Change of Myoglobin in Thermal Denaturation up to 130°C and Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change*. J. Phys. Chem. B, 117, 2430-2434 (2010).
- 15) Y. Moriyama, N. Kondo, and K. Takeda, *Secondary Structural Changes of Homologous Proteins, Lysozyme and α -Lactalbumin, in Thermal Denaturation up to 130°C and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Effects on These Changes: Comparison of Thermal Stabilities of SDS-Induced Helical Structures in These Proteins*, Langmuir, 28, 16268-16273 (2012).
- 16) K. Takeda and Y. Moriyama, *Kinetic Aspects of Surfactant-induced Structural Changes of Proteins—Unsolved Problems of Two-state Model for Protein Denaturation (Review)*. J. Oleo Sci., 64, 1143-1158 (2015).
- 17) N. Greenfield and G. D. Fasman, *Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation*, Biochemistry, 8, 4108-4116 (1969).
- 18) K. Takeda, *Conformational Analyses of Poly(L-Lysine) Induced by Various Surfactants*, Bull. Chem. Soc. Japan, 58, 1210-1214 (1985).
- 19) K. Takeda, *Kinetics of Coil to α -Helix to β -Structure Transitions of Poly(L-Ornithine) in Low Concentrations of Sodium Dodecyl Sulfate*, Biopolymers, 24, 683-694 (1985).
- 20) K. Takeda, A. Iba, and K. Shirahama, *Conformational Change of Poly(L-Lysine) by Sodium Octyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroism Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 54, 1793-1796 (1981).
- 21) K. Takeda, A. Iba, and K. Shirahama, *Conformational Change of Poly(L-Lysine) by Sodium Octyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroism Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 985-989 (1982).
- 22) K. Takeda, *Conformational Change of Delta-chymotrypsin Caused by Sodium Dodecyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroic Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 1335-1339 (1982).
- 23) K. Takeda, *A Kinetic Study of the Conformational Change of Bovine Serum Albumin by Sodium Dodecyl Sulfate*, Bull. Chem. Soc. Japan, 56, 1037-1040 (1983).
- 24) K. Takeda, A. Wada, K. Yamamoto, K. Hachiya, and P. P. Batra, *Secondary Structure Change of Myoglobin Induced by Sodium Dodecyl Sulfate and its Kinetic Aspects*, J. Colloid Interface Sci., 125, 307-313 (1988).
- 25) K. Takeda, *A Kinetic Study of the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Bovine Serum Albumin by Means of a Pressure-jump Method*, Bull. Chem. Soc. Japan, 55, 2547-2550 (1982).
- 26) K. Takeda, K., Takahashi, and P. P. Batra, *Kinetic Aspects of the Interaction of Horse Heart Cytochrome c with Sodium Dodecyl Sulfate*. Arch. Biochem. Biophys. 236, 411-417 (1985).
- 27) K. Takeda, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Interaction of protein with Ionic Surfactant (part 2): Kinetics of Conformational Change of Protein Induced by the Binding of Surfactant; Dynamics of Protein-Surfactant Complexes; Interaction of Protein with Reverse Micelles (Review)*, Encyclopedia of Surfactant and Colloid Science, A. T. Hubbard Ed., Marcel Dekker: New York, pp.2575-2592 (2002).
- 28) 竹田邦雄, 森山佳子, “界面活性剤とタンパク質の相互作用”, オレオサイエンス, 11, pp.3-10 (2011).
- 29) 安永達也, 竹田邦雄, “界面活性剤のミセル形成と緩和”,

表面, 14, pp.190–206 (1976).

30) K. Takeda and T. Yasunaga, *Kinetics of Sodium Dodecyl Sulfate Micelle Dissociation by a Pressure-jump Method*, *J. Colloid Interface Sci.*, 40, 127-128 (1972).

31) K. Takeda, H. Sasaoka, K. Sasa, H. Hirai, K. Hachiya, and Y. Moriyama, *Size and Mobility of Sodium Dodecyl Sulfate-Bovine Serum Albumin Complex as Studied by Dynamic Light Scattering and Electrophoretic Light Scattering*, *J. Colloid Interface Sci.*, 154, 385-392 (1992).

32) K. Sasa and K. Takeda, *Multiple Coexisting Species of Sodium Dodecyl Sulfate-Bovine Serum Albumin Complexes as Detected by*

Capillary Electrophoresis, *J. Colloid Interface Sci.*, 157, 516-517 (1993)

33) S. Kubota and J. T. Yang, *Conformation and Aggregation of Melittin: Effect of pH and Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate*, *Biopolymers*, 25, 1493-1504 (1986).

34) K. Takeda and Y. Moriyama, *Helix Formation of Melittin on Poly(L-glutamic acid) and Poly(D-glutamic Acid)*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1040-1041 (1991).

35) J. H. Fendler and E. J. Fendler, *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York (1975).

Structural Changes of Homopolypeptides Induced by Surfactants

—As Model System of Structural Change of Protein—

Kunio TAKEDA and Yoshiko MORIYAMA

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering,

Okayama University of Science

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

(Received October 4, 2016; accepted December 5, 2016)

The homo-polypeptides such as poly-L-lysine (PLL), poly-L-ornithine (PLO), and poly-L-glutamic acid (PLGA) are in random coil states with the repulsion between the charged side chains at a neutral pH. However, they form α -helical structures upon losing their charges at alkaline or acidic pH ranges. The structural changes of these homo-polypeptides are drastically induced by surfactants of mM order. The addition of anionic sodium dodecyl sulfate induces the coil to β -structure transition in PLL and the coil to α -helix transition in PLO. On the other hand, the addition of cationic dodecyltrimethylammonium bromide induces the coil to α -helix transition in PLGA. The secondary structures in these transitions have been analyzed quantitatively by the curve-fitting method of circular dichroism spectra. Further, the kinetic discussion proposes that these structural changes should be examined assuming one way reactions with no backward processes rather than assuming the reversible two-state reaction model or similar modified models.

Keywords: homopolypeptide; poly-lysine; poly-glutamic acid; surfactant; protein structure; sodium dodecyl sulfate; circular dichroism.