



放射光真空紫外円二色性分散計による生体分子の構造解析

月向邦彦 広島大学大学院理学研究科 〒739-8526 広島県東広島市鏡山 1-3-1
 広島大学放射光科学研究センター 〒739-8526 広島県東広島市鏡山 2-313
 松尾光一 広島大学大学院理学研究科 〒739-8526 広島県東広島市鏡山 1-3-1

要旨

広島大学放射光科学研究センター (HiSOR) の BL-15 を放射光源とし、高真空下において水溶液中で 140 nm まで測定可能な真空紫外円二色性 (VUVCD) 分散計を開発した。本分散計は、これまで市販の装置では不可能であった高エネルギー遷移に基づく生体分子の構造解析を可能にする。本稿では、開発した VUVCD 分散計の概要と、各種アミノ酸、糖類、タンパク質のスペクトル測定例を紹介し、生体分子構造解析への応用性について述べる。

1. はじめに

円偏光二色性 (Circular Dichroism: CD) は、左右円偏光の吸収で差が生じる現象であり、キラル分子や光学活性物質の構造を敏感に反映する。そのため CD 分光法は、生体分子の構造解析において有力な方法として広く利用されている。この分光法は、分子量に制限がなく、微量な試料で検出でき、液相・固相・気相状態でも測定可能で、温度や溶媒条件を変化できるなど、広範囲な実験条件に対応できる。特に生体分子の場合は、水溶液中の“生”の状態での構造が必要であり、CD 分光法は欠かせない構造解析法となっている^{1,2)}。しかし、通常光源を用いた市販の装置では、大気的光吸収や光学システムの問題のため、水溶液中で 190 nm 以下の真空紫外 (Vacuum-Ultraviolet: VUV) 領域の CD スペクトルを測定することは困難で、得られる情報に限界があった。VUV 領域への拡張が可能になれば、ヒドロキシル基やアセタール結合のような高エネルギー遷移に基づいたスペクトルが検出でき、生体分子の構造についてより詳細かつ新規な情報を得ることができる。このため、高輝度光源である放射光を用いた真空紫外円二色性分散計 (以下 VUVCD と略す) の開発が強く望まれてきた。このような VUVCD 装置の開発は、1980 年代初頭、アメリカの Brookhaven National Laboratory (BNL) と Synchrotron Radiation Center (SRC)、ドイツの Electron Stretcher Accelerator (ELSA) によって開始され、近年では、イギリスの Synchrotron Radiation Source (SRS)、デンマークの Aarhus Storage Ring (ASTRID)、中国の Beijing Synchrotron Radiation Facility (BSRF) によって開発され、現在、中国の University of Science and Technology (USTC)、ドイツの Berlin Electron Storage Ring Company for Synchrotron Radiation (BESSY)、ブラジルの Campinas National Synchrotron Light Laboratory (LNLS) で新しく建設中である。この中でも、特にイギリスのグループは、CD 装置用として 3 本のビームラインを

確保し、精力的に VUVCD 装置の開発に取り組んでいる^{3,4)}。2001 年 11 月には、Daresbury で VUVCD に関する第 1 回国際ワークショップが開かれ、上記の各施設から代表者が集まり開発状況について情報交換が行われた⁵⁾。現時点で、これら各国の装置はすべて窒素雰囲気中でしか測定できず、短波長限界は 170 nm 付近で止まっている。

このような状況の中、1997 年に広島大学放射光科学研究センター (HSRC/HiSOR) が設置され、研究室に密着した放射光利用が可能となった⁶⁾ (<http://www.hsarc.hiroshima-u.ac.jp/index.html>)。この放射光源 (0.7 GeV) は軟 X 線領域の研究には最適であり、我々はこのビームライン 15 を使い、日本分光株式会社の協力を得て VUVCD 分散計を開発してきた。光学系をすべて真空下に保持することにより、世界に先駆けて水溶液中で 140 nm までの CD 測定に成功した^{7,8)}。本稿では、この装置の概略と、アミノ酸、糖類、タンパク質についてのスペクトル測定結果を示し、本装置の生体分子構造解析への応用について紹介する。

2. 真空紫外円二色性分散計の開発

2.1 光学系

開発した VUVCD 装置の模式図を Fig. 1 に示す^{7,8)}。すべての光学素子は、水や大気的光吸収を防ぐために、高真空に保持された試料チェンバーと偏光変調チェンバー内に設置されている。McPherson 直入射分光器で分光された入射光は、MgF₂ 製のローションプリズム型直線偏光子 (polarizer: POL) によって直交する主光と参照光に分離される。その後、2 本の直線偏光は LiF 製の光弾性変調子 (photo-elastic modulator: PEM) によって、50 kHz の周期で左右円偏光に変調される。主光は試料チェンバーに設置された光学セルを通過後、光電子増倍管 (Main-PM) で検出される。参照光は主光の光軸に対して分離角 5.1° ~ 5.4° で検光子を通過後、別の光電子増倍管 (Ref-PM) で

