

超分子化学とタンパク質化学

高橋 圭子*

Supramolecular Chemistry and Protein Chemistry

Keiko TAKAHASHI

Proteins are natural polymers which are assembled under nucleic acid control from a menu comprising L- α -amino acids. Peptide bonds link the building blocks, giving macromolecules with polypeptide backbones and side-chains containing a variety of simple functionalities according to the amino acids selected. The structures are elaborated by non-covalent association, which is the fundamental concept of “supramolecular chemistry”.

1. はじめに

分子は原子と原子が化学結合で結びついたものであり、化学は分子を研究対象とする学問である。ところが近年、分子と分子が集まってできる化学種が注目され研究されるようになった。分子と分子あるいは分子とイオンが集まる作用は分子間力と呼ばれ、水素結合・疎水性相互作用・静電相互作用などがある。分子間力は原子と原子の結合より少し弱く、条件によっては結びついたり離れたりする。このような分子種を、1987年のノーベル賞化学者 J.M. Lehn は超分子と命名した。超分子化学の誕生である。実は、超分子は自然界ではありふれた現象である。遺伝子もタンパク質も超分子ができる反応と同様に構築され機能を発現しているのである。

さて、タンパク質というと糖質や脂質と共に3大栄養素の一つで、肉や卵などが思い浮かべられるであろう。昔からタンパク質は人間にとって最も重要なものであると考えられてきた。英語の“protein (タンパク質)”はギリシャ語の“protos (第一人者)”を意味して命名されていることからその重要性が理解されるであろう。

私たちの体の重量のおよそ60%が水であり、18%がタンパク質である。その約1/3が動物の構造を保持する働きをもつコラーゲンと呼ばれるタンパク質である。これ以外にも、酸素を運ぶヘモグロビンや血糖値を調節するホルモンであるインシュリン、成長を調節する成長ホルモン、免疫で重要な働きをしている抗体、生化学反応を触媒する酵素など、体内にはおよそ10万種類ものさまざまなタンパク質が存在し生命を維持している。いまだにその全てのタンパク質の構造と働きが明らかになっているわけではないが、どれ一つとして同じではなく、一つ一つが違った機能を有していることが知られている。

タンパク質は栄養学から遺伝子工学に至るまで多分野で研究対象となっている^{2,3)}。筆者は人工タンパク質の構造の制御に関する研究テーマを卒業研究であたえられ、はからずも研究を職業とするようになった。タンパク質を対象とする研究から長い間離れていたが、タンパク質の構造研究は分子間力の研究であると考え、現在超分子の研究に至ったのは当然のように思われる。そこで、本稿では自然界の超分子といえるタンパク質について解説をしたい。さらに、筆者の最も古い研究

* 東京工芸大学工学部応用化学科助教授
1999年9月20日 受理

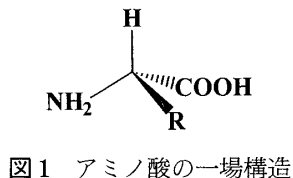
と、新しい研究について紹介したい。

2. タンパク質概論

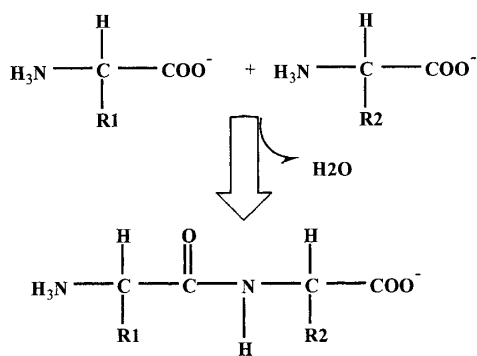
2.1. タンパク質とアミノ酸

タンパク質の基本単位は、アミノ酸である (図1)。地球上の生物に含まれるタンパク質を構成しているアミノ酸はたかだ

か20種類程度であり、1炭素原子にカルボキシル基とアミノ基と水素原子が結合しているという共

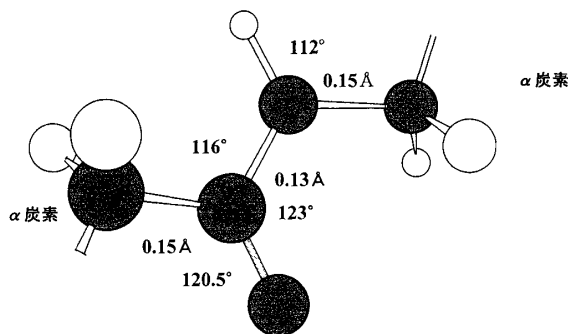


通構造を持つ。異なるのは側鎖(R)の構造だけである。側鎖の化学的性質がアミノ酸の性質として分類され、疎水性アミノ酸・親水性アミノ酸・塩基性アミノ酸・酸性アミノ酸と呼ばれる。これらのアミノ酸が脱水縮合してアミド結合(ペプチド結合)が形成される(図2)。多数のアミノ酸がペプチド結合でつながって分岐のない1本のポリペプチド(タンパク質)ができる。タンパク質の大部分は50から2,000個のアミノ酸残基でできている。アミノ酸の平均分子量は約110なので大多数のタンパク質の分子量は5,500から220,000の間ということになる。



