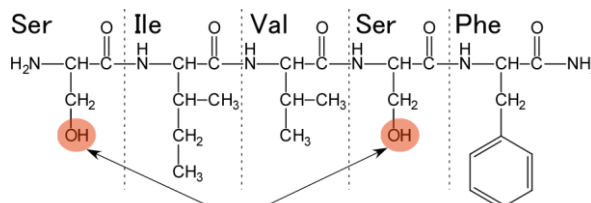


## 2A11 レーザー脱離・超音速ジェット法によるアドレナリン受容体タンパクの結合サイト部分ペプチドの電子・赤外スペクトル

(東工大・資源研) ○山田浩平, 石内俊一, Chakraborty Shamik, 藤井正明

**【序】** 神経伝達での分子認識過程は薬学や生理学の分野だけでなく、分子科学的にも興味深いテーマである。神経伝達において、神経伝達物質とその受容体は結合する相手を互いに精密に認識し、特異的に結合する。このことから神経伝達物質とその受容体は「鍵と鍵穴」の関係に



分子認識部位

Fig.1 SIVSF の構造式

例えられる。そのメカニズムを理解するために鍵や鍵穴の構造を詳細に調べることが不可欠である。当研究室では、極低温孤立気相状態において配座異性体（コンフォーマー）を分離・区別し、コンフォーマーの数とその構造を研究している。今までにアドレナリン等に代表されるカテコールアミン神経伝達物質（鍵側）の構造研究を行っているが、鍵穴となる受容体については未研究である。その理由は、受容体は G タンパク共役受容体と呼ばれる膜タンパクの一種で、分子量数万の巨大分子であり、これそのものに気相分光の手法を適用するのは非現実的だからである。しかし、リガンドとの結合サイトは極めて限られたアミノ酸残基であることが生化学的手法により示唆されている。そこで、リガンドとの結合に関与する部分配列だけを取り出して、これに気相分光の手法を適用することを着想した。本研究では、ヒトアドレナリン受容体タンパクの部分配列である 5 残基ペプチド Ser-Ile-Val-Ser-Phe (SIVSF) を取り上げた (Fig.1)。この部分配列はアドレナリンのカテコール OH 基との結合部位 (分子認識部位) として考えられており、2 つの Ser の OH 基がカテコール OH 基と水素結合を形成すると考えられている[1]。このペプチドに対しレーザー脱離・超音速ジェット法を適用し、極低温孤立気相状態で共鳴多光子イオン化 (REMPI) スペクトル、ホールバーニング (HB) スペクトル、IR dip を測定した。

**【実験】** SIVSF は不揮発性・熱分解性であるため、レーザー脱離法を用いた。カーボンブラックを混合した SIVSF をグラフィイトディスク側面に塗布し、そこに Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザー(1064 nm)を照射し、脱離・気化させた。これをパルス噴射した Ar ガス(よども圧:80 bar)で押し流し、超音速ジェット流を得た。ジェット中の SIVSF に紫外レーザーを照射し、REMPI 分光法により電子スペクトルを測定した。この方法では共存するコンフォーマーの電子遷移が同時に観測されるため、HB 分光法を用いてこれらを区別した(Fig.2)。第 1 の紫外レーザー( $\nu_p$ )を特定のコンフォーマーの電子遷移に固定してこのコンフォーマーのみを選択的に共鳴多光子イオン化する。イオン量は基底状態の分子数を反映しており、このイオン量をモニターしながら第 2 の紫外レーザー( $\nu_b$ )を  $\nu_p$  よりも時間的に前に照射し波長掃引する。 $\nu_b$  の波長が電子遷移エネルギーに一致すると、電子励起によって基底状態の分子数が減少してモニターしているイオン量が減少する。従って  $\nu_p$  によって生じるイオンを  $\nu_b$  の波数に対しプロットすると、 $\nu_p$  で選択した特定のコンフォーマーの電子遷移をイオン量の減少として抽出できる。次にこの特定したコンフォーマーに対して IR dip 分光法を適用し赤外スペクトルを測定した。

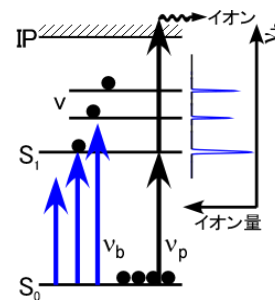


Fig.2 HB 分光法

原理は HB 分光法と同様であるが、焼き付け光の  $\nu_b$  を紫外レーザーから赤外レーザーに変更して赤外吸収をイオン量の減少として観測した。

【結果・考察】 SIVSF の  $S_1-S_0$  REMPI スペクトルを Fig.3a に示す。37648  $\text{cm}^{-1}$  に強いバンドが観測された。このバンドの低波数側では約 150  $\text{cm}^{-1}$  に渡ってバンドが確認されないため、これをバンドオリジンと帰属した。ここから高波数側の 50  $\text{cm}^{-1}$  の範囲に 4 本のバンドが観測された。複数のコンフォマーが共存するか否か検証するために  $\nu_p$  を 37648  $\text{cm}^{-1}$  に固定して HB スペクトルを測定した(Fig.3b)。REMPI スペクトルで観測された 4 本のバンド全てがこの HB スペクトルに観測されるため、これらのバンドは同一のコンフォマーに由来していることが分かった。即ち REMPI スペクトルには単一のコンフォマーのみが観測されることが分かった。