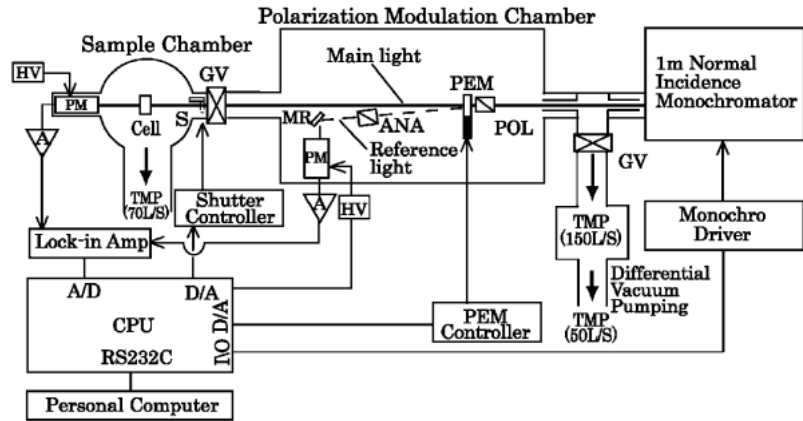


Figure 1. Block diagram of VUVCD spectrophotometer. Abbreviations: POL, polarizer; PEM, photo-elastic modulator; ANA, analyzer; MR, mirror; PM, photomultiplier; S, shutter; HV, high voltage supply; A, preamplifier; GV, gate valve.

検出される。Main-PMで検出されたCDシグナルは、Ref-PMで検出された参照光とlock-in-amplifier (LIA)において同期整流され、CD値としてモニターされる。また、この参照光はPEM駆動電圧の調整に使用され、PEMの熱などによるドリフトの自動補正を行うことにより位相変調を正確に制御している。このように、参照光を利用してLIAの安定性を向上させ、PEMを高精度に制御するシステムを光サーボリファレンス方式といい、CD分散計で採用されているのは本装置のみである。また、放射光による試料の分解を防ぐため、測定中にのみ光を通過させる自動制御シャッターが取り付けられている。試料チェンバーは偏光変調チェンバーとゲートバルブにより分離されており、偏光変調チェンバーを高真空下に保った状態で試料の交換が可能である。測定中のチェンバー内の真空度は $10^{-4} \sim 10^{-5}$ Paで維持されている。

2.2 光学試料セル

水溶液試料のCDスペクトルを140 nmまで測定するためには、光学セルは、①水溶液試料を高真空下で保持できること、②VUV領域での水の吸収を最小限に抑えるために光路長が短く可変であること、③セル窓の歪が小さくVUV領域において光の透過率が高いこと、④セル窓を洗浄できるよう簡単に組み立て・分解できること、⑤広範囲で温度が可変できること、などの条件を満たす必要がある。Fig. 2に我々の開発した光学セルと温度可変機構の模式図示す⁹⁾。窓材としてc軸カットのMgF₂結晶を利用することにより、複屈折による影響を最小限に抑え、120 nmまでの波長領域で60%以上の透過率が確保されている。光路長は、ドーナツ型の極薄テフロンスペーサーにより1.3~50 μmの範囲で制御可能である。このセル窓は3個のO-ringを使ってステンレスホルダーにセットされ、円筒形のスクリーにより全体を均一に固定することで、セル窓に歪を与えることなく試料溶液を高真空下に保持できる設計になっている。組み立て・分解が容易にでき、セ

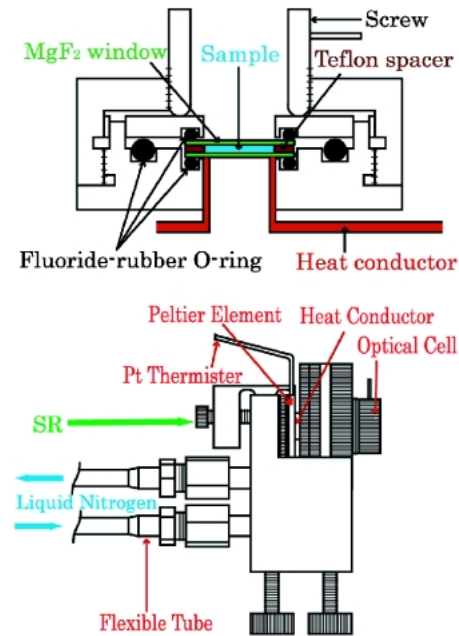


Figure 2. Block diagram of the optical cell and its temperature-control unit.

