

平行および逆平行 β -シート構造ならびにその混在系に関する 固体 NMR 構造解析

(農工大院工・科博)

○堀口紅実子、亀谷俊輔、山内一夫、朝倉哲郎

Solid-state NMR Analyses of Parallel and Anti-parallel β -sheet Structures, and Their Mixing System.

(Department of Biotechnology, Nature and Science Museum,
Tokyo University of Agriculture and Technology,)

○Kumiko Horiguchi, Shunsuke Kametani, Kazuo Yamauchi and Tetsuo Asakura

The β -sheet structures of alanine oligopeptides, *Samia cynthia ricini* silk fibroin and their model peptides were studied with solid-state NMR including ^{13}C spin-lattice relaxation time and X-ray diffraction powder pattern analyses. The appearance of unique structures which consist of mixture of parallel and anti-parallel β -sheet structures was observed for longer alanine peptides than (Ala)₇. The similar structure was also proposed for *Samia cynthia ricini* silk fibroin fibers. Since the structure of the silk fibroin fibers has been considered to be exclusively anti-parallel β -sheet structure, this proposed structure will give new insight on their structure-property relationship.

【緒言】

生体高分子にみられる二次構造の一つである β -sheet 構造は、重大な神経性の病気を引き起こすアミロイド線維の構造と対応することもあって、現在、その構造研究は非常に注目を浴びてきている¹⁾。我々は、これまで、ポリアラニン残基のメチル基の化学シフトは β -sheet 内での平行型 (Parallel, P) と逆平行型 (Anti-Parallel, AP) の違いを反映して異なることを報告してきた²⁾。

本研究は、鎖長を変化させた一連のポリアラニンの詳細な固体 NMR 研究から、アラニンが 7 残基以上で、平行型 β -sheet 構造と逆平行型 β -sheet 構造が一定の割合で混ざった、特有の分子間配置を優先的にとることを見出した。その時のアラニン残基自身の運動性は高く、単結晶 X 線解析等の手法では得られない固体 NMR 独自の知見と考えられる。また、このような特有の分子間配置の発現は、実際に、ポリアラニンを多く含む野蚕の一種であるエリ蚕の絹フィブロインでも確認された。これまでは、絹繊維の構造は、逆平行型 β -sheet 構造と考えられてきたが、平行型 β -sheet 構造も大きく関与した特有の分子間配置をとることが明らかとなった。

平行および逆平行 β シート構造、固体 NMR 構造解析、安定同位体ラベル、アラニンオリゴマー、X 線構造解析

ほりぐちくみこ、かめたにしゅんすけ、やまうちかずお、あさくらてつお

【実験】

Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて、一連のアラニンオリゴペプチド、(Ala)₃-(Ala)₈、(Ala)₁₂ならびに (Ala)₁₂の両端に Gly-rich 領域が結合した 34 残基からなるエリ蚕絹のモデルペプチドを合成した。その際、目的に応じて、適宜、残基特異的に ¹³C ラベル化を行った。また、(Ala)₃と (Ala)₄については、溶媒処理を変えることによって 100% 平行型と 100%逆平行型 β-sheet 構造に調整した。

一連の固体 NMR データを取得するために、¹³C CP/MAS NMR、RFDR、2 次元スピンドット NMR、¹³C スピン-格子緩和時間(T₁)等の測定を、Bruker Avance 400 ならびに CMX Infinity 400 を用いて行った。また、一連のアラニンオリゴペプチドについて、分子間配置の情報を得るために、粉末 X 線測定を行い、面間隔を決定した。さらに、特有の分子間配置を持つ β-sheet 構造に関して、水溶液からの発現を検討するために、Material Studio Discover を用いて、長期間にわたる MD 計算を行った。

