

—Brief Reviews—

生理活性ペプチドの C-末端アミド化が及ぼす構造化学的影響の解明

尹 康子

Structural Function of C-terminal Amidation in Bioactive Peptides

Yasuko IN,

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1, Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received November 27, 2006; Accepted December 21, 2006)

As a part of a series of elucidation of the structural features of amino acids and peptides caused by C-terminal α -amidation, the crystal structures of C-terminal amidated amino acids and di-peptide hydrochloride salts were analyzed by the X-ray diffraction method and compared with those of their C-terminal free acids. Their conformations are almost the same as the corresponding unamidated ones except side chain. But as for the molecular packing feature, the C-terminal amide group tended to form a repeated structure through those hydrogen bonds in which both amide NH and O=C groups participate. The chloride ions are located between the neighboring amino acids and peptides and are bifurcately hydrogen-bonded to the respective amide NHs, leading to the sheet structure. Furthermore, the hydrogen-bonding features between the amide and carboxyl groups and their function in molecular packing were discussed based on the results analyzed so far. While in order to clarify the structural function of the C-terminal amide group of endomorphin-2 (EM2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂), an endogenous μ -opioid receptor ligand, the solution conformations of EM2 and its C-terminal free acid (EM2OH, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-OH) in trifluoroethanol (TFE), dimethylsulfoxide (DMSO)-d₆, water (pHs 2.7 and 5.2), and aqueous dodecylphosphocholine (DPC) micelles (pHs 3.5 and 5.2) were investigated by the combination of two-dimensional ¹H-NMR measurement and molecular modeling calculation and the solid state conformation of EM2OH was determined by X-ray crystal analysis. These results show that the substitution of a carboxyl group for the C-terminal amide group makes the peptide structure more flexible and leads to the ensemble of folded and open conformers. And the conformational requirement of EM2 for binding to the μ -opioid receptor and the structural function of the C-terminal amide group are discussed on the basis of the present conformational features of EM2 and EM2OH and a possible model for binding to the μ -opioid receptor, constructed from the template structure of rhodopsin.

Key words—C-terminal amidation; endomorphin-2; molecular conformation; crystal structure; NMR; molecular modeling calculation; μ -opioid receptor

1. はじめに

これまで我々は、海洋生物や微生物が産生する異常アミノ酸や D-アミノ酸を多く含む生理活性ペ

プチド（アカチン - I , II , アシジアサイクラマイド及びその誘導体, パテラマイド -A, B, C, オーレオバシジン -A, E, セラトスポンゲアミド等）の立体

コンフォメーションに関して X-線結晶構造解析, NMR や CD による溶液構造解析, 分子動力学計算等の物理化学的手法を駆使して研究を進めるとともに, その立体構造と生理活性との相関性について詳細な検討を重ねてきた。その結果, 活性発現の際の異常アミノ酸及び D-アミノ酸の重要性をはじめとして有益な知見を数多く得ることができた。¹⁻¹⁶⁾

一方, 哺乳類や昆虫など動物体内からも Calcitonin, Gastrin I をはじめ Endomorphin-1 (EM1), Endomorphin-2 (EM2) などの生理活性なペプチドホルモンが数多く単離されているが, その多くは C-末端がアミド化されている。これらの生理活性ペプチドは C-末端がアミド化されることによってその生理機能を発現し, 脱アミノ化されてカルボキシル基になると著しい活性の低下をひきおこしたり, 活性が全く無くなってしまふことから活性発現の際の C-末端アミド化の重要性が示唆されている。¹⁷⁻²⁰⁾ しかしながら, 現在のところ C-末端アミド化がペプチド自身の安定性に寄与しているという報告^{21,22)} 及び C-末端アミド化の生合成メカニズムについての報告²³⁾ はあるが, 活性発現の際に生物学的あるいは構造化学的のどのように関与しているのかについての詳細な知見は殆ど得られていない。そこで生理活性ペプチドにおける C-末端アミド化の重要性と C-末端アミド化が及ぼす構造化学的影響を解明する目的で以下の 2 つの実験を行った。1) C-末端アミド基の構造化学的研究として C-末がカルボキシル基である通常のアミノ酸やペプチド(OH 体)とアミド化したもの(アミド体)について, これらの X-線結晶構造解析を基にアミド化が分子コンフォメーションや分子間相互作用, 水素結合様式に及ぼす影響を調べた。2) EM2 の C-末端アミド基の構造化学的研究として EM2 とその C-末端 OH 体(EM2OH) の分子コンフォメーションを ¹H-NMR, 分子動力学計算並びに X-線結晶構造解析より決定し, それらの比較から活性発現における C-末端アミド化が果たす役割について考察した。本稿では 1) と 2) の溶液及び固体状態でのコンフォメーション解析から得られた結果を基に, 生理活性ペプチドの機能発現時における C-末端アミド基の重要性並び

に構造化学的影響について 2 章に分けて述べる。

2. C-末端アミド基の構造化学的研究: モノアミノ酸及びジペプチドの X-線結晶構造解析

C-末がアミド化された性質の異なる 8 個のアミノ酸 (Ile-NH₂, Val-NH₂, Thr-NH₂, Ser-NH₂, Met-NH₂, Trp-NH₂, Gln-NH₂, Arg-NH₂), 及び 4 個のジペプチド (H-Val-Gly-NH₂, H-Ser-Phe-NH₂, H-Gly-Tyr-NH₂, H-Pro-Tyr-NH₂) の各 HCl 塩の分子コンフォメーションや分子間相互作用等 X-線結晶構造解析より明らかにし, 既に解析されている同種の OH 体と比較した。²⁴⁻³⁷⁾ またアミド基及びカルボキシル基が関与する水素結合様式の差異について, 本研究で解析したのものも含めこれまでに報告されているモノアミノ酸, ジペプチド, トリペプチド等のアミド体と OH 体の結晶構造を基に考察した。その結果アミド基は明らかに分子パッキング様式や水素結合様式においてカルボキシル基とは異なった影響を及ぼす事がわかった。

2-1. 分子コンフォメーションの比較

解析の結果得られた結晶学的データを Table 1 に示す。いずれも最終の信頼度因子は 5% 前後で構造化学的な情報を得るためには十分信頼できるデータが得られた。コンフォメーションの差異を明確にするために, ジペプチドのアミド体と OH 体の重ね合わせを行ったところ Fig. 1 に示すように, Ser-Phe に僅かに違いが見られただけで主鎖の構造に関しては大変よく似たコンフォメーションを有していた。他のジペプチドやモノアミノ酸のアミド体/OH 体の比較においても同様の結果が見られたことから C-末端アミド基は分子全体のコンフォメーションにはほとんど影響を及ぼさないことが考えられた。^{38, 39)}

