

3P010

レーザー脱離超音速ジェット分光法によるアドレナリン受容体部分ペプチドの赤外分光—ペプチド末端修飾によるコンフォメーション制御—

(東工大・資源研¹, パリ南大・オルセー分子科学研究所²) ○大場妃香里¹, 山田浩平¹, 石内俊一¹, Pierre Çarçabal², 藤井正明¹

Infrared spectroscopy of partial peptides in adrenaline receptor by laser desorption supersonic jet spectroscopy -conformational control by peptide terminals-

(Tokyo tech/Chemical resources lab.¹, Univ. of Paris-Sud/ISMO²) ○Oba Hikari¹, Yamada Kohei¹, Ishiuchi Shun-ichi¹, Çarçabal Pierre², Fujii Masaaki¹

【序】 神経伝達物質と受容体タンパク質は「鍵と鍵穴」の関係に例えられ、受容体は特定の神経伝達物質を認識し結合して細胞内へシグナルを伝達する。この分子認識機構を分子レベルで理解するために、神経伝達物質と受容体の結合構造の解明は極めて重要である。アドレナリン受容体タンパク質はGタンパク質共役受容体と呼ばれる膜タンパク質の一つで、アミノ酸 413 残基からなる巨大分子であるが、神経伝達物質との相互作用はその局所的な部分で起こることが知られている。生化学的な手法により、アドレナリン受容体では細胞膜内の α -ヘリックス鎖に存在する 2 つの Ser がリガンド結合部位であることが示唆されており

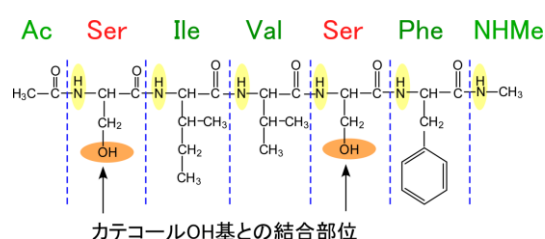


Fig. 1 Ac-SIVSF-NHMe の構造式

[1]、これら Ser 側鎖の 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[2]。そこで、この分子認識部位を含むアドレナリン受容体の部分配列である 5 残基ペプチド (Ser-Ile-Val-Ser-Phe-NH₂: SIVSF-NH₂) の構造を気相分光の手法を適用して調べた。ところが、受容体部分ペプチドの末端構造として NH₂ 基を選択したため、本来、相互作用しないはずの末端の NH₂ 基が Ser 側鎖の OH 基と水素結合を形成し、細胞膜内でアドレナリン受容体が形成しているはずの α -ヘリックス鎖に由来する構造が全く見いだされなかった。そこで本研究では、N 末端をアセチル化、C 末端をメチルアミド化により保護したペプチド (Ac-SIVSF-NHMe) (Fig. 1) を取り上げ、末端修飾による主鎖構造への影響を調べた。Ac-SIVSF-NHMe に対し、レーザー脱離超音速ジェット分光法を適用し、共鳴多光子イオン化 (REMPI) スペクトル、IR dip スペクトルを測定した。

【実験】 Methylamide Sieber レジンをを用いた固相合成法により Ac-SIVSF-NHMe を合成した。これを凍結乾燥した後、カーボンブラックと混合してグラファイト製ディスクに塗布した。ここに脱離レーザー (1064 nm) を照射して脱離・気化させた。これを Ar ガス (よどみ圧: 80 bar) のパルスジェットで押し流し、スキマーで分子線に切り出した。波長可変紫外レーザーを照射して生成したイオンを飛行時間型質量分析器で検出した。Ac-SIVSF-NHMe の質量をモニターしながら紫外レーザーを波長掃引し、電子スペクトルに相当する REMPI スペクトルを得た。次に、REMPI スペクトルに観測された特定のバンドに紫外レーザー ν_{UV} を固定し、生成するイオン量をモニターしながら、波長可変赤外レーザー ν_{IR} を照射

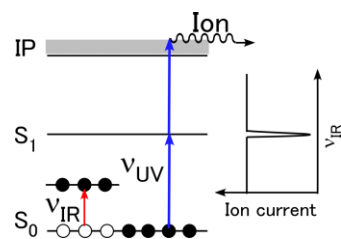


Fig. 2 IR-dip 分光法の原理

し波長掃引した (Fig. 2)。このとき生成するイオン量は特定のコンフォマーの基底状態の分子数に比例する。 ν_{IR} が特定のコンフォマーの振動遷移エネルギーに一致すると、赤外励起によって基底状態の分子数が減少するため、モニターしているイオン量が減少する。したがって、 ν_{UV} で選択した特定のコンフォマーの赤外スペクトルをイオン量の減少として測定できる (IR dip 分光法)。

