

1P088

¹³C 同位体置換赤外吸収法を用いたペプチド構造解析

(東北大院薬) ○平松弘嗣・竹内英夫

序 赤外分光法は分子構造解析の有力な手段の一つである。蛋白質を始めとする生体分子の研究において、赤外分光法が幅広く用いられてきた。ペプチド主鎖 C=O 基の伸縮振動 (アミド I) バンドの振動数はペプチド主鎖の二次構造とよい相関を示す。すなわち α ヘリックス、 β シート、ターン、等の二次構造ごとに、アミド I バンドの振動数が異なる。この関係を利用して、アミド I バンドの形状解析 (フィッティング解析によりアミド I バンドを構成要素に分解し、ピーク振動数で分類した上で、各領域のバンドの面積強度を比較する、という手順を含む) により蛋白質に含まれる二次構造含有率の解析が行われてきた。

多くの蛋白質は数十~数百残基を含む巨大な分子であるが、そのうちの特定の数残基が生理活性に重要な役割を果たす例が多々見られる。「特定残基の構造」の解析が可能になれば、生理活性発現に伴う構造変化のうち注目する残基のみの挙動を詳細に解析することが可能になる。この目的には ¹³C 同位体ラベル法が有用である。¹³C 同位体ラベルにより生じるスペクトル変化の解析法確立のために、従来 α ヘリックスや β シートなど規則的な二次構造を持つモデルペプチドが用いられてきた。一方、バルジ、ヘアピン、ループ、など繰り返しを持たない構造に関しては未解明の点が多い。本研究ではヘアピン構造を持つペプチドに同位体ラベルを行い、ヘアピン残基の同位体シフトがどのような特徴を有するか検証した。

実験 12 残基のペプチド HP7 (Scheme 1, PDB ID: 2EVQ) は水溶液中で安定な β ヘアピン構造を持つペプチドである。主鎖カルボニル基が全て ¹²C=O を含むペプチド、ならびに T2, W3, P5, A6, T7, G8, W10, T11 の位置にそれぞれ ¹³C=O を含むペプチドを合成した。赤外スペクトル測定条件は 0.5 mg/ml 重水溶液 (pD 6.0, 20 mM リン酸バッファー, 278K) とした。

同位体シフトの解析のため、アミド I 振動子の空間分布、力の定数、および振動子間相互作用を考慮して赤外スペクトルの計算を行った。アミド I バンドを与える (Glu12 以外の) 11 残基のうち、10 残基はアミド結合、1 残基はイミド結合 (Asn4-Pro5; 以下 imide) である。前者を二面角および分子内水素結合の有無によりさらに分類すると「 β ストランド相当の二面角をもち C=O が分子内水素結合に参与する残基 (Thr2, Lys9, Thr11; 以下 H-bonded β)」「 β ストランド相当の二面角をもち C=O が分子内水素結合に参与しない残基 (Lys1, Trp3, Trp10; β)」「ヘリックスに相当する 2 面角を持つ

配列	KTWNPATGKWTE
二次構造	-ssshhhss-
分子内水素結合	- \sqrt - \sqrt ----- \sqrt - \sqrt -
[s:strand, h: helix]	

表 計算に用いたパラメータ
力の定数 (単位 mdyn Å⁻¹ amu⁻¹)
 $f_{ii}(\alpha) = 1.604$; $f_{ii}(\text{imide}) = 1.560$;
 $f_{ii}(\beta) = 1.603$; H-bond => x 1.015.
C=O 結合と振動遷移モーメント(μ_T)の角度*
 $\angle\{\text{C=O}, \mu_T^{\text{amide}}\} = 22.143^\circ$
 $\angle\{\text{C=O}, \mu_T^{\text{imide}}\} = 17.723^\circ$
同位体ラベルでの換算質量変化: 0.9518 倍†
振動遷移モーメントの位置 G
C=O 結合軸上; CG:GO = 7:3

* Ala-Ala および Gly-Pro の振動数計算から求めた値 (Gaussian03, B3LYP/6-31G**).