2-2. 分子間相互作用の比較

2-2-1. C α -H \cdots O による水素結合の比較

アミド体と OH 体の結晶構造で見られる C α -H \cdots O による short contacts を比較したところ, H 原

Table 1. Summary of Crystal Data Collections and Structural Refinements

	IleNH ₂ ·HCl	ValNH ₂ ·HCl	ThrNH ₂ ·HCl	SerNH ₂ ·HCl
Crystallographic data				
formula	C ₈ H ₁₃ N ₂ OCl	C ₈ H ₁₃ N ₂ OCl	C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₂ Cl	C ₈ H ₉ N ₂ O ₂ Cl
molecular weight	166.65	152.62	154.60	140.57
crystallization solvent	MeOH/AcOH	MeOH/AcOH	H ₂ O	MeOH/H ₂ O
crystal system	monoclinic	monoclinic	orthorhombic	monoclinic
space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
unit cell dimensions				
<i>a</i> , Å	7.578(1)	5.338(1)	10.162(2)	7.562(2)
<i>b</i> , Å	4.897(1)	7.457(1)	10.567(2)	4.999(2)
<i>c</i> , Å	12.569(1)	9.899(1)	6.749(3)	8.519(3)
β, °	94.20(1)	91.73(1)		90.76(3)
volume, Å ³	465.1(2)	393.84(9)	724.8(3)	322.0(2)
<i>Z</i>	2	2	4	2
Structural refinement				
no. of unique data measd.	893	731	710	638
no. of reflections with <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	817	718	710	626
no. of variables refined	90	82	83	73
<i>R</i> (<i>wR</i>) for <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>) data	0.069 (0.184)	0.037(0.096)	0.047(0.121)	0.050(0.156)
<i>R</i> (<i>wR</i>) for all data	0.075 (0.187)	0.038(0.097)	0.047(0.121)	0.051(0.162)
goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.857	0.747	1.098	1.582
	MetNH ₂ ·HCl	TrpNH ₂ ·HCl	GlnNH ₂ ·HCl	ArgNH ₂ ·HCl
Crystallographic data				
formula	C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₂ Cl	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ OCl	C ₈ H ₁₂ N ₃ O ₂ Cl	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₂ Cl ₂
molecular weight	184.68	239.70	181.63	264.16
crystallization solvent	MeOH/H ₂ O	H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/AcOH
crystal system	monoclinic	monoclinic	monoclinic	orthorhombic
space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
unit cell dimensions				
<i>a</i> , Å	7.591(3)	7.639(1)	7.741(2)	7.536(3)
<i>b</i> , Å	5.029(3)	5.279(1)	4.891(1)	32.487(3)
<i>c</i> , Å	11.786(4)	14.597(1)	10.816(1)	5.277(4)
β, °	96.49(3)	100.1(1)	94.18(1)	
volume, Å ³	447.0(4)	579.6(2)	408.4(2)	1292(1)
<i>Z</i>	2	2	2	4
Structural refinement				
no. of unique data measd.	864	1100	816	1364
no. of reflections with <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	811	1075	812	1325
no. of variables refined	90	145	100	137
<i>R</i> (<i>wR</i>) for <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>) data	0.059(0.161)	0.030(0.093)	0.043(0.137)	0.055(0.171)
<i>R</i> (<i>wR</i>) for all data	0.064(0.163)	0.031(0.095)	0.043(0.137)	0.056(0.172)
goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.439	0.913	1.387	1.640
	Val-Gly-NH ₂ ·HCl	Ser-Phe-NH ₂ ·HCl	Gly-Tyr-NH ₂ ·HCl	Pro-Tyr-NH ₂ ·HCl
Crystallographic data				
formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₇ ·HCl	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₇ ·HCl	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₇ ·HCl·H ₂ O	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₇ ·HCl·H ₂ O
molecular weight	209.68	287.74	291.73	331.80
crystal system	monoclinic	orthorhombic	orthorhombic	orthorhombic
space group	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
unit cell dimensions				
<i>a</i> , Å	7.765(2)	8.226(2)	8.868(3)	9.187(2)
<i>b</i> , Å	9.132(1)	30.027(2)	27.841(2)	29.520(2)
<i>c</i> , Å	8.408(1)	5.605(2)	5.874(2)	5.877(1)
β, °	115.40(1)			
volume, (Å ³)	538.5(2)	1384.5(6)	1450.3(6)	1593.9(4)
<i>Z</i>	2	4	4	4
Structural refinement				
no. of unique data measd.	1026	1467	1547	2796
no. of reflections with <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)	992	1373	1227	2611
no. of variables refined	118	173	172	200
<i>R</i> (<i>wR</i>) for <i>I</i> > 2σ(<i>I</i>) data	0.039 (0.131)	0.028(0.099)	0.037(0.111)	0.058(0.189)
<i>R</i> (<i>wR</i>) for all data	0.041 (0.135)	0.033(0.104)	0.065(0.135)	0.072(0.219)
goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.284	0.935	0.982	1.949

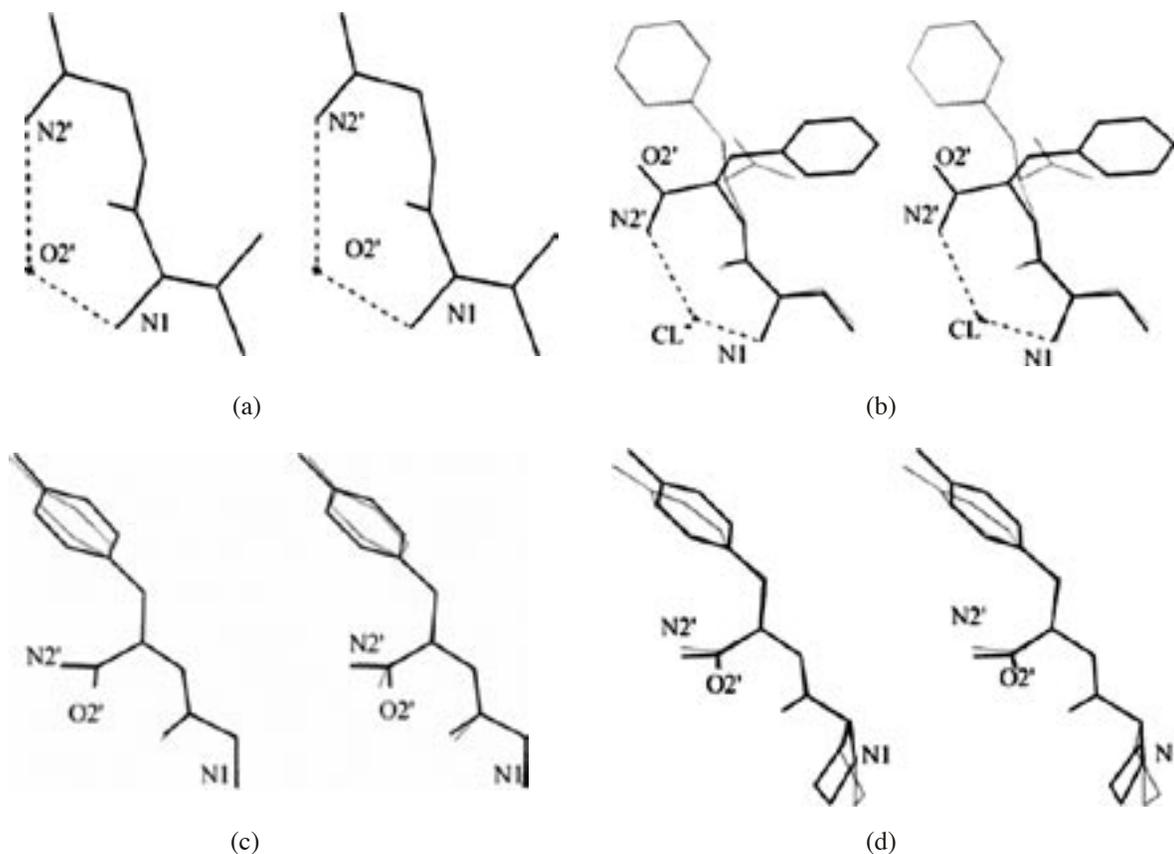


Figure 1. Stereoscopic View of Molecular Conformations of Val-Gly-NH₂ (a), Ser-Phe-NH₂ (b), Gly-Tyr-NH₂ (c) and Pro-Tyr-NH₂ (d)

The corresponding C-terminal carboxyl peptides, except for Val-Gly-OH, are superimposed on the respective C-amides with thin lines. Two hydrogen bonds of a neighboring O(2') atom or Cl⁻ anion to the amino and amide NHs of (a) or (b), respectively, are shown by dotted lines. Hydrogen atoms were omitted for clarity.

子とO原子の van der Waals 半径 (2.6Å) 及び $\text{Ca-H}\cdots\text{O}$ の角度から判断して⁴⁷⁾ 水素結合といえるような short contacts が, ThrNH₂ を除く全てのアミノ酸のアミド体の結晶構造で確認された. その一例を Fig. 2 (a) に示しているが, このような $\text{Ca-H}\cdots\text{O}$ 様の水素結合は OH 体のアミノ酸 (Fig. 2 (b)⁴⁰⁾ や生体分子の結晶構造でも見られることから,⁴¹⁾ 必ずしも C-末端アミド化に起因するものではないのかもしれない. しかしながら, その距離と角度からそのような相互作用の形成能力は, OH 体よりもアミド体のほうがより大きいことが示唆された.

OH 体の zwitterionic form やアミド体の neutral form の場合, $\text{Ca-H}\cdots\text{O}$ の相互作用は $\text{N1-H}\cdots\text{O1}'$ (OH 体) あるいは $\text{N2-H}\cdots\text{O1}'$ (アミド体) の相互作用を伴うことが多い. そのような対の相互作用は, OH 体やアミド体の HCl 塩の結晶構造では非常にま

れで, ほとんどの場合はどちらか一方のみ見られる. このことから, $\text{Ca-H}\cdots\text{O}$ の相互作用 (水素結合) 形成能力は HCl 塩の形成や, アミド基と隣接する 2 個の Cl⁻ との水素結合により優位に強められるのではないかと考えられる.