ル窓の洗浄も可能である。セルの温度は、ペルチェ素子を用いて可変できるようになっている。ペルチェ素子の冷却剤として液体窒素が使われており、外部からフレキシブルチューブをとおしてセルホルダー内に注入される。ペルチェ素子と光学セルのMgF₂窓の間には銅製の熱伝導板が設置されており、熱伝導板に取り付けられた白金サーミスターの温度を検知することにより、温度コントローラーがペルチェ素子の電圧を制御する仕組みになっている。

2.3 性能評価

CD測定では、楕円率の絶対値が正しく測定されているかが最も重要な問題である。VUVCD用の標準物質は知られていないので、ここでは通常のCD標準試料であるカ

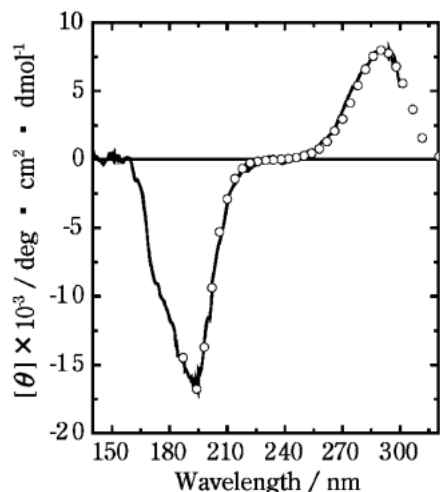


Figure 3. VUVCD spectra of ammonium *d*-camphor-10-sulfonate aqueous solution at 25°C. The solid line and open circles indicate the spectra measured with the same sample solution using a VUVCD spectrophotometer and a JASCO J-720W spectropolarimeter, respectively. The spectra were recorded with a 20- μ m path length MgF₂ cell, a 1.0 mm slit, a 16-sec time constant, a 4-nm/min scan speed, and 4–16 accumulations.

ンフェースルホン酸アンモニウムを用いて、開発した VUVCD 分散計と光学セルの性能評価を行った。Fig. 3 に 300~140 nm での測定結果を示す。この物質は、291 nm と 192 nm で 1 : 2 の CD 強度比を持つことが知られているが¹⁰⁾、得られたスペクトルはこの条件を満たしており、同一セルを用いて市販の CD 装置 (JASCO J-720W) で測定されたスペクトルとも 190 nm まで一致している。また、水のスペクトル (ベースライン) は測定波長領域において ± 2 mdeg と一定であることから、光学素子やセル窓などの歪が小さく、用いた PEM が真空下で正しく作動していることが確認された。試料溶液の温度を直接測定することは困難であるが、セル窓の温度から、 $-30 \sim 70^\circ\text{C}$ の温度範囲で $\pm 1^\circ\text{C}$ の精度で温度制御ができることを確認した。小間隙中の水はサブゼロ温度でも凍結しないため、光路長 25 μm と 50 μm の光学セルを使用した場合、それぞれ -17°C と -10°C まで試料溶液を凍結することなしに冷却することができる。このため、タンパク質の熱変性だけでなく低温変性による構造の違いを解析することも可能である。このように、開発した VUVCD 分散計と光学セルを用いて、140 nm までの短波長領域で $-30 \sim 70^\circ\text{C}$ の温度範囲で水溶液の CD スペクトルを $\pm 5\%$ の精度で測定することが可能になった^{8,9)}。

3. 生体分子構造解析への応用

3.1 アミノ酸

開発された VUVCD 分散計を用いて、各種アミノ酸水溶液 (pH 6, 25°C) の CD スペクトルを 260~140 nm の波長領域で測定した¹¹⁾。Fig. 4a に 5 種の疎水性アミノ酸

