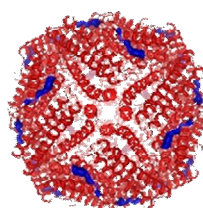


振動円二色性分光法による蛋白質の 二次構造にキラル転写された水和水の分光的検出

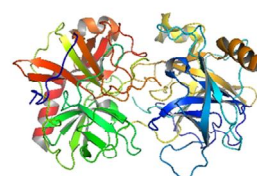
(東理大院総化) ○新井翔、今野光三、森作俊紀、由井宏治

【序】蛋白質は様々な高次構造を有し、その構造に基づき高度な機能を発現する。とりわけ、蛋白質を構成する α helix や β sheet などの二次構造は、構造形成・機能発現のための基本骨格であり、水環境中にさらされることで初めてその構造・機能が誘起される。そのため、構造や機能の発現機構の解明には、蛋白質の二次構造を水環境中で捉えることが必要不可欠である。これまで、蛋白質の二次構造を水環境中で捉えるために、円偏光と赤外吸収分光法を組み合わせた振動円二色性分光法 (VCD) が広く用いられている[1]。VCD では、左右それぞれの円偏光を高速で切り替え試料に照射し、その吸光度差を検出することによって、 α helix や β sheet のようなキラリティを有する構造由来の信号を選択的に抽出する。現在、水環境中にある蛋白質の様々な二次構造に起因した VCD スペクトルが測定されているが[1]、蛋白質の二次構造に水分子が水和したことで、二次構造がどのような構造的摂動を受けるかは未解明である。そこで本研究では蛋白質の水和レベルを変化させることで、蛋白質の二次構造が受ける構造変化および構造安定性について VCD を用いて明らかにすることを目的とした。

【実験】 α helix を支配的に持つモデル蛋白質として、24 量体の安定な球殻構造を形成し、生体に普遍的に存在する鉄貯蔵蛋白質アポフェリチン (α helix 含有率：74 %) を、 β sheet を支配的に持つモデル蛋白質として、膵臓から分泌される膵液に含まれる蛋白質分解酵素キモトリプシン (β sheet 含有率：36 %) を用いた (図 1)。5 mg / mL アポフェリチンまたはキモトリプシン / Tris-HCl 水溶液 (pH = 7.4) を準備し、CaF₂ 窓材上に滴下した。アポフェリチンに関しては、N₂ ガスによって乾燥後、室温で放置させ、水とフィルムを作製した。フィルム周辺の湿度を 20 – 50 % で変化させることでフィルムの水和レベルを制御し、VCD 測定を行った。一方キモトリプシンに関しては、N₂ ガスによって乾燥後、CaF₂ 窓材で挟み込むことで 65、30 % の水和レベルのフィルムを作製し、VCD 測定を行った。



PDB ID: 1aew



PDB ID: 1yph

図 1. アポフェリチン (左) とキモトリプシン (右) の立体構造

測定装置は Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。VCD 測定において、左右それぞれの円偏光は光弾性変調器 (PEM) を用いて 50 kHz で変調し、信号は MCT 検出器を用いて検出した。測定において、蛋白質の骨格構造 (-CO-NH-) を鋭敏に反映するアミド I (C=O 伸縮振動、波数領域 1,700 – 1,640 cm⁻¹)、アミド II (-NH-変角振動、波数領域 1,610 – 1,515 cm⁻¹) 領域に着目した。得られた VCD スペクトルの強度は、試料の左円偏光吸収 (A_L) と右円偏光吸収 (A_R) の吸光度差 ($\Delta A = A_L - A_R$) を表している。

【結果と考察】アポフェリチンフィルムの VCD スペクトルにおいて、アミド I 領域における $1,645\text{ cm}^{-1}$ の正のピーク強度が水和レベルの増加に伴い増加した (図 2)。さらに、そのピーク波数は水分子の -OH 変角振動の波数と一致した。これらから、 $1,645\text{ cm}^{-1}$ のピークは左円偏光活性を有する水和水に帰属された。ここで観測された水和水のキラリティは、本来アキラリな水分子がアポフェリチンを構成する α helix に水素結合したことで、 α helix からキラリティが転写 (キラリ転写) され誘起されたものと思われる。近年、キラリな小分子と水素結合した水分子にキラリティが転写されたケースが報告されたが[2]、蛋白質のような巨大分子については報告例はなく、今回、蛋白質のキラリ転写された水和水の同定に初めて成功したものと考えられる。アミド II 領域においても水和レベルの増加に伴い $1,539\text{ cm}^{-1}$ の正のピークの強度が増加した (図 2)。この波数はペプチド骨格由来の -NH- 基の変角振動と一致しており、そのピーク強度の増加は -NH- 基の N 原子の非共有電子対を介した水分子との水素結合によるものと推定され、水和サイトについての情報を有していると考えられる。