2-2-2. Cl⁻イオンとの相互作用様式の差異

Fig. 3 に Ile のアミド体/OH 体の結晶構造で見られる Cl⁻ を介したパッキング様式の一部を示している. 両者の分子間相互作用様式を比較するとアミド体 (Fig. 3 (a)) の場合は, C-末アミノ基同士が Cl⁻ を介して 'head-to-head' タイプで隣接分子と連続的に二重水素結合を形成していた. それに対して OH 体 (Fig. 3 (b)) の場合は, Cl⁻ を介して N-末アミノ基と C-末カルボキシル基が交互に存在する 'head-to-tail' タイプのリニアな水素結合

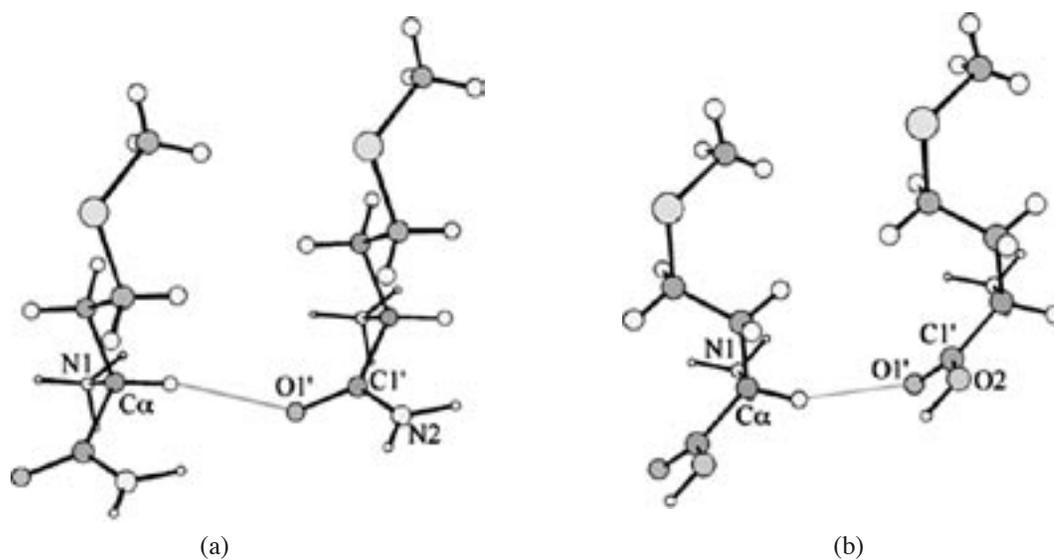


Figure 2. Intermolecular C α -H...O Interactions. (a) MetNH₂·HCl and (b) MetOH·HCl
The thin lines show hydrogen bonds. The open and meshed circles represent hydrogen and carbon atoms. The nitrogen and oxygen atoms are shown by the circles marked with crosses and dots, respectively.

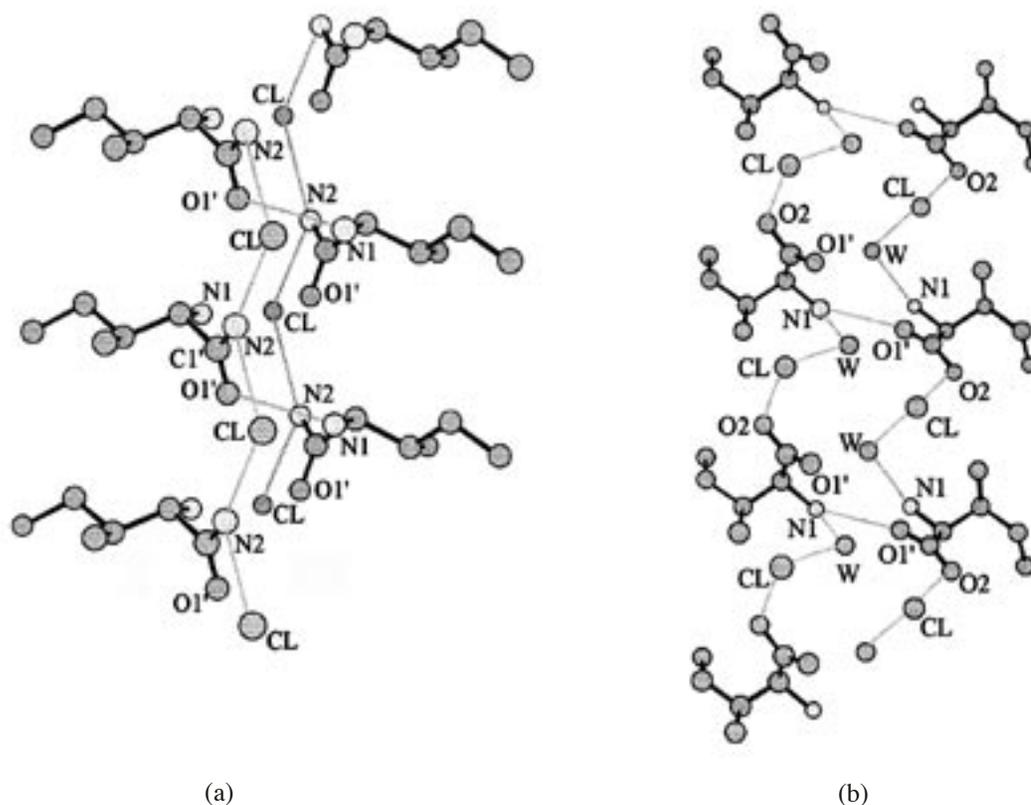


Figure 3. Interaction Patterns between the Amide NH₂ or the carboxyl OH and Chloride Ions, Observed in the Crystal Structures of IleNH₂·HCl (a) and IleOH·HCl (b)
The thin lines show hydrogen bonds. The nitrogen atoms, oxygen atoms that contains water solvents and chloride ions are shown by the cross, dot and shaded-marked balls, respectively.

を形成していた。同様の傾向が他のアミノ酸やジペプチドのアミド体/OH体でも確認された。^{38,39,42)} このように両者共に隣接分子との会合には Cl⁻ が関与しているが、その結合様式には明らかに違いが見られる。

2-2-3. アミド基及びカルボキシル基が関与する水素結合様式の差異

X-線結晶構造解析より、アミド体とOH体では Cl⁻ との間で異なった相互作用を導き、更にその違いはアミド基とカルボキシル基の水素結合様式の違いに起因していることが示唆された。そこで、アミド基とカルボキシル基の水素結合様式の差異を明らかにするために、両官能基と水素結合しているアクセプター原子あるいはドナー基の空間的な分布を統計学的に考察した。Fig. 4 は本研究で解析したアミノ酸、ジペプチドも含め、これまでに解析されてい

るアミド体/OH体のモノアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド等のアミド基及びカルボキシル基が関与している水素結合を模式的に立体比較したものである。アミド体 (Fig. 4 (a)) の場合、NH₂ 基と水素結合しているアクセプター原子あるいはイオンはほぼ同一平面上にあって明確に2つの領域に分かれていることから、NH₂ 基は結合する相手分子の位置と方向を限定している。すなわち、相手分子に対して位置特異性を有することが強く示された。一方、カルボニルのO原子と水素結合しているドナー基はO原子を取り囲む様に幅広く分布していることから、ある程度相手分子に空間的領域を許していることが考えられる。それに対してカルボキシル基 (Fig. 4 (b)) の場合、反対にカルボニルO原子と水素結合しているドナー基の空間的な配向が、ほぼ2つの領域に分かれていることから、カルボニルO原子の方に相手分子との位置特

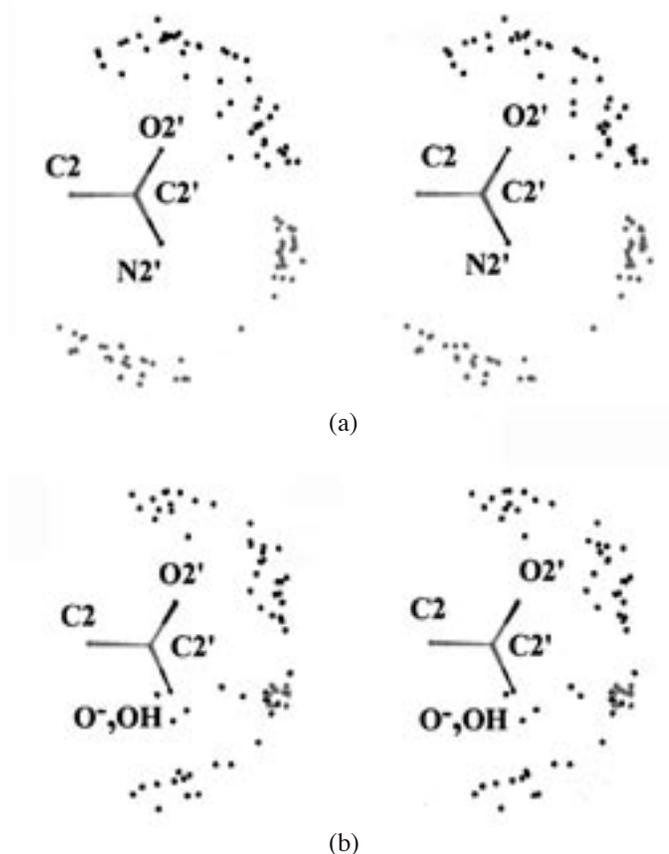


Figure 4. Stereoscopic Views of Spatial Distribution of Acceptor O Atoms or Cl⁻ Ions and Donor OH or NH Groups Hydrogen-Bonded to a C-Terminal Amide Group (a) and Carboxyl Group (b)
The donor groups, acceptor atoms and acceptor ions are shown by the black and gray circles, respectively.