2.2. タンパク質の構造

タンパク質の際だった特徴は3次元構造にある。特定の生物機能は正確に定まった構造(高次構造)から生じるのである。アミノ酸が連なったポリペプチドは線状分子でリボンのような形状である。リボンでできた巨大なオブジェを想像していただきたい。どういう仕組みでリボンが正確に折り畳まれ同じオブジェを作り上げるのであろう



か。それは分子内あるいは分子間での分子間力の働きである。

1930年代末にX線結晶解析の研究の結果、ペプチド単位(1つのペプチド結合)は平面構造で自由に動かないという発見がされた(図3)。ペプチド単位の両側は回転の自由度が大きく、従ってポリペプチドは規則的に折り畳まれることが予測された。1951年、堅く巻かれた太い棒状構造である α -ヘリックスと、隣接するポリペプチドと相互作用する β -シート構造が規則的な繰り返しをもつ高次構造として提案された。その後ヘアピン β -ターン、コラーゲンらせんも同様の高次構造として知られるようになった。これらの構造は部分構造として多くのタンパク質に含まれている(図4)。

タンパク質の構造を議論する場合、構造を4段階に分けて論じることが多い。1次構造とはアミノ酸配列のことである。2次構造は1次の配列の中で比較的近いアミノ酸残基の空間的な配置のことである。上述した α -ヘリックスや β -シートは2次構造の要素である。3次構造は非常に離れた位置にあるアミノ酸残基の配置とS-S結合のパターンである。2次構造と3次構造の分け方については他の考え方もある。4次構造は1次から3次構造により形成されたタンパク質がさらに分子会合して生ずる特殊な空間構造を指す。天然タンパク質は遺伝情報に従い逐次的にペプチド結合が形成された後にリボン状のポリペプチドが正確に折り畳まれて高次構造が形成される。この正確な折り畳みの機構解明は現在のタンパク質化学の中心論点でもある。間違った折り畳みにより生じる疾病の一例が狂牛病・スクレイピーであり、そのタンパク質がプリオンである⁴⁾。

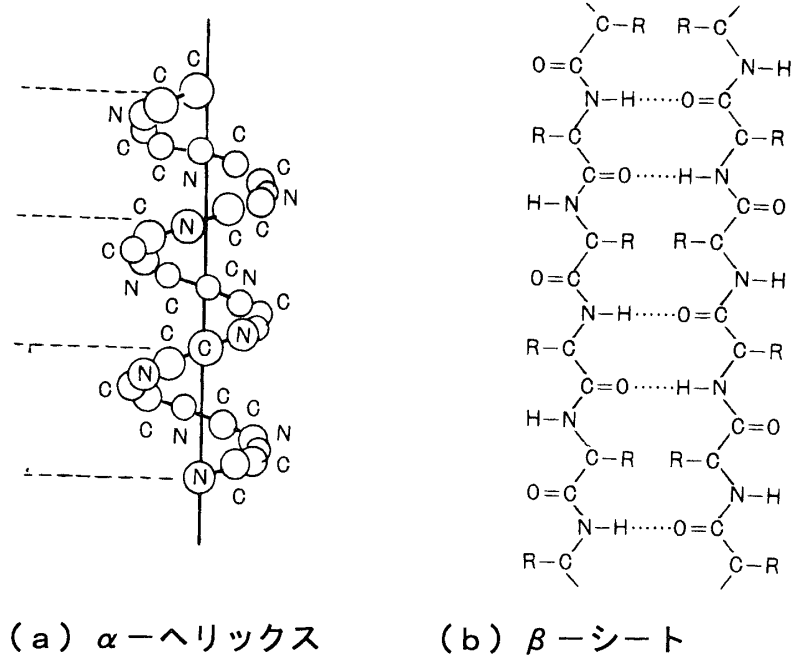


図4 代表的な規則構造 (a) α -ヘリックス (b) β -シート

2.3. タンパク質の構造を検出する方法

天然タンパク質の構造決定で最も困難を極めるのは目的のタンパク質の単離精製である。一般的には電気泳動、クロマトグラフィー、超遠心の手法が用いられる。1次構造(アミノ酸配列)はポリペプチド鎖のアミノ基の残っている端から標識物質の修飾とペプチド結合の切断をくりかえすエドマン分解法が自動化され迅速に行われるようになった。さらに組みかえDNA技術を組み合わせると分子量の大きいタンパク質でも比較的短時間で決定できるようになった⁵⁾。

