

## 2P083

### 連続2残基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ ダブルット形状とペプチド主鎖構造の関連

(東北大院・薬) ○岡部 仁美, 平松 弘嗣, 中林 孝和

Relationship between infrared  $^{13}\text{C}=\text{O}$  doublet band and residue-level conformation of peptide with isotope labels at consecutive two residues

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ.)

○Hitomi Okabe, Hirotsugu Hiramatsu, Takakazu Nakabayashi

#### 【序】

タンパク質が持つ固有の機能を理解するためには、構成するポリペプチドの高次構造の解明が必須である。本研究では、赤外吸収分光法を用いたペプチド主鎖構造の新規解析手法として連続2残基  $^{13}\text{C}=\text{O}$  同位体ラベルペプチド主鎖構造解析法を考案した。さらに合成したモデルペプチドの赤外吸収スペクトルの実測結果と比較することにより、妥当性を検証した。

本研究では、ペプチド主鎖構造の情報を含む  $\text{C}=\text{O}$  伸縮振動バンドについて、残基ごとの解析を可能にするために、連続2残基  $^{13}\text{C}=\text{O}$  同位体ラベルを行った。 $^{12}\text{C}=\text{O}$  を  $^{13}\text{C}=\text{O}$  でラベルした残基の  $\text{C}=\text{O}$  バンドは、同位体効果により低波数シフトする。さらに連続した2残基を  $^{13}\text{C}=\text{O}$  ラベルすると、ラベル残基間で相互作用が起これり  $^{13}\text{C}=\text{O}$  バンドはダブルットになる。これにより、従来よりも詳細な構造解析が可能になる。すなわちダブルットの強度比と分裂幅は2つの  $^{13}\text{C}=\text{O}$  の二面角によって変化すると期待され、ダブルットの形状から二面角を特定できると考えられる。

#### 【方法】

##### 1. Gly-Gly-Gly の連続2残基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ ダブルットのシミュレーション

Gaussian09 (RB3LYP/6-31+G\*\*) を用い構造最適化したトリペプチド Gly-Gly-Gly に関し、二面角 ( $\phi, \psi$ ) のみを  $10^\circ$  ずつ変化させた構造ファイルを作成した。2つのアミド I 振動子間で遷移双極子相互作用のみが生じると仮定して F 行列を求めた。また、同位体効果を考慮して G 行列を求めた。GF 行列の固有値と固有ベクトルから振動スペクトルを計算し、ダブルットの分裂幅 (振動数差) と強度比 (ダブルット全体の強度に対する高波数側のバンドの強度) の値を計算した[1]。

##### 2. モデルペプチドの赤外吸収スペクトル測定

6つのペプチド (Table 1 ①~⑥) の  $^{13}\text{C}=\text{O}$  ラベル体と非ラベル体の赤外吸収スペクトルを重水溶媒中で測定した。側鎖などの吸収バンドの寄与を除き解析を容易にするため、 $^{13}\text{C}=\text{O}$  ラベル体と非ラベル体の差を求めた。④⑤に関してはランダム構造 (⑥) の寄与も差し引いた。得られた差スペクトルの  $1575\text{ cm}^{-1}$  付近に現れる  $^{13}\text{C}=\text{O}$  ダブルットバンド形状の解析を行った。

Table 1 用いたモデルペプチド及び二次構造 (赤字はラベル化した残基、下線は PDB ID)

アミロイド $\beta$ (25-35)	<u>2LMN</u> *	
① $^{25}\text{GSNKGA}$ <b>AI</b> IGLA $^{35}$	(-137.2°, 150.5°)	平行 $\beta$ シート**
② $^{25}\text{GSNKGA}$ <b>AI</b> IGLA $^{35}$	(-108.8°, 124.0°)	(線維状態[2])
③ $^{25}\text{GSNKGA}$ <b>II</b> IGLA $^{35}$	(-147.4°, 114.5°)	
$\alpha$ -lactalbumin (101-111) 変異体	<u>2DX2</u>	
④ $^{101}\text{IN}^{\text{W}}$ <b>LA</b> HAKAG $^{111}$	(-80.6°, -15.2°)	$3^{10}$ ヘリックス
⑥ $^{101}\text{IN}^{\text{W}}$ <b>LA</b> HAKAG $^{111}$		ランダム
Staphylococcal nuclease (97-109)	<u>2FX2</u>	
⑤ $^{97}\text{KMVNEA}$ <b>LR</b> QGLA $^{109}$	(-97.9°, -34.6°)	$\alpha$ ヘリックス