異性が強く示された。そして neutral-OH 基の場合、水素結合するアクセプターの O 原子あるいはイオンは限られた領域、すなわち直線上にあることから強い水素結合を形成していることが考えられる。一方、anionic O⁻ の場合、水素結合しているドナー基は幅広く分布していることから結合の多様性が見られた。

2-3. 小括

以上の結果よりアミド体/OH 体のコンフォメーションそのものに優位な差異が見られないことから、アミド基は分子コンフォメーションに影響を及ぼさない事がわかった。それに対して隣接分子との相互作用様式、特に生体アニオンである Cl⁻ を伴う分子間相互作用様式、C α -H \cdots O による short contacts, アミド基とカルボキシル基が関与する水素結合様式等には顕著な差異が見られた。これらのことより、アミド基の水素結合様式やアニオンとの相互作用の優位性が、レセプター分子との特異的な結合や親和性を示す際の重要な要因となり得ることから、C-末端アミド基は活性コンフォメーションの形成に関与するよりも、受容体との結合に重要な役割を果たすことを示唆している。また、Cl⁻ は生体内に広く分布し、かつ重要な生体機能にも関与す

る生物学的アニオンである。それ故、原子レベルで得られたこれらの知見は、C-末端アミド基とカルボキシル基間の生物学的機能の差異を理解する上で、また、生理活性ペプチドとレセプターが結合する際のアミド基が及ぼす影響を明らかにする上で重要である。

3. EM2 の C-末端アミド基の構造化学的研究：EM2 とその C-末端 OH 体 (EM2OH) の分子コンフォメーション比較

エンドモルフィン (EM) は、 μ -オピオイド受容体に対して親和性と agonist 活性が極めて高い内因性オピオイドペプチドで、Endomorphin-1 (EM1), Endomorphin-2 (EM2) (Fig. 5) の 2 種類があり、共に C-末端がアミド化された 3 残基目のみが異なる類似のテトラペプチドである。⁴³⁾ これら両ペプチドの活性発現における C-末端アミド化の重要性を考察するために EM1, EM2 及びそれぞれの C-末端 OH 体—EM1OH, EM2OH のオピオイド活性 (μ -及び δ -レセプターに対する親和性と agonist, antagonist の評価) を測定した。その結果 (Table 2) 脱アミド化された EM1OH, EM2OH の μ -レセプターに対する親和性, agonist 活性は共に大きく減少した。そこで EM2 と EM2OH の種々の溶液中でのコンフォメーションを ¹H-NMR スペクトル及

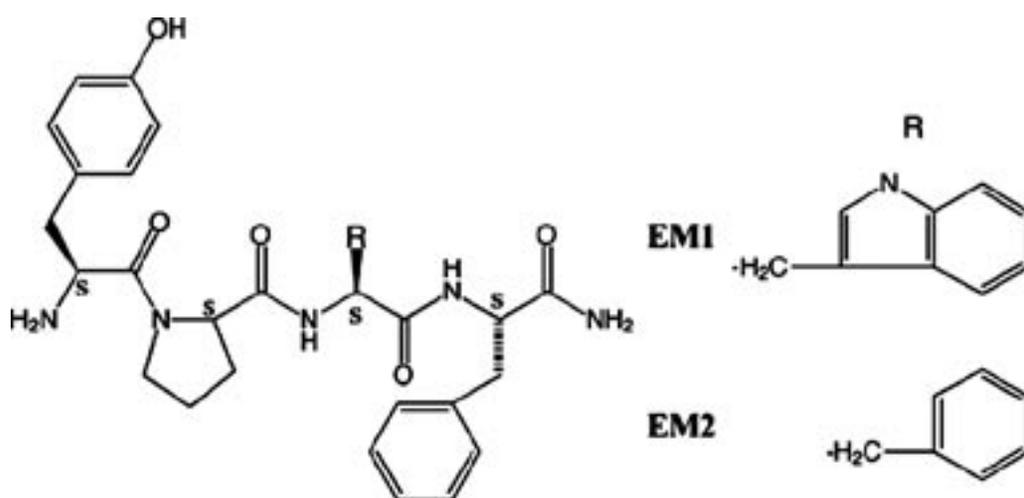


Figure 5. Chemical Structures of Endomorphin-1 (EM1) and Endomorphin-2 (EM2)

Table 2. Receptor Binding and *In vitro* Agonist Bioassay

Compound	μ -opioid receptor	δ -opioid receptor	GPI assay	MVD assay
	K_i (nM)	K_i (nM)	(μ -opioid receptor) IC ₅₀ (nM)	(δ -opioid receptor) IC ₅₀ (nM)
EM1	0.36 ± 0.08	1500 ± 170	10.1 ± 1.2	36.3 ± 5.2
EM1OH	200 ± 19	1800 ± 185	4032 ± 433	>10 ⁴
EM2	0.69 ± 0.16	9230 ± 303	5.80 ± 0.4	344 ± 93
EM2OH	200 ± 19	3950 ± 260	>10 ⁴	>10 ⁴

び分子動力学計算により解析し、それらの比較から活性発現における C-末端アミド化が果たす役割について検討した。また、オピオイド活性を示さなかった EM2OH については pH 5.2 の水溶液中から得られた単結晶を用いて結晶構造を決定し溶液構造との類似性を調べた。更に同じファミリーに属する rhodopsin の立体構造⁴⁴⁾ を雛型として構築した μ -オピオイドレセプターモデルと EM2 との docking study の結果から、EM2 が生体内で存在する可能性の高いコンフォメーションを推定すると共にその相互作用様式についても考察した。

3-1. EM2, EM2OH の溶液構造解析

3-1-1. ¹H-NMR 測定と構造計算

溶媒として DMSO-d₆, コンフォメーションに影響を及ぼす可能性のある溶媒として TFE, 水溶液 (pH 2.7 and 5.2), 受容体の存在する膜環境を考慮して擬似膜環境を作るために重水素化 DPC ミセル溶液 (pH 3.5 and 5.2) の計 6 種類を用い、それぞれ 1 次元及び各種 2 次元スペクトルを測定した。1 次元スペクトルからは、共に Tyr-Pro のペプチド結合に関して *trans(tr)/cis-* 体が 1:1 ~ 2:1 の存在比で平衡に共存していることが示された。そして、Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY) スペクトルから得られた距離情報、ペプチド結合の二面角、C α 炭素のキラリティー等の拘束条件を用いて、両ペプチドが溶液中で取りうる *tr/cis-* 体全ての電荷状態のコンフォメーション

を、シュミレーテッド・アニーリング法 (SA 法) を併用した束縛条件付き分子動力学計算により各 50 個構築した。⁴⁵⁾ そして、発生させた 50 組のコンフォーマーのうちエネルギー的に安定な 30 組を、主鎖のコンフォメーションに基づいて重ね合わせを行ったところ 4 個のグループに収束した。その例として、Fig. 6 に *tr*-EM2 の水溶液中 (pH 2.7 and 5.2) (a) 及び DPC micelles 中 (pH 3.5 and 5.2) (b) と *cis*-EM2OH の水溶液中 (pH 5.2) (c) 及び DPC micelles 中 (pH 5.2) (d) の fitting を示したが、他も同様の傾向が見られた。⁴⁵⁾ 即ち両ペプチドは、種々の溶液中において溶媒の環境に依って収束の程度に差は見られたものの *tr/cis-* の open conformer と folded conformer に大別できた。更に open conformer は rS-type (reverse S-like bending) と n7-type (numerical 7-like curve) に、folded conformer は N-末端と C-末端の極性原子により水素結合を形成する F1-type と水素結合を形成しない F2-type の各々 2 種類のタイプに分類できた。Fig. 7 にグルーピングした 4 タイプの各コンフォーマーのステレオ図を示している。このように、溶液中では EM2, EM2OH は *tr/cis-* の 4 種類のコンフォーマーが平衡状態で存在していると考えられる。そして、各種溶液中でのコンフォメーションの特徴を調べるために、この分類に基づいて Population 解析を行った。その結果を、¹H-NMR スペクトルによって得られた *tr/cis-* の存在比、各種溶液中でペプチドが取り得る電荷状態