二次構造を検出する方法としては旋光分散(ORD)・円偏光二色性(CD)がある⁶⁾。コンピューターと組み合わせることにより α -ヘリックスや β -シートの含量を計算することもできる。また、ペプチド結合単位(アミド基)の赤外吸収の変化により2次構造を類推する事もできる。最近では核磁気共鳴(NMR)分光法で溶液中の2次構造の検出が可能になった。

X線結晶解析法⁷⁾とNMR分光法⁸⁾は3次構造を決定できる重要な手法である。

2.4. タンパク質の化学合成

インシュリンや成長ホルモンなど治療薬として

使われているタンパク質は多い。天然産のタンパク質だけに頼っていたのでは十分な量のタンパク質を常に得られるとは限らない。また、天然物を超える機能を持つタンパク質を開発しようという考えもある(例えば熱に強いタンパク質など)。この関門を超えられたのは人工的にタンパク質を合成できるようになったからである。1901年、最も簡単なアミノ酸であるグリシン(Gly)を2個結合させた人工ペプチド、Gly-Glyが合成された。当時タンパク質はアミノ酸が30個程度縮合したものであろうと推定されていた。そして合成研究が進められ、タンパク質と似た化学的性質を示す物質の合成に成功した。その後、タンパク質合成に必要な保護基、縮合剤、精製法などの研究が進展し、現在のペプチド化学へとつながっている。

人工的にタンパク質を合成するには2種類の方法がある。化学的合成法と大腸菌などの生物のバイオプロセスを利用する方法である。天然有用タンパク質の大量生産などでは後者の手法が既に工場規模で行われている。

化学的にはタンパク質はカルボキシル基をdicyclohexylcarbodiimide (DCC)などの縮合剤と反応させて活性化し、アミノ基と結合させて合成する。アミノ基、カルボキシル基が複数存在す

