

3₁₀ヘリックスモデル錯体による金属酵素の活性調節機構研究

Synthetic Models of Novel 3₁₀-Helix Structure Found in Metallo Enzyme Active Sites

研究代表者 群馬大学工学部 助手 奥 浩之
Reserch Associate; Department of Chemistry, Gunma University
Hiroyuki Oku

3₁₀-helical peptides have been studied to clarify the role of 3₁₀-helices found in metalloenzyme active sites. As models of active site sequence, we have synthesized various block copolymers of -(Leu-Leu-Ala)- and -(Leu-Leu-Lac)- (Lac = L-lactic acid). Among them, the solid structures have been determined by X-ray diffraction for Boc-(Leu-Leu-Ala)₂-(Leu-Leu-Lac)₃-OEt (1)、Boc-Leu-Leu-Ala-(Leu-Leu-Lac)₃-Leu-Leu-OEt (2)、Boc-(Leu-Leu-Lac)₃-Leu-Leu-OEt (3) (Boc = *t*-butoxycarbonyl). From the structural analysis of 1-3, 3₁₀-helix is nucleated at Lac residue. Similar to Lac, Pro residue does not have NH group and is expected to initiate 3₁₀-helix in proteins.

1. 研究目的

蛋白質に見られる2次構造の1つ、3₁₀ヘリックス (Figure 1a) はαヘリックス (Figure 1b) より短い周期を持つらせん構造である。

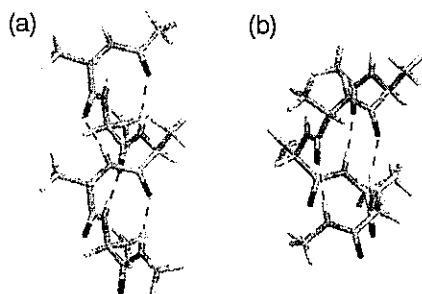


Figure 1. Structure of (a) 3₁₀- and (b) α-helix.

3₁₀ヘリックスは約3残基で1回転しi+2番目のアミノ酸残基と水素結合を、またαヘリックスは3.6残基で1

回転しi+3番目のアミノ酸残基と水素結合をしている。

3₁₀ヘリックスは一般にその存在量が少ない。よく見られるのは蛋白質のNH₂端で、平均4残基で存在する。3₁₀ヘリックスの役割はαヘリックスへのfolding過程に於ける最初の間体であると提案されている。

今回我々は金属酵素の反応性制御部位(金属と配位子の共有結合性の調節部位)に3₁₀ヘリックスが比較的多く存在することを見出した (Figure 2)。そこで3₁₀ヘリックスの新しい役割を解明するために、3₁₀ヘリックスを形成するペプチドの探索と溶液・結晶構造研究、および実際の酵素活

性中心配列の合成を行った。

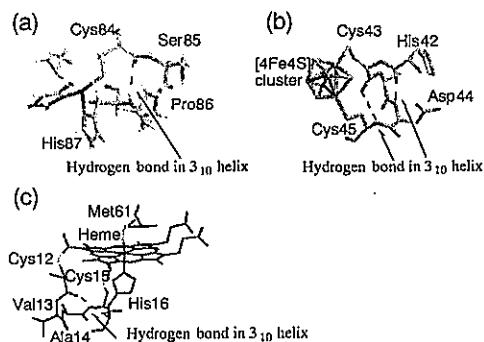


Figure 2. 3_{10} helices found in the active sites of metalloenzymes. (a) Plastocyanin, (b) HiPIP (electron transfer protein), (c) Cytochrome b-551.

2. 研究経過

2. 1. 方法

ブロックオリゴマーペプチドの合成

通常、ペプチド化合物はその純度、不安定構造、難溶性のために結晶化が非常に困難である。そこで合成は、これまでに解明してきた、安定なヘリックスを形成し溶解性の高い配列、-Leu-Leu-Ala-と-Leu-Leu-Lac- (Lac = L-lactic acid residue)、-Leu-Leu-Hmp- (Hmp = L-leucic acid residue)のブロックオリゴマー、8~24残基、について行った。

合成方法は高純度の単離を目的として、液相のフラグメント縮合で行った。得られたペプチドは CD 及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、ヘリックス形成傾向を解析した。

ペプチドの単結晶構造解析

多くのペプチドについて合成とその結晶化の結果、3種類の物質、

Boc-(Leu-Leu-Ala)₂-(Leu-Leu-Lac)₃-OEt (1)、Boc-Leu-Leu-Ala-(Leu-Leu-Lac)₃-Leu-Leu-OEt (2)、Boc-(Leu-Leu-Lac)₃-Leu-Leu-OEt (3) (Boc = *t*-butoxycarbonyl) の単結晶作成と X 線構造解析に成功した。結晶作成は MeOH 溶液への H₂O の vapor diffusion により行った。

