

## 5. 円二色性 (Circular Dichroism, CD) 測定によるタンパク質の二次構造解析

実験実施日：2018 年 11 月 28 日

レポート提出日：2018 年 12 月 5 日

レポート再提出日：2018 年 月 日

レポート提出者氏名 (学籍番号)：山口 舞佳 (1610668)

共同実験者名：前田 勇太、萬谷 朋恵、島田 春輝

### 1. 要旨

タンパク質は、一次から四次構造からなる階層的構造となっており、立体構造となることで正しく機能する。今回の実験では、CD (円二色性) 測定を行い、データを表及びグラフ化し考察することで、異なるタンパク質における三次構造の違いを評価した。また、タンパク質の変性実験では、生物化学における化学熱力学・物理化学の関わりとその重要性について理解した。

### 2. 目的

身近で日常的に使われているペプチドやタンパク質を用いて CD 測定をすることで、測定の方法を知り、それらの構造の違いを解析し、化学への理解を深める。

タンパク質の変性試験により、ギブスの標準自由エネルギーについて触れることで、生物化学における化学熱力学および物理化学の重要性を考える。

### 3. 結果と考察 \*原理、器具・試薬、実験操作は省略。

#### 3.1. 身近なペプチド、タンパク質の構造評価

ゲル化試験の結果を表 1 に示す。化合物濃度は全て、0.1 g/mL で行った。

表 1. ゲル化試験の結果

化合物名	形態	色	透明度
ゼラチン	ゲル	黄色	透明
コラーゲンペプチド	ゾル	黄色	半透明
廃油処理剤	ゲル	白色	不透明

また、ゼラチンとコラーゲンペプチドの CD (Circular Dichroism) スペクトルの

結果を図 1 に示す。化合物濃度は両者について、0.08 mg/mL について行った。

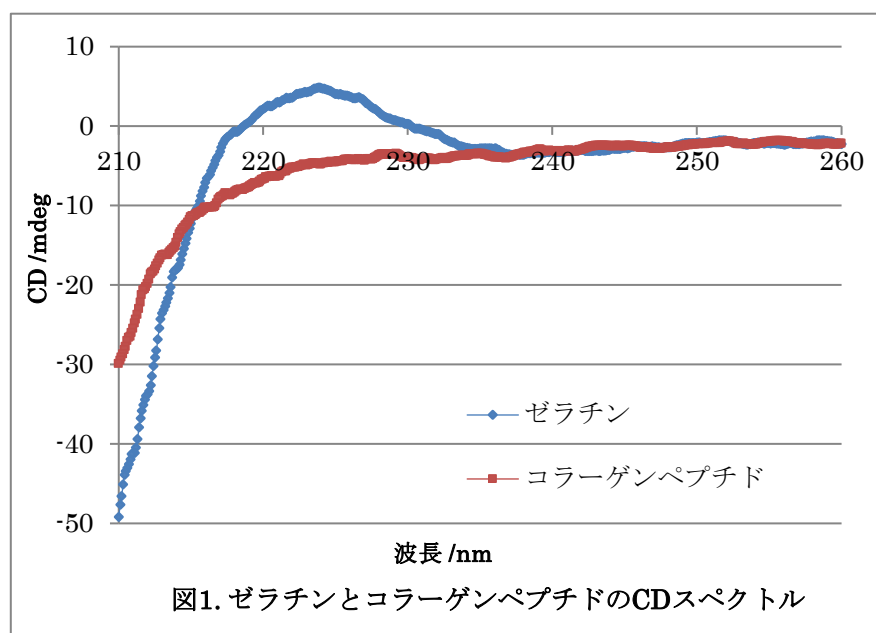
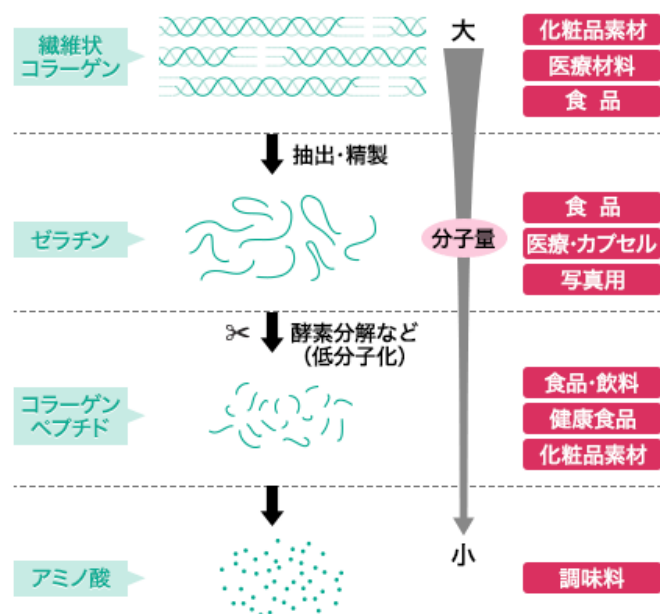


