

## 2P091

### テラヘルツ時間領域分光法によるポリペプチドおよび球状タンパク質の低振動ダイナミクス

(1 : 神戸大院理、2 : 神戸大分子フォト)

○ 金子 梓<sup>1</sup>、山本 直樹<sup>2</sup>、田村 厚夫<sup>1</sup>、富永 圭介<sup>1, 2</sup>

【序】タンパク質は機能を発現する際、しばしばその構造を大きく変化させる。この変化は、タンパク質内の原子が集団的に運動することで起こるが、この集団的な運動は水素結合や疎水相互作用、ファンデルワールス力などの弱い相互作用を媒介とした運動で、数十  $\text{cm}^{-1}$  程度の低振動運動に相当する。そのため、この波数領域のスペクトルを調べることで、タンパク質の機能に関する低振動運動について調べることができると考えられている。過去の研究<sup>1</sup>から、機能発現における低振動運動には、準安定構造間の遷移を誘起する非調和結合が重要であることが指摘されている。この非調和結合によりある温度より高いところでは、タンパク質の低振動運動の振幅が大きくなる(動力学転移)。このような動力学転移は、非弾性中性子散乱による平均二乗変位の測定で観測され、最近ではテラヘルツ時間領域分光法(THz-TDS)でも同様の現象が観測されている。この動力学転移は天然構造のタンパク質に限らず、ある程度の長さを持つポリペプチドやリフォールドしたタンパク質でも観測されることがわかった。今回、動力学転移と機能性タンパク質の構造の関係を調べるため、以下の二つの系について、低振動スペクトルの水和依存性と温度依存性を調べた。

① ミオグロビン (Mb、ホロ体) とアポ体(ヘム無し)

② リゾチームとそのジスルフィド結合を切断した変異体(CM-リゾチーム)

また、THz-TDSにより観測される運動は、選択律のため、原則的には非弾性中性子散乱で観測される運動とは異なる。最近、いくつかのポリペプチドについて非弾性中性子散乱を用いて動力学転移に及ぼす側鎖のメチル基の役割について議論された。そこで、以下のポリペプチドについて THz-TDS を用いて動力学転移を調べ、非弾性中性子散乱との相違について議論した。

③ ポリグリシン、ポリ-L-アラニン、ポリ-L-イソロイシン

以上、三つの実験について報告、議論する。

【実験】ホロ体に2-ブタノンを加えてヘムを抽出しアポ体を得た。また、リゾチームはグアニジン塩酸塩、DDTを加えてジスルフィド結合を還元し、ヨード酢酸を加えてカルボキシメチル化することでランダム状態のリゾチームの変異体の溶液を得た。テラヘルツ電磁波は水分子によって強く吸収されるため、タンパク質の溶液をそれぞれ凍結乾燥させ、ペレット状にした。このペレット状の試料は湿度を調整した容器内に数時間放置することで水和させた。テラヘルツ電磁波の発生、検出にはフェムト秒レーザーパルス(中心波長 800 nm)と光伝導アンテナを用いた。THz-TDSでは、試料を透過したテラヘルツ波と参照となる電磁波の電場の時間依存性を測定し(図1)、これをフーリエ変換することによりスペクトルを得ることができる。この電場の振幅の変化と位相の変化から試料の吸光係数と屈折率な

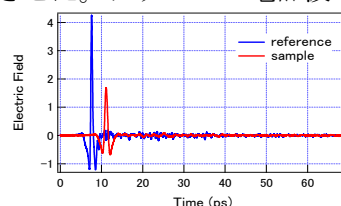


図1.電場の時間変化

どの物理量を求めることができる。

【結果と考察】 リゾチームについて、天然構造のものとジスルフィド結合を切断した変異体 (CM-リゾチーム) のペレットを水和量(水和量は  $h$  によって表し、タンパク質 1g あたりの水と水の量(g)で定義する)、 $-150^{\circ}\text{C}$  から  $0^{\circ}\text{C}$  まで温度を変化させて THz-TDS で測定し、吸光係数と屈折率のスペクトルを得た。吸光係数は波数とともに単調増加した。このスペクトルから式(1)を用いて、換算吸収断面積 (Reduced Absorption Cross Section : RACS) を定義した<sup>2</sup>。

$$\begin{aligned} \sigma_R(\tilde{\nu}) &\equiv \frac{\beta h c \tilde{\nu}}{\rho \ln 10 (1 - e^{-\beta h c \tilde{\nu}})} n(\tilde{\nu}) \alpha(\tilde{\nu}) \quad (1) \\ &= \frac{2\pi^2 c N_A}{3\epsilon_0 N} \beta \tilde{\nu}^2 \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i2\pi\tilde{\nu}t} \langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle \end{aligned}$$

