

二次元 NMR およびレプリカ交換 MD によるモデルペプチドのアルコール変性機構の研究

(福岡大理*,産総研**) 吉田 亨次*, Sergey KRISHTAL*, 藤永 丈晴*, 李 相男*, 根本 直**, 金澤 健治**, 山口 敏男*

【序】アルコールは多くのタンパク質やペプチドの α -ヘリックス構造を安定化するので、タンパク質工学分野ではアルコール-水混合溶媒は α -ヘリックス構造を制御する試薬としてよく用いられている。近年、アルコールによる α -ヘリックス構造の安定化は溶媒の誘電率だけでは説明できないことが明らかになっている[1]。一般に、アルコールの疎水基が大きいほど、また、脂肪族アルコールよりフッ素系アルコールのほうが、 α -ヘリックス構造の安定化には大きく寄与する。我々は、これまでアルコール-水混合溶媒についてX線回折や中性子小角散乱測定によりマイクロスコピックやメゾスコピック構造を決定してきた。その結果、正四面体状の水クラスター構造から鎖状のアルコール本来の構造への液体構造の転移が起こるアルコール組成、また、濃度ゆらぎが極大になるアルコール組成は、アルコールの疎水基が大きくなるほど、水リッチ側にシフトすることがわかった。これは、溶媒のクラスター構造と α -ヘリックス構造の安定化にはよい相関があることを示している。そこで本研究では、モデルペプチドとして Full Sequence Design-1 (PDB ID:1FSD)の一部である 10 残基ペプチド(ELRDFIEKFK)を合成し、エタノール(EtOH)-水混合溶媒中で NMR 測定を行った。また、同様の系についてレプリカ交換分子動力学 (REMD) 計算を行い、ランダム構造から α -ヘリックス構造への転移における溶媒環境の役割を考察した。

【実験】ペプチドの合成と精製 10 残基ペプチド (ELRDFIEKFK) の合成は、バッチ式 Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相合成法で行った。433A peptide synthesizer (Applied Biosystems) を使用した。Fmoc-Lys(tBoc)-PEG-PS 樹脂を出発物質とし、結合剤として HBTU、HOBT、DIEA を用いた。得られた粗ペプチドについて、C18 カラム(内径 20 mm、カラム長 250 mm)を用いて、逆相 HPLC で精製を行った。

NMR 測定 INOVA600 分光計 (Varian) を用い、ペプチドの濃度は 1-2 mM で測定した。TOCSY 実験は、150 ms、NOESY 実験は、100, 300, 500, 700 ms のミキシングタイムで行った。全ての 2 次元スペクトルは、8000 Hz のスペクトル幅、2048 x 256 データポイントで測定した。

REMD 計算 10 残基ペプチドの座標は Protein Data Bank に登録されている FSD-1 の座標を引用した。水のモデルは TIP3P、EtOH のモデルは OPLS-AA を用い、プログラムは Amber9、温度は 250 ~ 650 K (32 レプリカ)、経過時間は 1 ns (時間ステッ

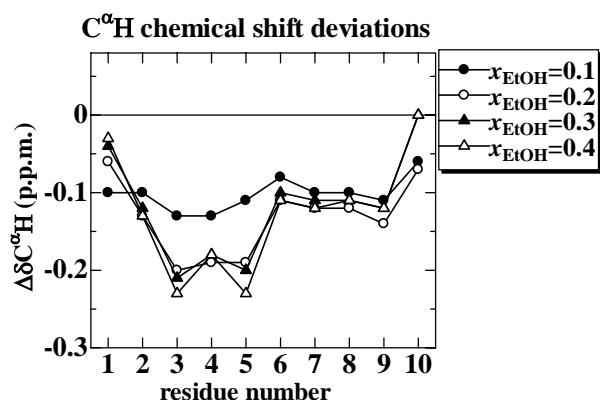


Fig. 1. The $C^{\alpha}H$ chemical shift deviations from that in pure water for 10-residue-peptide in EtOH-water mixtures.