【結果】

アラニンオリゴペプチドにおける特有の分子間配置の出現

Fig.1 に、一連のアラニンオリゴペプチド、(Ala)₃-(Ala)₈について、¹³C CP/MAS NMR スペクトルのメチルピークと粉末 X 線回折の結果を示した。(Ala)₃-(Ala)₆までは、100%逆平行型 β-sheet 構造である (ペプチドの両端と内部で AlaC δ の化学シフトが異なることを反映してピークが分裂するが、長くなると 20.5ppm 付近に収束する)。一方、(Ala)₇以上から、ピークの線形が大きく変化する。(Ala)₈ならびに (Ala)₁₂、(Ala)₁₂を含むエリ蚕絹フィブロインさらに 34 残基のモデルペプチドでも、メチルピークは (Ala)₇と同様の線形である。また、粉末 X 線パターンは、(Ala)₇以上で、突然、面間隔が大きく異なり (破線)、特有の分子間配置の出現を示している。この傾向は、固体 NMR データと一致する。

(Ala)₇の ¹³C メチルピークについての詳細な解析

そこで、(Ala)₇について詳細に固体 NMR 解析を進めた。中央部の 4 残基のみを選択的に ¹³C ラベルした A₃[3-¹³C]A⁴A₃を合成し、そのメチルピークの線形をノンラベル試料 (Ala)₇と比較した (Fig.2)。高磁場側の 17.5ppm 付近のブロードなピーク (↓印, Fig.2) は、中央部をラベルした

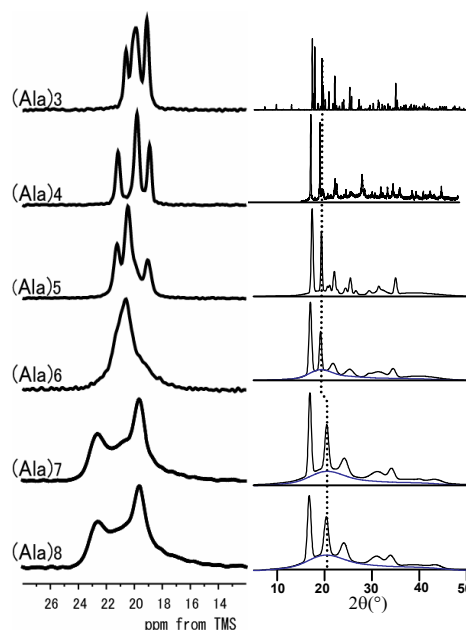


Fig.1 Ala C δ region ¹³C CP/MAS NMR spectra and X-ray diffraction powder patterns of (Ala)₃-(Ala)₈ with β-sheet structures.

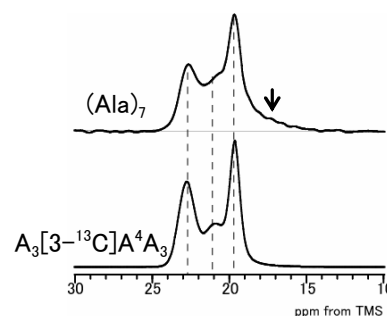


Fig.2 Expanded Ala C δ region of ¹³C CP/MAS NMR spectra of non-labeled Ala₇ and A₃[3-¹³C]A⁴A₃.

試料では消失することから、ペプチド鎖末端のピーク (random coil) に帰属される。従って、 ^{13}C ラベル試料で観測された 3 つのピーク (破線部) は、(Ala) $_7$ の中央部に帰属される。次に、この 3 つのピークは、 β -sheet 構造の範囲で内部回転角の違いを反映しているのか、または、分子間配置の違いを反映しているのかを区別する必要がある。

そこで、先ず、当研究室で作成した AlaC8 の化学シフト等高線マップ³⁾ を用い、 β -sheet 構造の範囲内での内部回転角の変化に伴う化学シフトの変化を検討した (Fig.3)。その結果、 β -sheet 構造の範囲内では、内部回転角が異なっても、化学シフトの違いはわずかであり、3 つのピークの出現は、主に分子間配置の違いを反映することが明らかとなった。

