

赤外分光法を用いたタンパク質の二次構造解析

著者

Suja Sukumaran
Thermo Fisher Scientific, USA

キーワード

FTIR, ATR, タンパク質の構造解析、
バイオセル、ConcentrateIR2、透過
測定

序章

フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) は、さまざまな分野で使用される最も汎用性の高い分析手法の1つです。本アプリケーションノートでは、全反射 (ATR) 測定および透過測定アクセサリを搭載したThermo Scientific™ Nicolet™ iS10 FTIRおよびThermo Scientific™ Nicolet™ iS50 FTIRを使用して、タンパク質の二次構造を決定する方法について解説します。タンパク質のデータベースに基づく構造計算およびスペクトル分解の検討をします。分析は迅速かつ容易に実施できます。

はじめに

タンパク質の二次構造は、タンパク質およびペプチドの繰り返し構造を説明するものです。二次構造には主に α -ヘリックスと β -シートの2つの形態があり、これらはタンパク質のペプチド骨格を形成するアミン水素原子とカルボニル酸素原子間の水素結合のパターンに由来する名称です¹。タンパク質の二次構造を理解することは、タンパク質の構造と安定性に対する洞察を得る上で重要です。例えば、二次構造の温度依存性分析は、活性のある治療用タンパク質を維持するための保存条件を決定する上で極めて重要です²。タンパク質の二次構造は、さまざまなタンパク質の構造と機能の関係や触媒反応を理解する上でも極めて重要です³。

FTIRは、タンパク質の二次構造と局所的な構造変化を調査するための強力な分析手法として、確立されています^{1,4}。典型的なタンパク質の赤外スペクトルには、タンパク質の骨格とアミノ酸側鎖の両方からの振動により、9つのアミドバンドが含まれていることがあります。そのうち、タンパク質の二次構造と特に関連性が高いのはアミドIとアミドIIのバンドです。C=O伸縮振動に関連する吸収はアミドIと表記され、一方、N-H変角振動に関連する吸収はアミドIIと表記されます。C=O結合とN-H結合はどちらも二次構造の異なる部分間の水素結合に関与しているため、アミドIのバンドとアミドIIのバンド位置はタンパク質の二次構造の組成に敏感に反応します^{3,4}。ただし、アミドIIIバンドはタンパク質の二次構造を定量化するための予測因子としてはあまり有用ではないと広く考えられています。

アミドバンドのシフトは、バンドの固有の幅と比較して小さいことが多く、そのため二次構造の種類ごとに分解された一連のピークではなく、1つの幅広いピークが形成されます。

デコンボリューションや二次微分などの数学的処理を使用することで、タンパク質の二次構造の定量的分析のために重なり合ったバンドを分解できます³。表1は、水中のタンパク質の二次構造バンドの割り当てを示しています。各ピークの正確な位置は、水素結合の相互作用やタンパク質の環境の違いにより、タンパク質ごとに異なるため、全ての割り当ては範囲として示されていることにご注意ください。

表1. 水溶液中のタンパク質の二次構造バンドの割り当て²

二次構造	水溶液中でのバンドの割り当て
α -ヘリックス	1,648~1,657 cm^{-1}
β -シート (高周波数成分)	1,623~1,641 cm^{-1} 1,674~1,695 cm^{-1}
ランダム	1,642~1,657 cm^{-1}
コイル	1,662~1,686 cm^{-1}

FTIRは、透過法、ATR法、赤外反射吸収分光法 (IRRAS) など、さまざまなサンプリング技術を備えており、タンパク質の二次構造解析のための他の分析技術と比較して、その汎用性とアプリケーション拡張性の面で特に優れています。FTIR測定に適したタンパク質サンプルの形態には、凍結乾燥粉末、水溶液、コロイドなどがあります。ここでは、透過測定とATR測定をそれぞれ用いて、タンパク質の二次構造を決定した2つの例を紹介します。どちらの方法も迅速で、サンプルの使用量は微量で済み、サンプルの前処理も最小限です。