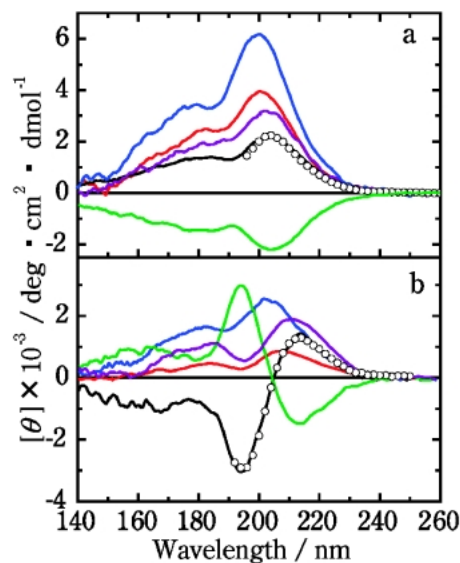


Figure 4. (a) VUVCD spectra of amino acids in aqueous solution at 25°C. (a) L-alanine (—, pH 6.2, concn. 10%), D-alanine (—, pH 6.2, concn. 10%), L-valine (—, pH 6.0, concn. 3%), L-isoleucine (—, pH 6.2, concn. 2.5%), and L-leucine (—, pH 6.3, concn. 1.5%). (b) L-proline (—, pH 6.2, concn. 4%), D-proline (—, pH 6.2, concn. 4%), L-threonine (—, pH 5.6, concn. 4%), L-lysine (—, pH 10.3, concn. 3%), and L-serine (—, pH 5.7, concn. 3%). The cells with 25- and 50- μ m path length were used for the measurements. All spectra are recorded under the same conditions as described for Figure 3. Circles indicate the spectra measured by a JASCO J-720W spectropolarimeter.

(L-アラニン, D-アラニン, L-バリン, L-ロイシン, L-イソロイシン) の VUVCD スペクトルを示す。200 nm までの波長領域において市販の装置 (JASCO J-720W) で観測されたスペクトルと一致している。L および D 型のアラニンでそれぞれ正と負の対称な CD スペクトルが観測され、光学異性体に対する理論的予測と一致している。また、各アミノ酸の VUVCD スペクトルは、200 nm と 180 nm 付近に連続した 2 つの特徴的な正のピークを示しており、それぞれ、カルボキシル基の $n \rightarrow \pi^*$ と $\pi \rightarrow \pi^*$ 遷移に帰属される^{12,13)}。これらのピークは、アラニン < バリン < ロイシン と側鎖の疎水性が増すほど短波長側にシフトし、強度が増加している。また、側鎖のアルキル炭素数が同じにもかかわらず、 β 炭素に不斉をもつイソロイシンはロイシンよりも小さな楕円率を示している。このように、カルボキシル基の電子遷移は、明らかに側鎖の大きさや不斉に敏感であることがわかる。親水性アミノ酸 (L-プロリン, D-プロリン, L-リジン, L-トレオニン, L-セリン) の VUVCD スペクトルを Fig. 4b に示す。セリンとトレオニンは疎水性アミノ酸と同様、200 nm と 180 nm 付近に 2 つの正のピークを示す。側鎖の β 炭素に不斉をもつトレオニンでは、やはり楕円率は小さく長波長側にシフトしている。また、170 nm 以下にいくつかのピークが観測され、ヒドロキシル基やアミノ基の関与が示唆される。側鎖に正の荷電を有するリジンでは、2 つのピークは 210

nm と 185 nm にレッドシフトしており、はっきりと分離して観測される。L-プロリンの VUVCD スペクトルは他のアミノ酸と大きく異なり、213 nm に正、194 nm と 166 nm に 2 つの負のピークを示す。これは、明らかにプロリン側鎖の五員環構造によるものである。このように、アミノ酸の VUVCD スペクトルは側鎖構造を敏感に反映しており、これまで不可能であった VUV 領域でのアミノ酸のエネルギー遷移について有益な情報を得ることができる。現在、我々は分子軌道法を用いて、これらのスペクトルの理論的帰属を行っている。

3.2 糖類

糖類のヒドロキシル基 (OH) やアセタール結合 (COC) は、200 nm 以下の波長領域にのみ吸収を持つため、市販の装置では CD スペクトル測定が困難で、VUVCD 分散計でのみ構造解析が可能となる。Fig. 5a に 5 種の単糖類 (D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-キシロース、D-リキソース) の VUVCD スペクトルを示す¹⁴⁾。Fig. 6 に示すように、これらの糖の構造は非常に類似しているが、その VUVCD スペクトルは大きく異なる。D-グルコースと D-マンノースはそれぞれ 168 nm と 170 nm 付近に、D-キシロースと D-リキソースはそれぞれ 167 nm と 172 nm 付近に正のピークを示す。D-ガラクトースでは、対照的に 177 nm と 162 nm 付近に 2 つの負のピーク

が観測される。これらのスペクトルは、主として環状構造中の酸素の吸収に起因するものと予想されるが¹⁵⁾、その理論的帰属は今後の研究を待たねばならない。D-グルコースと D-マンノースは C2 の OH 基の配向が異なるだけであるが、D-グルコースでは D-マンノースと比べ、モル橢円率が小さくブルーシフトしている。単糖類の C1 の OH 基は水溶液中で α -anomer と β -anomer の平衡状態にあり、C2 の OH 基が axial 配向では α -anomer が優位であることが NMR 測定により知られている¹⁶⁾。D-マンノースの α -anomer 含有率は 65% で D-グルコースの 38% よりも多く、 α -anomer は橢円率の増加とピークのレッドシフトを誘起すると推測される。同様な関係は、C5 にヒドロキシメチル基を持たない D-リキソース (α -anomer, 71%) と D-キシロース (α -anomer, 37%) でも観測される。

