

平成19年度工学部予算重点配分研究テーマに係る研究報告書
「タンパク質周囲の水」を取り込んだヘリックス-コイル転移機構の提案と
分光学的な方法による実証

研究代表者:水野 和子(生物応用化学専攻・准教授)

概要	タンパク質の「構造と機能」の間の関係を調べる戦略は、タンパク質についての多くの知見をもたらしてきたが、タンパク質の基本的な性質であるコンフォメーション変化が生じる原因については、これまでわかってこなかった。最近、理論やシミュレーションの研究者が、その一番の原因になっているのは、「水の並進のエントロピー」であることを提案している。私は、有機化合物の水溶液中の水の水素結合を調べる実験から、タンパク質の周囲の水分子の分極がアミノ酸の側鎖の種類と、タンパク質の二次構造に依存していると考えようになり、周囲の水を取り込んだヘリックス-コイル転移機構を提出してきた。本研究ではこれを実験的に証明するためのプローブを確立することを最初の目的とした。その結果、水溶液中に5 vol%程度まで重水(D ₂ O)を加えてできるHODのO-D伸縮振動バンドを赤外分光法で測定することが有効であることを見出した。そして、 <i>N</i> -メチルフォルムアミドやアラニンのジペプチドなどの水溶液で、バルクとは完全に区別できる溶質周囲の水分子に対応するO-D伸縮振動バンドを測定することができた。さらに、タンパク質水溶液についても測定を始めた。ただ、タンパク質のコンフォメーションをしらべるための測定法であるCD(円二色性)法ではタンパク質の濃度は極端に低いのに対して、IR法による測定はタンパク質濃度がかかなり高くなる。この問題を克服しながらの実験を工夫していくことが今後の課題である。
関連キーワード	ヘリックス-コイル転移機構, タンパク質周囲の水

研究の背景

タンパク質の研究が花盛りという印象を受けるが、これまでの「構造と機能」の観点からタンパク質だけを研究の対象にしてきた研究方法は大きな壁にぶつかっている。この状況を打開するキーワードが「水」であることに多くの研究者が気づいていることを、2007年12月の日本生物物理学会で実感することができた。そ

の多くはしかしながらシミュレーションを利用した研究で、実験的な結果にもとづいている報告はほとんどなかったと言わざるを得ない。本研究では、周囲の水と相互作用をしているタンパク質を常に考えて、ヘリックス-コイル転移を起こす理由をこのモデルで説明するための仮説の提案とその実証を試みている。

研究の目的

私はこれまでに、種々の有機化合物水溶液中の水分子の分極が、溶質の種類と濃度に応じてさまざまに変化することを実験的に見つけてきた。これより、タンパク質を構成する20種のアミノ酸は、その周りの水分子の分極をそれぞれ異なる大きさに変化させることができる、したがって、固有のアミノ酸配列をもつ個々のタンパク質は、周りの水分子の分極、水素結合状態を固有の状態に制御することができる（仮説1）。タンパク質の二次構造が異なれば、個々のアミノ酸と最近傍の水分子との関係も異なると考えなければならない。また、ヘリックスの周囲では、タンパク質の水素結合配列に由来する双極子の場が形成されることも予想できる。すなわち、同じアミノ酸配列においても、ヘリックスとコイルでは、周囲の

水の状態が異なると考える（仮説2）。ヘリックス-コイル転移が生じるのは、温度の変化や、変性剤などの添加、pHの変化などの、水とタンパク質との安定な関係が妨害される時である。外的な条件でバルクの水の状態が変化した時、ルシャトリエの法則にしたがって、これと逆方向に水の状態を変化させるための構造へとタンパク質が自己防衛機構を発揮する手段として、ヘリックス-コイル転移が生じると考える（仮説3）。本研究では、仮説1と仮説2を実験的に証明したい。

私はこれまでに、水溶液中の水の水素結合を調べるために、水プロトンのケミカルシフトをプローブとする方法を提出して、実際に測定・報告もしてきた。しかしながら、核磁気共鳴分光法の測定のタイムスケールは10⁻⁷sec程度