実験

全てのタンパク質はSigma-Aldrich™ (MO, USA) から調達し、そのまま使用しました。透過測定にはBioCell™ CaF₂窓板セル (Biotools, Jupiter, FL) を使用し、測定は室温で行いました。10 μL のタンパク質溶液をウィンドウの中央に配置し、2枚のCaF₂窓板で挟み、ホルダーに設置しました。

試験したタンパク質の濃度は6~12 mg/mLでした。

2枚のCaF₂窓板を挟み込むことで、6 μm の光路長が作成されました。CaF₂窓板は、水系サンプルの分析に適しています。水は1,645 cm^{-1} の領域に大きな吸収ピークがありますが、6 μm という短い光路長であれば、飽和した水の赤外吸収ピークを効果的に回避できます。

DTGS検出器を搭載したNicolet iS10 FTIRを事前にガスパーズし透過測定を行いました。使用された測定パラメーターは、分解能4 cm^{-1} で256回積算でした。Thermo Scientific™ Smart OMNI-Transmission™ アクセサリーにより、アクセサリー内部のパーズが迅速に行われ、ほとんどの分析において水蒸気補正が不要になりました。バッファー液を差し引いたスペクトルの二次構造分析は、PROTA-3S™ FTIR タンパク質構造分析ソフトウェアに組み込まれた機能を使用しました。PROTA-3S ソフトウェアの二次構造計算は、47個の二次構造データベースに基づいています (詳細は、www.btools.comをご覧ください)。

ATR分析には、Nicolet iS50 FTIRに装備された水銀カドミウムテルル (MCT) 検出器を用いました。アクセサリーはConcentratIR2™多重反射ATRアクセサリー (Harrick Scientific Products, Inc., Pleasantville, NY) を使用し、ATRクリスタルとして、ダイヤモンドを採用しました。ダイヤモンドは、入射角45度で10回の内部反射が生じます。次にリン酸バッファー液中のタンパク質溶液10 μL をATR結晶表面上で乾燥させました。測定パラメーターは256回積算、分解能は4 cm^{-1} としました。二次構造の決定にはThermo Scientific™ OMNIC™ソフトウェアのピーク分離機能を使用しました。

結果とディスカッション

Bio Cellによる透過測定

図1は、リン酸バッファー液、リン酸バッファー液中のシトクロムC 6 mg/mL、および12 mg/mLの3つの赤外スペクトルの重ね合わせを示しています。一見したところ、スペクトルは主に水のバンドです。3つのスペクトルは、タンパク質濃度が高い12 mg/mLでもほとんど違いがありません。

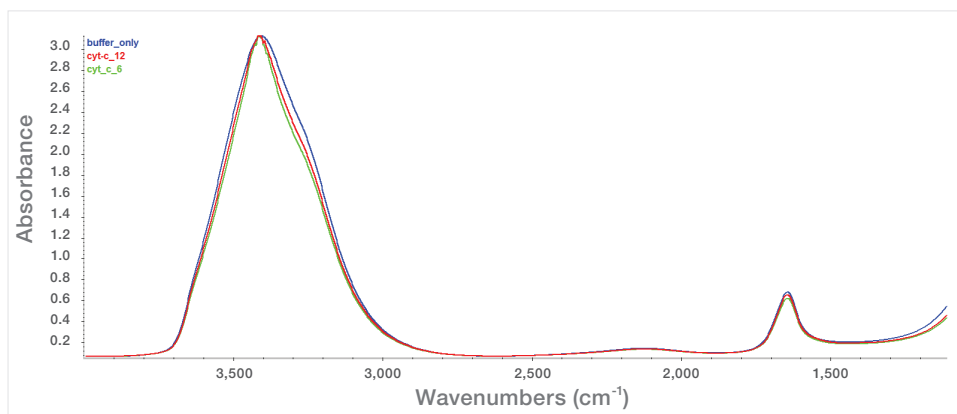


図1. 12 mg/mLおよび6 mg/mL (cytc_6) のリン酸バッファー液中のシトクロムC (cytc_12) とリン酸バッファー液ブランクの透過測定赤外スペクトル