D-グルコースと D-ガラクトースの構造は、C4 の OH 基が axial か equatorial かだけの違いであるが、正負の全く異なったスペクトルを与える。D-ガラクトースと D-グルコースの α -anomer 含有率は、それぞれ 38% と 32% でそれほど大きくは違わないが、C5 のヒドロキシメチル基のゴーシュ・ゴーシュ (GG), ゴーシュ・トランス (GT), トランス・ゴーシュ (TG) の 3 つの立体構造は、C4 の OH 基の配向の影響を大きく受けることが知られている (Fig. 7 参照)。D-グルコースでは C4 の OH が equatorial

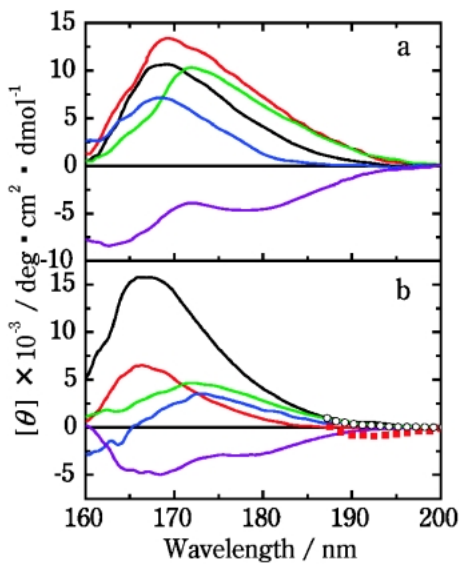


Figure 5. (a) VUVCD spectra of saccharides in aqueous solution at 25°C. (a) D-glucose (—, concn. 10%), D-mannose (—, concn. 5%), D-galactose (—, concn. 5%), D-xylose (—, concn. 10%), and D-lyxose (—, concn. 3%). (b) maltose (—, concn. 8%), isomaltose (—, concn. 8%), cellobiose (—, concn. 8%), gentiobiose (—, concn. 8%), and lactose (—, concn. 3%). Squares indicate the 20-fold spectrum of maltose. A cell with a 50- μ m path length was used for the measurements from 200 to 180 nm, and no spacer was used below 180 nm. All spectra were recorded under the same conditions as described for Figure 3. Circles indicate the spectra obtained with a 50- μ m spacer using a JASCO J-720W spectropolarimeter.

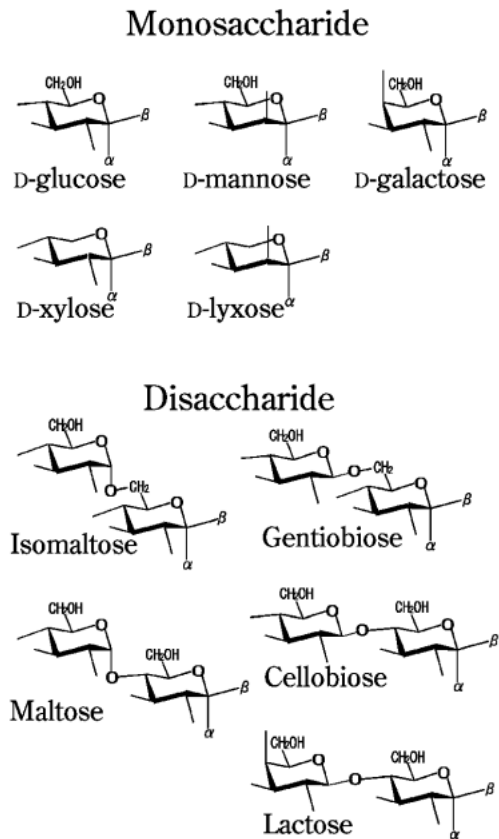


Figure 6. Chemical structures of monosaccharides and disaccharides.

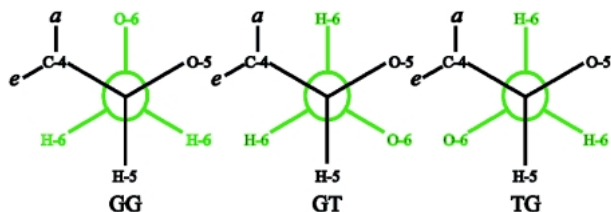


Figure 7. Three possible staggered conformations (GG, GT, and TG) of the hydroxymethyl group at C-5. The C-4 hydroxyl is axial (a) for D-galactose and equatorial (e) for D-glucose. This is a view looking down the bond from C-5 to C-6.

