

2P048 分子拡散測定によるポリペプチド鎖の二次構造変化の研究

(京大院理) 井上圭一, 岩谷健二郎, 馬殿直樹, 寺嶋正秀

【序】フォールディング問題を初めとする巨大なタンパク質分子の構造変化過程やその溶媒との相互作用に対する研究は、タンパク質自身の生理的な機能の発現を理解するうえで非常に重要なものとなっている。これまでタンパク質の構造研究には可視・紫外分光法、FTIR、ラマン分光法、円偏光二色性法等の分光学的手法や NMR、小角 X 線散乱などの様々な実験法が用いられてきた。また近年、タンパク質の構造変化を拡散定数の時間変化を通して調べることが、過渡回折格子法 (TG 法) を用いることによって可能になっている。時に拡散定数は分子全体の構造や周辺の溶媒環境を敏感に反映するため、タンパク質の構造を調べる上で非常に多くの知見を与えると期待される。しかし、タンパク質が構造を変えたときにどのような拡散定数の変化として現れるのか、その相関関数についてはわかっていない部分が多く、拡散定数の値からタンパク質自身の構造や溶媒との相互作用を研究する上ではその知識が重要になる。

本研究ではタンパク質の構造変化と拡散定数の相関を明らかにするため、モデル化合物であるポリ-L-グルタミン酸 (PLG) について調べた。このポリペプチドは水溶液中で pH5.5 あたりを境として、pH が低くなるとランダムコイル状態から α -ヘリックスへと大きく構造を変化させることが知られている。この構造変化に伴うポリペプチドの拡散定数変化を測定することで、タンパク質の二次構造と拡散定数の相関に対する知見を得ることを目指した。

【原理と実験】TG 法では 2 本のパルス光をポンプ光として入射させることにより、光学的な干渉縞を溶液上に作る。これにより光強度の強いところでより多くの分子が励起され、それによる周期的な屈折率変化や吸収率変化が生じることで過渡的な回折格子が形成される (図 1)。この回折格子に別のプローブ光を入射させることで過渡回折光 (TG 光) が得られる。その強度変化から励起後の分子のダイナミクスを知ることができる。特に今回は分子の並進拡散運動に着目した。単一分子種が拡散した場合 TG 信号は $\exp(-Dq^2t)$ で減衰する (D : 拡散定数、 q : 格子波数) ため種々の q^2 で信号の減衰速度定数を測定し、 D を求めた。

実験では XeCl Excimer レーザー (308 nm) の光を励起光とし、ビームスプリッターで分けた後サンプル溶液中に交差させる形で入射させた (図 1)。プローブ光には 780 nm のダイオードレーザーの光を用い、2 本のポンプ光の交差点へ、Bragg 角を満たすように入射させた。このときに生じる TG 光は光電子増倍管を用いて検出された。

サンプルとして 100 mM の NaCl を含んだ 300 μ M の PLG (平均分子量 75,000) 溶液を用い

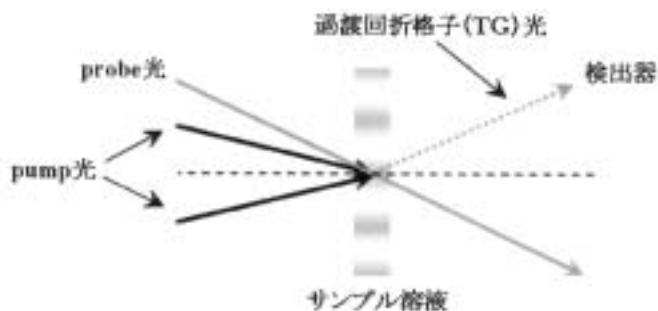


図1 過渡回折格子法概念図

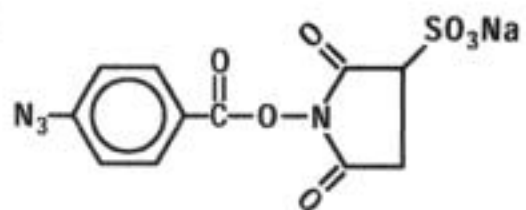


図2 sulfo-HSAB 構造式

た。またポンプ光照射により溶液の屈折率変化を生じさせるための光ラベリング剤として、ポリペプチドと等量の *N*-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (sulfo-HSAB、図2) をサンプル溶液に加えた。これはポリペプチドに結合し、光励起により N_2 を解離することで TG 信号を出すことができる。¹⁾