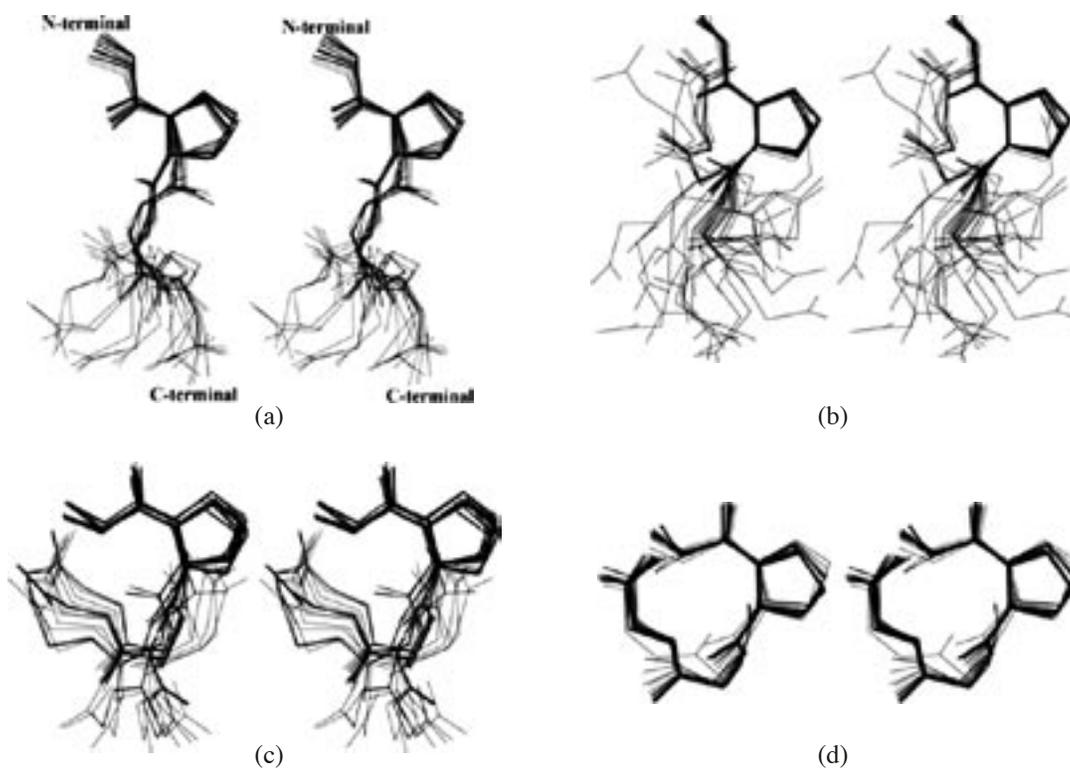


Figure 6. Stereoscopic Superimpositions of Backbone Structures of 30 Energetically Stable Conformers of *tr*-EM2 in (a) Water (pH 2.7 and 5.2), (b) DPC Micelles (pH 3.5 and 5.2) and of Zwitterionic *cis*-EM2OH in (c) Water (pH 5.2), (d) DPC Micelles (pH 5.2)

The conformations are overlaid so as to superimpose their Tyr-Pro backbone chains.

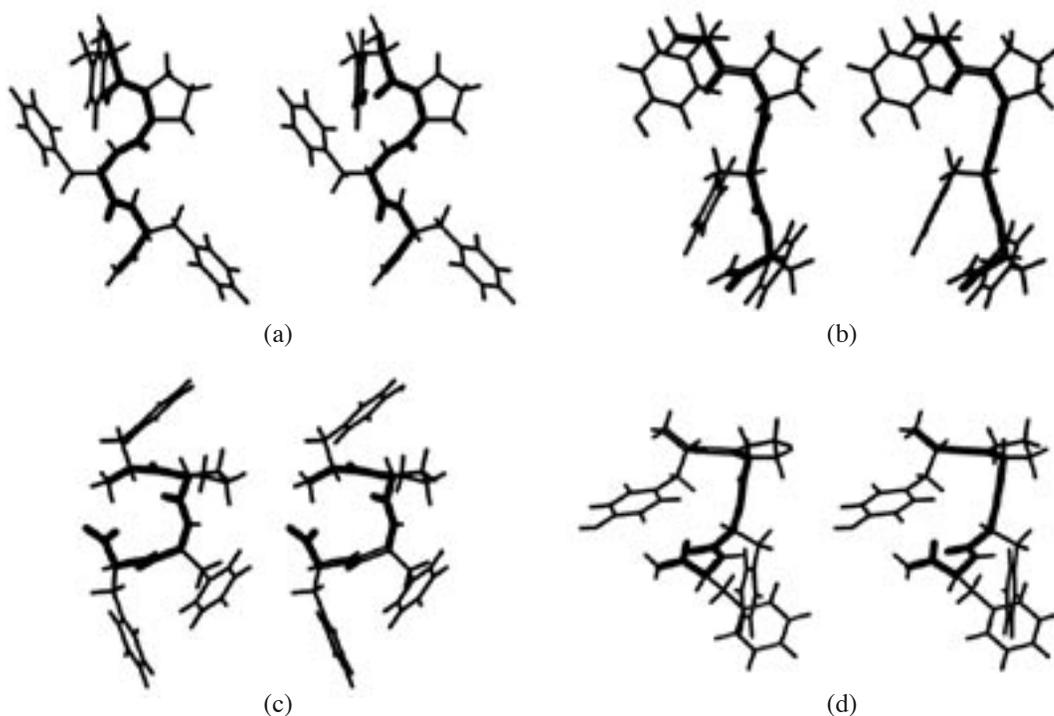


Figure 7. Stereoscopic Views of Representative Four-type Conformers: (a) rS-type Open Conformer of *tr*-EM2 in TFE, (b) n7-type Open Conformer of *tr*-EM2 in Water, (c) F1-type Folded Conformer of *cis*-EM2OH in DPC Micelles, (d) F2-type Folded Conformer of *tr*-EM2 in DPC Micelles

Table 3. Summary of Overall Conformational Characteristics of EM2 and EM2OH in DMSO, TFE, H₂O (pH 2.7 and 5.2), and DPC Micelles (pH 3.5 and 5.2)

	solvent electronic form	DMSO	TFE	H ₂ O		DPC	
				pH 2.7	pH 5.2	pH 3.5	pH 5.2
EM2		<i>cis:tr</i> = 1:2	<i>cis:tr</i> = 2:3	<i>cis:tr</i> = 2:3	<i>cis:tr</i> = 2:3	<i>tr</i>	<i>tr</i>
<i>trans</i>	neutral	open (rS=30)	open (rS=18, n7=4) fold(F2=8)	—		—	
	monocation	—	—	open (rS=18, n7=12)		open (rS=17, n7=4) fold (F1=1, F2=8)	
<i>cis</i>	neutral	open (rS=30)	open (rS=13, n7=7) fold(F2=10)	—		—	
	monocation	—	—	open (rS=7, n7=20) fold (F1=1, F2=2)		—	
EM2OH		<i>cis:tr</i> = 1:2	<i>cis:tr</i> = 1:1	<i>cis:tr</i> = 2:3	<i>cis:tr</i> = 1:1	<i>tr</i>	<i>cis:tr</i> = 1:2
<i>trans</i>	zwitter	open (rS=6, n7=12) fold (F1=7, F2=5)	open (n7=11) fold (F1=14, F2=5)	open (rS=4, n7=14) fold (F1=8, F2=4)	open (rS=21, n7=2) fold (F2=7)	open (rS=12, n7=9) fold (F1=1, F2=8)	fold (F1=30)
	monocation	—	—	open (rS=18, n7=10) fold (F2=2)	—	—	—
<i>cis</i>	zwitter	fold (F1=30)	fold (F1=30)	open (rS=16, n7=2) fold (F1=12)	open (rS=5, n7=7) fold (F1=18)	—	fold (F1=30)
	monocation	—	—	open (rS=30)	—	—	—

Open and fold represent the open and folded conformations. rS and n7 in parentheses indicate the reverse-S and numerical seven-like-open conformations; F1 and F2 represent the folded conformations in which hydrogen bond is formed and not formed between the N- and C-terminal polar atoms, respectively. The numbers following these symbols indicate the number of conformers that belong to the respective categories from a total of 30 conformers.