であるため、O6 との立体障害により TG 構造をとることができないが (GG : GT : TG = 55 : 45 : 0)、ガラクトースでは OH 基が axial であるため TG 構造が存在する (GG : GT : TG = 20 : 60 : 20)^{17,18}。これらの構造の違いが、D-グルコースと D-ガラクトースの VUVCD スペクトルに反映しているものと考えられる。このように、単糖類の VUVCD スペクトルには、C1 のアノマー型 (α および β) や C5 のヒドロキシメチル基のトランスやゴーシュ構造が複雑に関与していると考えられる。

単糖類の 6 種類の配位 (α -GG, α -GT, α -TG, β -GG, β -GT, β -TG) は、水溶液中では平衡状態で存在するため、それぞれの CD スペクトルを単独に測定することは難しい。しかし、VUVCD スペクトルの deconvolution 解析により、それらの寄与を分離して評価することができる。D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトースに対して、6 種類の構造がそれぞれガウス分布の CD スペクトルを持つと仮定し、以下の式からそれらのスペクトルを求めた。

$$[\theta]_{m, \text{obs}} = X_{m, \alpha\text{-GG}}[\theta]_{m, \alpha\text{-GG}} + X_{m, \alpha\text{-GT}}[\theta]_{m, \alpha\text{-GT}} + X_{m, \alpha\text{-TG}}[\theta]_{m, \alpha\text{-TG}} + X_{m, \beta\text{-GG}}[\theta]_{m, \beta\text{-GG}} + X_{m, \beta\text{-GT}}[\theta]_{m, \beta\text{-GT}} + X_{m, \beta\text{-TG}}[\theta]_{m, \beta\text{-TG}} \quad (1)$$

$$[\theta]_m = [\theta_0] \times \exp\{- (\lambda_0 - \lambda)^2 / w^2\} \quad (2)$$

ここで、 $[\theta]_{m, \text{obs}}$ は実測された単糖類 m (D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース) のモル楕円率、 X_m はそれぞれの単糖類中に含まれる 6 種類の配位 (α -GG, α -GT, α -TG, β -GG, β -GT, β -TG) の含有率である。 $[\theta]_m$ は各構造のモル楕円率で、半値幅 w を持つ CD スペクトルのピーク波長 λ_0 でのモル楕円率 $[\theta]_0$ を用いて、式(2)のように表される。Fig. 8 に deconvolution 解析の結果を示す。D-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトースいずれにおいても、C5 のヒドロキシメチル基の GG と GT 構造は、それぞれ正および負の CD ピークを示している。こうして、D-グルコースと D-マンノースで観測された 170 nm 付近の正の CD ピークには、GG 配位が大きく寄与していることがわかる。さらに、D-ガラクトースで観測された 165 nm と 177 nm の負の CD ピークには、それぞれ GT と β -TG 配位が大きく寄与していることが示唆される。同じ

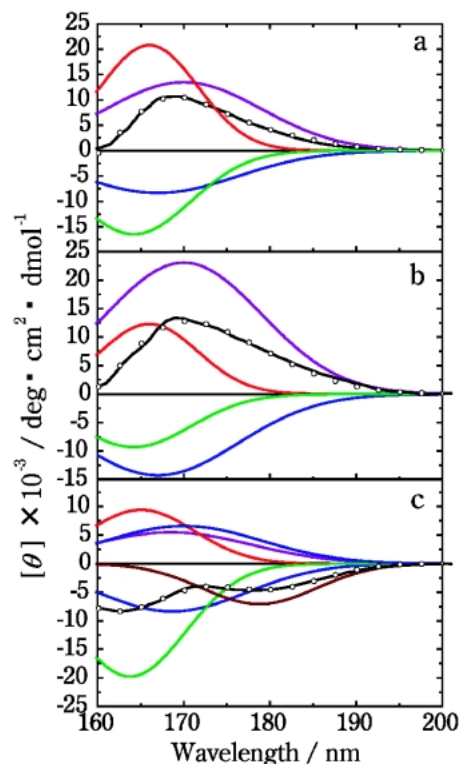


Figure 8. Deconvolution of the VUVCD spectra of D-glucose (a), D-mannose (b), and D-galactose (c) into the existing conformers α -GG (—), α -GT (—), β -GG (—), β -GT (—), α -TG (—), and β -TG (—). Black lines show the observed spectra, and circles represent the spectra reconstituted from the spectrum for each conformer.