プ1 fs)で行った。

【結果と考察】NMR 測定 Fig.1は水中における $C^{\alpha}H$ 化学シフトから EtOH-水混合溶媒中での値を差し引いたものである。 x_{EtOH} 0.2では3~5番目の残基である R3-D4-F5において高磁場シフトが観測され、 α -ヘリックスへの構造転移が示唆される。 x_{EtOH} の増加に伴い、2から3残基先でのNOEが観測された。特に、E7(NH) D4($C^{\alpha}H$)、D4(NH) E1($C^{\gamma}H$)、D4(NH) E7($C^{\beta}H$)、D4(NH) E7(NH)のシグナルは、Asp 残基を中心とした α -ヘリックス構造への転移を示唆する。このことは、 $C^{\alpha}H$ 化学シフト偏差から得られた結果(R3-D4-F5を中心とした構造転移)と一致した。

REMD 計算 $x_{EtOH}=0, 0.4, 1$ の組成で計算を行った(fig.2)。水中における計算結果(a)は、実験と同様にランダム構造であることがわかる。 $x_{EtOH}=0.4$ (b)および1(c)では、E1-D4-E7の接近が見られ、N末端側で α -ヘリックスへの構造転移が観測された。このことは、NMR 測定の結果とよく一致した。また、 $x_{EtOH}=0.4$ では両末端、E1(CO_2H)、K10(NH_3^+)基の近傍では水分子が、逆に Phe 基、Ile 基などの疎水基の周辺では EtOH 分子が多く存在していることがわかった。このように、ペプチド近傍において選択的溶媒和が観測された。ペプチド各残基と溶媒との水素結合数を調べると、EtOH 濃度が増加するにつれて、ペプチド中心部で溶媒との水素結合数が減少して、ペプチド分子内水素結合が形成されやすくなり、その結果、ヘリックス構造が形成されると考えられる。

参考文献

[1]D. Hong, M. Hoshino, R. Kuboi, Y. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8427 (1999).

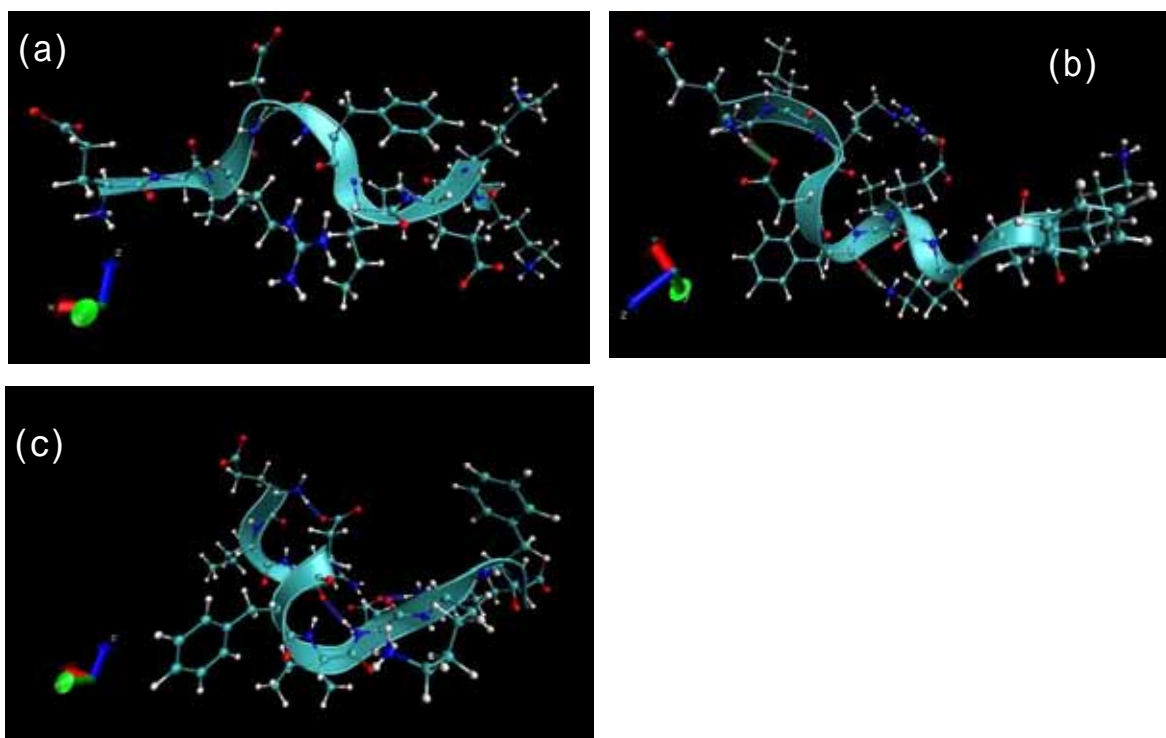


Fig.2. Snapshot of 10-residue-peptide in (a) pure water, (b) 40 mol% ethanol, and (c) pure ethanol.