

## テラヘルツ時間領域分光によるポリグルタミン酸の低振動ダイナミクス

(神戸大・分子フォト<sup>1</sup>、神戸大院・理<sup>2</sup>) 山本直樹<sup>1</sup>、神原大<sup>1</sup>、田村厚夫<sup>2</sup>、富永圭介<sup>1,2</sup>

【序論】タンパク質は多数のアミノ酸が共有結合して連なり、各種分子間力を利用して特定の立体構造を形成することにより機能発現する。タンパク質分子内には  $100\text{cm}^{-1}$  以下の波数領域に原子の集団運動に由来する多数の低振動モードが存在することが知られており、機能発現にはそれらの振動モード間を遷移する、大きな構造変化を伴う非調和的な”動力学転移”が重要であることが示唆されている<sup>1</sup>。従って動力学転移のメカニズムを理解することはタンパク質の機能発現機構を理解する上で重要である。これまで動力学転移はタンパク質の立体構造に関係なく水和量にのみ依存すると考えられてきたが、2次構造レベルで大きく構造変化させた際にその挙動が構造にどのように依存するかはわかっていない。そこで本研究では低振動領域におけるダイナミクスをモニターすることができるテラヘルツ分光法により、pH および温度条件によりランダムコイル、 $\alpha$ -helix および  $\beta$ -sheet の3種類の2次構造を形成することが知られているポリグルタミン酸の、低振動吸収スペクトルの水和依存性を調べた。

【実験】分子量約 8,000 および 64,000 のポリグルタミン酸を超純水に 3mg/ml となるよう溶解させ、濃塩酸溶液を添加することにより pH7 および 4 に調整し、ランダムコイルおよび  $\alpha$ -helix 構造を得た。また 10mg/ml となるよう溶解させて pH4 に調整したのち  $95^{\circ}\text{C}$  で 2 日間インキュベートさせることにより  $\beta$ -sheet 構造を得た。各サンプルを凍結乾燥することにより粉末状態の試料を得た。THz 分光器はモードロック Ti:sapphire レーザーを用いた時間領域分光計 (Aispec) を用い、測定室の相対湿度はドライエアーを流入させることにより 8% 以下に保った。試料測定の際は、粉末試料を圧力 9MPa によりペレット状にしたものを用い、水和量の変化は乾燥ペレットを各種無機塩類の飽和溶液とともに制限空間に任意時間放置することで達成した。ATR FT-IR 測定により各サンプルがペレット状態でも水溶液中と同様の2次構造を保持していることを確認した。温度変化測定はペレットをセルホルダとともに液体窒素に直接漬けることにより温度を  $-194^{\circ}\text{C}$  まで低下させたのち測定室にセットし、自然に室温に戻る間の任意温度において素早く時間領域スペクトルをスキャンすることにより行った。

【結果および考察】室温において各試料の乾燥状態での吸収スペクトルを測定したところ、分子量の大小および2次構造の種類に関わらず、振動数の増大に伴って単調増加的に吸光係数が増加するスペクトルを与えた(図 1)。いずれの振動数においても分子量の増大に伴う吸光係数の変化はほとんど見られなかった。2次構造間で比較すると、 $\alpha$ -helix と  $\beta$ -sheet の吸光係数はほぼ同じであった一方、ランダムコイルの値はそれらよりも大きくなった。従ってこの差異はランダムコイル状態ではグルタミン酸側鎖がマイナスに帯電していることによる双極子モーメントの増大に由来すると考えられる。また  $\beta$ -sheet 構造のスペクトルには、 $\alpha$ -helix には見られない  $37\text{cm}^{-1}$  の比較的ブロードなピークが確認された。 $\beta$ -sheet を形成することが知られているポリグリシンにおいても  $45\text{cm}^{-1}$  にピークが観測されており<sup>2</sup>、また理論計算により  $\beta$ -sheet 構造ではポリペプチドの分子間振動モードに由来する吸収帯が  $37\text{cm}^{-1}$  に観測されると予測されていることから<sup>3</sup>、今