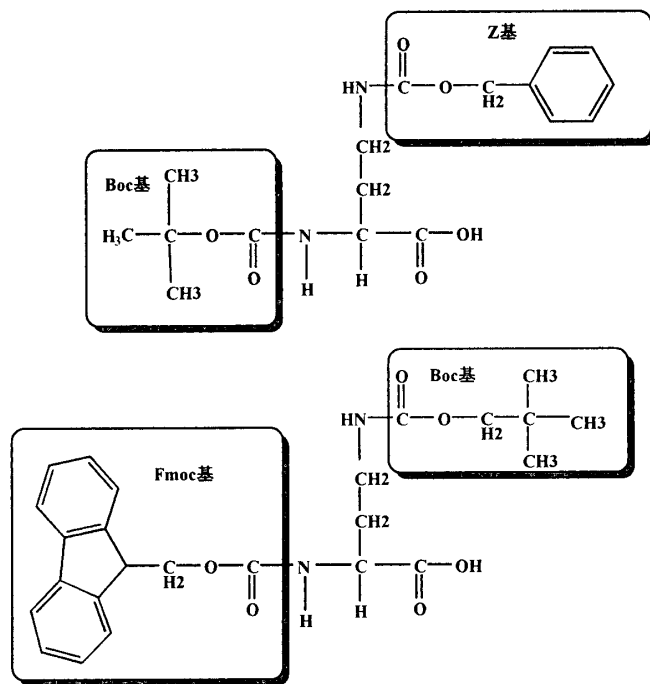


図5 代表的なアミノ基保護基とカルボキシル基保護基の例

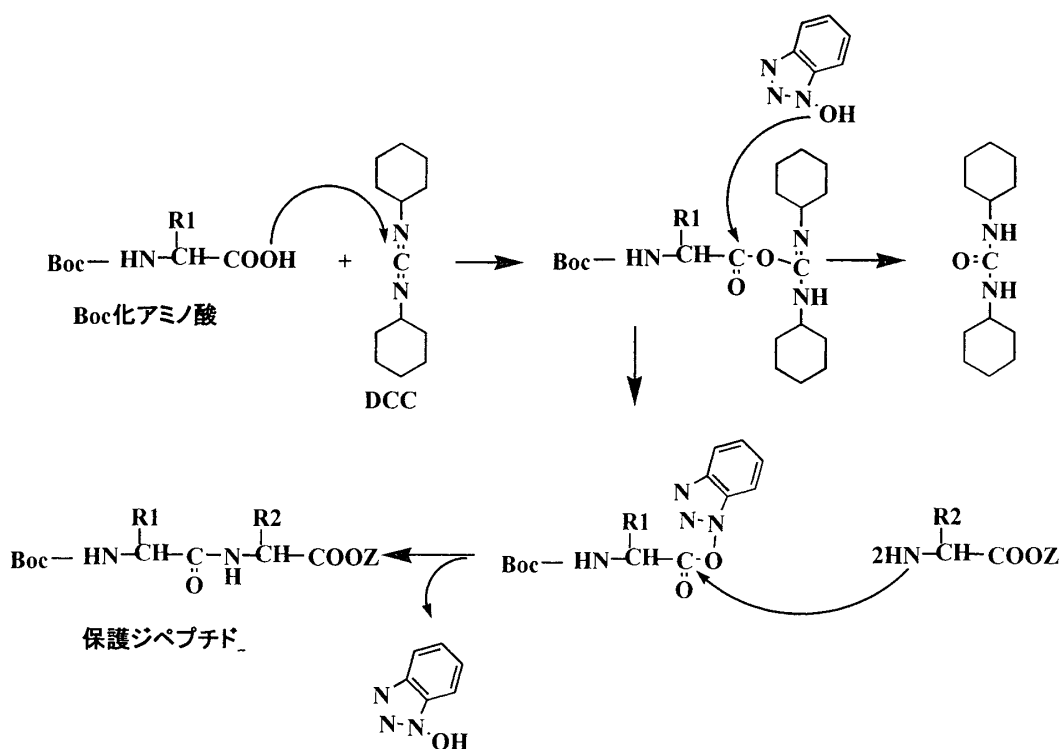


図6 溶液中におけるペプチド結合の形成

ると複数種のペプチド結合ができてしまうので、通常はアミノ基かカルボキシル基のいずれか反応させたい基だけを残し、残りは保護しておく必要がある。保護基の例を図5に示した。縮合、化学的脱保護基、次の保護アミノ酸との縮合—このよ

うな操作を繰り返していけば望み通りのアミノ酸配列のペプチドが合成できる(図6)。しかし、1回の収率が90%としてもフラスコの中で、この操作を繰り返すと50回目には最初の5%になってしまう。50回、100回の縮合を行うには、合成戦

略が必要である。戦略の柱は固相合成法⁹⁾とブロック法である。

固相合成法は、アミノ酸のアミノ基を保護した誘導体(多くは Boc 基または Fmoc 基)を導入したポリスチレン樹脂をフィルターで仕切った容器に入れ、保護基を除去し、活性化したアミノ基保護アミノ酸を加え縮合をする方法である。大過剰の試薬を加えて各反応をほぼ完全に進行させる。生成物であるポリペプチドは樹脂に結合しているため、大過剰の試薬は溶媒による洗浄により除くことができる。繰り返しにより目的のポリペプチドが生成したところで樹脂からポリペプチドを遊離させ、高速液体クロマトグラフィーで精製しポリペプチドは完成する¹⁰⁾。この一連の操作は自動合成装置を使用しても行うことができる。

100 個以上のアミノ酸の結合したポリペプチドを得たい場合には、固相合成法で合成した約 50 個以下のアミノ酸が縮合したポリペプチド(合成ブロック)を合成し、合成ブロック同志を結合させて目的のポリペプチドを得る。合成ブロックの結合には、普通のアミノ酸縮合と同様の DCC を用いる方法、カルボキシル末端にチオエステルをつけたブロックを合成し硝酸銀を添加して結合する方法、システインを末端に結合させ S-S 結合で結

合する方法などがある。

3. 光でタンパク質の構造を制御する

3.1. 分子機能の光制御

1978 年、筆者が研究室に配属され与えられたテーマが「分子機能の光制御」であった。人工系でのポリペプチド構造制御の例として手短に紹介したい。自然界では植物成長を光制御するフィトクローム系や動物における視物質ロドプシンに見られるように、光が重要な機能の制御・発現に信号として作用している。ロドプシンの場合、クロモフォア(発色団)であるレチナールが *cis-trans* 光異性化を行い、それに伴いタンパク部分オプシンの立体構造(コンフォメーション)変動が起こる。そして究極的には、レチナールによる 1 光子の吸収から神経細胞の活性化に至る信号の増幅が起こっている。これらの作用機序は自然の巧妙な仕組みであり人工的に類似の系を構築することは容易なことではない。そこで、ロドプシン系の現象を「光により可逆的なペプチドコンフォメーションの構造変化」と位置づけ、側鎖にアゾベンゼン基を有する様々な共重合体を合成した(図 7)。ここではレチナールをアゾベンゼン基に、オプシンをポリペプチドになぞらえている。合成方法はアゾ

