

## 2C14 アミド振動の $^{13}\text{C}$ 同位体置換シフトを用いた蛋白質二次構造解析：

### $\beta$ ターンと $\beta$ ストランドの区別

(東北大院薬) ○平松弘嗣・竹内英夫

**序** 蛋白質の機能と、構造および構造変化との関係を解明することは、生命現象を分子科学の視点から理解する上で重要である。この目的のために様々な実験が行われてきた。今日、蛋白質高濃度溶液や結晶を対象とした構造解析は原子座標の精度で可能である。しかしながら試料形態の制限から、凝集体や低濃度試料を対象とすることは困難である。病原性をもつ凝集体や、低濃度で生理活性を示すペプチドホルモンなど、構造機能相関を明らかにすべき興味深い蛋白質が多数存在することを考えると、これらを対象とした新規構造解析法を開発することは意義深い。

凝集体や低濃度試料に対して利用可能な実験手法の一つに振動分光法が挙げられる。中でも、特定の残基に施した同位体置換がスペクトルに与える影響（同位体置換シフト）の解析は、置換残基の構造に関する知見を得るための有力な方法であり、これまで幅広く利用されてきた。振動スペクトルのうち、赤外吸収スペクトルに現れるアミド I バンドの振動数は二次構造の種類によって顕著に異なることが知られている。そこで、蛋白質中のある残基の主鎖  $\text{C}=\text{O}$  基を  $^{13}\text{C}$  同位体置換することで、新たに現れる  $^{13}\text{C}=\text{O}$  バンドあるいは消失する  $^{12}\text{C}=\text{O}$  バンドを解析することにより、被置換残基がどの二次構造に含まれるかに関する情報が得られると期待される。本研究では  $\beta$  ストランドとターンを対象とし、赤外吸収スペクトルに現れる同位体シフトを解析した。

**実験** 20 mM リン酸緩衝液(pH 6.0)中  $7^\circ\text{C}$  で二次構造が  $\beta$  ストランドとターンを含む 12 残基のペプチド HP7 [ $^1\text{KTWNPATGKWTE}^{12}$ ]に関して[1]、主鎖  $\text{C}=\text{O}$  基が全て  $^{12}\text{C}=\text{O}$  からなるもの、および  $^{13}\text{C}$  同位体置換が W3, P5, A6, W10 に施されたもの(それぞれ W3\*, P5\*, A6\*, W10\*と呼ぶ)を合成した。20 mM 重水リン酸緩衝液(pD 6.0)に試料を溶解し、試料濃度 0.5 mg/ml として  $5^\circ\text{C}$  で赤外吸収スペクトルを測定した。

**結果・考察** 各試料の赤外吸収スペクトルを図 1 A に示す。HP7 の赤外吸収スペクトル(黒線)には  $1640\text{ cm}^{-1}$  周辺にアミド I バンド、 $1589\text{ cm}^{-1}$  と  $1560\text{ cm}^{-1}$  にそれぞれ C 末端  $\text{COO}^-$  基と Glu 側鎖  $\text{COO}^-$  基の逆対称伸縮振動バンドが観測された。各同位体置換種と HP7 のスペクトルの差(図 1B)には正負のピークを持つ特徴的な波数シフトが観測された。いずれの場合も  $\sim 1597\text{ cm}^{-1}$  に現れた正

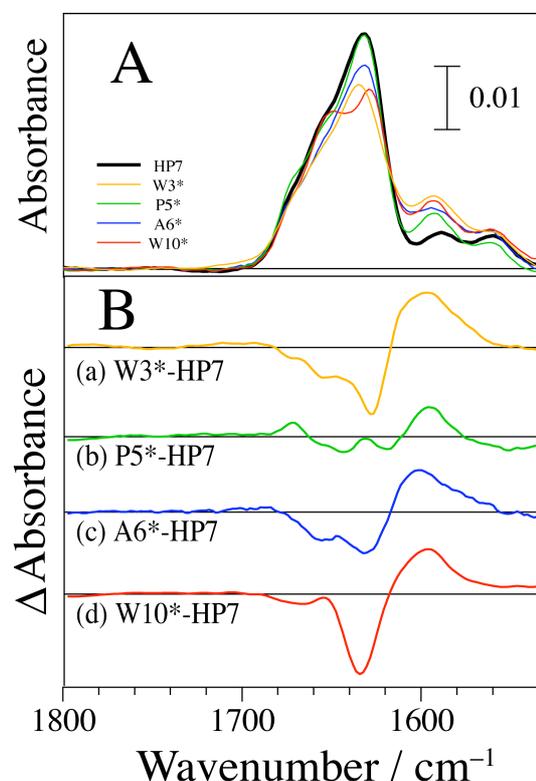


図 1 A;赤外吸収スペクトル、B;差スペクトル。(a) W3\*-HP7, (b) P5\*-HP7, (c) A6\*-HP7, (d) W10\*-HP7.