酵素活性中心ペプチドの合成

以下に示すように NH を持たない Lac 残基は 3₁₀ヘリックスを誘導することがわかった。同様に NH を持たない Pro 残基を含む 3₁₀ヘリックス活性中心配列、plastocyanin の -Cys-Ser-Pro-His- を酵素モデルとして用いた (Figure 2a)。これにヘリックス構造を維持する配列、-Leu-Leu-Lac-を加えた、*t*-Bu-Leu-Aib-Cys(Acm)-Ala-Pro-His(Dnp)-(Leu-Leu-Lac)₂-OEt (4) (Aib = aminoisobutylic acid residue, Dnp = dinitrophenyl) を設計した。合成は液相のフラグメント縮合法で行った。

2. 1. 結果および考察

$^1\text{H-NMR}$ によるペプチドの溶液構造

合成されたブロックオリゴマーペプチドは *n*-BuOH 溶液の CD スペクトルによりヘリックス形成を確認した。更に2次元による構造解析を CDCl₃ 中で行った。ROESY スペクトルより溶液構造は、3₁₀ヘリックス (ROE ピーク: $d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$)、3₁₀- α 混合ヘリックス (ROE ピーク: $d_{\alpha\text{N}}(i,i+2)$ と $d_{\alpha\text{N}}(i,i+4)$)、3₁₀ か α か不明なヘリックスの3種が観測された。

(1) 3_{10} ヘリックス

Boc-(Leu-Leu-Ala)₂-(Leu-Leu-Lac)₃-OEt (1)

Boc-(Leu-Leu-Ala)₂-(Leu-Leu-Lac)₂-OEt

Boc-(Leu-Leu-Hmp)₃-Leu-Leu-OEt

(2) 3_{10} - α 混合ヘリックス

Boc-(Leu-Leu-Ala)₃-(Leu-Leu-Lac)₂-OEt

Boc-(Leu-Leu-Ala)₃-(Leu-Leu-Lac)₃-OEt

(3) 3_{10} か α か不明なヘリックス

(分子間会合によるシグナルブロードニング

または 3_{10} と α に由来する ROESY ピークの

観測されなかったもの)

Boc-(Leu-Leu-Ala)₂-(Leu-Leu-Lac)_{4,6}-OEt

Boc-(Leu-Leu-Lac)_{4,5,6}-OEt

Boc-(Leu-Leu-Hmp)₂-Leu-Leu-OEt

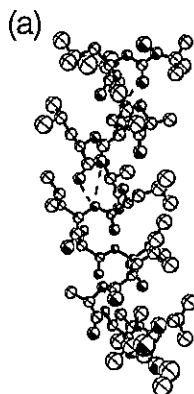
¹H-NMR の結果より、NH を持たない Lac 残基は 3_{10} ヘリックスを誘導することがわかった。しかし 3_{10} ヘリックスは不安定で配列変化により α - 3_{10} 混合状態へ転移しやすいことも明らかになった。

X線解析によるペプチドの固体構造

合成されたブロックオリゴマーペプチドはすべて単結晶を得ることができた。しかし反射データの測定と位相決定に成功して、結晶構造を得たのは 1-3 のみであった。

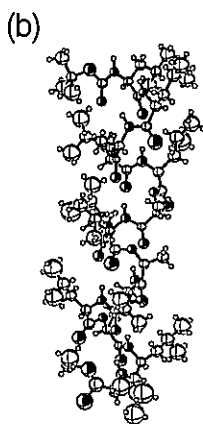
オキシ酸である Lac 残基を含有するペプチドはそのエステル結合により水素結合が欠落し、安定なヘリックスを形成しにくいと考えられてきた。しかし 1-3 は予想に反し溶液・固体、低温・高温(60 °C)に於いて安定なヘリックスを形成する。これはヘリックス形成要因が水素結合だけ

ではないことを示唆している。



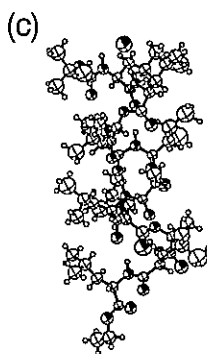
Crystal and Refinement Data.

formula = C₈₂H₁₄₈O₂₂N₄
F.W. = 1654.14
a = 10.903(3) Å
b = 19.112(3) Å
c = 12.467(2) Å
 α = 95.00(1) °
 β = 101.81(1) °
 γ = 94.87(1) °
V = 2526.8(1) Å³
Z = 1
space group P1
no. of unique data 7524
no. of used data 3107
(|F_o| > 2 σ (F))
R (R_w) = 0.108 (0.166)



Crystal and Refinement Data.

