

エレクトロスプレー・冷却イオントラップ法による
アドレナリン-受容体部分ペプチド (SIVSF) の錯合体の赤外分光

(東工大・化生研¹, 東理大・理²)

○関口翼¹, 輪胡宏学¹, 窪田知弥², 山口佳祐², 石内俊一¹, 築山光一², 藤井正明¹

IR spectroscopy of an adrenaline – receptor partial peptide (SIVSF) complex
by electrospray / cold ion trap technique

(CLS, Tokyo Tech.¹, Faculty of science, Tokyo University of Science²)

○Tsubasa Sekiguchi¹, Hiromichi Wako¹, Kazuya Tsuruta², Keisuke Yamaguchi²,

Shun-ichi Ishiuchi¹, Koichi Tsukiyama², Masaaki Fujii¹

【序】神経伝達物質は受容体タンパク質に分子選択的に結合し、神経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にはそれらの結合構造を解明する事が必須である。神経伝達物質であるアドレナリンの受容体タンパク質β₂-アドレナリンレセプターはこれまで多くの研究報告があり¹⁾、point mutation の実験から2つのSer残基のOH基がアドレナリンのカテコールOH基と水素結合すると考えられてきた²⁾。最近、アドレナリンが結合した複合体のX線結晶構造が解かれ、2つのSer残基がカテコールOH基と水素結合する事が確認された³⁾。β₂-アドレナリンレセプターにはSerは29個含まれており、なぜ上述の2つのSerだけが結合部位としてはたらくのであろうか？

すぐに思いつく理由は、binding pocket にアドレナリンが嵌ったとき、ちょうど都合のよいところにこれらのSerが位置しているから、という事である。もちろんこれは主たる原因の1つであると考えられるが、アドレナリンの側鎖を持たないカテコール単体でもこれらのSerと結合する事が示唆されており⁴⁾、受容体全体でbinding pocketを形成していなくてもこれらのSerはカテコールOH基との結合部位として機能する可能性がある。すなわち、これらSerを含む部分構造そのものがアドレナリンのカテコールOH基との結合に適している可能性がある。もしそれが正しいならば、これらSerを含む部分ペプチドでもアドレナリンのカテコールOH基と選択的な水素結合を形成するはずである。そこで、本研究では、これらの2つのSerを含む部分ペプチド Ac-SIVSF-NHMe (図1) とアドレナリンとの水素結合クラスター (錯合体) を生成させ、気相分光の手法を用いて錯合体の水素結合構造を明らかにする事を目的とした。

【実験】錯合体の極低温孤立気相状態を得るためにエレクトロスプレー・冷却イオントラップ法を用いた。アドレナリンと Fmoc 法により固相合成した Ac-SIVSF-NHMe をそれぞれ 10⁻⁵ M の濃度で 0.5% 蟻酸-メタノール溶媒に溶解し、エレクトロスプレーによりプロトン付加錯合体を得た。アドレナリンは塩基であるため、アドレナリンにプロトンが付加していると考えられる。冷却イオントラップに錯合体イオンを捕捉し、ここに紫外レーザーを導入した。紫外光吸収によって生じた光解離フラグメントを飛行時間型質量分析器で検出し、紫外光を波長掃引し、紫外光解離スペクトルを測定した。コンフォメーションにより電子遷移エネルギーが異なるため、紫外光解離スペクトルに観測

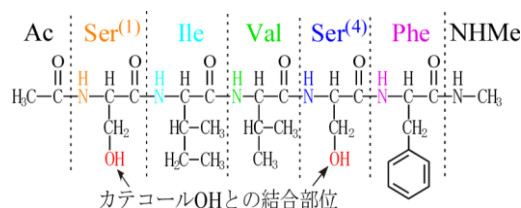


図1. 受容体部分ペプチド Ac-SIVSF-NHMe

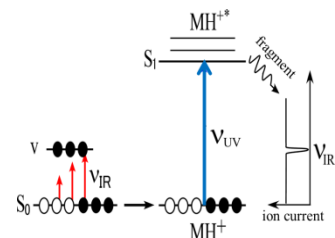


図2. IR dip 分光法の原理

した。コンフォメーションにより電子遷移エネルギーが異なるため、紫外光解離スペクトルに観測

された特定のバンドに紫外レーザーの波長を固定し、赤外レーザーを波長掃引することでコンフォーマーごとの赤外スペクトルを測定した (図2)。

【結果・考察】図3に錯合体イオン並びに構成する分子単体の紫外スペクトルを示す。錯合体ではプロトン付加アドレナリンと同じ波長領域でのみ光解離生成物 (中性アドレナリンが脱離) が観測された。次に紫外スペクトル中の矢印で示したバンド α , β に紫外レーザーの波長を固定し赤外スペクトルを測定した (図4)。両者は異なる赤外スペクトルを与える事から、異なるコンフォーマーに由来する事が分かった。