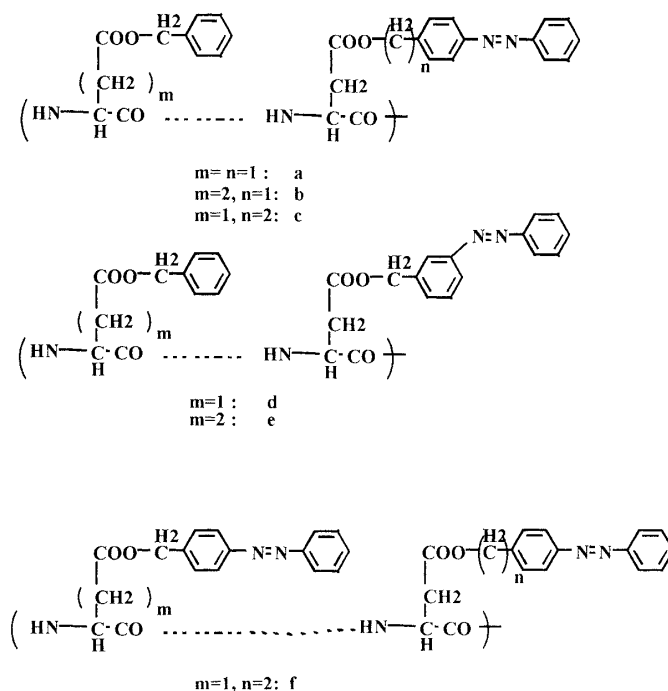


図 7 光応答基を含む合成ポリペプチド

ベンゼンをエステル結合で導入したアスパラギン酸あるいはグルタミン酸とベンジル基を導入したアスパラギン酸あるいはグルタミン酸を比率を変えて溶液中で重合した。

3.2. ポリペプチド 2 次構造の可逆的光制御

代表的な CD スペクトルを図 8, 9 に示す。ポリペプチドは大別すると

- ① 左巻きらせん \rightleftharpoons 右巻きらせん

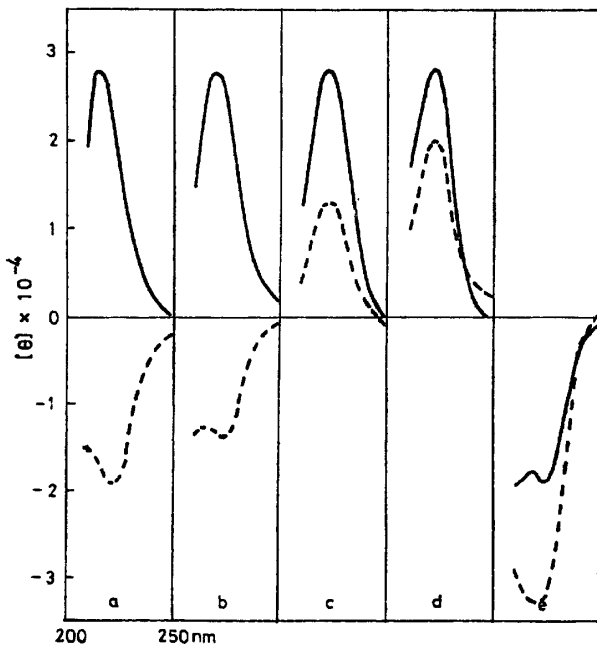


図 8 DCE 中における光照射前 (—) 後 (---) の CD スペクトル; a, b; 共重合体 a 系列アゾ含量 (81%, 59%), c, d; 共重合体 d 系列アゾ含量 100%, 92%, e; 共重合体 e 系列アゾ含量 89%

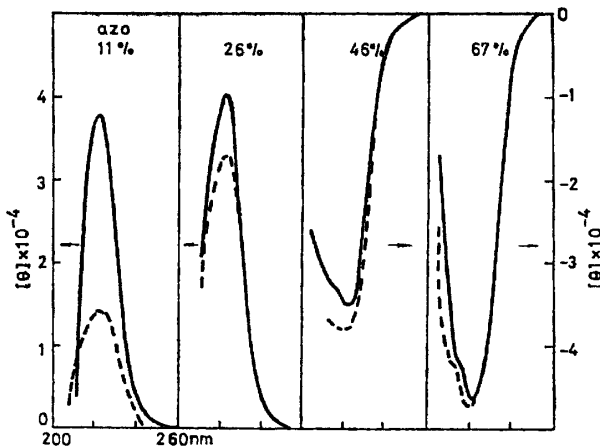


図 9 共重合体 d 系列の DCE 中における光照射前 (—) 後 (---) の CD スペクトル

② 左巻きらせん \rightleftharpoons ランダムコイル
 ③ ランダムコイル \rightleftharpoons 右巻きらせん
 の過程の存在が示された。共重合体系 a, b, d, e では光応答基含量の大なるものほど光によるコンフォメーション変化の傾向が強かったが (図 8)¹¹⁾, 共重合体系 c では光応答性基含量の小なるものが最も顕著な変化を示した (図 9)¹²⁾。また側鎖に全て光応答基を導入した共重合体系 f はランダムコイル構造が大部分を占め、光応答性もあまり観察されなかった¹³⁾。

