

エレクトロスプレー・冷却イオントラップレーザー分光法による天然変性タンパク質 α シヌクレイン部分ペプチド-低分子リガンド複合体の構造研究

¹東工大院生命理工, ²理論創薬研究所, ³東工大科創院化生研
○田端みずき^{1,3}, 吉森篤史², 中野洋文³, 石内俊一^{1,3}, 藤井正明^{1,3}

Structural study on a partial peptide of intrinsically disordered protein α -synuclein - small ligands complexes by electrospray / cold ion trap laser spectroscopy

○Mizuki Tabata^{1,3}, Atsushi Yoshimori², Hirofumi Nakano³, Shun-ichi Ishiuchi^{1,3}, Masaaki Fujii^{1,3}

¹ School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Japan

² Institute for Theoretical Medicine, Inc., Japan

³ Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, Japan

【Abstract】

Aggregated intrinsically disordered protein (IDP) triggers neurodegenerative disorders, thus therapeutic strategy for the disease is targeting IDPs. Recently small ligands to inhibit IDP aggregation has been found, but highly dynamic nature of IDP-small ligand complexes complicates the use of the conventional structural biological approach such as NMR and X-ray crystallography. Here we report the bottom-up approach; infrared spectroscopy combined with electrospray / cold ion trap mass spectrometry is applied to complexes of dopamine/dopamine analogues and its binding motif in α -synuclein, which is an IDP associated with Parkinson's disease.

【序】

タンパク質の機能はその固有の立体構造により説明できる、と考えるのが構造生物学の大前提である。しかしながら、生理的条件下で固有の立体構造を形成しないにも関わらず機能を発揮するタンパク質が多数発見されている[1]。このようなタンパク質は天然変性タンパク質 (IDP) と呼ばれ、多様な分子と結合することによって多くの生体内プロセスに関与している。そのため IDP は凝集しやすく、パーキンソン病など神経変性疾患の多くは原因 IDP の凝集との関連が指摘されている。この治療薬開発を目指し原因 IDP の凝集を阻害する低分子リガンドが発見されているが[2]、その複合体の構造揺らぎが大きいために従来の構造生物学的手法 (NMR、X 線結晶構造解析など) を適用できず作用機序の理解につながる結合様式の解明が困難である。そこで私たちはこの問題に対し、結合部位を切り出した部分ペプチドと低分子リガンドとの複合体の構造をエレクトロスプレー・冷却イオントラップ法とレーザー分光法により調べるボトムアップアプローチ[3]を適用することを着想した。本研究では、パーキンソン病原因タンパク質である α シヌクレインとその低分子凝集阻害剤であるドーパミン及びドーパミン類似体に着目した。 α シヌクレインのドーパミン

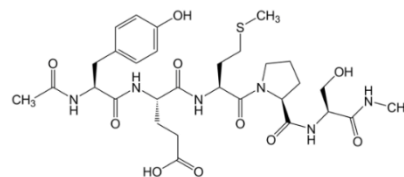


Fig. 1. Formula of Ac-YEMPS-NHMe.

結合モチーフである $^{125}\text{YEMPS}^{129}$ の両末端を保護した Ac-YEMPS-NHMe (Fig. 1、以降 YEMPS) とその低分子リガンドであるドーパミン/ドーパとの複合体の結合様式を調べることを目的とした。

【実験方法】

ドーパミン/ドーパはアミノ基をもち、生理条件下ではプロトン化されている。そこで、プロトン化ドーパミン/ドーパと YEMPS の複合体をエレクトロスプレーイオン法により生成し、真空中に導入した。これを冷却イオントラップで捕捉・冷却した。ここに H_2 ガスを 20% 含んだ He ガスを導入することにより、複合体の H_2 クラスターを生成した。ここに赤外レーザーを照射し、波長掃引した。赤外波長が分子の振動準位に一致すると、 H_2 分子と複合体イオンに解離する。解離生成する複合体イオン (解離フラグメントイオン) 量を飛行時間型質量分析器で検出しながら赤外レーザーを波長掃引することで、赤外吸収スペクトルに相当する赤外光解離 (IRPD) スペクトルを測定した (Fig. 2)。過去の研究によれば α シヌクレインの 125-129 残基の結合モチーフはドーパミン/ドーパのカテコールの部分と結合することが示唆されている[4]。ドーパミン/ドーパのプロトン化アミノ基はペプチドと強く相互作用することが分かっており[3]、その様な構造を排除するために、プロトン化アミノ基を 18-crown-6-ether (CE) で包接保護した。

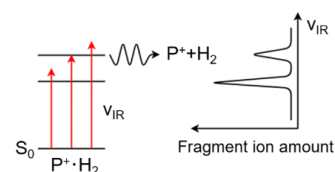


Fig. 2. IRPD spectroscopy.

【結果・考察】

まず、目論見通りリガンド分子がカテコール OH 基で YEMPS と結合しているかを調べるために、YEMPS-ドーパミン/ドーパ-CE 複合体の XH 伸縮振動領域の IRPD スペクトルを測定した (Fig. 3a, b)。振動数から、 $3050\sim 3530\text{ cm}^{-1}$ を NH 伸縮振動、 $3530\sim 3700\text{ cm}^{-1}$ を OH 伸縮振動と帰属した。OH 伸縮振動領域に着目すると、CE でアミノ基を保護していない複合体 (Fig. 3c, d) で観測される free のカテコール OH ($\sim 3650\text{ cm}^{-1}$)、分子内水素結合カテコール OH ($\sim 3580\text{ cm}^{-1}$) 伸縮振動バンドがドーパミン/ドーパ-CE 複合体両方で観測されていない。これは、両カテコール OH 基が YEMPS と強い水素結合を形成したため、これらのバンドがレッドシフトしたためだと考えられる。この結果から、CE でリガンドのアミン側鎖を包接保護したことにより、目論見通り両カテコール OH 基が YEMPS と結合している複合体を選択的に生成できたと結論できる。先行研究では α シヌクレインのドーパミン結合モチーフはリガンド結合時に何らかの二次構造を形成していることは示唆されているが[4]、その立体構造については未だに明確な結論が出ていない。講演では、二次構造を反映する amide-I バンドに基づいて、YEMPS の立体構造について議論する。

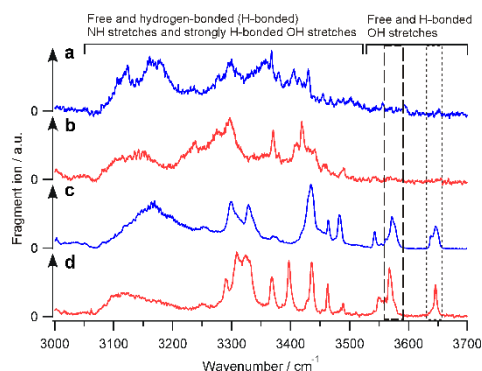


Fig. 3. IRPD spectra of the X-H stretching region of (a) YEMPS-dopamine-CE, (b) YEMPS-dopa-CE, (c) YEMPS-dopamine, and (d) YEMPS-dopa. Vibrational region of free OH stretching vibration of catechol is shown by the dotted rectangle, while that of the (weak) intramolecular hydrogen-bonded OH vibrations of catechol is marked by the dashed rectangle.

【参考文献】

- [1]P. E. Wright, et al., *J. Mol. Biol.* **293**, 321 (1999). [2]R. Cuchillo, et al., *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1004 (2012). [3]T. Sekiguchi, et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 5626 (2018). [4]F. E. Herrera, et al., *PLoS One.* **3**, e3394 (2008).