錯合体の赤外スペクトルを帰属するために、単量体の赤外スペクトルと比較した (図4)。プロトン付加アドレナリンでは3つのコンフォーマーconf a, b, cが観測され、共通して3595, 3660 cm^{-1} 付近にシャープなバンドが観測される。これらは、カテコール分子の赤外スペクトル⁵⁾との比較により、それぞれ分子内水素結合OH及びfree OH伸縮振動と帰属した。またconf bでは3648 cm^{-1} にもバンドが観測され、これは側鎖のOH伸縮振動に帰属できる。一方、中性のペプチド単体Ac-SIVSF-NHMeでは2つのコンフォーマーが観測され、3598 (conf x), 3564 (conf y) cm^{-1} のバンドは共にPhe残基と π 型の水素結合したSer⁽⁴⁾のOH伸縮振動であると帰属されている⁶⁾。

これらの結果を基に錯合体のOH伸縮振動領域の帰属を議論する。conf α , β で共通して観測される3571 cm^{-1} のバンドは振動数から水素結合したSerのOH伸縮振動と帰属できる。conf α では他にも3593, 3598, 3674 cm^{-1} にバンドが観測され、プロトン付加アドレナリンとの比較から3593, 3598 cm^{-1} のバンドをそれぞれカテコールの分子内水素結合OHと側鎖OHの伸縮振動と帰属した。また、3674 cm^{-1} のバンドはアドレナリンのカテコールfree OHよりも高波数であるため、アドレナリン由来のバンドとは考え難く、Serのfree OH伸縮振動に帰属した。以上の帰属から、conf α , β 共にカテコールのfree OHのバンドが消失し、さらにconf β ではカテコールの分子内水素結合のバンドも消失している事が分かった。これは、これらOH基が強い水素結合を形成し、レッドシフトしたためと考えられる。従って、conf α ではカテコールの分子内水素結合を保持したままfree OHが新たに水素結合を形成し、一方conf β ではカテコールOHの配向が変化して分子内水素結合が消滅し、両方のカテコールOHが新たに強い水素結合を形成したと考えられる。ペプチドの構造を議論するためにはNH伸縮振動領域の帰属が不可欠であるが、水素結合OHなどが同じ領域に観測されるため、ペプチド単体との比較だけでは帰属は困難である。そこでアミノ酸の同位体置換(¹⁵N)により、どのバンドがどのアミノ酸NH伸縮振動に由来するかを実験的に帰属した。講演ではその結果に基づき、錯合体中のペプチドの主鎖構造とアドレナリンとの水素結合構造について議論する。

【参考文献】1) B.Kobilka. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, **52**, 6380. 2) A.D.Strosberg, *Protein Sci.*1993, **2**, 1198.

3) A.M.Ring. et. al., *Nature*. 2013, **502**, 575. 4) G. Swaminath. et. al., *JBC*, 2005, **280**, 22165.

5) M.Gerhards. et. al., *PCCP*. 2000, **2**, 7812. 6) 大場妃香里. 第8回分子科学討論会 要旨. 講演番号 3P010. 2014.

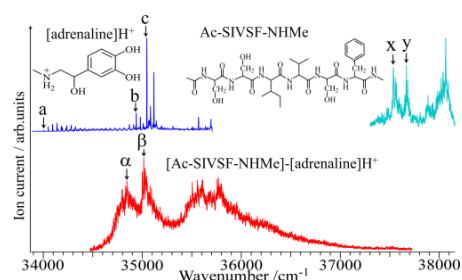


図3 錯合体および構成分子の紫外スペクトル

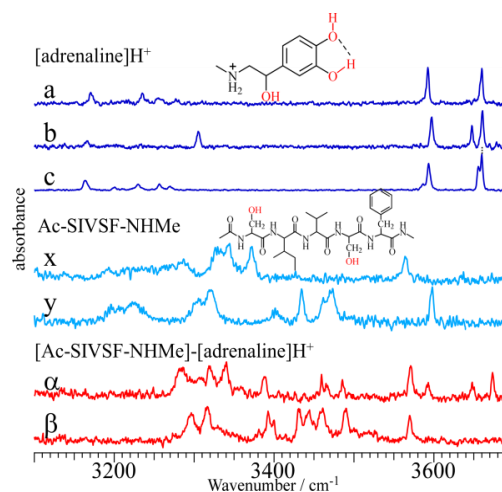


図4 錯合体および構成分子の赤外スペクトル