一方、キモトリプシンフィルムの VCD スペクトルにおいても、水和レベルの増加に伴い $1,650\text{ cm}^{-1}$ にキラリ転写された水和水が観測された (図 3)。またアミド II 領域においても、アポフェリチンと同様、ピークの一部の偏光活性が右回りから左回りに反転した。ただし、これらの変化は α helix が主体であるアポフェリチンに比べて微弱であることから、 β sheet 由来のキラリ転写した水和水というよりは、11% 程度含まれる α helix 由来であると考えている。

また、水和レベルの上昇によるアミド II 領域全体の低波数側へのピークシフトは、水分子が -NH- 基に水和したことで、 -NH- 基のバネ定数が小さくなり、蛋白質の二次構造の安定化に寄与するペプチド鎖間の -NH- 基と -C=O 基間との水素結合が弱くなったことに起因すると考えている。

[1] Ganesh, S. and Prasad, L. P. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 10292 (2004).

[2] Yang, G. *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 130, 164506 (2009).

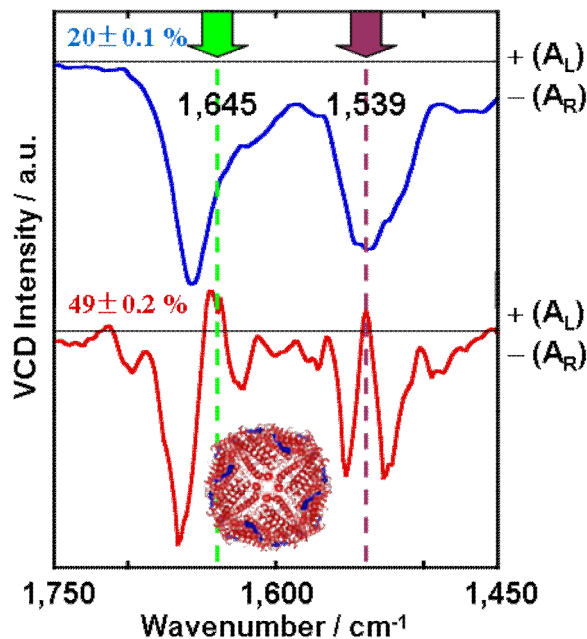


図 2. 湿度 20% (上) と 50% (下) におけるアポフェリチンフィルムの VCD スペクトル。

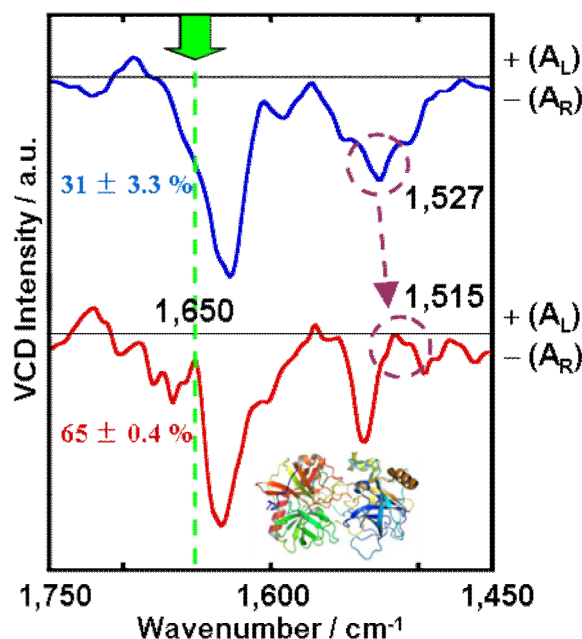


図 3. 湿度 30% (上) と 65% (下) におけるキモトリプシンフィルムの VCD スペクトル。