回観測されたピークも同様の振動モードに由来するものであると考えられる。理論計算では $\alpha$ -helix においても低振動領域に吸収帯が存在すると予測されている一方で<sup>3</sup>、今回そのようなピークは観測されなかったことから、 $\beta$ -sheet 構造は $\alpha$ -helix 構造よりも秩序だった構造を形成している、すなわち結晶性が高いと考えられ、 $\beta$ -sheet 構造がしばしば数 100nm オーダーの線維構造体を形成することと矛盾しない。次にペレット試料を水和させて温度変化を行うと、いずれの試料においても水和量が増大するに従って 200-240K 以上の領域において吸光係数の増大に明らかな変曲点がみられ、またその変化の度合いは水和量の増大とともに増加した(図 2, MW 8,000 のものは掲載せず)。なお、水和量は  $h$  によって定義しており、タンパク質 1g 当たりの水和水の量 (g) を比率で表している。この急激な増大は温度上昇に伴い双極子モーメントが大きく変化するような振動が誘起されたことに由来すると考えられ、中性子散乱実験等により観測されている動力学転移に対応していると解釈することができる<sup>4</sup>。今回極端に異なる 3 種類の 2 次構造形成条件下においても水和により動力学転移が観測されたことは、タンパク質の動力学転移は構造に依存せず水和量のみ依存するという過去の観測例と矛盾せず<sup>5</sup>、動力学転移はタンパク質特有の立体構造に起因するのではなく水和水の運動により誘起されるものであるという考えを強く支持する結果である。

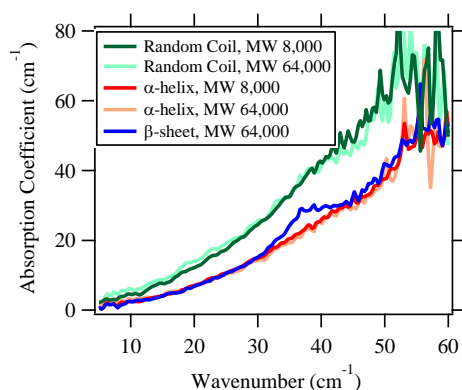


図 1. 各 2 次構造におけるポリグルタミン酸の低振動領域吸収スペクトル

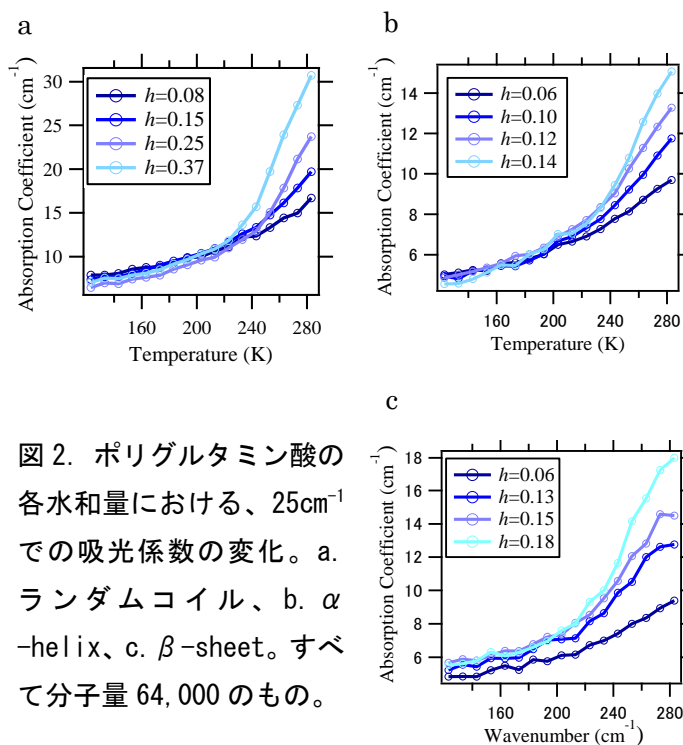


図 2. ポリグルタミン酸の各水和量における、 $25\text{cm}^{-1}$ での吸光係数の変化。a. ランダムコイル、b.  $\alpha$ -helix、c.  $\beta$ -sheet。すべて分子量 64,000 のもの。

1. Rasmussen et al., *Nature* **357** 423-424 (1992)
2. Yamamoto et al., *Biophys. J* (Letters) L22-L24 (2005)
3. Krimm, S. Peptides and Proteins in Biological Applications of Raman Spectroscopy. T. G. Spiro, editor. John Wiley & Sons, New York, NY. 1-45 (1987)
4. G. Zaccai, *Science* **288** 1604-1607 (2000)
5. Pei et al., *PRL* **101** 178103 (2008)