

## 連続二残基 $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$ ラベル赤外吸収分光法を用いた ポリプロリンの主鎖構造解析

<sup>1</sup>東北大院・薬, <sup>2</sup>台湾交通大学

○宮田大輔<sup>1</sup>, 岡部仁美<sup>1</sup>, 平松弘嗣<sup>2</sup>, 中林孝和<sup>1</sup>

### Analysis of the Structure of the Polyproline Backbone Using IR Absorption of a $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$ Doublet Band

○Daisuke Miyata<sup>1</sup>, Hitomi Okabe<sup>1</sup>, Hirotsugu Hiramatsu<sup>2</sup> Takakazu Nakabayashi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Japan

<sup>2</sup> Department of Applied Chemistry, National Chiao Tung University, Taiwan

**【Abstract】** IR absorption spectroscopy is one of the most useful tool to determine the secondary structure of a peptide. In this study, we have proposed a new method of evaluating not only the secondary structure but also the dihedral angle using IR amide bands. In this method, the peptide whose successive two amino acids are labeled as  $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$  is prepared. The amide I band of the labeled peptide split as the doublet band whose magnitude is determined by the dihedral angle of the two amide bonds. Therefore, the dihedral angle of the target amide bonds can be evaluated by the theoretical analysis of the splitting width and intensity ratio. The dihedral angle of ( $\varphi = -50^\circ$ ,  $\psi = 150^\circ$ ) was obtained for a proline peptide, which is the same as the experimental value of ( $\varphi = -73^\circ$ ,  $\psi = 153^\circ$ ) for  $\psi$ . We will discuss the difference in the experimental and theoretical values with respect to the theoretical analysis.

**【序】** 赤外吸収分光法は、タンパク質やペプチドなどの生体分子の構造を調べる方法として広く用いられている。特に、赤外吸収強度の強いアミドバンドは、ペプチドの二次構造に応じてピーク位置が変化し、二次構造の解析に用いられる。我々はアミドバンドの解析において、二次構造のみではなく、ペプチドの二面角を解析することができる新規手法について検討している[1]。この方法では、ペプチドのある残基について、カルボニル基を二残基連続で  $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$  置換を行う。二残基の同位体置換によって、ラベルした部分のアミド I 赤外バンドは選択的に低波数にシフトし、また遷移双極子の相互作用（カップリング）によってダブルットに分裂する(Fig. 1)。アミド I 振動の遷移双極子はアミド結合の平面上に存在するため、観測されるダブルット形状は二面角の値に依存する(Fig. 2)。そのために、ダブルット形状を理論解析することによって二面角を求めることができる。本研究では、ポリプロリンの二面角について我々の手法を用いて検討した。モデルとして用いるプロリンジペプチドに対し、量子化学計算と GF 行列法を組み合わせ、ダブルットの波数差と強度比を計算する。ポリプロリンの赤外吸収スペクトルを測定し、波数差と強度比の実測と計算値と比較することで、ペ

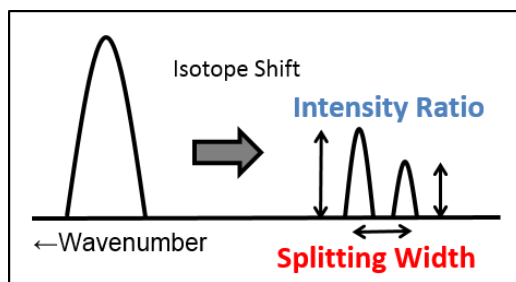


Fig. 1 The concept of the doublet band due to the labeling of two successive amino acids.

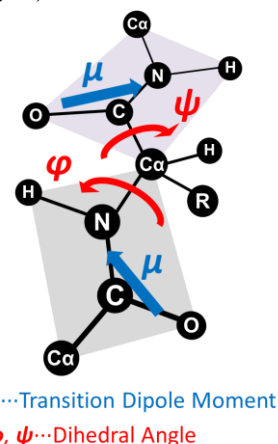


Fig. 2 Relationship between transition dipole moment and dihedral angle.