表 1 より、ゼラチンではゲル化が観察され、コラーゲンペプチドではゲル化が観察されなかった。

これは、主に分子量の大きさの違いが原因であると考える。



コラーゲンは規則正しい三重らせん構造をとっている。これを加熱・抽出するとその構造が壊れて一本鎖の状態となり、温水中に溶けだしてしまう。これが、ゼラチンである。ゼラチンは水に溶けにくい、温水にはよく溶ける。それを冷やすと、ゼリーのようなゲル状になる。よくプリンなどの原材料として用いられ、実際に作ればそうなることは明らかである。また、魚のアラや手羽先を煮た後に冷え固まるのもそれが原因である。そして、コラーゲンペプチドとは、このゼラチンを細かく酵素分解したものである。コラーゲンペプチドは分子量が少ないため、ゼラチンのように再び架橋構造をとることができず、形状的にも固まることができない。よって今回の実験では、ゾル状になったのだと考えられる。

図 1 より、ゼラチンとコラーゲンペプチドの CD 値について、223nm 前後で大きな差が見られる。これは先述した三重らせん構造の有無が原因であると考えられる。223nm 付近でその構造がピークを示すため、ゼラチンはその CD 値が大きく、コラーゲンペプチドはそれが小さかったのだと推測できる。

ゲル化の色や透明度の違いは、それぞれ構造上の違いとタンパク質構造の違いによって生じたのだと考えられる。ゼラチンは網目の大きさが均一であるため、光を透過しやすく透明になる。一方テンブルは、網目の大きさがまちまちで光を散乱してしまい通過することが出来ない、不透明となる。色の違いに関しては、ある種の不純物が原因で生じている。一般に、物質は吸収した色の補色を発色している。本実験では黄色が観測できたので、その補色である青色の光を吸収する構造(例えばベンゼン環など)が存在したと考えられる。

本実験におけるゼラチンは高分子ゲル、廃油処理剤は低分子ゲルを形成したと考えられるが、コラーゲンペプチドでゲル化を実現するには、コラーゲンペプチドをつなげることを考えなければならない。コラーゲンペプチドの末端はカルボキシ基であるので、ペプチド縮合剤を用いる方法がまず挙げられる。

### 3.2. リゾチームタンパク質の構造解析（溶液変化）

また、リゾチームタンパク質について、リン酸緩衝液中、トリフルオロエタノール中、8 M 尿素中における CD スペクトルの結果を図 2 に示す。リゾチーム濃度は各々、0.05 mg/mL について行った。