【結果】図3に sulfo-HSAB のみを 100 mM NaCl 水溶液に加えて測定した TG 信号と、300 μ M PLG 溶液に sulfo-HSAB を加えて得られた信号を示す。PLG の入った試料では 3-50 ms の遅い時間領域に sulfo-HSAB のみのものには見られない成分が現れていることがわかる (図3 * 部)。この減衰成分は単一の指数関数で再現することができ、格子波数 q を変えることでこの成分の寿命が変化することから、これは拡散過程を表す信号であることがわかった。その寿命は sulfo-HSAB のみの場合の減衰寿命と比べて 1 桁以上遅く、これは大きい分子量を持つ PLG の溶液中での並進拡散運動に対応すると帰属付けされた。格子波数 q とこの減衰成分の寿命から PLG の拡散定数は pH 6.75 で $1.4 \pm 0.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と求められた。この付近の pH 領域では PLG は完全にランダムコイル型になっていることが円偏光二色性測定から判っている。同程度の分子量を持つ通常のタンパク質の場合、ランダムコイル構造をとると経験的にその拡散定数は $3.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 程度の値になることがわかっているが、今回の PLG の拡散定数はその値の半分程度となっている。これはこの pH で PLG の極性残基のグルタミン酸残基が完全に脱プロトン化しているため、極性溶媒の水分子との相互作用が強く、通常の疎水性残基を含んだ天然タンパク質よりも拡散運動が妨げられるためであると考えられる。

次に PLG の溶液に塩酸を加えて pH を変え、拡散定数の pH 依存性を測定したところ図4のようになった。これを見ると pH 6.0 付近までは pH を下げてもあまり拡散定数に変化は無いがその後徐々に大きくなり最終的に α -ヘリックスを形成するような pH 5.0 以下では拡散定数の値は $2.0 \pm 0.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ となった。ここからランダムコイル状態にあった PLG が α -ヘリックスに構造変化すると、拡散定数がおおよそ 1.4 倍大きくなることがわかった。この値の変化は α -ヘリックスの構造がランダムコイルのものよりコンパクトであることと、グルタミン酸残基の側鎖が低 pH でプロトン化されたことにより溶媒分子との相互作用が弱まったことに対応すると考えられる。今後更にモデルポリペプチドや溶媒条件等を変化させることで、拡散定数の変化の様子からより詳しいペプチド-溶媒の相互作用変化を研究することが出来ると考えている。

[参考文献] 1) N.Baden, and M. Terazima, *Chem. Phys. Lett.* In press

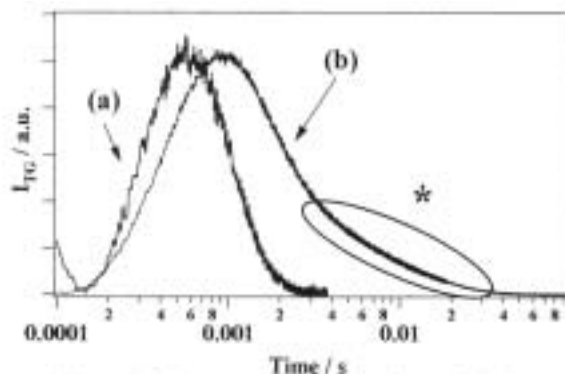


図3 ポリ-L-グルタミン酸 TG 信号
(a) sulfo-HSAB のみ (b) PLG + sulfo-HSAB 溶液

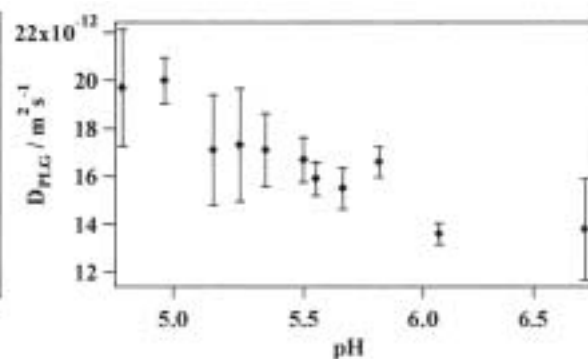


図4 PLG の拡散定数の pH 依存性