

## 4P062

連続2残基<sup>13</sup>C,<sup>18</sup>Oラベルによるヘリックス主鎖構造二面角解析

(東北大院薬) ○平松弘嗣・岡部仁美・中林孝和

Analysis of dihedral angle of peptide main chain in helix  
using the two-residue <sup>13</sup>C, <sup>18</sup>O isotope labeling

(Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.) Hirotsugu Hiramatsu, Hitomi Okabe, Takakazu Nakabayashi

**序** 原子座標などによって指定されるタンパク質の静的な構造の情報は、構造と機能の関連性を議論する際の出発点となりうる。また、条件に応じて生じる構造変化を解析することは、タンパク質の動的な性質を理解する上で本質的な重要性を持つ。赤外吸収スペクトル測定は、タンパク質構造の変化を鋭敏に検出する実験手法の一つである。タンパク質の動的な性質を解明することを目的として、赤外スペクトルに現れるバンドのうち、ペプチド主鎖構造の情報をもたらすアミドバンド、および側鎖構造に関する知見をもたらす種々のマーカーバンドが利用されてきた。

タンパク質において、末端を除く各アミノ酸残基はペプチド(O=C-N-H)結合で連結してペプチド主鎖を形成する。ペプチド主鎖 C=O 伸縮振動バンドに相当するアミド I バンドは 1600-1700 cm<sup>-1</sup> に現れる。アミド I 振動数と二次構造の関連性は、振動子間の遷移双極子相互作用(TDC)を考慮して大方説明することが可能である。我々はこの対応関係を利用して残基二面角を解析する新規実験手法「連続2残基 <sup>13</sup>C=<sup>18</sup>O 同位体ラベル法」を考案し、実験値と計算値の対応関係を示した[1]。すなわち赤外スペクトルに現れる <sup>13</sup>C=<sup>18</sup>O ダブルレットの振動数差と強度比(ダブルレット全体の強度に対する高波数側バンドの強度)の実測値がラベル残基の二面角と対応関係を持つことを報告した。<sup>13</sup>C=<sup>18</sup>O ダブルレットが主鎖構造(二面角)マーカーとして利用可能かどうか、さらに探ることを目的として、本研究では、用いるパラメータを改良することで実験値と計算値の対応関係が改善するかどうか検討した。

**実験** 試料として 11 残基のペプチド[2FXZ]および 13 残基のペプチド[2DX2]を用いた(表1)。それぞれのペプチドは水溶液中でαヘリックスおよび<sub>310</sub>ヘリックスを取っており二面角がよく定まっている。2FXZのAla6および2DX2のLeu7の二面角の解析を行うため、全て<sup>12</sup>C=<sup>16</sup>Oからなる試料、1残基のみ<sup>13</sup>C=<sup>18</sup>Oラベルを施した2種類の試料、および連続2残基ラベル体を合成した(表1、ラベルを施した2つの残基を下線で示す)。各試料は溶液中で一定の割合でランダム構造をとり、赤外スペクトルにランダム構造の寄与が現れる。この成分の寄与を除くため、D<sub>2</sub>O/DMSO(2:8)溶媒中で測定したスペクトルを差し引いた。連続2残基ラベル体の測定結果から、<sup>13</sup>C=<sup>18</sup>O ダブルレットバンド形状(振動数差および強度比)を解析した。赤外吸収スペ

クトル測定は重水中で行った。

**結果** 実験結果を図1に、解析の結果を表1にそれぞれ示す。この実験結果と、注目する残基の二面角（文献値、表1）の関連性を説明するために、GF行列法を用いて振動数計算を行った。その際、モデル化合物 Gly-Gly-Gly の二面角を任意の値に固定して得られる「2つのアミドI振動子の距離と配向」を考慮することで計算値を得た。