次に、PROTA-3Sソフトウェアを使用して、バッファースペクトルを未処理のタンパク質スペクトルから差し引きました。その結果を図2 (a) シトクロムCと図2 (b) コンカナバリンに示します。両方のスペクトルにおいて、アミドIおよびIIピークがはっきりと識別できます。シトクロムCのスペクトルにおけるアミドIピークの位置は $1,654\text{ cm}^{-1}$ であり、 α -ヘリックスが優勢な二次構造を示唆しています。コンカナバリンAのアミドIピークは $1,633\text{ cm}^{-1}$ に中心があり、 $1,690\text{ cm}^{-1}$ (赤丸) にも顕著なショルダーピークがあり、これは β シート成分と関連する高周波成分を示しています²。

表2は、PROTA-3Sソフトウェアを使用した二次構造予測の概要を示しています。シトクロムCは α -ヘリックスが45%、 β -シートが5%であるのに対し、コンカナバリンAは β -シートが42%、 α -ヘリックスが4%である。X線とFTIRデータの二次構造の構成の違いは、結晶か溶液か、温度、pH、または緩衝条件など、タンパク質サンプルの物理的な状態の違いによるものと考えられます。また、異なる予測アルゴリズムを使用すると、結果が若干異なる可能性があります⁷。

分析手法、サンプルの状態、予測アルゴリズムの違いはあったものの、PROTA-3Sソフトウェアを使用したFTIRによる二次構造解析の結果は、X線による解析とほぼ一致していました。PROTA-3Sソフトウェアと組み合わせた透過測定は、最小限のサンプル調製で、溶液中のタンパク質の二次構造を簡単に迅速に解析できる手段を提供していることがわかります^{2,3}。

ConcentratIR2多重反射アクセサリーによるATR測定

タンパク質の量や濃度が限られている場合は、ConcentratIR2™ 多重反射ATRアクセサリーが、透過測定よりも優れた代替手段となります。このATRアクセサリーの独自の設計により、タンパク質粉末、ゲル、溶液、およびATR表面で乾燥させたタンパク質の直接測定が可能です。

タンパク質を結晶表面で濃縮する場合、バッファ液も結晶表面で濃縮されるため、バッファ液の選択には注意が必要です。

アミドIおよびIIの領域にピークがほとんどないバッファ液を選択してください。図3は、 1 mg/mL の溶液から乾燥させたリン酸バッファ液中のBSAのATR赤外スペクトルを示しています。アミドIおよびIIのバンドに加えて、チロシン由来の $1,515\text{ cm}^{-1}$ やアスパラギン酸由来の $1,498\text{ cm}^{-1}$ など、側鎖のスペクトル特性も見られます。側鎖のピークは、さまざまなアミノ酸のプロトン化および脱プロトン化状態の解明に不可欠です²。

表2. FTIR (PROTA-3S) とX線データによる二次構造計算の比較

タンパク質	α -ヘリックス (%)		β -シート (%)		ランダム (%)	
	FTIR	X線	FTIR	X線	FTIR	X線
シトクロムC	45	41	5	0	50	59
コンカナバリンA	4	0	42	48	54	52

