



随 筆

思い出： コラーゲンモデルペプチドの研究を中心に

小林 祐次*

Memories of my research on collagen model peptides

Key Words : protein structure, collagen, triple helix

私は平成 17 年大阪大学薬学部を定年退職し、現在、工学研究科フロンティア研究機構の特任教授を務めています。私は理学部に入学以来、半世紀近く大阪大学のお世話になって居ります。本誌に随筆を書くようにと依頼されましたが、悲しいことに、そのような文才を持ち合わせていません。コラーゲン研究を中心として、退官教授の思い出話と近況報告を少し書かせていただきます。

世の中はコラーゲンブームです。美容や健康に特に興味のない方もテレビのコマーシャルなどでしきりにコラーゲンという言葉を見聞きされているとします。美容やいわゆる健康食品としてコラーゲンがこれほど持て囃される時代が来ようとは夢想だにしませんでした。私は阪大においてほぼ半世紀にわたってコラーゲンの研究をしてきました。ただし蛋白質の立体構造とそのアミノ酸配列の関係を見出したいという大きな問題に挑戦するためのモデルとしての研究です。蛋白質研究の一つの“ケース・ヒストリー・もどき”になれば幸いです。

4 回生で分属した蛋白研の研究室は日本の生物物理学の産みの親の一人である伊勢村寿三先生が主宰されていた、生命現象を物理、化学の言葉で説明しようとする学問を研究する部屋でした。根幹を成す問題は遺伝情報に従ったアミノ酸配列を持つように生合成されたペプチド鎖が、蛋白質として生理活性

を発現するために必要な立体構造をどの様にして獲得し安定に保っているかという疑問です。Anfinsen の蛋白質を加熱や変性剤の添加により構造を破壊した後、冷却や変性剤の除去を行うと構造や活性が元に戻ったという実験例によってアミノ酸配列が立体構造を規定しているらしいことは示されていました。伊勢村研に於いてもこのような“戻り”の研究が行われていました。伊勢村先生から与えられたテーマはコラーゲンの溶液物性を調べ、構造の戻りを見る実験でした。コラーゲンの名の由来は Kolla (にかわ；膠) のもと (gen) として、骨、皮膚、腱の構成成分であり、動物界において最も存在量の多い蛋白質であること、及び加熱すると接着剤となる膠や食品などに用いるゼラチンに成ることは古くから知られていました。しかし 40 年以上も前には細胞間マトリックスとしてのコラーゲンの働きは分かっておらず、酵素のような面白い生理活性があるわけではなく、どちらかと言うとそれほど注目される蛋白質ではありませんでした。

蛋白質は加熱すると一般に水に溶けなくなるのにコラーゲンは逆に水溶性が増すことや、コラーゲンが 30 万もの大きな分子量を持つ蛋白質で加熱などによりサブユニットに分離することが、1960 年代に明らかとなって来ていました。そのころ研究室には分析用超遠心機が二台設置されていました。当時としては非常に高価な装置でまだそれほど豊かではなかった日本では購入することが出来ず、米国の Rockefeller 財団の援助で購入した機械だと聞かされました。丁度、最新の沈降平衡法の実用化が図られている時期でした。この装置を用いてコラーゲンを高分子の解離会合系として解析することにしました。このときから、私の 50 年近く続くコラーゲンと解離会合系のライフワークが始まることになりました。



*Yuji KOBAYASHI

1941年12月生
大阪大学大学院理学研究科 (1972年)
現在、大阪薬科大学 大阪大学名誉教授
・特任教授 大阪薬科大学客員教授 (常勤)
理学博士 (大阪大学) 生物物理化学
TEL : 072-690-1080
FAX : 072-690-1080
E-mail : kobayasi@gly.oups.ac.jp

私が鶏の脚の腱より抽出、精製したコラーゲンは沈降平衡法による分子量測定の結果、見かけ上、単分散していて231,000という分子量が得られ、この溶液に変性剤を加えると76,000という分子量が得られました。コラーゲンを80 で30分加熱すると分子量18,500のユニットに分かれました。こうして、コラーゲンのサブユニットへの解離を231,000 : 76,000 : 18,500 12 : 4 : 1と分子量的に初めて示すことが出来ました。当時はまだコラーゲンのアミノ酸配列も遺伝子の存在も明らかでなかったため、コラーゲンはこの18,500のユニットが熱に比較的弱いエステル結合が何かで4つ結合したペプチド鎖が3本寄り集まってコラーゲン分子を構成すると考えました。ORD, CDを用いてこのサブユニットへの解離を測定すると、ペプチド鎖の左巻きヘリックスからランダムコイルへの構造転移を伴うことが分かりました。この結果を、4年生の終わりの春の化学学会年会で発表し、J.Biochem. 誌に投稿しました。このころ世界中でカラムクロマトや沈降実験からコラーゲンが三本のポリペプチドから構成されることが示されましたが、私のこの仕事も一つの証明を加えることになりました。