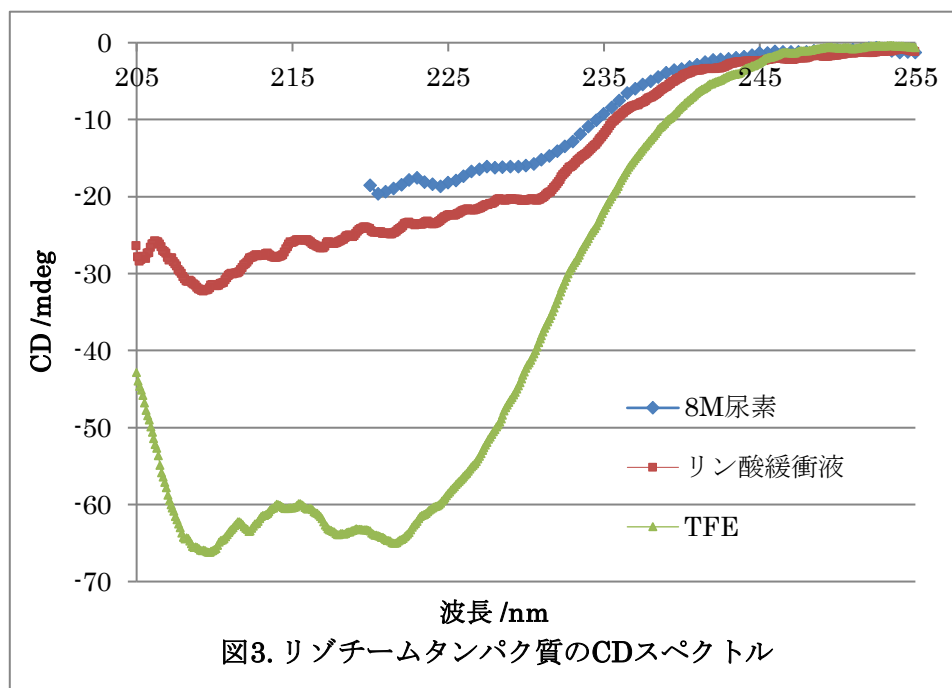


図 3 より、緩衝液であるリン酸緩衝液中でのリゾチームタンパク質を基準にして考察を行う。トリフルオロエタノール中では、緩衝液中 ( $\text{H}_2\text{O}$  系) と異なり、リゾチーム分子の周辺には水分子やリン酸イオンではなく、トリフルオロエタノール ( $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) 分子が多く存在することになる。フッ素化合物は  $\text{C-F}$  結合が安定しているため、分子と分子が引き合う力が弱く、表面張力が低い。一方水や油は分子間凝集エネルギーが大きく、分子同士が引き合うため表面張力が高い。表面張力の異なるフッ素化合物と水が接触すると、表面張力の高い水は分子同士が引き合って球となり、フッ素から弾かれる。よって、タンパク質の二次構造形成で重要な役割を果たすアミノ基とカルボキシル基との水素結合が促進されることとなり、結果として、 $\alpha$ -ヘリックスなどの含有量が増えると考えられる。

222 nm 付近の吸収はリゾチームにおける  $\alpha$ -ヘリックスなどの含有量を反映していると考えられている。よってトリフルオロエタノールにおいて  $\alpha$ -ヘリックスの含有が多いことがわかる。また、尿素 ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) 分子は尿素自身がその分子構造上、非常に強い水素結合供与体かつ水素結合受容体である。そのため、タンパク質の構造変化が起こり、 $\alpha$ -ヘリックスが破壊され変性していると考えられる。

### 3.3. リゾチームタンパク質の変性試験 (尿素存在下)

表 2 に尿素濃度増加による波長 222 nm における CD 値の値を示し、その関係をプ

ロットしたものを図 3 に示す。また、リゾチームタンパク質濃度は、尿素添加による溶液の体積変化が無いものとし、0.05 mg/ml とする。

表 2. 尿素濃度増加による CD 値の変化

尿素 / M	CD <sub>222 nm</sub> / mdeg
0	-30.34
0.5	-26.51
1.5	-26.16
2.5	-23.74
3.5	-23.92
4.5	-22.32
5.5	-22.06
6.5	-21.65
7.5	-20.73
8.0	-20.68