【結果・考察】 Fig. 3 に Ac-SIVSF-NHMe の REMPI スペクトルを示す。37536 cm^{-1} から高波数側 530 cm^{-1} の範囲に複数のバンドが観測された。REMPI スペクトル中のバンド a~c に ν_{UV} を固定して IR dip スペクトルを測定したところ、バンド a、c に固定した場合とバンド b に固定した場合では異なる赤外スペクトルが得られ (Fig. 4a, b)、2つの異なるコンフォマー a, b が共存している事が分かった。今回の結果を SIVSF-NH₂ の赤外スペクトル (Fig. 4c) と比較したところ、大きく異なっており、末端修飾によりペプチド構造が大きく変化したことが示唆された。

Ac-SIVSF-NHMe の2つのコンフォマーを比較するとコンフォマー b では 3400–3470 cm^{-1} に複数のバンドが観測された。一方、コンフォマー a ではこの領域にバンドは見られず、3372 cm^{-1} より低波数側にレッドシフトした NH 伸縮振動が観測された。これよりコンフォマー a はコンフォマー b よりも強固な水素結合を形成していることが示唆される。コンフォマー b の 3472 cm^{-1} 付近のバンドは、振動数に基づき自由な NH 伸縮振動と帰属した。また、3401 cm^{-1} 及び 3435 cm^{-1} のバンドは、これまでの研究結果より [3]、C₁₀ 構造 (数字は NH...O=C 間の水素結合により形成されるサイクル (Cycle) の原子数を示す [4]) の水素結合を形成した NH 伸縮振動と暫定的に帰属した。一方、コンフォマー a ではコンフォマー b と異なり、3344 cm^{-1} 付近にブロードなバンドが観測された。このバンドは、C₁₃ 構造 (α -ヘリックスに相当) の NH 伸縮振動が 3320–3350 cm^{-1} に現れることより [3]、 α -ヘリックスに由来する α -ターン構造の水素結合を形成した NH 伸縮振動と帰属した。SIVSF-NH₂ では、 α -ターン構造が観測されなかったが、この結果はペプチド末端の保護によりコンフォメーションが本来の α -ヘリックス構造に近づいた事を示している。詳細な構造を明らかにするため、分子動力学シミュレーション及び量子化学計算により構造の探索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、Ac-SIVSF-NHMe の詳細な構造について議論する予定である。

【参考文献】 [1] A. D. Strosberg, Protein Science, **2**, 1198 (1993). [2] J. Ostrowski, Annu Rev Pharmacol Toxicol, **32**, 167 (1992). [3] J. A. Stearns et al., Phys. Chem. Chem. Phys., **11**, 125, (2009). [4] Wutharath Chin et al., Phys. Chem. Chem. Phys., **8**, 1033, (2006).

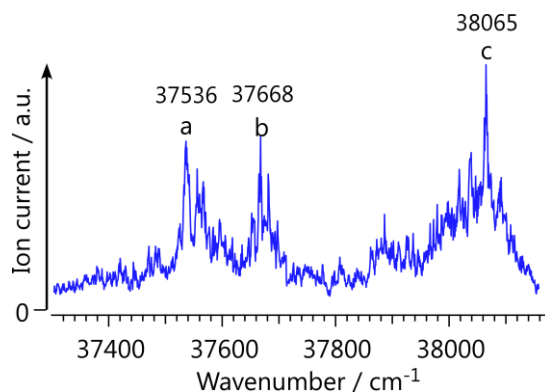


Fig. 3 Ac-SIVSF-NHMe の REMPI スペクトル

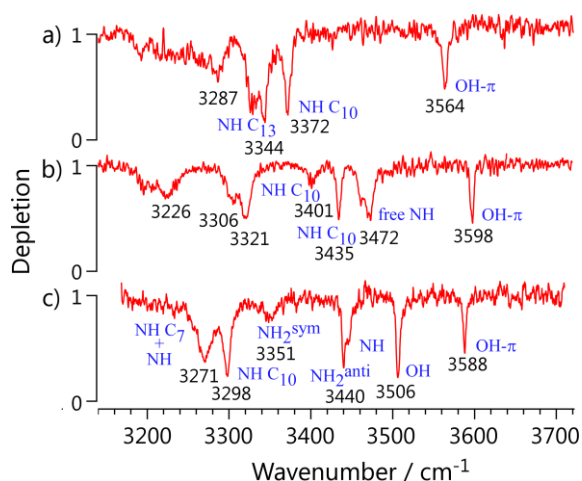


Fig. 4 Ac-SIVSF-NHMe (a, b) 及び SIVSF-NH₂ (c) の IR-dip スペクトル