プチドの二面角を得ることができる。

【方法 (実験・理論)】プロリン二量体をモデルペプチドとし、二面角である  $\phi$ ,  $\psi$  に対して、それぞれ  $15^\circ$  刻みで回転させた初期構造を作製した。各々の構造に対して、二面角を固定したままで構造最適化とエネルギー計算を行い、各二面角に対する自由エネルギー等高図を得た。また各々の構造に対して、アミド I 振動に対するエネルギーの二次微分を計算し、相互作用の強さを表すカップリング定数を求めた。得られたカップリング定数を  $GF$  行列法のパラメータとして用い計算することで、各二面角に対する分列幅、強度比の等高図を得た。得られた等高図を実測値と比較することで、二面角を解析した。

【結果・考察】 Fig. 3 に二面角に対する自由エネルギー等高図を示す。二面角を固定した計算であるために、立体障害によって構造が大きく歪む領域が存在する。そこで、 $\alpha$  炭素と炭素との結合および  $\alpha$  炭素と窒素との結合において、平均結合長である  $1.63 \text{ \AA}$  と  $1.56 \text{ \AA}$  よりも長い結合長を持つ構造を等高図から取り除いた。得られたエネルギー等高図は、実験によって得られたタンパク質中のプロリン残基の二面角分布と良い一致を示した。この結果は、我々の行った計算方法の妥当性を示している。

$GF$  行列計算では、 $G$  行列は、 $^{13}\text{C}=^{18}\text{O}$  の振動系自身を用いているために単位行列とし、 $F$  行列の対角項は、相互作用をせずに振動する場合の力の定数であることから、一残基ラベルしたポリプロリンの赤外吸

収スペクトルから求めた。 $F$  行列の非対角項は、相互作用しながら振動している時の力の定数であるために、各二面角に対するエネルギーの二次微分の値を代入した。 $G$  行列と  $F$  行列の積を対角化することで、各二面角に対する固有値と固有ベクトルを求めた。行列の固有値は振動の波数に対応することから、差をとることにより波数差を得た。強度比は、はじめに振動数計算によって  $N$ -アセチルプロリンのアミド I の遷移双極子モーメントと  $\text{C}=\text{O}$  結合の成す角を求め ( $21.2^\circ$ )、各二面角に対する遷移双極子モーメントと固有ベクトルの内積を二乗することにより、強度比を得た。

Fig. 4 にプロリンペプチドの波数差と強度比の計算結果を示す。実測の二残基置換したスペクトルから、波数差は  $17\text{cm}^{-1}$ 、強度比は  $0.44$  という値を得ることができ、この値での波数差と強度比のプロットのみを示している。波数差と強度比のプロットの交点 (Crossing Point) が取り得る二面角となり、( $\phi = -50^\circ$ ,  $\psi = 150^\circ$ ) の二面角値が計算された (Fig. 4)。ポリプロリンについては、X線結晶構造解析により、( $\phi = -73^\circ$ ,  $\psi = 153^\circ$ ) という値が報告されており [3]、本手法により  $\psi$  については高い精度で解析ができたことがわかる。一方、 $\phi$  については  $20^\circ$  程度のずれが生じた。 $GF$  行列のパラメータの調整を行い、実測値との対応を検討している。

### 【参考文献】

- [1] 岡部, 平松, 中林, 第8回分子科学討論会, 2P083(2014).
- [2] C. Lovell *et al.* *Proteins*. **50**, 437 (2003).
- [3] H. Wennemers *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15829 (2014).

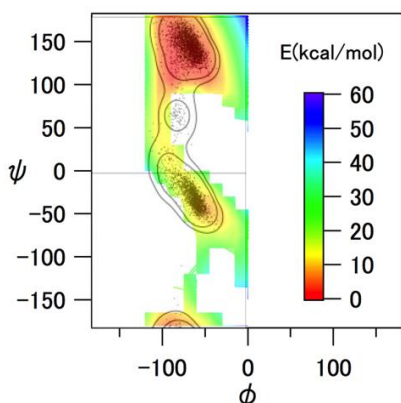


Fig.3 Free energy map of a proline dimer with respect to the dihedral angle. Black dots are the experimental values of proline residues in many proteins [2].

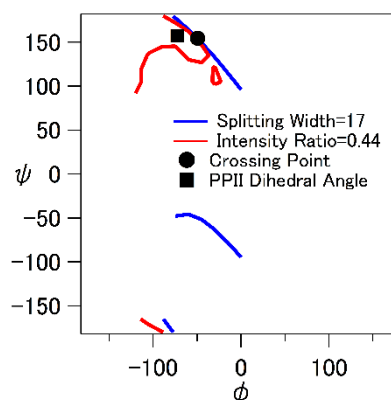


Fig.4 Comparison of the theoretical and experimental results. The contour lines at  $17 \text{ cm}^{-1}$  (splitting width) and  $0.44$  (intensity ratio) were shown, together with the crossing point and the experimental dihedral angle.