3.3. 溶媒効果

先の例は 1,2-dichloroethane (DCE) 溶液について得られたものであるが、これらのポリペプチドのコンフォメーションが系の自由エネルギーの

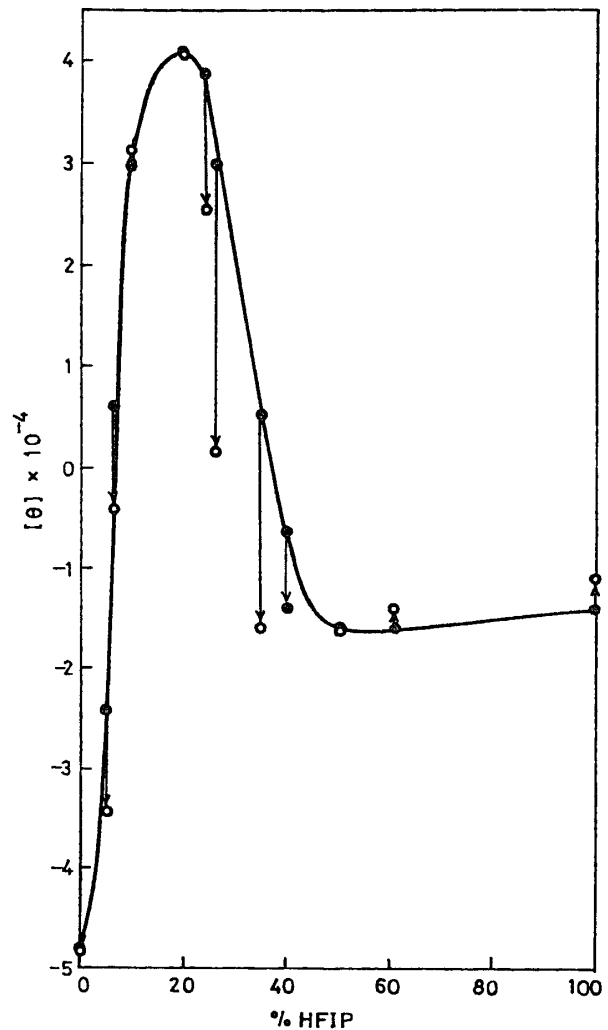


図 10 共重合体 c (アゾ含量 67%) 系列の $[\theta]_{222}$ の溶媒添加効果と光応答性; (●) 光照射前, (○) 光照射後。

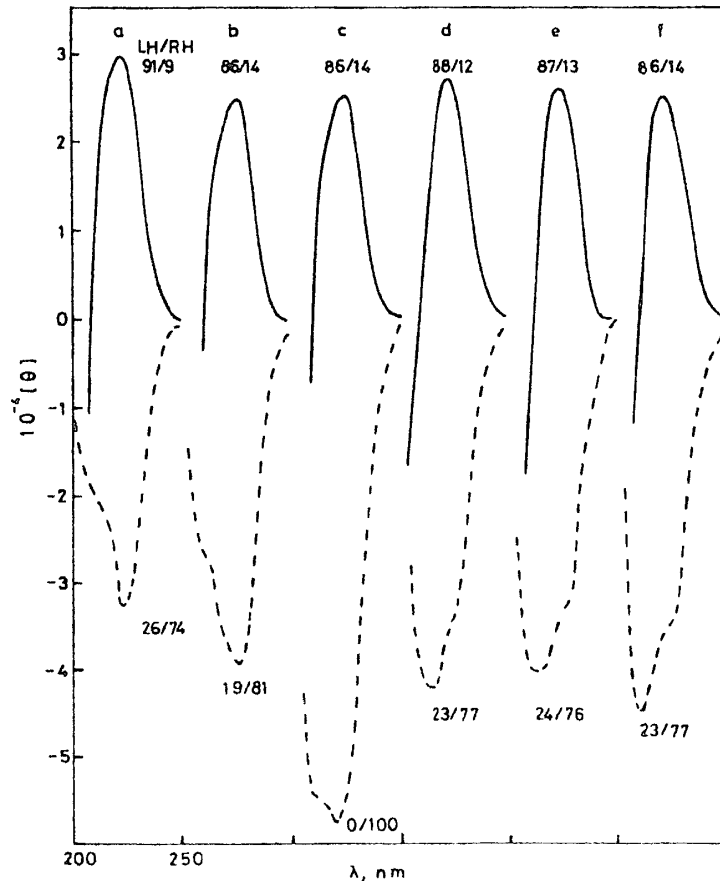


図 11 混合溶媒中における共重合体系列 c の微著なコンフォメーション変化; アゾ含量: 9.7% (a TMP 25%; b TMP 30%); 49% (c TMP 60%); 67% (d TMP 60%); 92% (e TMP 60%; f TMP 70%).