と共に Table 3 に示した。両者の顕著な違いは pH 依存性に見られる。即ち、EM2 は同一溶媒であれば pH の値に拘わらずケミカルシフト、*tr/cis*- の存在比は全く同じであったが、EM2OH は同一溶媒であっても pH が異なればケミカルシフト、*tr/cis*- の存在比は異なっていた。そして、EM2、EM2OH の *tr/cis*- の存在比は、溶媒の種類や pH の違いにより同じか、もしくは EM2 は *tr*-体が、EM2OH は *cis*-体が優位に存在する傾向にあることがわかった。

3-1-2. コンフォメーションの特徴

溶液中でのコンフォメーションの特徴として EM2 は溶媒の種類や *tr/cis*-, 電荷状態にかかわらず rS-type の open conformer が優位に存在し、同一

溶媒であれば pH の値が異なっても全く同じ NMR スペクトルを示すことから、pH の変化によりそのコンフォメーションはほとんど影響を受けていないということが考えられる。それに対して EM2OH は電荷状態に依存して open conformer に加えて folded conformer が共存し、特に *cis*-体では F1-type が優位なコンフォーマーとして存在していた。また、pH 3.5 の DPC micelles において EM2 同様ほとんどが *tr*-体として存在していたが、pH 5.2 では *tr* : *cis* = 2:1 の割合で共存していた。そして、コンフォメーションの差異が顕著に見られたのは生理的条件に最も近い pH 5.2 の DPC micelles 中で、EM2 は大部分が *tr*-体で open conformer がメジャーコンフォーマーとして存

在していたが、EM2OHは *tr/cis*-共に F1-type の folded conformer しか存在していなかった。

3-2. EM2OHの結晶構造解析

EM2OHの単結晶はNMRの測定条件と全く同じ pH 5.2の水溶液中から、蒸気拡散法により解析可能な無色透明の針状晶として得ることができた。解析の結果、得られた Crystal data 及び結晶構造をそれぞれ Table 4, Fig. 8 に示している。非対称単位中には結晶学的に独立な EM2OH 2 分子

(それぞれ Conformer A 及び Conformer B とする) と 7 個の水分子が存在していた。そして両分子共に zwitterionic form, Tyr1-Pro2 のペプチド結合が *cis*- 体の、溶液中でみられたメジャーコンフォーマーである F1-type の folded conformer を取っていた。また、水分子を介した水素結合が各コンフォメーションの安定化に大きく寄与していることが示唆された。

一方、X-線結晶構造解析から得られた結晶構造と、NMR スペクトルから得られた溶液構造の類似

Table 4. Summary of Crystal Data Collections and Structural Refinements

Crystal data	Refinement
formula: $C_{12}H_{16}N_4O_6 \cdot 3.5H_2O$	Refinement method: Full-matrix least-squares on F^2
formula weight: 635.70	number of parameters: 819
crystal habit: clear colorless needle	Final R -indices [$I > 2\sigma(I)$]: $R1=0.0699$ $wR2=0.1391$
crystal size: $0.6 \times 0.1 \times 0.01$	R -indices (all data): $R1=0.1114$ $wR2=0.1662$
space Group: $P2_1$	Largest diff. peak and hole, $e \text{ \AA}^{-3}$: 0.367 and -0.342
crystal system: monoclinic	Goodness-of-fit on F^2 : 1.068
$a=19.687(2) \text{ \AA}$, $\beta=101.370(2)^\circ$,	
$b=6.5058(7) \text{ \AA}$, $V=3248.3(6) \text{ \AA}^3$,	
$c=25.869(3) \text{ \AA}$, $Z=4$	
$F(000)$: 1356, $\mu(\text{Mo K}\alpha)$: 0.096 mm^{-1}	
Data Collection	
wavelength/Temperature: $0.7103 \text{ \AA} / 120 \text{ K}$	Index ranges: $-17 \leq h \leq 25$, $-8 \leq k \leq 8$, $-34 \leq l \leq 34$
$2\theta_{\text{max}}$: 56.54°	no. of reflections used for refinement ($I > 2\sigma(I)$): 9,580
no. of observed reflections: 20,743	
R_{int} : 0.0453	

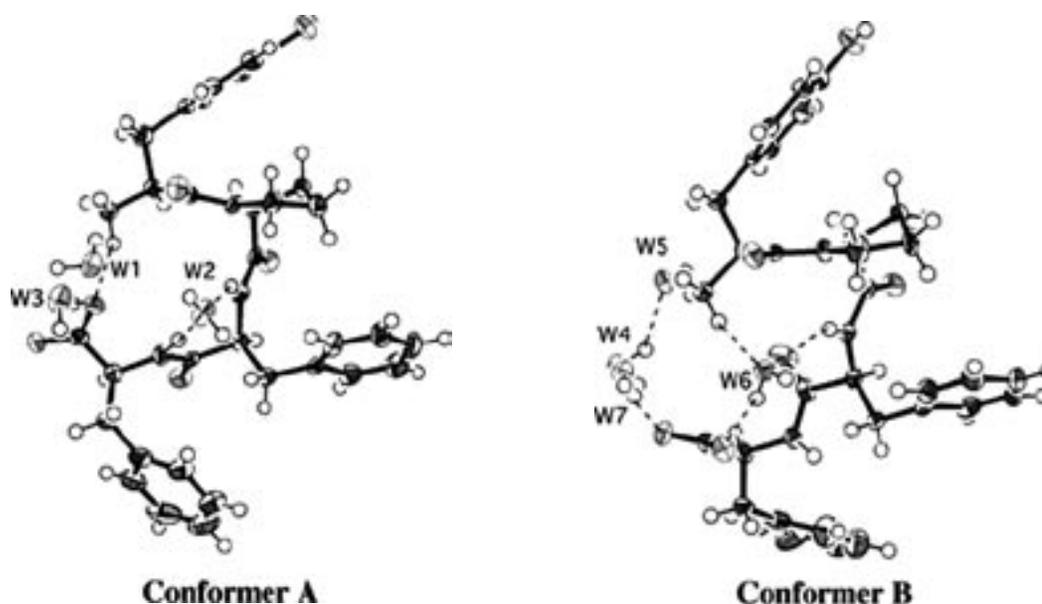


Figure 8. Stereoscopic Views of Conformers A and B Observed in the Crystal Structure of EM2OH, together with Hydrogen-Bonding Water Molecules
Intermolecular hydrogen bonds are shown by broken lines. The displacement ellipsoids are drawn at 70% probability level. The atomic numbering of water molecules is also given as W1 – W7.



Figure 9. Superimpose of EM2OH Conformers by X-ray Crystal Analysis and *cis*-EM2OH Ones in DPC Micelles (pH 5.2) by $^1\text{H-NMR}$ Spectra
Conformers of EM2OH by X-ray analysis and by $^1\text{H-NMR}$ spectra are represented by thick line and thin line, respectively.