で、水分子の運動のタイムスケールよりはるかに遅く、したがって、タンパク質近傍の水とバルクの水を区別することができない。これに対

して、本研究では、水素結合の強さが異なる水の区別が可能な赤外分光法の利用を考えた。

研究の結果と成果

1. 水の水素結合の強さのプロープ, $\nu(\text{O-D})$

Fig.1 にテトラヒドロフラン(モル分率0.1)水溶液の O-H 振動スペクトルを示す。水の $\nu(\text{O-H})$ バンドは $3700\text{-}3000\text{cm}^{-1}$ の波数領域に、余りに広いバンド幅と強い吸収強度を持つために定量的に測定ができない。本研究では、5 vol% までの D_2O を加えて H_2O との反応で生じる HOD の $\nu(\text{O-D})$ バンド($\sim 2500\text{cm}^{-1}$) を水の水素結合を調べるためのプロープとした。 $\nu(\text{O-D})$ スペクトルを単離するために、参照セルにも試料溶液と同じ濃度の溶質を溶解して、参照セル中に、「試料溶液中と全くおなじに溶質の影響を受けている水(H_2O)」を作り出してそのスペクトルを差し引いた Fig.1 では [I-II] で示している Fig.2 に [テトラヒドロフラン/水] 系の組成の変化に伴うスペクトルの変化を示した $\nu(\text{O-D})$ が水の濃度減少に応じて単調にブルーシフトし、ケミカルシフトで測定した結果と一致することより、水の水素結合のプロープとして利用できることがわかる。さらにここでは示さないが、アミドやジペプチドを広い濃度範囲で変化させた時、これらの自己会合の進行に応じて複数の $\nu(\text{O-D})$ バンドを観測することができた。

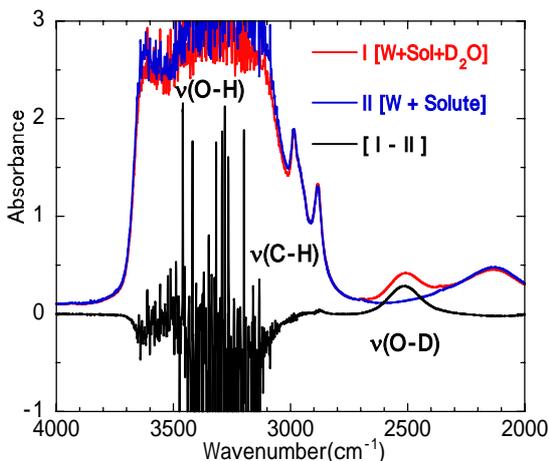


Fig.1 Isolation of $\nu(\text{O-D})$ spectrum.

2. タンパク質水溶液中の水

本研究では、アミノ酸の側鎖の性質の違いに

よって、周囲の水分子の分極が異なると予想しているため、本研究に最もふさわしいタンパク質は一種類のアミノ酸残基のみから構成されているポリペプチドである。市販の試薬から手に入れられるものとしてポリ-L-リジン (poly-L-Lys) を購入して、測定を試みた。

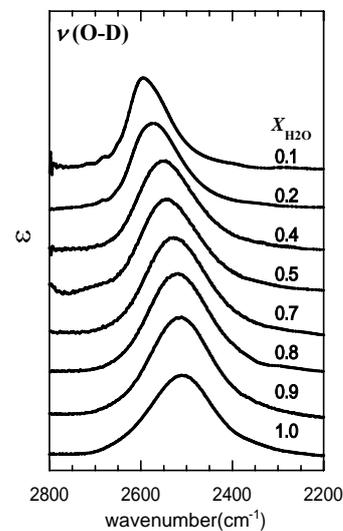


Fig.2 $\nu(\text{O-D})$ spectra for [tetrahydrofuran/water] mixtures at various $X_{\text{H}_2\text{O}}$.

すなわち、pH を変化させて、上記の方法で溶液中の HOD の $\nu(\text{O-D})$ スペクトルの変化を測定した。しかしながら、非常にわずかな変化しか観測できなかったため、タンパク質の濃度を変化させて測定するなどの基本的なデータを取ることに始めて、この測定法で、仮説の証明めざしたい。

仮説と上記の実験結果を、Joint Conference of JMLG/EMLG Meeting 2007(Fukuoka, Nov.) と日本生物物理学会第 45 回年会(横浜 12 月)で発表した。

配分額と支出内訳

1. 配分額: 円
2. 支出内訳: 円
 円
 円
 円