† Ala-Ala と Ala*-Ala の赤外スペクトルから求めた値。

残基(Pro5, Ala6, Thr7, Gly8; 以下 α)」に分類できる。これらの分類ごとに力の定数が異なるものとした。アミド I'領域に現れる他の赤外吸収バンドとして Asn4 側鎖 C=O 伸縮振動バンド[1650 cm^{-1} 、重水中]、C 末端と Glu12 側鎖の COO⁻逆対称伸縮振動バンド[各々 1591, 1562 cm^{-1}]を考慮した。振動カップリングは遷移双極子相互作用によるものとした。用いたパラメータを表に示す。

結果・考察 HP7 および同位体ラベルを行った試料の赤外スペクトルの測定結果 (図 1 左、実線) および差スペクトル (図 1 右、実線) を示す。ラベルを行った残基により異なる同位体シフトが観測された。差スペクトルに現れた正負のピーク (それぞれ $^{13}\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動の出現および $^{12}\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動モードの変化による) の特徴を解析した。

$^{13}\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動バンドの振動数は、C=O 基が分子内水素結合受容体である残基 (T2*および T11*) の場合 1608 cm^{-1} であり、その他の場合 (1599 \pm 3 cm^{-1}) より高波数に現れることがわかった。 $^{12}\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動バンドに関して、HP7 吸収極大値(A_{peak})に対する差スペクトル極小値 (ΔA_{min})から求めた強度減少率 ρ ($= \Delta A_{\text{min}}/A_{\text{peak}}$)は、 β ストランドの場合分子内水素結合の有無によらず、 $-24 \pm 3 \%$ であった。これに対し P5* (-7%)と A6* (-12%)においては ρ が小さいことが見いだされた。差スペクトルの極小ピーク振動数に置換残基二次構造との明確な関連は見られなかった。

蛋白質中のアミド I'振動子の力の定数およびその相互作用を考慮して赤外スペクトルの計算を行った (図、点線および棒グラフ)。振動形解析の結果から、二次構造ごとの同位体シフトの相違は、同位体効果が現れる振動モードの相違によるものと説明される。P5*, A6*において $\Delta A/A$ が小さい理由として (i) ヘアピン残基の振動モードが広い波数範囲に分布しているため増減が相殺したこと、(ii) 大きな強度を持つ β ストランド残基の振動バンドの強度変化に影響しなかったこと、が挙げられる。また、分子内水素結合に関与する $^{13}\text{C}=\text{O}$ 基の振動バンドがその他の場合より 10 cm^{-1} 程度高波数に観測されたことは、アミド I'振動の力の定数が 15%増加したことに起因すると考えられる。これらの結果は、 β ストランドとヘアピンの区別および β ストランドに含まれる残基の分子内水素結合の有無の判定に有用と期待される。

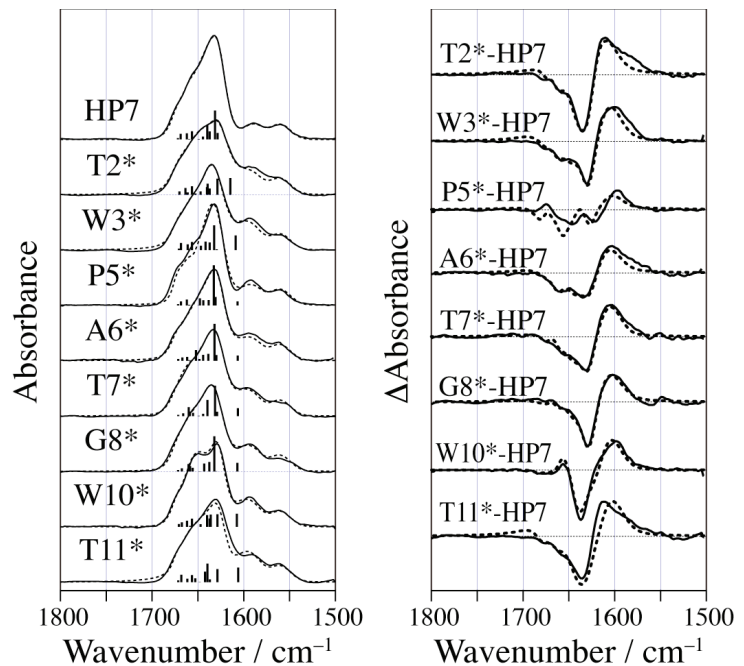


図 HP7 および ^{13}C 置換体の赤外スペクトル (左) および同位体シフト (右)。実線: 測定結果、点線&棒グラフ: 計算結果。