



CDスペクトルおよびFT-IRスペクトルからのタンパク質二次構造含量の求め方 Method of protein secondary structure content from CD spectrum and FT-IR spectrum

岡村元義, 木下薫

株式会社 ファーマトリエ
www.pharmatelier.com

CDスペクトルのどこがタンパク質の二次構造を反映しているのか？

タンパク質の遠紫外領域のCDスペクトルは、ペプチド主鎖のアミド領域の吸収帯であるが、 α ヘリックス、 β シート及びその他(ランダムコイル)という二次構造にそれぞれ特徴的なスペクトルを呈する。(図1) 測定法によって二次構造を帰属させる方法として、計測の容易さからCDスペクトルが専ら用いられている。しかしながら、遠紫外領域のCDスペクトルと二次構造含量に相関がみられないことが往々にしてある。これは**推定のアルゴリズム**や**波長領域に原因があるのではなく、二次構造帰属法に問題がある**と考えられる。

DSSP法¹⁾は、遠紫外領域CDスペクトルを用いる帰属法で、それぞれの二次構造含量が100%のときの参照スペクトルから推定する簡易な帰属法であるのでもっともよく用いられている。CDスペクトル分光光度計は、HPLCの検出器型も市販されており(日本分光)、リアルタイム・リリースの手法としても使える可能性がある。

CDスペクトルはバイオ医薬品のCTDの特性解析の項に普遍的に記載されているが、標準物質との比較(スペクトルのパターン認識)で終わっているケースもあり、もったいない。

Protein Data Bank (PDB) 5)には、X線結晶解析によるタンパク質の二次構造情報が多くのタンパク質で記載されており、有用である。

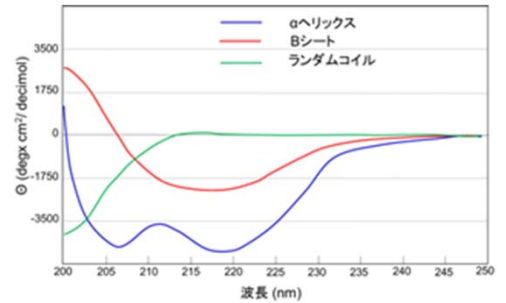


図1 タンパク質二次構造のCDスペクトル

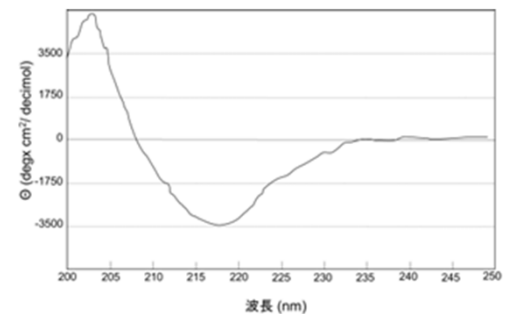


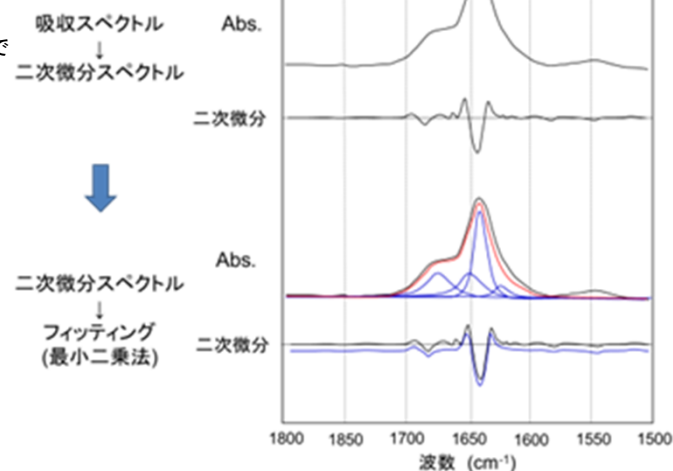
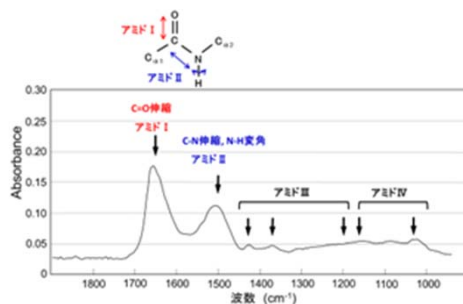
図2 IgG1の遠紫外領域のCDスペクトル

FT-IRスペクトルのどこがタンパク質の二次構造を反映しているのか？

波数1653cm⁻¹のアミド I 吸収は二次構造を反映していると記載されることが多いがこれは正しくない。この吸収はペプチド主鎖カルボニル基の振動に帰属されるタンパク質共通の吸収であり、タンパク種固有の二次構造が反映されるのはその形状である。 α ヘリックス、 β シートおよびランダムコイルの組成比によりアミド I ピーク形状が異なってくる。

抗体のような高分子タンパク質では二次構造を反映する連成振動が多く帰属が難しいが、二次微分スペクトルをもとにフィッティングを行うことで、二次構造の比率を算出することができる。²⁾

フィッティング解析のポイントは、原スペクトルに一致するまで二次構造からくるピークを加えていく作業である。このフィッティングの成否が二次構造含量算定結果に大きく効いてくる。



結論

IgG1はほとんど α ヘリックス構造を持たないことが3方法の結果から分かる。 β シート含量及びランダムコイルについては3法の結果に差が見られるが、FT-IRスペクトルも正しく解析法を使えば、有用な二次構造特性値が得られることが示された。

方法	α ヘリックス含量(%)	β シート含量(%)	その他(%)
X線結晶解析 ⁵⁾	3	67	30
CDスペクトル DSSP法 ^{1),3)}	3	52	45
FT-IRスペクトル ⁴⁾	3	64	33

文献

- 1) 小副川博也学位論文, 蛋白質の二次構造帰属法ProSSAの応用とアプリケーションの開発, 2008.
- 2) 平松弘嗣, 赤外吸収スペクトルを用いた二次構造解析法, 蛋白質科学会アーカイブ, 2, e054, 2009.
- 3) Alena Janda, Arturo Casadevall, Circular Dichroism reveals evidence of coupling between immunoglobulin constant and variable region secondary structure, Molecular Immunology 47,142-1425, 2010.
- 4) FT-IR Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, Acta B.B. Sinica,39,549-559,2007.
- 5) Protein Data Bank (PDB): <http://www.rcsb.org/pdb/>