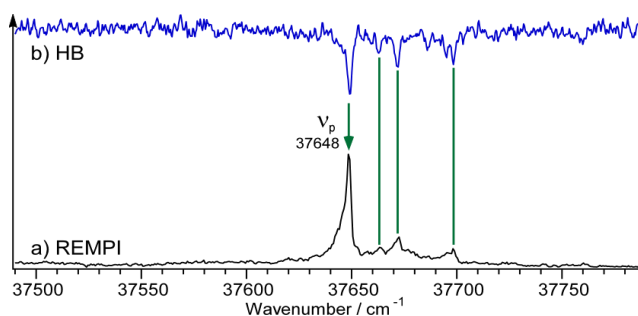


Fig.3 SIVSF の a)REMPI、b)HB スペクトル

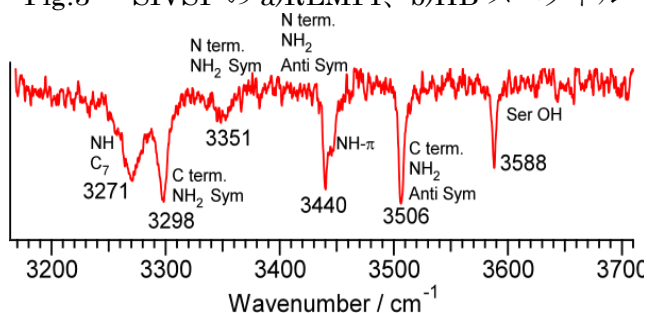


Fig.4 SIVSF の IR Dip スペクトル

このコンフォマーの IR dip スペクトルを Fig.4 に示す。NH,OH 伸縮振動領域にブロードなものを含め 6 本のバンドが観測された。最も高波数側に観測された 3588  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは、メタノールの水素結合していない自由な OH 伸縮振動が 3681  $\text{cm}^{-1}$ [2]、及びペプチド C 末端(amide)の自由な  $\text{NH}_2$  逆対称伸縮振動が約 3550  $\text{cm}^{-1}$  に観測される[3]ことから、Ser 残基の OH 伸縮振動であると帰属した。次に 3506  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは、3550  $\text{cm}^{-1}$  より低波数であること、及びペプチド鎖中(amide)の自由な NH 伸縮振動 (約 3490  $\text{cm}^{-1}$ [3]) より高波数であることから、強く水素結合した C 末端の  $\text{NH}_2$  逆対称伸縮振動と帰属した。また、逆対称伸縮振動のレッドシフトの度合いから C 末端の  $\text{NH}_2$  対称伸縮振動は 3298  $\text{cm}^{-1}$  のバンドであると推定した。3351  $\text{cm}^{-1}$  付近の弱いバンドは、 $\beta$ ターン構造の水素結合した NH 伸縮振動[3]と、ペプチド N 末端(amine)の  $\text{NH}_2$  対称伸縮振動[4]の可能性はあるが、強度が小さい点を考慮して、後者と暫定的に帰属した。これに基づいて 3440  $\text{cm}^{-1}$  のバンドを N 末端の  $\text{NH}_2$  逆対称伸縮振動と推定した。3271  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは、 $\gamma$ ターン構造の水素結合した NH 伸縮振動[3]であると推定した。3440  $\text{cm}^{-1}$  のバンドの高波数側に観測される肩は  $\text{NH}\cdot\pi$ 水素結合の NH 伸縮振動であると推定した。

以上の帰属を確認するために、分子動力学シミュレーション及び量子化学計算により最適化構造の探査と理論赤外スペクトルの計算を現在行っている。講演では実験結果と理論計算の比較により、SIVSF の構造を議論する予定である。

【参考文献】 [1] A.D. Strosberg, *Protein Science*, **2**, 1198 (1993). [2] G. Herzberg, *Molecular Spectra and Molecular Structures III*, Van Nostrand Reinhold: New York, 1996. [3] W. Chin, F. Piuze, I. Dimicoli and M. Mons, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 1033 (2006). [4] A. Abo-Riziq, L. Grace, B. Crews, M. P. Callahan, T. van Mourik, and M. S. de Vries, *J. Phys. Chem. A*, **115**, 6077 (2011).