次に、 $\text{A}_3[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{A}^4\text{A}_3$ の ^{13}C ラベル部位の $^{13}\text{CT}_1$ の測定を行い、各ピークについて、その部分緩和スペクトルを詳細に検討した (Fig.4)。低磁場ピーク (A) の $\ln(M_0 - M_z)$ vs τ_z のプロットは、直線となるので 1 成分であった。一方、高磁場側の 2 個のピーク (B,C) は、直線からずれて、2 成分から成ることが明らかとなった。Tab.1 に、各ピークの $^{13}\text{CT}_1$ 値とその割合をまとめた。

(Ala) $_7$ のメチル基の $^{13}\text{CT}_1$ の温度変化の実験から、高温では $^{13}\text{CT}_1$ 値は長くなることから、本実験の状況下では、 $^{13}\text{CT}_1$ 値が長いほど運動性が高いと考えられる。Fig.1 の逆平行 β -sheet 構造の (Ala) $_3$ -(Ala) $_6$ までの $^{13}\text{CT}_1$ 値は 90-160ms の範囲であった。一方、(Ala) $_7$ の 3 個の主ピークの $^{13}\text{CT}_1$ 値は 7-10 倍程度長くなっており (Tab.1)、(Ala) $_7$ 以上の鎖長で急激に運動性が上昇したことが分かる。すなわち、分子間の構造が急激に変化し、緻密な逆平行型 β -sheet 構造の分子間配置から、メチル基が回転しやすい平行型 β -sheet 構造の分子間配置に、その構造が変化したことに起因すると考えられる。実際、100%平行型と 100%逆平行型 β -sheet 構造をとる (Ala) $_3$ および (Ala) $_4$ では、平行型のメチル基の T_1 は、逆平行型と比較して 3 倍以上長いことを報告している。²⁾ Tab.1 の B のピーク中には、9%の 170ms の成分があり、これが (Ala) $_3$ -(Ala) $_6$ までの逆平行 β -sheet 構造の成分に相当すると考えら

Tab.1 $^{13}\text{CT}_1$ and fraction of three Ala $^{13}\text{C}\beta$ peak of $\text{A}_3[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{A}^4\text{A}_3$

peak	$^{13}\text{CT}_1$ (fraction)
A	1160ms(40%)
B	170ms(9%), 670ms(16%)
C	290ms(17%), 910ms(18%)

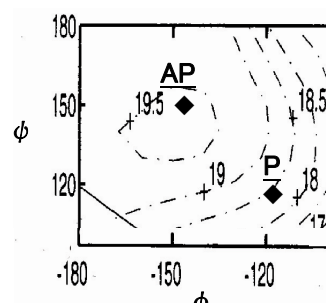


Fig.3 ^{13}C Ala C8 chemical shift contour plot as a function of torsion angles in β -sheet region.

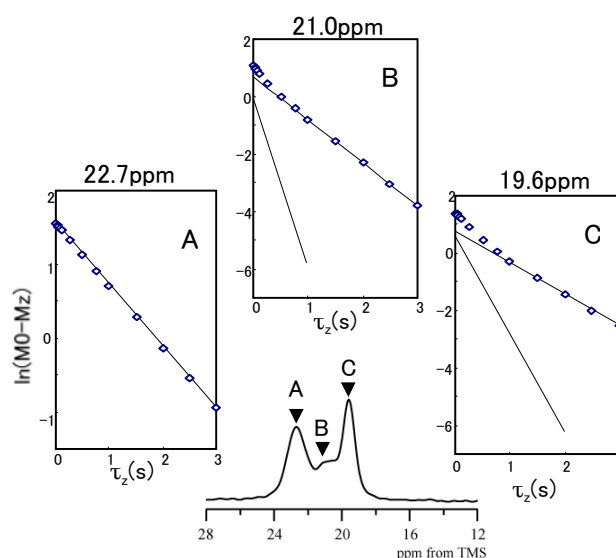


Fig.4 $\ln(M_0 - M_z)$ vs τ_z plots of three Ala $^{13}\text{C}\beta$ peak of $\text{A}_3[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{A}^4\text{A}_3$

