

エレクトロスプレー・冷却イオントラップ法による K^+ チャネル選択フィルタ一部分ペプチド-アルカリ金属錯体水和クラスターの構造研究

¹東工大化生研

○佐々木裕太¹, 田端みずき¹, 石内俊一¹, 藤井正明¹

Conformational study of hydrated alkali metal complexes of partial peptide of selectivity filter in K^+ channel by electrospray ionization / cold ion trap laser spectroscopy

○Yuta Sasaki¹, Mizuki Tabata¹, Shun-ichi Ishiuchi¹, Masaaki Fujii¹

¹ Tokyo Institute of Technology

【Abstract】 K^+ channel selectively transports K^+ ion. According to the crystal structure of K^+ channel with K^+ ion, an amino-acid sequence, GYG, acts as a binding motif of K^+ ion, which is called selective filter. The selectivity has been explained by the similarity of the structure between GYG - K^+ and hydrated K^+ . In the case of Na^+ , theoretical calculations suggest that the structures in hydration and coordination with GYG are different, and which inhibits the GYG coordination. However, such structural difference between K^+ and Na^+ has not been clarified experimentally yet. In this work, structures of complexes of a partial peptide of the selective filter and alkali metal ions were investigated by using electrospray / cold ion trap technique with infrared photo dissociation spectroscopy.

【序】 K^+ チャネルは、 K^+ を選択的に透過する膜タンパク質である。 Na^+ は K^+ よりもイオン半径が小さいにも拘わらず K^+ チャネルをほとんど通過する事はできず、 K^+ チャネルが両者をどのようにして区別しているのか興味深い。Mackinnon らは X 線結晶構造解析により、選択フィルターと呼ばれるアミノ酸配列 Gly-Tyr-Gly (GYG)が K^+ と特異的な錯合体を形成する事を明らかにした。その構造が K^+ の水和構造に近い為、水和イオンから選択フィルターへ容易に移行できるが、 Na^+ の場合は水和構造と選択フィルター錯合体の構造が異なるため、チャネルへの侵入が阻害されると考えられている[1,2]。これは Allen らの分子動力学シミュレーションからも支持されている[3]。しかし、X 線結晶構造解析では Na^+ がフィルターと錯合体を形成している様子を観測できないため、 Na^+ が選択フィルターとどのように相互作用するのかは実験的には明らかになっていない。そこで、選択フィルターを切り出した部分ペプチド Ac-Tyr-NHMe (Fig.1) とアルカリ金属イオンとの錯合体を作り、気相分光によりその構造を解明することを着想した。さらにこの錯合体に水分子を配位させることで、水和と選択フィルター錯形成の関係を分子レベルで解明できると期待される。本研究では、Ac-Tyr-NHMe と K^+ 及び Na^+ との錯合体及びその水和クラスターをエレクトロスプレー・冷却イオントラップ法で生成し、赤外光解離分光法によりそれらの構造の差異を明らかにする事を目的とした。

【実験】 装置図を Fig. 2 に示す。エレクトロスプレー法を用いて Ac-Tyr-NHMe・ M^+ ($M=Na, K$)錯合体を気相中に取り出し、クラスター生成トラップで水和クラスター

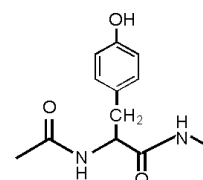


Fig. 1 A partial peptide of selective filter, Ac-Tyr-NHMe

を生成した。その後、四重極質量選別器で特定のイオンを選別し、冷却イオントラップ内にイオンを保持した。ここに赤外光を導入し、生成したフラグメントイオンを飛行時間型質量分析器で検出した。赤外光を波長掃引する事で、赤外光解離(IRPD)スペクトルを測定した。