F行列非対角項に関して TDC および補正項  $\Delta$ （文献値）を考慮した結果、振動数差の計算値が実測値をよく再現した（表1）。

実際のペプチドにおいて、各残基の C=O 結合長は一定ではない。これは各ペプチド結合の水素結合構造の相違、あるいは静電的環境の相違に由来する。その結果、F行列の対角項の値( $f_{ii}$ )は一定とは限らない。そこで、1残基ラベル体に関して、赤外吸収スペクトルに現れる  $^{13}\text{C}=\text{O}$  バンドの振動数、および同位体ラベルにより消失した  $^{12}\text{C}=\text{O}$  バンドの位置を決定し、原子質量由来の振動数シフト実測値から  $f_{ii}$ （および  $g_{ii}$ ）を決定した。 $\alpha$ ヘリックスと  $3_{10}$ ヘリックスに関してこれらの実測値を用いたところ、計算結果は大きく変化しないことが分かった（表1）。

$\text{H}_2\text{O}$  中、アミドI振動子の振動遷移モーメントは C=O 結合軸と約  $20^\circ$  をなす。 $\text{H}_2\text{O}$  中でのアミドIと  $\text{D}_2\text{O}$  中とアミドI

では振動形が異なることを念頭に、振動遷移モーメントと C=O 結合軸の間の角度を  $10^\circ$ – $30^\circ$  の範囲で変化させた。ダブルット強度比計算値は小さく変化したが、実測値との合致は特に改善しなかった。

以上の解析から、用いるパラメータを適切に選ぶことにより実測値と計算値の対応が改善することが示された。

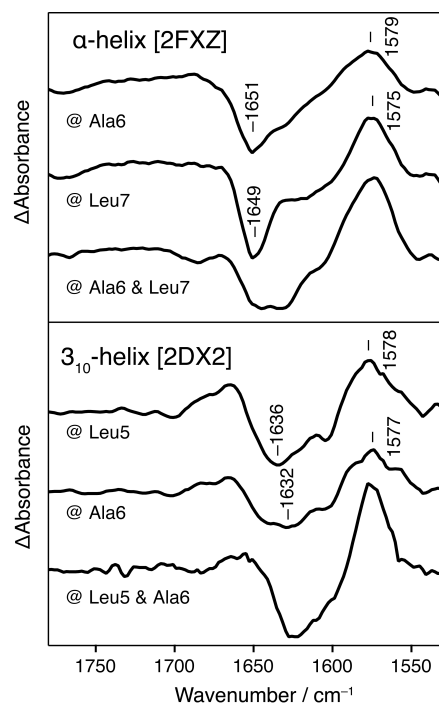


図1  $^{13}\text{C},^{18}\text{O}$ ラベルにより生じた赤外吸収変化を示す差スペクトル(ラベルなしの結果との差分)。ラベル残基を図中に示す。

表1

構造	$\alpha$ -helix		$3_{10}$ -helix	
PDB ID	2FXZ		2DX2	
配列*	K M V N E <u>A</u> L V R Q G L A		I N Y W L <u>A</u> H A K A G	
{ $\phi, \psi$ }	{ $-97.9^\circ, -34.6^\circ$ }		{ $-80.6^\circ, -15.2^\circ$ }	
実測値	$\Delta\omega$	強度比	$\Delta\omega$	強度比
計算値† A	$15.4 \pm 1.4$	$0.38 \pm 0.04$	$10.4 \pm 1.3$	$0.68 \pm 0.10$
B	24.9	0.82	22.5	0.67
C	16.1	0.82	13.8	0.67
	16.2	0.82	14.6	0.66

\*同位体ラベル残基を下線で示した。

†A:  $g_{ii} = 1, g_{ij} = 0.91, f_{ii} = 1.605, f_{ij} = (\text{TDC})$ ;

B:  $g_{ii} = 1, g_{ij} = 0.91, f_{ii} = 1.605, f_{ij} = (\text{TDC} + \Delta)$ ;

C:  $g_{ii} = 1, g_{ij} = (\text{実測値}), f_{ii} = (\text{実測値}), f_{ij} = (\text{TDC} + \Delta)$