のピークは  $^{13}\text{C}=\text{O}$  伸縮振動に帰属される。このバンドの振動数は「 $\beta$  ストランドに含まれる残基 W3, W10」「ターンに含まれる残基 P5, A6」いずれの場合もほぼ一定であることから、アミド I 振動の力の定数はこれらの二次構造の間で大きく変化することはないと考えられる。一方、負のピークの形状は置換残基により異なっていた。すなわち  $\beta$  ストランドに含まれる残基(W3\*, W10\*)に同位体置換を行なった場合には  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  に極小を有する幅の狭い形状であることに對し、ターンに含まれる残基では、P5\*の場合  $1620\text{ cm}^{-1}$  と  $1645\text{ cm}^{-1}$  に、また A6\*の場合  $1632\text{ cm}^{-1}$  と  $1659\text{ cm}^{-1}$  に浅い極小を持つ形状であった。

波数シフトの原因を解明するため、力の定数 (F 行列対角要素)、遷移双極子相互作用 (F 行列非対角要素)、および同位体効果 (G 行列対角要素) を考慮して赤外スペクトルを計算した[2]。固有値と固有ベクトルから半値半幅  $10.8\text{ cm}^{-1}$  のガウス関数を仮定して求めた同位体シフト計算結果 (差スペクトル、図 2) は、実測差スペクトル (図 1) の「W3\*と W10\*に見られた線幅の狭い負のピーク」「P5\*と A6\*に見られた2つの浅い負のピーク」「 $1600\text{ cm}^{-1}$  周辺に現れる正のピーク」をよく再現した。各振動モードの振動形 (図 3) の解析から、 $\beta$  ストランドとターンで振動モードがよく分離されていること ( $\beta$  ストランド部位とターン部位の  $\text{C}=\text{O}$  基のなす角度が直角に近く遷移双極子相互作用が小さいため)、および各々の部位の振動強度分布に相違があること ( $\beta$  ストランド部位の振動は  $1644\text{ cm}^{-1}$  バンドに強度が集中、ターン部位では強度の集中なし)、が分かった。これが、 $\beta$  ストランドとターンで異なる同位体シフトが見られた理由であると考えられる。

一般にターン部位に含まれる  $\text{C}=\text{O}$  基は、その前後の  $\beta$  ストランド部位の  $\text{C}=\text{O}$  基とねじれの位置にあるため、各々の部位を同位体置換することにより今回と同様の同位体シフトが現れると期待される。つまり本実験は、蛋白質構造中の  $\beta$  ストランド部位およびターン部位を検出するための手掛かりをもたらすと考えられる。

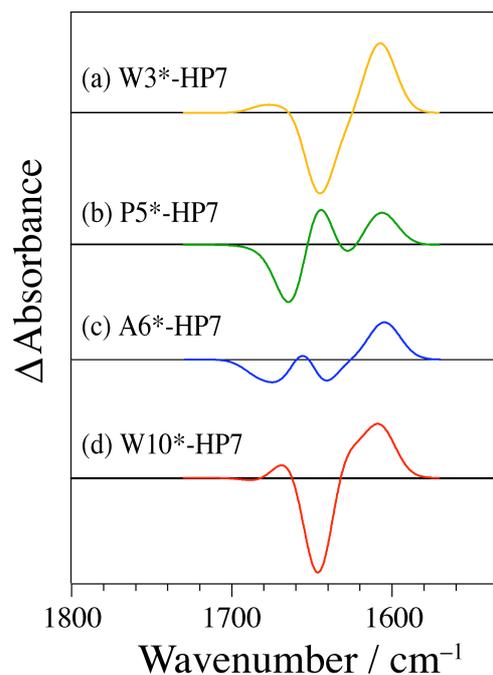


図 2 差スペクトル 計算結果

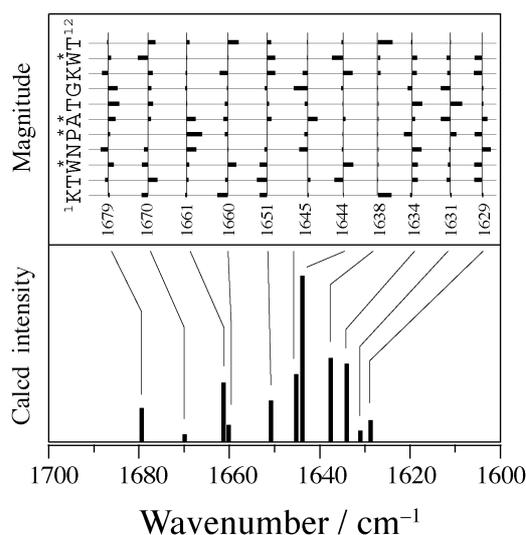


図 3 上段：振動モードごとの各残基の振幅  
下段：赤外スペクトル計算結果