ここで、 $\tilde{\nu}$  は波数、 $n(\tilde{\nu})$  は屈折率、 $\alpha(\tilde{\nu})$  は吸光係数、 $\rho$  は密度、 $c$  は光速、 $N$  は系の分子数、 $\mathbf{M}(t)$  は系の全双極子モーメントである。スペクトルの変化を記述する物理量として、RACS の強度に注目した。図 2 はリゾチームと CM-リゾチームを THz-TDS で水和量、温度を変化させて測定し、それぞれ RACS を求めた結果で、水和量が最少、最大のものをそれぞれ示した。このグラフからリゾチーム、CM-リゾチームともに RACS が温度とともに大きくなっており、その変化量は水和させたリゾチーム、CM-リゾチームの RACS の方が大きいことがわかる。図 3 は特に  $20\text{ cm}^{-1}$  での RACS の強度を温度に対してプロットした図である。この図からすべての試料で温度とともに RACS の強度が増加しているが、水和試料では増加の傾きに変曲点が見られた。またこの動力学転移の起こる温度がリゾチームと CM-リゾチームを比べるとリゾチームの方が低いことがわかる。発表ではこの結果についてより詳細に、またミオグロビンとポリペプチドの低振動スペクトルを示し得られた結果について議論する。

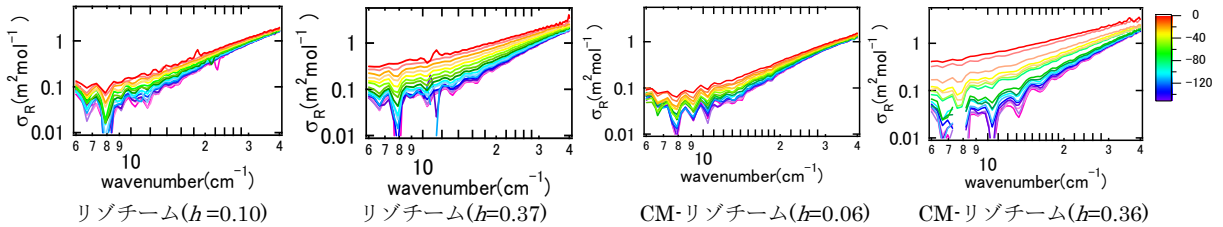


図 2 : リゾチーム、CM-リゾチームの RACS の水和、温度依存性

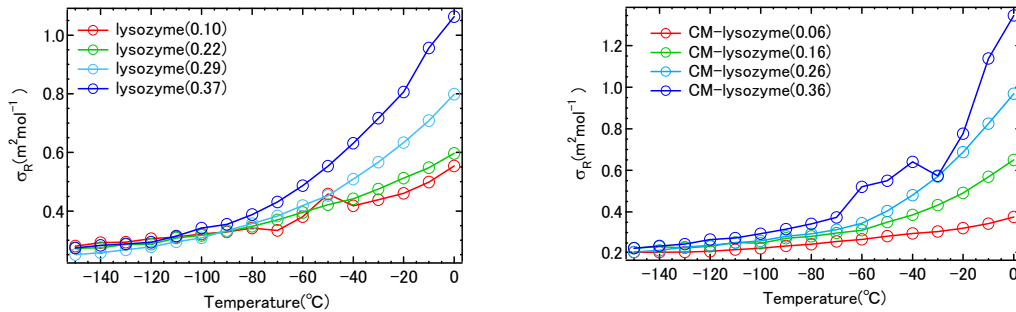


図 3 : リゾチーム、CM-リゾチームの  $20\text{ cm}^{-1}$  における RACS 強度の温度、水和依存性

#### 【参考文献】

- 1, W. Doster, S. Cusack, W. Petry (1989) *Nature*, 337, L754-L756
- 2, K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake, and N. Sarukura, (2005) *Biophys. J.* 89, L22-L24.