formula = C₇₉H₁₄₁O₂₀N₁₁
F.W. = 1565.04
a = 20.976(4) Å
b = 20.382(2) Å
c = 11.605(2) Å
 β = 98.55(2) °
V = 4906(1) Å³
Z = 2
space group P2₁
no. of unique data 7773
no. of used data 3827
(|F_o| > 2 σ (F))
R (R_w) = 0.142 (0.190)



Crystal and Refinement Data.

formula = C₆₄H₁₁₆O₁₈N₆
F.W. = 1285.66
a = 11.489(2) Å
b = 17.296(3) Å
c = 10.592(3) Å
 α = 97.05(2) °
 β = 91.15(2) °
 γ = 71.75(1) °
V = 1983(1) Å³
Z = 1
space group P1
no. of unique data 5315
no. of used data 4142
(|F_o| > 2 σ (F))
R (R_w) = 0.168 (0.238)

Figure 3. ORTEP drawings and crystallographic data for (a) Boc-(Leu-Leu-Ala)₂-(Leu-Leu-Lac)₃-OEt (1), (b) Boc-(Leu-Leu-Ala)₃-(Leu-Leu-Lac)₂-Leu-Leu-OEt (2), and (c) Boc-(Leu-Leu-Lac)₃-Leu-Leu-OEt (3) (Boc = t-butoxycarbonyl, Lac = L-lactic acid residue).

固体構造は 3_{10} ヘリックス(2 (Figure 3b)), 3_{10} - α 混合ヘリックス(1 (P1 cryst.), 3 (Figure 3a,c)), α ヘリックス(1 (P2, cryst. (未掲載)))の3種であった。溶液の場合と同様に 3_{10} ヘリックスを形成しやすいと考えられる。しかし配列や格子内での分子間相互作用により α ヘリックスや α - 3_{10} 混合状態も発生することがわかった。混合ヘリックス構造の観察から Lac残基が 3_{10} ヘリックス形成核となっていることがわかった。

酵素活性中心ペプチドの合成

活性中心モデルペプチド、4 を合成した(Figure 4)。現在、保護基の脱離反応と精製を行っている。

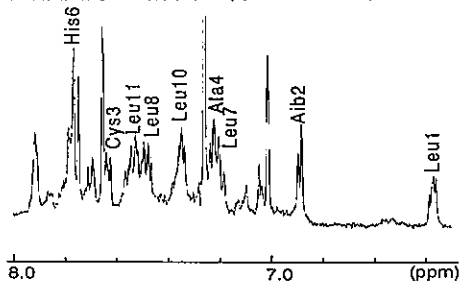


Figure 4. NH region of 500 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum for *t*-Bu-Leu-Aib-Cys(Acm)-Ala-Pro-His(Dnp)-(Leu-Leu-Lac) $_2$ -OEt (4) in CDCl_3 (10 mM) at 30 °C.

3. 研究成果

3_{10} ヘリックスの形成機構を立体障害を用いずに初めて明らかにした。Lac残基が 3_{10} ヘリックス形成核になることが解明された。しかし配列や分子間相互作用で 3_{10} → α 転移の起こりやすいことも観察された。

4. 今後の課題と展開

3_{10} ヘリックスはNHを持たないLac残基により誘導された。蛋白質での 3_{10} ヘリックス形成核は同様にNHを持たないPro残基であることが予想される。これを証明するため天然蛋白質での配列調査をし、Proを含む酵素モデルペプチドで 3_{10} ヘリックスを発現させ、その機能を解明することが今後の課題である。

3_{10} → α ヘリックス転移の起こりやすさは、蛋白質の折れ畳み初期段階に予想されている 3_{10} ヘリックスを経る α ヘリックス形成機構に合致する。よって本研究は蛋白質の高次構造発現機構への展開が期待される。

5. 発表論文リスト

1. 3_{10} -Helix Nucleation in a Depsipeptide: Crystal Structure of Boc-(Leu-Leu-Ala) $_2$ -(Leu-Leu-Lac) $_3$ -OEt. Ohyama, T.; Oku, H.; Katakai, R. In *Peptide Science 1999*; N. Fujii, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2000; pp 287-290.
2. Spectroscopic Study of 3_{10} Helix Depsipeptides. Oku, H.; Tetsuka, Y.; Ohyama, T.; Kobayashi, K.; Katakai, R. In *Peptide Science 1999*; N. Fujii, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2000; pp 291-294.
3. The Crystal Structure for a Depsipeptide, Boc-(Leu-Leu-Ala) $_2$ -(Leu-Leu-Lac) $_3$ -OEt with a 3_{10} Helical Segment. Ohyama, T.; Oku, H.; Hiroki, A.; Maekawa, Y.; Yoshida, M.; Katakai, R. *Biopolymers*, in press.