

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19350059
 研究課題名 (和文) ホスト・ゲストモデルペプチドを用いたコラーゲンの構造安定化機構の
 解明
 研究課題名 (英文) Stabilization mechanism of collagen helix by using host-guest model
 peptides
 研究代表者
 奥山 健二 (OKUYAMA KENJI)
 大阪大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：30038020

研究成果の概要 (和文)：Hyp 残基によるコラーゲンらせんの位置特異的な安定化や不安定化の解明は、近年のコラーゲンの構造化学的研究において最も重要な問題の一つとなっている。本研究では、一連のコラーゲンモデルペプチドの高分解能構造解析結果と、それらペプチドの helix-coil 転移温度に基づき、コラーゲンらせんの安定化・不安定化を支配している重要な因子の一つである、Hyp 残基のパッキングに関する規則を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Understanding the mechanism of the stabilization and destabilization of a collagen helix induced by Hyp residues is one of important issues in structural study of collagen. The present study has revealed the rule for ring puckering of Hyp residues, which governs stabilization and destabilization of collagen helix, by the high resolution structure analyses of collagen-model peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：コラーゲン 三重らせん モデルペプチド 高分解能解析 構造安定化

1. 研究開始当初の背景

コラーゲン (本研究では、最も広く分布する I 型コラーゲンを指す) は、両末端の 10～20 残基のテロペプチドを除く 1014 残基で Gly-X-Y の繰り返し配列をしており、その特異な配列を反映して 3 重らせんという特有の分子構造をしている。コラーゲン分子は生理条件下で自発的に繊維を形成するために、球状蛋白質と異なり単結晶とならない。その

ため、分子構造に関する情報は、単結晶解析に比べ情報量の少ない X 線繊維回折データに頼らざるを得ない。コラーゲンの分子構造は、これまで Rich と Crick が 1955 年に繊維回折データに基づいて提案した 10/3-helix 構造であるとされてきた。一方、申請代表者らは、コラーゲンモデルペプチドの単結晶解析から、モデルペプチドの分子構造が 7/2-helix であることを見つけた。天然コラーゲンの繊

維回折像も 7/2-helix で問題なく説明できることや、モデルペプチドで 10/3-helix 構造をとるものが皆無であること等から、コラーゲンの分子構造も 7/2-helix であると結論した。

コラーゲンの三重らせん構造は、翻訳後修飾によるプロリン(Pro)のヒドロキシル化により安定化される。ヒドロキシル化反応における補酵素であるビタミン C が長期間にわたって欠乏すると、致死的な壊血病になることから、Pro が Hyp に代わることがコラーゲンの構造安定化に重要であることを示している。ところが、ヒドロキシル化により何故らせんが安定化するかについては、種々の説があるものの、未だに結論が得られておらず、世界中のコラーゲン研究者の重要課題となっている。

2. 研究の目的

(Pro-Pro-Gly)₁₀に比べて(Pro-Hyp-Gly)₁₀の helix-coil転移温度(変性温度)が約30°C高いことから、Hyp残基はらせんの構造安定化に寄与していることは明白である。しかしながら、(Hyp-Pro-Gly)₁₀は同様の条件下でらせんを巻かないことから、Hypは位置特異的に安定化・不安定化に関与していることも分かっている。そこで、本研究の目的は、一連のホスト・ゲストペプチドの高分解能構造に基づいて、Hypによるコラーゲンらせん構造の安定化・不安定化の機構を原子分解能の三次元構造に基づいて解明することである。

3. 研究の方法

Pro-Hyp-Gly配列に比べ、より高分解能回折データをこれまで与えてきたPro-Pro-Gly配列をホストとした一連のホスト・ゲストペプチド(Pro-Pro-Gly)₄-Xaa-Yaa-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄(以降、PPG9-XYGと呼ぶ)を設計し、放射光を用いた高分解能の単結晶構造解析を行う。それらの高分解能構造を基にして、Hypのリングパッカリングと構造安定化の関係を構造論的な側面から調べる。

4. 研究成果

(1) 次のモデルペプチド単結晶の高分解能解析を行った。Protein Data Bank (PDB)に登録した構造については、括弧内に PDB code を記した。

PPG9-OOG_H (PDB entry: 3A19)

PPG9-OOG_T (PDB entry: 3A08)

PPG9-OTG (PDB entry: 3A1H)

PPG9-OVG (PDB entry: 3A0M)

PPG9-OSG (PDB entry: 3ADM)