れる。実際、Bの化学シフトは、(Ala)₆と一致する。

興味深いことは、(Ala)₈、(Ala)₁₂ならびに(Ala)₁₂を含むエリ蚕絹フィブロインならびに34残基のモデルペプチドのメチル基は、大きく3本に分裂し、基本的に(Ala)₇のメチル基の線形と同じである点、さらに、その緩和挙動も同じである点である。このことは、ポリアラニンの分子鎖が7残基以上で急激に動きやすくなっただけではなく、特有の分子間構造が新たに発現し、それが主構造となったことを意味する。この平行型β-sheet構造を基本とした、(Ala)₇以上で発現する特有の分子間構造を有するモデルの詳細については、現在、検討中である。

ポリアラニンに特有な分子間配置の発現に関する分子動力学 (MD) による検討

水溶液中で、ランダムに平行または逆平行をとらせて配置した伸びた状態のポリアラニン鎖が水分子の減少に伴い、その分子間配置を自由に変えながら、最終的に乾燥状態で凝集したβ-sheet構造を形成するシミュレーションを行った。すなわち、100本の(Ala)₁₂をa軸方向に並べ、その周囲に5000の水分子を配置し、溶解状態とした(Fig.5-A)。この初期構造から水分子を14段階(各50Psec)にわたって、徐々に減らすとともに、b, c軸方向の分子間配置は、自由に変えることができるようにして、MDシミュレーションを開始した。

水分子が除かれた最終的な凝集状態(Fig.5-B)では、ポリアラニン鎖で形成されるβ-sheet構造は、平行型と逆平行型が独立の領域を形成するのではなく、同一シート内に両β-sheet構造が混在した分子間配置が多く出現するという結果(一例としてB図中の網かけ部分)となった。この結果は、固体NMRの結果に対応する。

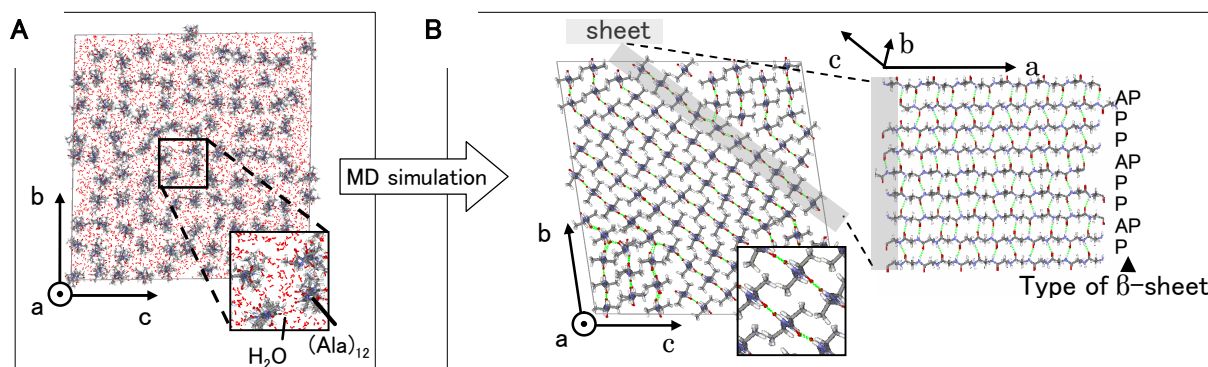


Fig.5 MD simulation concerning aggregation of polyalanine chains. The special structures with parallel and anti-parallel β-sheet chains were generated after removal of water molecules.

参考文献

- 1) A. T. Petkova, G. Buntkowsky, F. Dyda, R. D. Leapman, W. -M. Yau, R. Tycko, *J. Mol. Biol.* 2004, 335, 247.
- 2) T. Asakura, M. Okonogi, Y. Nakazawa, K. Yamauchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 6231.
- 3) T. Asakura, M. Iwadate, M. Demura, M. P. Williamson, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1994, 24, 167.