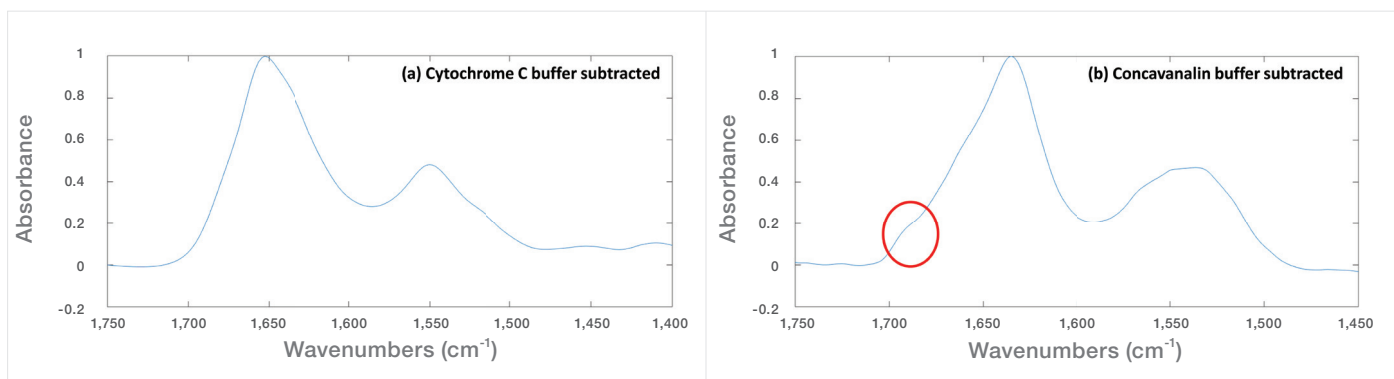


図2. PROTA-3Sソフトウェアを使用してバッファースペクトルを差し引いた後の (a) チトクロムCおよび (b) コンカナバリンAの赤外スペクトル

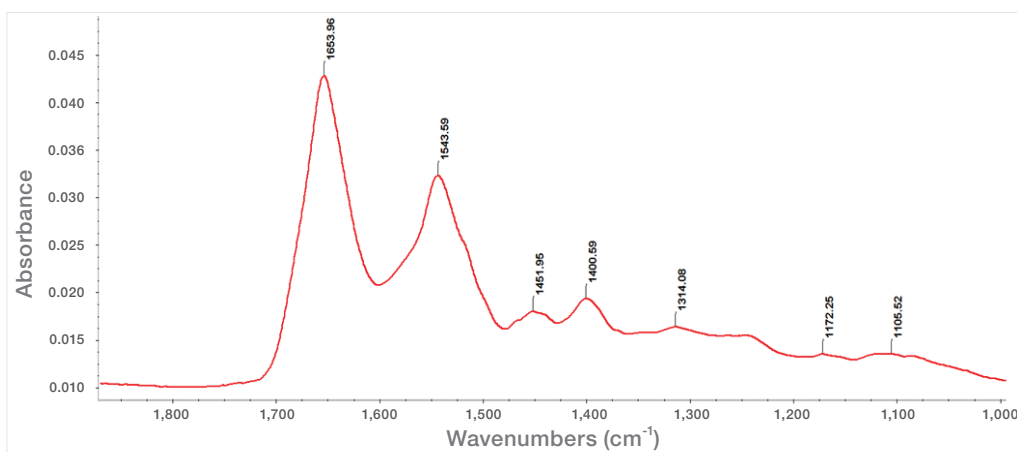


図3. MCT検出器を搭載したNicolet iS50 FTIRでConcentratIR2多重反射ATRアクセサリーを使用して分析した 1 mg/mL BSAのアミドIおよびII

BSAのアミドIピーク (図4) のデコンボリューションは、OMNICソフトウェアを使用して実施されました。ピークフィッティングに必要なピークを明確に特定するために、デコンボリューションの前に二次微分を実施されることが多いことに留意することが重要です²。本研究では、得られた二次微分ピークは表1の二次構造ピークの割り当てとよく相関していました。ピークフィッティングに適したピーク形状を得るために、アミドI領域のベースライン補正も実施しました。ベースライン補正はアミドII領域の寄与を効果的に除外しました。アミドIのデコンボリューションにより5つのピークが得られ、各ピークの面積は合計面積に対して評価されました。アミドIピークのデコンボリューションにより、二次構造は47% α -ヘリックス、3% β -シート、24%コイル、26%ランダムであることが示されました。これは、FTIRおよびX線データで公表されている値と一致しています。

まとめ

本アプリケーションノートでは、赤外分光法を用いたタンパク質の二次構造解析の2つの例を示しました。透過測定とPROTA-3Sソフトウェアを組み合わせることで、最小限のサンプル調製で溶液中のタンパク質の二次構造を簡単に解析できます。また、タンパク質の量や濃度が限られている場合は、ATR法がより優れた選択肢となります。タンパク質をATRクリスタル内で直接乾燥できます。