PPG9-ODG (PDB entry: 3ABN)

PPG9-OPG (PDB entry: 3A0A)

PPG9-PPG (PDB entry: 3AH9)

PPG9-POG (PDB entry: 2D3F)

PPG9-ONG_M, PPG9-ONG_K (PDB 登録予定)

ただし、PPG9_OOG と PPG9_ONG には 2 つの結晶形態があり、両方について構造解析を行った。

(2) 上記 11 種のホスト・ゲストペプチドの高分解能構造と、それ以前に我々が解析した (Pro-Hyp-Gly)_n (n= 10, 11) や、(Pro-Hyp-Gly)₄-Leu-Hyp-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄, (Pro-Hyp-Gly)₄-(Leu-Hyp-Gly)₂-(Pro-Hyp-Gly)₄ の構造を詳細に検討した結果、Y 位の Hyp は、例外なく up-puckering 構造(図 1)をとることが分かった。一方、X 位の Hyp は、分子内の隣接鎖間に向かい合った Y 位のアミノ酸が Pro の場合には down-puckering であるが、それ以外のアミノ酸の場合にはやはり up-puckering であることが分かった。

これまで X 位の Hyp は、この Hyp(X) と相互作用する隣接鎖の残基が Hyp(Y) の時だけ 2 つの Hyp の C_γ-O_δ 間の双極子・双極子相互作用により安定化するように、Hyp(X) が up-構造をとり、Y 位に Hyp 以外のアミノ酸がくる場合には X 位の positional preference により Hyp(X) は down-構造をとるとされていた。しかし、本研究の結果は、これまでの予測と大きく異なるものであった。

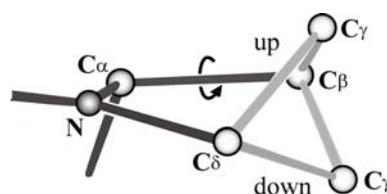


図 1 プロリン環のパッカリング

(3) 上記(2)の結果から、Hyp 残基の好んでとるエネルギー的に安定な構造(residual preference)である up-puckering は、X 位の positional preference より強いこと、X 位の Hyp が隣接鎖の Y 位の Pro と相互作用する場合には Hyp(X) は residual preference に反して down 構造をとり、Pro(X):Pro(Y) の場合と同様な鎖間での stacking 相互作用により安定化していることが分かった。

Hyp(X):Hyp(Y) stacking の場合には、Hyp(X) が up-構造をとり、Vitagliano 等が提案しているように Hyp 間で、2 つの C_γ-O_δ の双極子・双極子相互作用により安定化している可能性もあるが、Y 位に Pro 以外の他のアミノ酸がきた場合にも、Hyp(X) は up-構造なので、Hyp の residual preference は十分強いと考えるべきであろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① 奥山健二、川口辰也、コラーゲンの分子構造・高次構造、高分子論文集、査読有、67, 229-247 (2010).
- ② T. Shikata, N. Yoshida, and K. Okuyama, Anomalous Dehydration Behavior of a Short Collagen Model Polypeptide, (L-Prolyl-L-ProlylGlycyl)₅, in Aqueous Solution, J. Phys. Chem. Letters, 査読有、2010, 412-416.
- ③ K. Okuyama, T. Morimoto, H. Narita, T. Kawaguchi, K. Mizuno and H. P. Bächinger, Structure analyses of two crystal modifications of (Pro-Pro-Gly)₄-Hyp-Hyp-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄ revealed the puckering preference of Hyp(X) in the Hyp(X):Hyp(Y) and Hyp(X):Pro(Y) stacking pairs in collagen-helix, Protein Sci., Acta Cryst., 査読有、D66, 88-96 (2010).
- ④ T. Shikata, A. Minakawa and K. Okuyama, Structure, Dynamics and Hydration of a Collagen Model Polypeptide, (L-Prolyl-L-ProlylGlycyl)₁₀, in Aqueous Media: a Chemical Equilibrium Analysis of Triple Helix-to-Single Coil Transition, J. Phys. Chem. B., 査読有、113(43), 14504-14512 (2009).
- ⑤ K. Okuyama, H. P. Bächinger, K. Mizuno, S. Boudko, J. Engel, R. Berisio and L. Vitagliano, Comments on *Microfibrillar structure of type I collagen in situ* by Orgel *et al.* (2006), PNAS 査読有、103, 9001-9005, Acta Cryst. D65, 1007-1008 (2009).
- ⑥ T. Shikata, N. Yoshida, A. Minakawa and K. Okuyama, Dynamics and Hydration Behavior of a Short Collagen Model Polypeptide, (L-Prolyl-L-ProlylGlycyl)₅, in Aqueous Media, J. Phys. Chem. B., 査読有、113(27), 9055-9058 (2009).
- ⑦ K. Okuyama, C. Hongo, G. Wu, K. Mizuno, K. Noguchi, S. Ebisuzaki, Y. Tanaka, N. Nishino and H.P. Bächinger, High resolution structures of collagen-like peptides, (Pro-Pro-Gly)₄-Xaa-Yaa-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄ - Implications for triple-helix hydration and Hyp(X) puckering, Biopolymers, 査読有、91, 361-372 (2009).
- ⑧ K. Terao, K. Mizuno, M. Murashima, Y. Kita, C. Hongo, K. Okuyama, T. Norisue and H.P. Bächinger, Chain dimension and hydration behavior of collagen model peptides in aqueous solution: [Glycyl-4(R)-Hydroxyprolyl-4(R)-Hydroxyproline]_n and