性を調べるために、結晶構造の Conformer A, B と pH 5.2 の DPC micelles 中で得られた *cis*-EM2OH の 30 組の構造との重ね合わせを行った。その結果主鎖間の RMSD が約 0.6 Å と非常に相同性の高いコンフォメーションを示したことから (Fig. 9), F1-type の folded conformer が EM2OH の最安定構造の一つであることが考えられる。

3-3. μ -オピオイドレセプターモデル及び EM2 とのドッキングモデルの構築

以上の構造と活性相関の結果をふまえて、種々の溶液中で存在する EM2 のどのタイプのコンフォーマーが活性コンフォメーションとして適しているのかを検討する為、まず立体構造の明らかにされていない μ -オピオイドレセプターモデルを構築し、ついで EM2 との docking study からレセプター分子との相互作用様式を考察した。

Fig. 10 はアミノ酸配列によるオピオイドレセプターの構造模式図を示している。図に示すように、オピオイドレセプターは N-末端が細胞外領域 (EL: extracellular loop), C-末端が細胞内領域 (IL: intracellular loop) に位置し、7 個の膜貫通部位を有するロドプシンファミリーに属する受容体で、特に細胞外領域が各受容体のリガンド選択性に重要であるといわれている。そこで、これらの一次構造を基に μ -オピオイドレセプターに対してアミノ酸配列の相同性が極めて高く、X-線結晶構造解析

されている膜蛋白質 rhodopsin の立体構造を参照構造とし、DS Modeling のモジュールである自動ホモロジーモデリング Modeler⁴⁶⁾ を用いて立体構造未知の μ -オピオイドレセプターを構築した。得られたレセプターモデル及びリガンドとの binding に重要なアミノ酸残基を Fig.11 に示している。更に EM2 とのドッキングモデルを構築するために以下のことを考慮にいった。Fig. 10 及び Fig. 11 に示すように、既に Mosberg らによって μ -オピオイドレセプターの変換体を用いた実験から、^{47, 48)} EL2 : Glu229, TM3 : Asp147, Tyr148, TM6 : His297, TM7 : Trp318, Tyr326 の各領域のアミノ酸残基がリガンドとの binding に重要であることが明らかにされている。特に膜貫通領域の Asp147, His297 残基はオピオイドレセプター構造に、細胞外領域の Glu229 残基はリガンドの選択性に必須要素であるといわれている。また、内因性オピオイドペプチドの構造と薬理活性との関係については Schwyzer⁴⁹⁾ らによって提唱された “message-address concept” に基づいて論じられている。この概念によれば、リガンド側の Tyr のフェノール基とカチオン性の N-末端アミノ基が本来の薬理活性発現 (メッセージ: 活性発現部分) に、C-末端アミド基が各レセプタータイプに対する選択性発現 (アドレス: 選択性発現部分) に重要に関与している。これらのことを念頭に置いて、リガンドとして溶液構造解析より得られ

た EM2 の各コンフォーマーを用い、生体高分子モデリングソフト Insight II/Discover のモジュール Docking によりレセプターモデルとの種々の docking model を構築し、エネルギー極小化計算を行った。その結果、*tr*-EM2 の rS-type の open

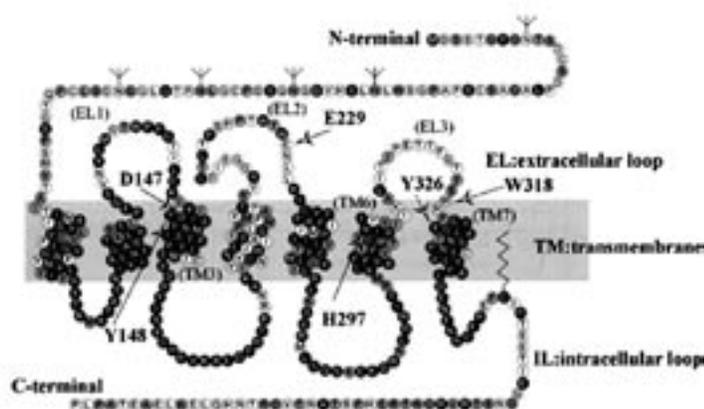


Figure 10. Structural Scheme of Opioid Receptor Alphabet and three letters indicate important amino acids residue for the interaction with ligand.

conformer との docking model がエネルギー的にも安定で最適であった。そのモデルのステレオ図及び両者の相互作用様式を Fig. 12, Table 5 に示している。この図からも明らかのように (Tyr1) NH \cdots OD2 (Asp147), (Tyr1) OH \cdots imidazole-N (His297),

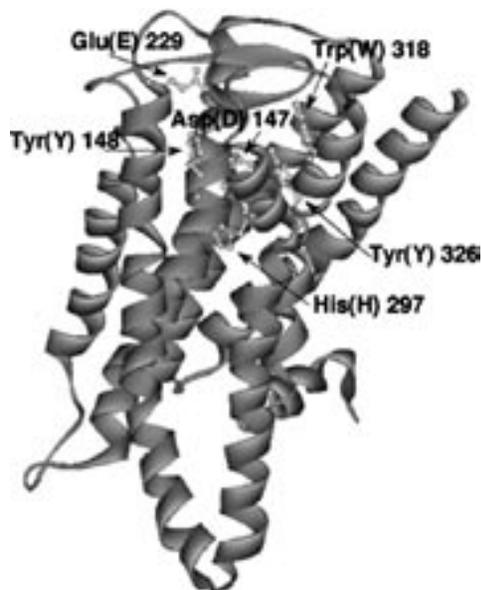


Figure 11. Constructed μ -opioid Receptor Model and Some Key Residues (black letter) at the Binding Pocket of μ -opioid Receptor



Figure 12. Stereoscopic View of Possible Docking of rS-type Open Conformer of EM2 (ball and stick model) on the Agonist Binding Site of the μ -opioid Receptor Structural Model (ribbon model)

The functional residues of the receptor for the interaction are shown by a ball and stick model. The hydrogen bonds or electrostatic interactions are represented by dotted lines.

Table 5. Interaction Mode of EM2 at The Binding Pocket of The μ -opioid Receptor

EM2	μ -receptor
Hydrogen bonds or electrostatic interaction	
Tyr1 NH	D147 OD2
Tyr1 OH	H297 imidazole-N
C-NH ₂	E229 OE
Tyr1 OH	A240 C=O
Tyr1 C=O	T218 OG1
Stacking interaction	
Tyr1	Trp293
Phe3, Phe4	Trp318

(C-末端 amide) NH \cdots OE (Glu229) 間の水素結合に加えて, (Tyr1) OH \cdots O=C (Ala240), (Tyr1) C=O \cdots OG1 (Thr218) 間においても水素結合あるいは静電的相互作用の可能性が示唆された. 更に, Trp293 と Trp318 のインドール環はそれぞれ Tyr1 及び, Phe3 と Phe4 の各芳香環との間でスタッキング相互作用を形成しており, EM2 がレセプター分子と結合する際の安定化に寄与していることが考えられる. 一方 C-末端にカルボキシル基を含むリガンドの間ではレセプター分子との binding サイト, 特にリガンドとの選択性に重要である Glu229 間でイオン間相互作用が働き, その結果親和性が減少することが示唆される.⁴⁹⁾

以上のことより, *tr*-EM2 の open conformer が C-末端アミド基を介したレセプター分子との相互作用に最も適していることが明らかとなった.

3-4. 小括

EM2, EM2OH の種々の溶液中でのコンフォメーション解析の結果, 共に Tyr-Pro ペプチド結合に関して *tr/cis*-体 が 1:1 ~ 2:1 の存在比で, 各々 2 type の open と folded conformer がそれぞれ単独あるいは両方が平衡に共存していた. また, コンフォメーションの特徴として, 活性体である EM2 は *tr/cis*-体かかわらず open conformer がメジャーコンフォマーとして存在しているが, 不活性体である EM2OH はそれに加えて *cis*-体では特に N-末端と C-末端との間で分子内水素結合を形成した folded conformer が多く見られた. 一方, EM2OH の X-線結晶構造解析の結果, 結晶学的に独立な 2 分子は共に溶液中で見られた folded conformer と極めて類似のコンフォメーションを有していることから, この conformer が EM2OH の最安定コンフォマーの一つであることが考えられる. これらのことから EM2 が種々の溶液中で優位に存在する open conformer が μ -オピオイドレセプターと結合する際の構造即ち活性コンフォメーションに適していることが推察された. そしてこのことは, rhodopsin の立体構造を雛形として構築した μ -オピオイドレセプターと EM2 とのドッキングモデルの考察から,

tr-EM2 の open conformer が C-末端アミド基を介したレセプター分子との相互作用に最も適していることから支持された.

4. おわりに

以上のことより, 生理活性ペプチドの活性発現に重要な C-末端アミド基はコンフォメーションの形成よりもレセプター分子との相互作用に重要に関与していることが示唆された. また, 本研究の溶液及び固体状態でのコンフォメーション解析の結果から得られた知見は, 生理活性ペプチドの機能発現時における C-末端アミド基の果たす役割を構造化学的に解明する上で有益なものであると思われる. 一方, C-末端アミド基を伴うアミド体には, 既述したように OH 体とは異なる水素結合様式や分子間相互作用様式が見られた. そのため, ペプチドのアミノ酸配列によっては特異的なパッキング様式を有し, これまで活性コンフォメーションであるといわれている構造を崩す可能性があることも示唆された. それ故 EM1, EM2 あるいは他の μ -opioid receptor ligand の結晶構造を明らかにすることは極めて興味深いことである. 更に今後は μ -opioid receptor の wild type 及び変換体を大腸菌等用いて大量発現し単離・精製に着手していくことを考えている. この方法が確立すれば, 最も直接的な手段である μ -opioid receptor と各種 ligand との複合体の結晶構造解析が可能となり, それらリガンドの活性コンフォメーション及びレセプターとの結合様式や相互作用様式等更に詳細な情報が得られるものと期待できる.