微妙な均衡で定まる以上、溶媒効果などの光以外の要因もコンフォメーション変化を引き起こす可能性がある。こうした観点から 1,1,1-3,3,3-hexafluoroisopropanol (HFIP), triphenylphosphate (TPP) trifluoroacetic acid (TFA) の溶媒添加効果を検討したところ、溶媒の添加により右巻きらせん-左巻きらせん-ランダムコイル過程が進行する系が見いだされた¹⁴⁾(図 10)。溶媒添加によるコンフォメーション変化の顕著な濃度において光を照射すると、著しい光応答性が観察され、100% 右巻きらせんから 100% 左巻きらせんの変化も実現された (図 11)。

3.4. アゾベンゼン共重合体系列の問題点

本節で示したポリペプチドは平均的な重合度、平均的な側鎖基の割合は判明しているが、正確な

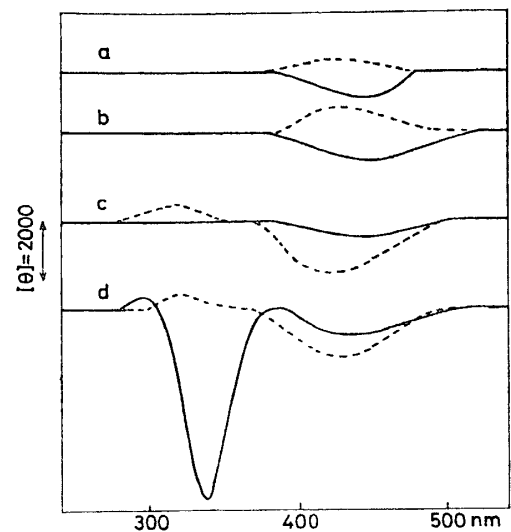


図 12 DCE 溶液中における共重合体系列 c の側鎖遷移領域 ($\pi-\pi^*n-\pi^*$) における誘起二色性スペクトルアゾ含量 (a) 11%, (b) 26%, (c) 46%, (d) 67%.

1次構造は不明である。従って、CD スペクトルにより各ポリペプチドの側鎖間の相互作用が異なることは判明しても(図 12), 分子レベルでの議論は不可能である。また, 生体内の反応は不均一系であれ均一系であれ, 必ず水分子が存在している。この系では水分子との分子間力は議論できない。ポリペプチドの2次構造とアミノ酸の側鎖の構造とは相関性があり, 2次構造についてはタンパク質の立体構造を人工的に制御できる可能性を示したことがこの研究の意味であると思われる。

4. 天然にはない立体構造の人工タンパク質

4.1. 水中で α -ヘリックスを形成するポリペプチド

近年, ある複数のアミノ酸が結合した単位(いわばブロック)とタンパク質構造間の相関が明らかになってきた。建物を設計するようにアミノ酸をつなぎ合わせ人工的なタンパク質を作る技術も確立されつつある。そうして天然にはないアミノ酸配列を持つ人工タンパク質の設計も行われ, 全く人工的な立体構造も出現している¹⁵⁾。水中で α -ヘリックスを形成するポリペプチドもその一つである。 α -ヘリックス(らせん)はペプチド結合のアミド基間の相互作用(主に水素結合)により安定化されるが, 水溶液中では水素結合性の水分子が存在するためらせん構造は形成されにくい。ところが静電相互作用をもつ酸性あるいは塩基性アミノ酸をらせんをつなぎ止める糊のように精密に設計して組み入れるとらせん構造が形成されるようになる¹⁶⁾。らせん構造をとりやすいとされているポリアラニンにグルタミン酸とリジンを導入すると水溶液中でのらせん構造性が増す。具体的にはグルタミン酸-アラニン-アラニン-アラニン-リジンのブロックを3回繰り返した構造が基本構造として知られている。

4.2. 水中で α -ヘリックスを形成するポリペプチドを利用した機能性分子の合成¹⁷⁾

水溶液中で規則正しいらせん構造をとりしかも水溶性のペプチド分子は複数の機能性分子の配置制御の基盤として有用である。既に多くの研究例

が報告されているが, その多くは2機能性分子の配置制御である。1ペプチド分子に3個の異なる機能性基を導入するために次のような合成戦略が考えられる;

- (1) あらかじめ機能性基を導入した非天然アミノ酸を合成し, 縮合する。
- (2) 機能性基が塩基性アミノ酸側鎖と反応する誘導体とする。
- (3) 機能性基が酸性アミノ酸側鎖と反応する誘導体とする。

ペプチドを合成すると同時に第1の機能性基は導入され, ついで保護基の選択と保護基の除去条件を調節する事で第2の機能性基, 第3の機能性基が決まった導入位置に配置する事ができる。詳細にここでは示さないが, 3種の機能性基を導入位置をもつらせん方向を逆とする17個のアミノ酸からなるペプチドの合成が行われている。

5. 非天然アミノ酸

天然にはないアミノ酸配列で新しい立体構造を形成する例を述べたが, 非天然型のアミノ酸が有機合成の技術をもって合成されタンパク質に組み込むことにより生化学的領域の範囲を超えた人工機能を発現させる試みも行われている。このようなタンパク質は超タンパク質¹⁸⁾と呼ばれている。「非天然型」を特異的に見分けて機能する抗体なども作製されており, 非天然アミノ酸はタンパク質の構造やその安定性を変化させることだけではなく広い意味でタンパク質化学や超分子化学の拡張に貢献すると思われる。