\*A $\beta$  (1-40) の二面角の値を参考に行っている

\*\*ラベル体と非ラベル体をモル比 1:5 に混合して作成

## 【結果・考察】

Gly-Gly-Gly に関して、計算により得た分裂幅及び強度比の  $(\phi, \psi)$  プロットを Fig. 1A, B に示す。通常のペプチドがとりうる二面角の許容領域  $\{\phi < -100^\circ, \psi > -50^\circ\}$  において、分裂幅プロットでは  $\psi$  依存性が見られた ( $\psi$  が大きいほど分裂幅が小さく、 $\psi$  が小さいほど分裂幅が大き)。よって、分裂幅より  $\psi$  の値を決定することができる。強度比プロットでは、全ての象限に同心円状の等値線が見られた。これはある  $\psi$  の値に対して、許容領域において  $\phi$  の値を等値線上で 1 つに限定できることを示す。以上により、ダブルット形状に基づく二面角決定が可能であると考えられる。

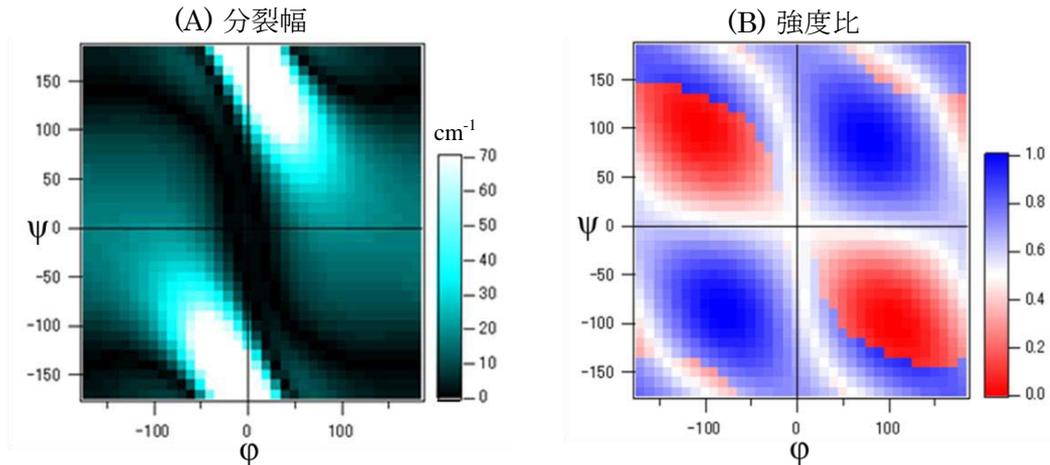


Fig. 1 Gly-Gly-Gly の分裂幅プロット (A) と強度比プロット (B)、値のスケールバーを各々右に示す

実測した赤外吸収の差スペクトル (Fig. 2 黒の実線) において、gauss 関数を用いてフィッティングを行った (Fig. 2 赤色の点線)。1550~1600  $\text{cm}^{-1}$  の正の吸収について、①④⑤では 2 本、②③では 1 本のバンドで実測スペクトルを再現した。 $\beta$ シート構造のうち②③では、第 2 のバンドが検出されなかった。二面角から計算される分裂幅は 5  $\text{cm}^{-1}$  程度 (Fig. 1 A)、強度比は 0.1 以下 (Fig. 1 B) と小さい。上記の結果から予想されるように、検出下限を超えている可能性がある。一方、①は  $\beta$ シートでありながら②③と異なる挙動を示した。この結果は、①の二面角  $(\phi, \psi) = (-137.2^\circ, 150.5^\circ)$  (Table 1) において、強度比が大きく変化するという計算値 (Fig. 1 B) と一致する。ランダム構造 (⑥) では幅の広いバンドが検出された。この特徴は二面角が不定であるためにダブルット形状が定まらなかったことに由来する。⑤のダブルット形状は計算値と異なり、2 本のバンドの中で高波数のバンドの相対強度が減少した。これはラベルした残基に隣接する残基の影響などを考慮することにより、計算値を改善できる可能性がある。

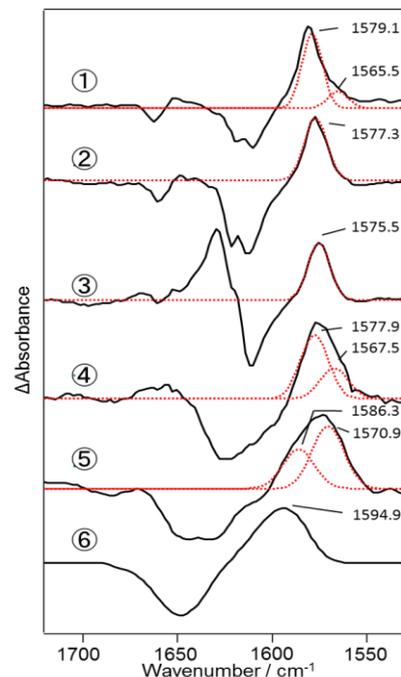


Fig. 2 スペクトル解析結果、黒実線：実測値  
赤点線：フィッティングに用いたバンド