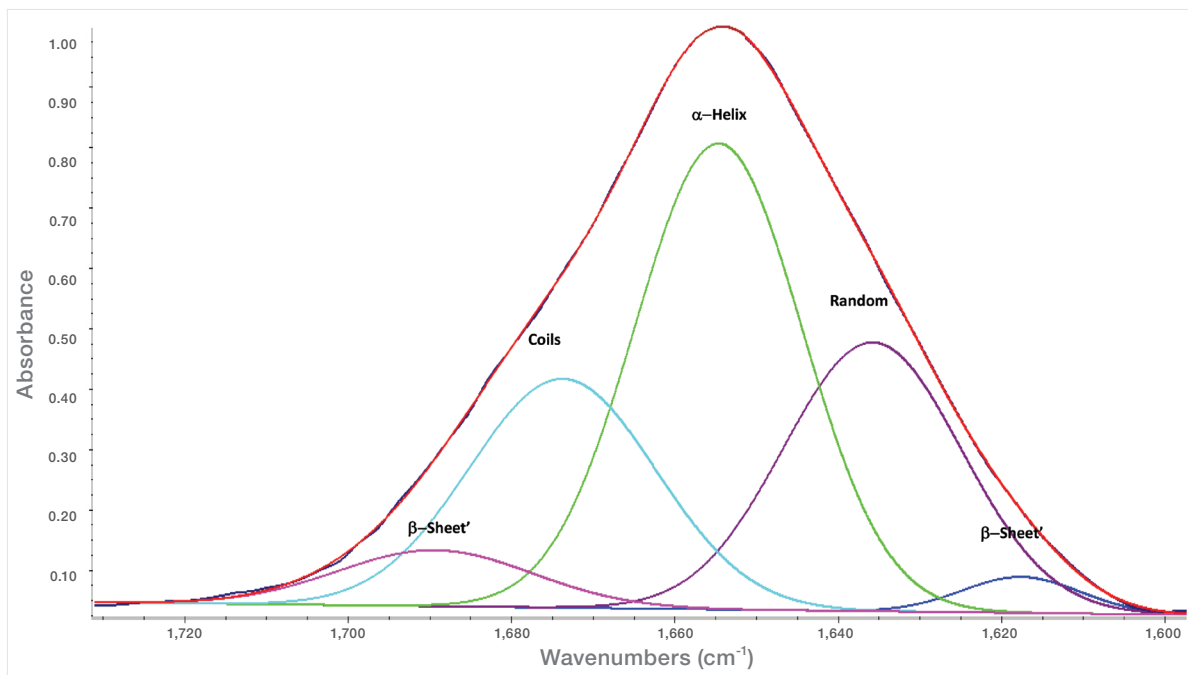


図4. OMNICソフトウェアのPeak Resolve機能を使用してBSAのアミドIピークをピーク分解した結果

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/brighteroutcomes

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. Sigma-Aldrich is a trademark of Merck KGaA.

BioCell and PROTA-3S are trademarks of BioTools, Inc. ConcentratIR2 is a trademark of Harrick Scientific Products, Inc.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc FTIR514-A24120B

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

お問い合わせはこちら thermofisher.com/contact

thermo scientific

参考文献

1. Elliott, A., Ambrose, E. J. Structure of synthetic polypeptides, *Nature* (1950) 165, 921-922.
2. Jackson, M., Mantsch, H.H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (1995) 30, 95-120.
3. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta* (2007) 1767, 1073-1101.
4. Byler, D.M., Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers* (1986) 25, 469-487.
5. Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra, *Biochim. Biophys. Acta* (1988) 952, 115-130.
6. Sukumaran, S., Hauser, K., Maier, E., Benz, R., Mantele, W. Tracking the unfolding and refolding pathways of outer membrane protein porin from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry* (2006) 45, 3972-3980.
7. Klose, D., Janes R.W. 2Struc – the protein secondary structure analysis server, *Biophysical Journal* (2010) 98, 454-455.