6. 展望

「分子間力で集まり, 組織化し, 機能を発現する化学種」が超分子の定義であり, それを化学するのが超分子化学である。これは超分子をタンパク質に入れ替えてもそのまま通じる。超分子化学以前から, 生体機能を真似た人工系を研究しようとする「生体疑似化学(biomimetic chemistry)」や分子の形に応じて包接されて集合する分子を研究する「包接化学(host-guest chemistry)」があった。酵素分子の何百ものアミノ酸からなる1本の

リボンで作られている空洞を単に「疎水場」として人工的な疎水場を提供する分子で置き換え、モデル化する議論が盛んに行われた。そこで重要なのは活性基であった。そうしてたとえば酵素と同等の加速効果が観察されれば「天然系を超えた。」と報告された。本当であろうか。リボンで作られた空洞は無駄なものであろうか。活性基だけが必要であるのか。そうではないように思われる。前述の化学と超分子化学の差異は分子間力の解明に力点をおいている点であろう。活性基の厳密な配置制御、分子の運動性や変化、相反する事象をタンパク質は備えている。それは強すぎない複数の分子間力の総和として発現される特質である。生物界にはない元素や分子を使って超分子を構築すれば新しい機能を示すことも可能であろう。そのとき超分子は生物の枠を超えるのであろうと思われる。

7. 謝辞

本学工学部短期研修の規定により、1998年9月16日より1999年3月15日まで、工学部を離れて研修をする機会をいただきました。この間、多くの学会やセミナーに参加し、また東北大学大学院薬学研究科、北里大学大学院薬学研究科等でセミナーを受け持つ機会を得ました。しかしながら、なんとといっても、東京工業大学生命理工学部生物機能工学講座でテーマを設定し、研究に真っ正面から向き合う時間を持つことができたことが一番の喜びでした。微力ながら筆者の20年弱の研究を見直すよい機会ともなりました。非常に贅沢で密度の高い時間を過ごさせていただきました。このような機会を与えてくださった本学工学部の皆様、とりわけ応用化学科の教職員の皆様に心から感謝いたします。

また、研究にあたりご指導いただいた上野昭彦教授・三原久和助教授に深く感謝いたします。池田博博士をはじめとする、上野・三原研究室の全ての方々に感謝いたします。

さらに、YMCA 厚木チャイルドケアセンターホサナの古賀友野リーダーをはじめとするスタッフ全員の方々に心より深い感謝を捧げます。ホサ

ナがなければなに一つ始めることはできませんでした。

文献

- 1) F. Vögtle, "Supramolecular Chemistry" JOHN WILEY & SONS (New York) 1991; J. M. Lehn, "Supramolecular Chemistry" VCH (New York) 1995.
- 2) 例えば、戸田不二緒ら「生物工学基礎」講談社 (1988), ストライヤー「生化学 第4版」トッパン (1996)
- 3) M. Perutz, 黒田玲子訳「タンパク質」東京科学同人 (1993); F. Sanger, *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 1, (1988)
- 4) 立石潤「プリオンとプリオン病」共立出版 (1998)
- 5) 井本泰治「タンパク質工学への招待」南江堂 (1989)
- 6) W. C. Johnson, Jr, *Proteins*, **7**, 205 (1990)
- 7) J. P. Glusker and K. N. Trueblood, "Crystal Structure Analysis" Oxford University Press (London) 1972
- 8) K. Wüthrich, 京極好正訳「タンパク質と核酸のNMR」(東京科学同人) 1986.
- 9) B. Merrifield, *Science*, **232**, 341 (1986).
- 10) *Int. Peptide Protein Res.* **35**, 161 (1990), 日本科学会編「実験科学講座 22 有機合成—酸・アミノ酸・ペプチド, 丸善; 矢島治明監修「続医薬品の開発 14 ペプチド合成」広川書店
- 11) 上野明彦, 安齋順一, 高橋圭子, 長哲郎, 高分子論文集, **37**, 281 (1980).
- 12) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai and T. Osa, *Chem. Lett.*, **1981**, 113.
- 13) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai and T. Osa, *Makromol. Chem.*, **182**, 693 (1981)
- 14) a) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai and T. Osa, *Macromolecules*, **13**, 459 (1980), b) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai and T. Osa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **35**, 1988 (1980); c) A. Ueno, K. Takahashi, J. Anzai and T. Osa, *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 6410 (1981)
- 15) 「蛋白質—この絶妙なる設計物」日本生物物理学会編, 吉岡書店 (1994)
- 16) a) Marqusee. And R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **84**, 8898 (1986); b) G. Merukta, S. William and E. Stellwargen., *Biochemistry*, **30**, 4245 (1991); c) M. R. Ghadiri and C. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1630 (1990)
- 17) K. Takahashi, A. Ueno, H. Mihara, *unpublished data.*
- 18) 宍戸昌彦, 芳坂貴弘, 化学と工業, **49**, 515 (1996)