謝辞 本研究を遂行するにあたり終始懇意なる御指導御鞭撻を賜りました大阪薬科大学・石田壽昌教授に謹んで感謝の意を表します. また本研究をまとめるにあたり有益な御助言と御討論を頂きました大阪薬科大学・大石宏文講師, 友尾幸司講師に深く感謝致します. 本研究を進めるにあたり, NMR スペクトルの測定並びにその解析に際し数々の御教授と御助言を頂きました大阪薬科大学・箕

浦克彦助手, 神戸薬科大学・杉浦真喜子助教授, 上垣内みよ子講師に深く感謝致します。また各オピオイドペプチドの活性測定並びに数々の御助言と御討論を頂きました神戸学院大学・岡田芳男教授, 東北薬科大学・佐々木有亮教授, アメリカ国立環境健康科学研究所・Lawrence H. Lazarus 博士に感謝の意を表します。さらに本研究に御協力頂きました大阪薬科大学・薬品物理化学教室の卒業生に深謝致します。最後に本研究を行うにあたり各種ペプチドを御供与頂きました(財)サントリー生物有機科学研究所・南方宏之博士に謹んで御礼申し上げます。本研究の一部は科学研究費補助金(基盤研究(c))によって実施されたものであり, ここに厚くお礼申し上げます。

REFERENCES

- Ishida T., In Y., Inoue M., Yasuda-Kamatani Y., Minakata H., Iwashita T., Nomoto K., *FEBS Lett.*, **307**, 253-256 (1992).
- Ishida T., In Y., Doi M., Inoue M., Hamada Y., Shioiri T., *Biopolymers*, **32**, 131-143 (1992).
- Ishida T., In Y., Doi M., Inoue M., Yasuda-Kamatani Y., Minakata H., Iwashita T., Nomoto K., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **39**, 258-264 (1992).
- Ishida T., In Y., Fujikawa A., Urata H., Inoue M., Ikai K., Takesako K., Kato I., *Chem. Commun.*, **17**, 1231-1233 (1992).
- In Y., Doi M., Inoue M., Ishida T., Hamada Y., Shioiri T., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1686-1690 (1993).
- Fujikawa A., In Y., Urata H., Inoue M., Ishida T., Nemoto N., Kobayashi Y., Ikai K., Takesako K., Kato I., *Peptide Chemistry*, **1992**, 255-258 (1993).
- In Y., Doi M., Inoue M., Ishida T., Hamada Y., Shioiri T., *Acta. Crystallogr.*, **C50**, 432-434 (1994).
- In Y., Doi M., Ishida T., *Acta. Crystallogr.*, **C50**, 2015-2017 (1994).
- Fujikawa A., In Y., Inoue M., Ishida T., Nemoto N., Kobayashi Y., Kataoka R., Ikai K., Takesako K., Kato I., *J. Org. Chem.*, **59**, 570-578 (1994).
- Ishida T., In Y., Shinozaki F., Doi M., Yamamoto D., Hamada Y., Shioiri T., Kamigauchi M., Sugiura M., *J. Org. Chem.*, **60**, 3944-3952 (1995).
- Shinozaki F., In Y., Doi M., Yamamoto D., Kamigauchi M., Sugiura M., Ishida T., Hamada Y., Shioiri T., *Peptide Chemistry*, **1996**, 405-408 (1997).
- Doi M., Shinozaki F., In Y., Ishida T., Yamamoto D., Kamigauchi M., Sugiura M., Hamada Y., Kohda K., Shioiri T., *Biopolymers*, **49**, 459-469 (1999).
- In Y., Ishida T., Takesako K., *J. Peptide Res.*, **53**, 492-500 (1999).
- In Y., Ishida T., Takesako K., *Peptide Science*, **1998**, 349-352 (1999).
- Yokokawa F., Sameshima H., In Y., Minoura K., Ishida T., Shioiri T., *Tetrahedron*, **58**, 8127-8143 (2002).
- Yokokawa F., Shioiri T., In Y., Minoura K., Ishida T., *Peptide Science*, **2002**, 41-44 (2003).
- Eipper B. A., Mains R. E., *Annu. Rev. Physiol.*, **50**, 333-344 (1988).
- Merkler D. J., *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 450-456 (1994).
- Suwan S., Isobe M., Yamashita O., Minakata H., Imai K., *Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 1001-1007 (1994).
- Imai K., Nomura T., Katsuzaki H., Komiya T., Yamashita O., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1875-1879 (1998).
- Yang Y. R., Chiu T. H., Chen C. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **372**, 229-236 (1999).
- Gentilucci L., Tolomelli A., *Curr. Topics Med. Chem.*, **4**, 105-121 (2004).
- Kulathila R., Merkle K. A., Merkle D. J., *Nat. Prod. Rep.*, **16**, 145-154 (1999).
- Varughese K. I., Srinivasan R., *Pramana.*, **6**, 189-195 (1976).
- Dalhus B., Gorbitz C. H., *Acta. Chem. Scand.*, **50**, 544-548 (1996).
- Ando O., Ashida T., Sasada Y., Kakudo M., *Acta. Crystallogr.*, **23**, 172-173 (1967).
- Koetzle T. F., Golic L., Lehmann M. S., Verbist J. J., Hamilton W. C., *J. Chem. Phys.*, **60**, 4690-4696 (1974).
- Ramanadham M., Sikka S. K., *Chidambaram R.*,

- Pramana.*, **1**, 247-259 (1973).
- 29) Kistenmacher T. J., Rand G. A., Marsh R. E., *Acta Crystallogr.*, **B30**, 2573-2578 (1974).
- 30) Blasio B., di Pavone V., Pedone C., *Cryst. Struct. Commun.*, **6**, 845-848 (1977).
- 31) Torii K., Iitaka Y., *Acta. Crystallogr.*, **B29**, 2799-2807 (1973).
- 32) Takigawa T., Ashida T., Sasada Y., Kakudo M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **39**, 2369-2378 (1966).
- 33) Shamala N., Venkatesan K., *Cryst. Struct. Commun.*, **1**, 227-229 (1972).
- 34) Koetzle T. F., Frey M. N., Lehmann M. S., Hamilton W. C., *Acta. Crystallogr.*, **B29**, 2571-2575 (1973).
- 35) Dow J., Jensen L. H., Mazumdar S. K., Srinivasan R., Ramachandran, G. N., *Acta. Crystallogr.*, **B26**, 1662-1671 (1970).
- 36) Smits D., Wiebenga E. H., *Acta. Crystallogr.*, **6**, 531-539 (1953).
- 37) Klein C. L., Cobbinah I., Rouselle D., Malmstrom Sr. M. C., Stevens E. D., *Acta. Crystallogr.*, **C47**, 2386-2388 (1991).
- 38) In Y., Tani S., Ishida T., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 374-381 (2000).
- 39) In Y., Fujii M., Sasada Y., Ishida T., *Acta. Crystallogr.*, **B57**, 72-81 (2001).
- 40) Steiner T., *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.*, **2**, 1315-1319 (1995).
- 41) Wahl M. C., Sundaralingam M., *Trend. in Biol. Chem.*, **22**, 97-102 (1997).
- 42) In Y., Ono H., Ishida T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 571-577 (2002).
- 43) Zadina J. E., Hackler L., Ge L. J., Kastin A. J., *Nature*, **386**, 499-502 (1997).
- 44) Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M., *Science*, **289**, 739-745 (2000).
- 45) In Y., Minoura K., Tomoo K., Sasaki Y., Lawrence H. L., Okada Y., Ishida T., *FEBS J.*, **272**, 5079-5097 (2005).
- 46) Fiser A., Sali A., Modeller: *Enzymol.*, **374**, 461-491 (2003).
- 47) Mosberg H. I., Fowler C. B., *J. Peptide Res.*, **60**, 329-335 (2002).
- 48) Mansour A., Taylor L. P., Fine J. L., Thompson R. C., Hoversten M. T., Mosberg H. I., Watson S. J., Akil H., *J. Neurochem.*, **86**, 344-353 (1997).
- 49) Schwyzer R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **297**, 3-26 (1977).