修士課程に入って、これらコラーゲンの戻りの研究を超遠心やORD, CDを用いて行っているところに、当時蛋白研のペプチドセンターに居られた榊原俊平先生から(プロリン・プロリン・グリシン)_n(以下(PPG)_n)というペプチドの分子量を見てほしいとの依頼を受けました。Merrifieldが提唱したペプチドの固相重合法に榊原先生はHFを適用して、保護基の切断とアンカーの樹脂から生成したペプチドの切断を同時に行う手法を開発しておられました。先生の目的はオリゴペプチドをユニットとして、これをn回繰り返して重合し、途中で重合が不完全なステップが少ないことを証明することでした。ユニットとして偶然ブラディキニンの合成用に持っておられたラセミ化や枝分かれの恐れのないトリペプチドPro-Pro-Glyを用いて(PPG)_nを合成されました。分析してみると分子量が小さくなるどころか実験条件によっては、予想値の2倍近くなったりしました。この3番目ごとにGlyが来るアミノ酸配列はコラーゲンに特徴的なことが知られていたため、ひょっとすると三本になるのではないかとアイデアが頭に浮びました。私にとってはまさにserendipityでした。

コラーゲンの例に倣ってORD, CDの温度依存性を測定すると見事な構造転移を示しました。非常に苦労しましたが超遠心を用いて分子量の温度依存性を調べると、まさに三量体から単量体への転移を示しました。また転移点は重合度nに明らかに依存しました。こうして分子量の揃ったPro-Pro-Glyの配列がコラーゲンのトリプルヘリックス形成の必要十分条件であることを世界で最初に示すことが出来ました。1960年後半の学園紛争前夜の事です。この結果をMITでの第三回国際生物物理学会で発表しました。まだドルが360円で海外に持ち出せる額にも700ドルと制限のある時代でした。最前列にRamachandran, Blout, Scheragaと超大物が陣取っていました。D1の学生である私が発表を終えると、Ramachandranが立ち上がって今の発表の重要性を説明したいと言って、“初めて合成ペプチドで三本鎖⇌一本鎖の転移を証明したものであり、自分のコラーゲンの三本鎖構造の正しさが実証された”と発言してくれました。

この後(PPG)_nはコラーゲンのトリプルヘリックス構造に関する研究のスタンダードサンプルと認められ現在に至るまで多くの研究者によって用いられています。三本鎖⇌一本鎖転移に引き続きコラーゲン以外では存在のまれなHypの存在意義を考えました。動物の種類によってコラーゲンからゼラチンへの転移温度は大きく変わり、動物の体温またはその生育環境の温度に一致すること、さらに、この転移温度とコラーゲンに含まれるHypの含量が比例することは知られていました。HypはProのピロリジン環の位が、蛋白質の生合成が終わったあと酵素により水酸化されたものです。すなわちRNAからアミノ酸配列への翻訳後の修飾ですから直接遺伝情報に書き込まれているわけではありません。

コラーゲンのような大きな分子のアミノ酸配列はずっと後になって初めてcDNAの解析から決められるようになりましたが、当時でもコラーゲンのペプチド断片の配列からX位にはPro、Y位はProまたはHypが占めるX-Y-Glyという繰り返し構造が長く続いていることは分かっていました。そこで(Pro-Hyp-Gly)_nを合成したところ、(PPG)_nに比べて転移温度が飛躍的に上昇しました。これは水素結合により水素結合が形成され安定化したのだらうと思われました。しかし続いて合成した(Hyp-Pro-Gly)_nが三

した合理的な薬剤の設計を薬学部で始めました。定年後も、センター長を務める大阪薬大のハイテクリサーチセンターと、福井希一教授をホストとしたフロンティア研究機構において製薬会社との共同研究で創薬に取り組んでいます。その他、Peptide Science 誌の副編集長を務めていますが、最近は奈良女で中沢隆教授が主宰する古代史研究会に参加し、中学生時代からの趣味である仏像鑑賞を生かして、仏像に用いられてきた膠や漆、装飾の貝などの研究に従事し始めました。

振り返って、“アミノ酸配列が非常に複雑で精巧な蛋白質の構造を規定する原理を探る”という遠大なテーマを $(PPG)_n$ という理想的なモデル系で、各時代の最前線の分子生物学、計算機科学、NMR はじめ多くの技術の進歩の恩恵を受けながら、多くのよき共同研究者とともに半世紀近く研究することが出来た喜びを噛みしめています。

昨年12月には高分子学科50周年記念講演会で卒業生代表の一人として“コラーゲンから創薬まで”という講演をする荣誉に浴することが出来ました。