- [Glycyl-Prolyl-4(R)-Hydroxyproline]_n, 査読有、Macromolecules, 41, 7203-7210 (2008).
- ⑨ T. Kawaguchi, K. Masakiyo, H. Jin and K. Okuyama, Electrostatic interaction explains D-staggered structure of collagen, Acta Cryst., 査読有、A64, C331 (2008).
 - ⑩ K. Okuyama, Structure of collagen-helix motif, Acta Cryst., 査読有、A64, C353 (2008).
 - ⑪ S. P. Boudko, J. Engel, K. Okuyama, K. Mizuno, H. P. Bächinger, M. A. Schumacher, Crystal structure of human type III collagen G991-G1032 cystine knot containing peptide shows both 7/2 and 10/3 triple helical symmetries, J. Biochem. 査読有、283, 32580-32589 (2008).
 - ⑫ M. Hayashi, E.V. Koychev, K. Okamura, A. Sugeta, C. Hongo, K. Okuyama, and S. Ebisu, Heat Treatment Strengthens Human Dentin, J. Dent. Res., 査読有、87(8) 762-766 (2008).
 - ⑬ K. Okuyama, Revisiting the molecular structure of collagen, Connect. Tissue Research, 査読有、49, 1-12 (2008).
 - ⑭ K. Okuyama, 7/2-Helical model for collagen - Evidence from native collagen and model peptides -, Proceeding of Recent Trends in Collagen, Diamond Jubilee Conference, 24-25 Jan. 2008, Central Leather Research Institute, Chennai, India, 査読なし、p.10-19.
 - ⑮ K. Okuyama, H. Narita, T. Kawaguchi, K. Noguchi, Y. Tanaka, and N. Nishino, Unique side chain conformation of a Leu residue in a triple-helical structure, Biopolymers, 査読有、86, 212-221 (2007).

[学会発表] (計 20 件)

- ① 三山啓太、森本辰也、正清孝一、川口辰也、奥山健二、H. P. Bächinger, コラーゲンモデルペプチド (Pro-Pro-Gly)₄-Hyp-Yaa-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄ (Yaa = Thr, Val, Ser)のX線結晶構造解析、日本結晶学会年次大会、関西学院大学、12月5-6日、2009.
- ② K. Miyama, T. Morimoto, K. Masakiyo, T. Kawaguchi, K. Okuyama, K. Mizuno, H. P. Bächinger, Stabilization mechanism by Hyp-Thr-Gly sequence in collagen-helix, AsCA'09 Joint Conference of the Asean Crystallographic Association and Chinese Crystallography Society, Beijing, China, Oct. 24, 2009.
- ③ 三山啓太、Nattha Jiravanichanun、奥山健二、水野一乗、Hans Peter Bächinger、コラーゲンモデルペプチド (Pro-Pro-Gly)₄-Hyp-Thr-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄のX線結晶構

- 造解析、第 57 回高分子討論会、大阪市立大学、大阪、9 月 24 - 26 日、2008.
- ④ 喜田裕介、寺尾憲、奥山健二、水溶液中における (Pro-Pro-Gly)₁₀ の三重らせんー 1 本鎖転移挙動、第 57 回高分子討論会、大阪市立大学、大阪、9 月 24 - 26 日、2008.
- ⑤ 奥山健二、高分解能解析で分かったコラーゲンらせんにおける第 1 層の水と第 2 層の水、第 57 回高分子討論会、大阪市立大学、大阪、9 月 24 - 26 日、2008.
- ⑥ K. Okuyama, Structure of collagen-helix motif, International Union of Crystallography, XXI Congress and General Assembly, Osaka, Japan, Aug. 23-31, 2008.
- ⑦ T. Kawaguchi, K. Masakiyo, H. Jin, K. Okuyama, Electrostatic interaction explains D-staggered structure of collagen, International Union of Crystallography, XXI Congress and General Assembly, Osaka, Japan, Aug. 23-31, 2008.
- ⑧ 金 海哲、川口辰也、服部俊治、奥山健二、小角 X 線によるアテロコラーゲン D-stagger 構造の研究、第 57 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、横浜、5 月 28 - 30 日、2008.
- ⑨ 正清孝一、川口辰也、奥山健二、7/2 らせん対称とアミノ酸配列に基づくコラーゲン繊維中の D-stagger の理解、第 57 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、横浜、5 月 28 - 30 日、2008.
- ⑩ K. Okuyama, 7/2-helical model for collagen - Evidence from native collagen and model peptides -, Recent Trends in Collagen, Diamond Jubilee Conference, Central Leather Research Institute, Chennai, India Jan. 24 - 25, 2008.
- ⑪ 奥山健二、正清孝一、金海哲、川口辰也、コラーゲン繊維における D-stagger 構造、特定領域研究「生体超分子構造」第 4 回公開シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、豊中、12 月 18 - 19 日、2007.
- ⑫ 金海哲、川口辰也、奥山健二、アテロコラーゲンの小角 X 線回折、特定領域研究「生体超分子構造」第 4 回公開シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、豊中、12 月 18 - 19 日、2007.
- ⑬ 金 海哲、奥山健二、アテロコラーゲンの小角 X 線回折、日本結晶学会年会、東京工業大学、12 月 1 - 2 日、2007.
- ⑭ T. Morimoto, M. Haga, C. Hongo, K. Noguchi, K. Okuyama, and T. Tanaka, Stabilization of collagen triple-helix by Arg in the Y position, The 8th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA'07), Taipei, Taiwan, Nov. 4 - 7, 2007.
- ⑮ K. Masakiyo, T. Kawaguchi, and K. Okuyama, Understanding of D-stagger in collagen fibers based on the 7/2-helical structure and amino acid sequence, The 8th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA'07), Taipei, Taiwan, Nov. 4 - 7, 2007.
- ⑯ T. Kawaguchi, M. Shimura, C. Hongo, K. Noguchi, K. Okuyama, K. Mizuno, and H.P. Bächinger, The structural analysis of the collagen-model peptide, (Pro-Pro-Gly)₄-Hyp-Asp-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄ crystal, The 8th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA'07), Taipei, Taiwan, Nov. 4 - 7, 2007.
- ⑰ K. Okuyama, Understanding of D-stagger in collagen fibrils, 7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Shangri-La Resort, Cairns, Australia, Oct. 28 - Nov. 1, 2007.
- ⑱ 奥山健二、静電相互作用に基づくコラーゲン高次構造における D-stagger の解説、特定領域研究「生体超分子構造」第 3 回ワークショップ、ホテルニューアカオ、熱海、静岡、7 月 11 - 13 日、2007.
- ⑲ 奥山健二、放射光で分かったコラーゲンの分子構造と高次構造、大阪大学蛋白質研究所セミナー「放射光が拓く繊維高分子のルネッサンス」、蛋白質研究所、大阪大学、吹田、6 月 8 - 9 日、2007.
- ⑳ 川口辰也、本郷千鶴、奥山健二、志村正紀、野口恵一、水野一乗、H.P. Bächinger、コラーゲンモデルペプチド (Pro-Pro-Gly)₄-Hyp-Asp-Gly-(Pro-Pro-Gly)₄ の結晶構造解析、高分子学会年次大会、国立京都国際会館、5 月 29 - 31 日、2007.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 奥山健二、コラーゲンの分子構造・高次構造、コラーゲンの製造と応用展開、谷原正夫 監修、シーエムシー出版、p.5-30, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 健二 (OKUYAMA KENJI)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：30038020

(2) 研究分担者

金子 文俊 (KANEKO FUMITOSHI)
大阪大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：70214468
川口 辰也 (KAWAGUCHI TATSUYA)
大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号 : 10314353