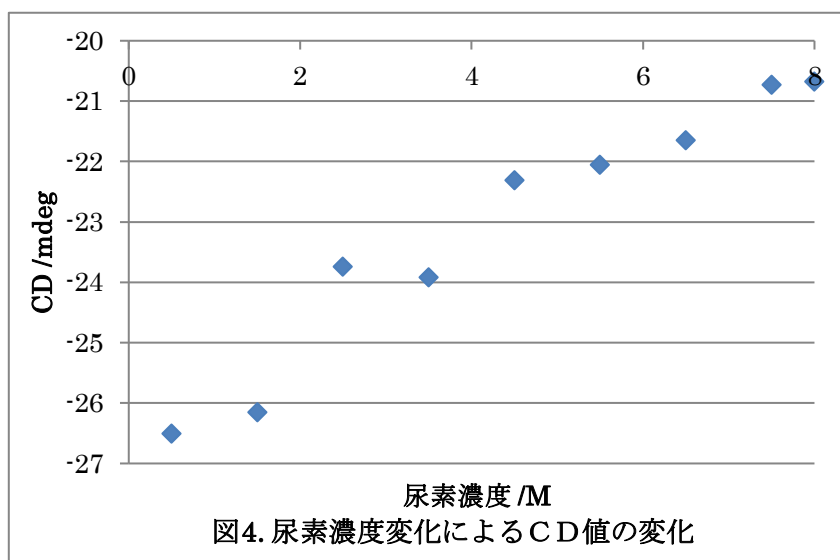


表 2 において、CD 値が最も小さい値をリゾチームが全く変性していないとみなし、 $f_n=1$  とする。また、CD 値が最も大きい値をリゾチームが全て変性しているとみなし、 $f_d=1$  とする。 $f_n$  と  $f_d$  をそれぞれ系中の天然のリゾチームと変性しているリゾチームの割合（濃度）とすれば、 $f_n+f_d=1$  の関係が成り立つ。よって、

$$\text{平衡定数 } K_{eq}=[D]/[N]=f_d/f_n、$$

$$\text{標準自由エネルギー変化 } \Delta G^\circ = -RT\ln K_{eq} \text{ より、}$$

各尿素濃度において、各パラメータを算出したものを表 3 に示す。また、尿素濃度と

そのときの  $\Delta G^\circ$  の関係を図 5 に示す。

表 3.  $\Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}}$  算出のための各パラメータ

尿素 / M	$f_d$	$f_n$	$K_{\text{eq.}}$	$\Delta G^\circ / \text{Jmol}^{-1}$
0.5	0.3967	0.6033	0.658	1039
1.5	0.4327	0.5679	0.763	671
2.5	0.6826	0.3174	2.150	-1897
3.5	0.6642	0.3358	1.978	-1690
4.5	0.8304	0.1696	4.895	-3935
5.5	0.8573	0.1427	6.009	-4443
6.5	0.8990	0.1010	8.902	-5417
7.5	0.9941	0.0059	167.7	-12690

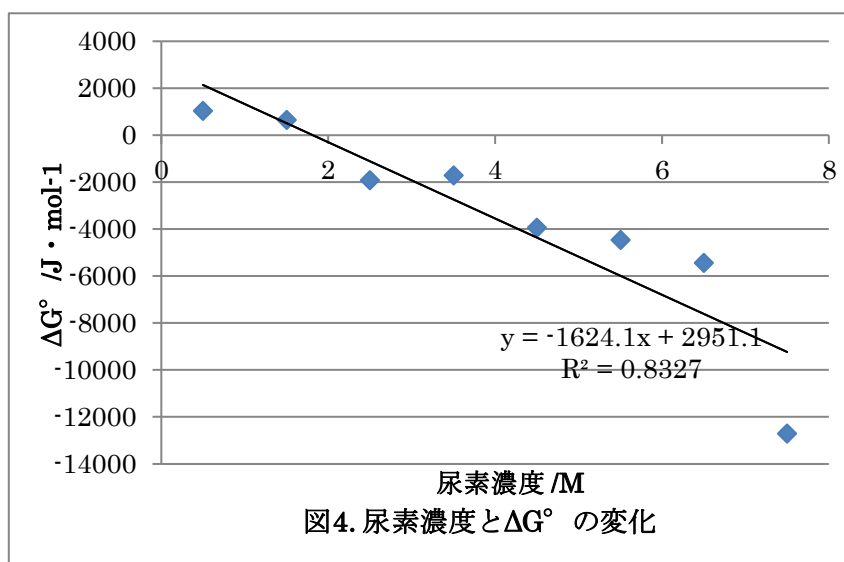


図 4 のプロットを線形近似し、尿素なしのときの標準自由エネルギー変化  $\Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}}$  を求めると

$$\Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}} = +4.33 \text{ kJ/mol}$$

となる。

リゾチームタンパク質の変性試験により求めたリゾチームの標準自由エネルギーは  $\Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}} = +4.33 \text{ kJ/mol}$  であった。自由エネルギー変化が正の値をとるということは、尿素が存在しない環境においては、天然状態のタンパク質 N から変性状態のタンパク質 D への変化は熱力学的に自発的な反応ではないことを意味している。これはリゾチームタンパク質がフォールディングによって分子内水素結合が生じ、結果とし

て、エントロピー変化  $\Delta H$  が小さいと、エントロピー項 ( $-T\Delta S$ ) の寄与を受けやすいからであると考えられる。

しかしながら、タンパク質溶液に尿素を加えていくことによって自由エネルギー変化  $\Delta G^\circ$  は徐々に負の値をとるようになる。これは、尿素の添加によって水素結合が破壊され、エントロピーが高くなるためである。

