

研究テーマ	「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実証：トリフルオロエタノールによるアルツハイマー- β -(1-40) のヘリックス形成	○ H19 から 継続
研究代表者	生物応用化学専攻・准教授・水野 和子	
研究成果の概要		
<p>研究の背景と目的</p> <p>実験方法</p>	<p>タンパク質の「構造と機能」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イル-ヘリックス転移が生じる原因については、これまでわかってこなかった。本研究で取り上げているトリフルオロエタノール (TFE) は、20vol% 程度を水に混合することによって、タンパク質中のコイル部分やベータシート部分を完全にα-ヘリックスに変化させてしまうことが知られており、この原因についての多くの研究が報告されてきた。それらは、転移の原因がタンパク質と TFE との分子間相互作用にあると発想するもので、TFE によって、水の性質が変化する効果を取り込んだ報告は、これまで見られてこなかった。本研究では、TFE によるコイル-ヘリックス転移が、TFE によって、水の性質が変化的ことと関係があるのではないかと予想して、TFE による水の性質の変化とをまず赤外分光で調べ、次にこれにタンパク質を加えた系での水の性質の変化と、タンパク質のコイル-ヘリックス転移を同じく赤外分光法で調べた。</p> <p>昨年度から、有機化合物と水の混合物中の水の性質をしらべるために、2~5vol% の D₂O を試料に加えて生じる HDO を水のプローブ分子として、赤外吸収スペクトルを測定することが、水の水素結合を調べる有力な方法であることがわかってきた。本研究ではこれをさらに確かな方法とするために、1) 光路長が限りなく近いウォータージャケット付き液体セル2つを一組として、温度を制御しながら赤外吸収スペクトルを測定する、2) 水の O-H 基の水素結合ドナー性を調べる目的で、HDO の O-D 伸縮振動バンドを測定する。この時、試料室内の二酸化炭素の量がわずかでも変化すると、O-D バンドと同じ波数領域にあるために、不都合が起きる。この不都合を解決する目的で、シングルビーム方式の分光系をダブルビーム方式のように改良して、すなわち、参照と試料用の二つのセルをシャトルのように動かして、交互に測定することで、この不都合を解消できた。3) 参照セルの溶液中にも溶媒の(水+TFE)だけではなく、タンパク質を入れることで、(水+TFE+タンパク質)を参照溶液として、(水+TFE+タンパク質+HDO)中のHDOのスペクトルを測定した。この、solute-affected waterを差し引く方法は、HDO スペクトルのみの観測を可能として、コイル-ヘリックス転移に伴う水の性質の変化を詳しく測定できるようになった。</p>	

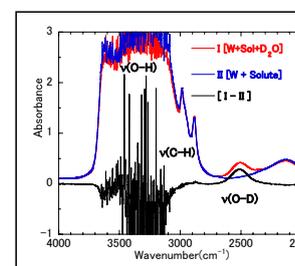
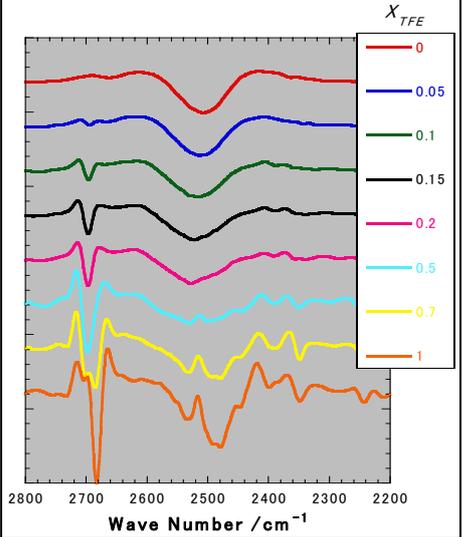


Fig.1 v(O-D) spectrum as a probe of water.

<p>実験の結果と解析</p>	<p>アルツハイマー病の患者から検出されるアミロイド成分であるアルツハイマー-β-(1-40) (A-β-40) は、分子全体がベータシートを持つために、ヘリックス転移を調べるタンパク質として理想的である。しかしながら、予備的、基礎的な研究段階で使用するタンパク質として高価すぎる。そこで、本研究では、A-β-40ほど完全ではなく、85%程度のベータシートを持つ、β-ラクトグロブリンをタンパク質として選んで、TFE の濃度を变化させたときの水の赤外吸収スペクトルを調べた。</p> <p>Fig.2 に、(水 + TFE + HDO) のν(O-D) 伸縮振動バンドの二次微分曲線を TFE の濃度を増加させて測定した結果を示してある。X_{TFE} が増加するにつれて、ピークの波数が高波数側にシフトしていく。これは TFE が水の O-H 基の水素結合ドナー性を減少させることを明確に示している。</p> <p>ここには示さないが、(水 + TFE + HDO + β-ラクトグロブリン) においてもほとんど同じ結果、すなわち、1) 水の水素結合ドナー性が低下し、しかも、2) 水の変角振動バンドが高波数側にシフトして、水分子の並進・回転の自由度が低下する、という結果が得られた。さらにこのとき、3) アミド I バンドのシフトから、ベータシートからアルファヘリックスへの転移が確かめられた。</p> <p>本研究の実験結果は、タンパク質の conformation 変化が、TFE のみではなく、TFE によって変化する水の性質と関係していることを明確に示した。水の極性の低下は、溶媒としての(水 + THF)の極性を低下させ、その結果、水素結合性の溶質の、水素結合形成による自己会合を促進させる。β-ラクトグロブリンの folding をこのような分子論的な見方で説明することができる。</p>																				
<p>結論</p>	<p>Fig.2 Quadratic derivatives of the Absorption curves.</p> 																				
<p>経費の支出額内訳</p>	<table border="0"> <tr> <td>消耗品費</td> <td>タンパク質, アルコールなどの試薬とガラス器具</td> <td>■</td> <td>■</td> <td>円</td> </tr> <tr> <td></td> <td>赤外用フッ化カルシウム窓板温度可変セルの購入</td> <td>■</td> <td>■</td> <td>円</td> </tr> <tr> <td>旅費</td> <td>1 2 月福岡での生物物理学会での発表</td> <td>■</td> <td>■</td> <td>円</td> </tr> <tr> <td></td> <td>合計</td> <td>■</td> <td>■</td> <td>円</td> </tr> </table>	消耗品費	タンパク質, アルコールなどの試薬とガラス器具	■	■	円		赤外用フッ化カルシウム窓板温度可変セルの購入	■	■	円	旅費	1 2 月福岡での生物物理学会での発表	■	■	円		合計	■	■	円
消耗品費	タンパク質, アルコールなどの試薬とガラス器具	■	■	円																	
	赤外用フッ化カルシウム窓板温度可変セルの購入	■	■	円																	
旅費	1 2 月福岡での生物物理学会での発表	■	■	円																	
	合計	■	■	円																	
<p>その他特記事項</p>	<p>本研究の結果を 日本生物物理学会 (福岡) と、特定領域研究「水と生体分子」 成果取りまとめ公開シンポジウム(3 月 岡崎) で発表した。</p>																				