GG や GT 配位では、 α -anomer が β -anomer より長波長側にシフトしており、エネルギー的に弱い遷移であることがわかる。

二糖類の VUVCD スペクトルを Fig. 5b に示す¹⁴。ほとんどのスペクトルで単糖類と同様、170 nm 付近に正のピークが観測される。ラクトースにおいては 165 nm と 180 nm に 2 つの負のピークが観測され、構成糖の一つであるガラクトースの寄与が大きいものと考えられる。二糖類の構造は Fig. 6 に示すように、構成単糖の違いだけでなく、グリコシド結合の配向 (α と β) や部位 (も 1,6 や 1,4) によっても異なり、CD スペクトルにはこれらの影響が敏感に反映されている。 α -1,6 結合からなるイソマルトースは、 β -1,4 結合からなるマルトースに比べて大きな楕円率を示すことから、1,6 結合は 1,4 結合より楕円率を増加させる方向に寄与していることが示唆される。同様の結果は、 β -1,6 結合からなるゲンチオビオースと β -1,4 結合からなるセロビオースのスペクトルの比較からも確認できる。また、 α -結合であるイソマルトースやマルトースのスペクトルを、 β -結合からなるゲンチオビオースやセロビオースのスペクトルと比較することにより、 β -結合に比べて α -結合は楕円率を増加させ、ピークをブルーシフトさせる方向に寄与していることがわかる。さらに、マル

トースの190 nm 付近の小さな負の CD ピークは、単糖類の VUVCD スペクトルの deconvolution 解析から β -TG 配位に起因することが予想されるが、NMR 測定や理論計算からもこの予測と一致する結果が得られている^{19,20}。

このように、糖類の VUVCD スペクトルには多くの構造因子が関わっており、その帰属は容易ではないが、これらの情報は VUV 領域への波長拡大によりはじめて明らかになったものであり、今後の糖類の CD の理論解析に重要な糸口を与えるものと考えられる。

3.3 タンパク質

タンパク質の遠紫外 CD スペクトルには、 α -helix や β -strand などの二次構造に関する情報が含まれており、二次構造含有率の予測や変性状態の解析に広く利用されている。Fig. 9 に X 線結晶構造の分かっている15種類のタンパク質の VUVCD スペクトルを示す²¹。Fig. 9a は、ミオグロビン、ヘモグロビン、ヒト血清アルブミン、シトクロム *c* などの α -helix だけからなるタンパク質 (α -protein) のスペクトルで、これまで知られているように222 nm 付近と208 nm 付近に負、190 nm 付近に正の CD ピークが見られる。しかし、今回新たに180 nm 付近に肩と170 nm 付近に負のピークが観測され、160 nm 以下にも正のピークの存在が予測される。また、 α -helix の含有率が増すにつれ CD 強度も大きくなる傾向が見られる。Fig. 9b は α -helix に富んだタンパク質の VUVCD スペクトルで、全体的に α -protein に類似したスペクトルが観測される。しかし、これらの中で、 β -strand 構造を多く持つリボヌクレアーゼ A では、180 nm 付近で他のタンパク質と大きく異なるスペクトルが観測された。Fig. 9c は4種類の β -strand に富んだタンパク質 (β -strand-rich protein) と2種類の β -strand だけからなるタンパク質 (β -protein) のスペクトルで、200–230, 170–175, 160 nm 付近で負、185–200と165 nm 付近に正の CD ピークが観測される。しかし、 α -protein と比べて極めて多様なスペクトルを示すことがわかる。特に、無秩序構造 (unordered structure) が40%以上ある大豆トリプシンインヒビターでは、225 nm 付近に正の CD ピークが観測されている。

このように、タンパク質の VUVCD スペクトルは二次構造の特徴を敏感に反映しており、波長拡張によるタンパク質二次構造含有率の予測精度の向上が期待される。そこで、二次構造解析プログラム SELCON3²²の適用波長を160 nm まで拡張し、今回測定された15種類のタンパク質を基底タンパク質として二次構造含有率の予測を行った。予測精度の指標としては、以下の式で示される自乗平均偏差 (RMS) (δ) と Pearson 相関係数 (r) を使用した。

$$\delta = \{\sum(X_i - Y_i)^2 / N\}^{1/2} \quad (3)$$

$$r = \frac{(\sum X_i Y_i - \sum X_i \sum Y_i / N)}{\{\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / N\}^{1/2} \times \{\sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2 / N\}^{1/2}} \quad (4)$$