タンパク質分子を構成するアミノ酸残基がつながると、二次構造であったペプチド鎖は立体的な三次構造となる。ここで、もしこの構造が破壊されると、折りたたみのみが解消され変性状態となる。変性状態から天然状態への変化は秩序的であり、熱力学的にも安定な構造である。この天然状態から変性状態への変化をフォールディングという。反応はエネルギーの高い方から低い方へ、つまり熱を放出する方向へ変化することが一般的であり、 $\Delta H < 0$  の反応は自発的に進む。今回の実験では、 $\Delta H > 0$  であった。天然状態のタンパク質を尿素で変性させており、この反応は先述の秩序に逆らったものであると考えられる。

尿素溶解による溶液体積増加並びに溶液濃度変化を無視しているため、エントロピー寄与の値が小さくなったと考えられる。今回の実験の反応を等温過程であると仮定すると、体積が増加するとき ( $V_2 \rightarrow V_1$ )、外からの期待になされる仕事を正とすると、

$$W = - \int P dV = -nRT \int \frac{1}{V} dV = -nRT \ln\left(\frac{V_2}{V_1}\right)$$

と表される。等温変化より温度  $T$  においてこの反応系の熱は

$$Q = nRT \ln\left(\frac{V_2}{V_1}\right)$$

となり吸熱する。このときのエントロピー変化は

$$\Delta S = \frac{Q}{T} = nR \ln\left(\frac{V_2}{V_1}\right)$$

となり、エントロピーは増加する。

また、今回の実験において  $\Delta H$  や  $\Delta S$  は温度変化を伴う実験を行うと求めることができる。 $\Delta G$  の温度依存性を測定したのち、 $\Delta H$  は  $K_{eq}$  を用いて

$$\Delta H = -R \left( \frac{\partial(\ln K_{eq})}{\partial(1/T)} \right)$$

と表される。 $\Delta S$  は

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

で導くことができる。

#### 4. レポート課題

選んだ論文のタイトル：「Circular Dichroism Spectroscopy of Collagen Fibrillogenesis: A New Use for an Old Technique」

##### Q1. 何のために CD 測定を行っているのか？（目的）

I 型コラーゲンは、三重らせんの折り畳み構造から繊維の構成まで、階段状の階層的な様式で組み立てられる。三重らせんの折り畳み構造は、CD 測定などの光学的方法を用いることができ、繊維構造は、典型的には濁度、レオロジー、および顕微鏡法などの代替方法によって測定される。これらのアプローチによって、コラーゲンに基づく足場や、組織の機械的特性および構造の調査が可能になる。本論文では、主にタンパク質の二次構造を評価するために使用される技術である CD 測定を用いて、コラーゲン原線維形成をモニターすることもできることを示す。

##### Q2. どのような情報が得られていて、何が考えられるか（結果と考察）

波長 222nm にて、様々なコラーゲンに対して CD 測定を行った。温度に変化を加えながら観測した結果、30℃付近が変性温度であったため、その付近では独特の CD 値を示した。また、pH に変化を加えながらも行った。I 型コラーゲンは、独特な値を示した。

##### Q3. 今回の学生実験の CD 測定とはどのような点が異なるのか（比較検討）

学生実験とこの論文の実験との大きな違いは、温度変化や pH 変化を加えていたか否かである。本実験では、濃度にしかな変化を与えていない。

##### Q4. 論文の研究成果より明らかになった課題点、新たに解決すべき問題点、謎等を 1 つ探し出し、それらに対してどのような研究をすればよいか

温度や pH 以外で変化させられる要因がいるのではないかと思った。例えば尿素を入れて水素結合に影響を与えてみたり、測定するコラーゲンの長さを半分にしてみたい、という事例が挙げられる。

#### 5. 参考文献

- [1] コラーゲンとは何？コラーゲン、ゼラチン、コラーゲンペプチドの違い

URL : <http://collagen-net.com/basic/knowledge/about/02>

- [2] 生体高分子のゲル化がもたらす構造色とフォトメカニカル効果への応用

URL : [https://www.color.t-kougei.ac.jp/research/r\\_hiejima.html](https://www.color.t-kougei.ac.jp/research/r_hiejima.html)