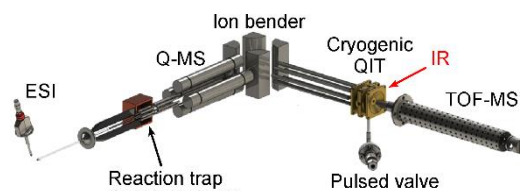


Fig. 2 Experimental setup

【結果・考察】 Fig. 3 に Ac-Tyr-NHMe·K⁺と Ac-Tyr-NHMe·Na⁺の IRPD スペクトル及びその理論赤外スペクトルを示す。

両者に共通して観測される 3635 cm⁻¹ 付近のバンドは Tyr の OH 伸縮振動、3400~3500 cm⁻¹ のバンドは N-H 伸縮振動 (amide A) と帰属できる。また、1680~1700 cm⁻¹ のバンドは C=O 伸縮振動 (amide I)、1500~1550 cm⁻¹ のバンドは N-H 変角振動 (amide II) と帰属できる。Ac-Tyr-NHMe·M⁺には 2 つの NH が存在するため、1 つの異性体で amide A 領域に 2 本のバンドが観測されるはずである。それぞれの錯合体ではともにこの領域に 6 本のバンドが観測されている事から両錯体には少なくとも 3 種類の異性体が共存していることが分かった。

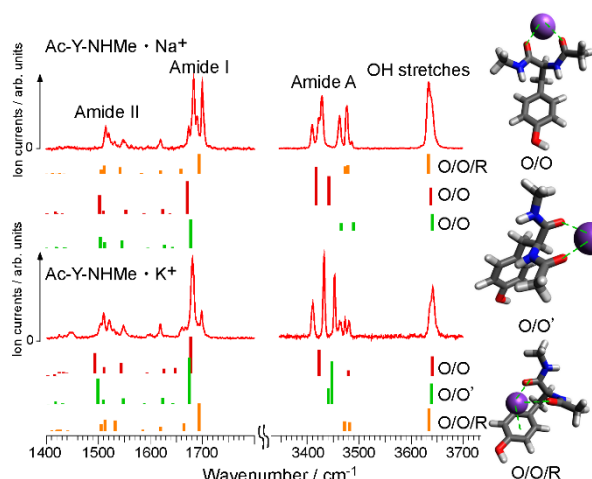


Fig. 3 IRPD spectra and calculation spectra (B3LYP/cc-pVDZ, scaling factor: 0.965 (OH and NH stretches), 0.975 (others))

の錯合体ではともにこの領域に 6 本のバンドが観測されている事から両錯体には少なくとも 3 種類の異性体が共存していることが分かった。

構造帰属のために量子化学計算を行ったところ、カルボニル基が金属イオンに配位した構造が安定であり、そうでない場合、例えば Tyr の OH 基が配位した構造より 100 kJ/mol 以上安定であることが分かった。安定な配位構造としては、2 つの C=O が配位した構造 (O/O 及び Tyr の C_α-C_β 周りの二面角が 120° 回転した O/O')、加えてベンゼン環も配位した構造 (O/O/R) が見出された。それぞれの理論赤外スペクトルの特徴は、O/O 型で amide I が 1680 cm⁻¹ 付近に、O/O/R 型で 1700 cm⁻¹ 付近に現れる点である。これに注目して実測スペクトルと比較すると、K⁺錯合体では 1681 cm⁻¹ に観測される強いバンドが O/O 及び O/O' 型に、1699 cm⁻¹ の弱いバンドは O/O/R 型の amide I にそれぞれ帰属できる。同様に Na⁺錯体の場合は 1683, 1689, 1699 cm⁻¹ にバンドが観測され、それぞれ O/O、O/O'、O/O/R 型に帰属できる。量子化学計算で得られたそれぞれの amide I の遷移強度を考慮して各異性体の存在比を見積もったところ、K⁺錯体では O/O 型 (O/O' も含む) と O/O/R 型でおよそ 1:0.5 であるのに対して、Na⁺錯体ではほぼ 1:1 であり O/O/R 型の寄与が大きくなった。この違いは、K⁺の場合イオン半径が 2 つのカルボニル基で挟むのに適した大きさであるのに対し、Na⁺の場合はイオン半径が K⁺より小さいため、2 つのカルボニル基に加え、ベンゼン環によるアシストが安定化に必要なためだと考えられる。発表では水クラスターの結果についても示し、水和構造と選択フィルター錯形成との関係性について議論する。

【参考文献】 [1]Morais-Cabral, et al., *Nature*. **414**, 37-42(2001) [2]Zhou, Y, et.al., *Nature*. **414**, 43-48(2001) [3]Allen, T, et al., *Biophys. J.*, **77**, 2502-2516(1999)