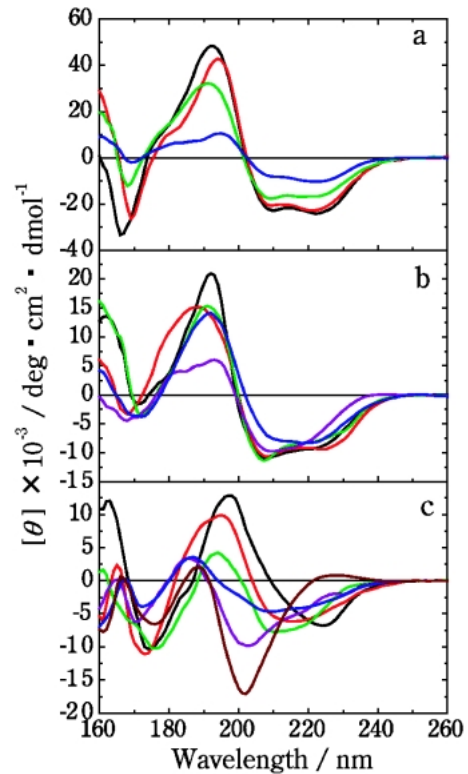


Figure 9. VUVCD spectra for 15 proteins in aqueous solution at 25 °C. (a) myoglobin (—), hemoglobin (—), HSA (—), and cytochrome *c* (—); (b) peroxidase (—), α -lactalbumin (—), lysozyme (—), ovalbumin (—), and RNase A (—); (c) concanavalin A (—), β -lactoglobulin (—), pepsin (—), trypsinogen (—), α -chymotrypsinogen (—), and STI (—). The spectra were measured at protein concentrations of 0.2–1.0%. All other conditions were same as those described for Figure 5.

ここで、X と Y はそれぞれ X 線結晶構造より求めた二次構造含有率と CD から予測された二次構造含有率で、N は解析に用いたタンパク質の数である。 δ が小さく r が 1 に近づくほど高い予測精度を表す。 α -helix と β -strand をそれぞれ regular (α_R, β_R) と distorted (α_D, β_D) 構造に分離し、turns と unordered 構造を含めた計 6 種類の二次構造含有率の予測精度を Table 1 に示す。全体の予測精度を示す δ と r の値から、波長拡張とともに予測精度が向上し、165 nm で最良であることがわかる。また、二次構造間で比べると、 α -helix の予測精度は β -strand よりも高いことがわかる。次に、X 線結晶構造から得られた二次構造含有率と、165 nm まで拡張した VUVCD スペクトルから得られた二次構造含有率を比較して Table 2 に示す。ミオグロビンに代表されるように、 α -protein の予測結果は X 線結晶構造とよく一致することが分かる。 β -strand-rich protein であるトリプシノーゲンでは、 α -helix の予測結果は X 線結晶構造と少し異なるが、 β -strand に関しては高い精度で予測されている。このように、 α -helix-rich protein と β -strand-rich protein で予測精度に差はあるが、VUVCD による二次構造含有率の予測結果は全体的に X

Table 1. Performance indices (δ and r) of six types of secondary structure determined from CD spectra in different wavelength regions^a

Secondary Structure	Wavelength region from 260 nm to						
	185 nm	180 nm	175 nm	170 nm	165 nm	160 nm	
α_R	δ	0.069	0.056	0.055	0.059	0.053	0.062
	r	0.930	0.953	0.955	0.948	0.960	0.944
α_D	δ	0.055	0.058	0.067	0.060	0.059	0.076
	r	0.708	0.658	0.520	0.645	0.674	0.536
β_R	δ	0.085	0.076	0.076	0.070	0.061	0.088
	r	0.733	0.792	0.785	0.829	0.868	0.692
β_D	δ	0.045	0.037	0.035	0.034	0.027	0.034
	r	0.696	0.799	0.818	0.836	0.896	0.836
Turn	δ	0.047	0.050	0.047	0.046	0.041	0.052
	r	0.442	0.323	0.412	0.468	0.650	0.602
Unordered	δ	0.053	0.068	0.066	0.066	0.064	0.078
	r	0.803	0.677	0.679	0.674	0.698	0.628
Total	δ	0.061	0.059	0.059	0.057	0.052	0.067
	r	0.788	0.816	0.825	0.825	0.849	0.754

^a α_R , regular α -helix; α_D , distorted α -helix; β_R , regular β -strand; β_D , distorted β -strand.

線結晶構造に近いことが確認された。distorted 構造の含有率 α_D と β_D には、それぞれ α -helix と β -strand の本数の

Table 3. Numbers of α -helix and β -strand segments determined by X-ray analysis and CD spectra in the wavelength region from 260 to 165 nm

Protein	α -Helix		β -Strand	
	X-ray	CD	X-ray	CD
Myoglobin	8	8.0	0	0
Hemoglobin	8	7.5	0	0
Human serum albumin	31	37.0	0	2.0
Cytochrome c	5	5.0	0	3.0
Peroxidase	17	16.0	2	7.0
α -Lactalbumin	9	5.0	3	2.0
Lysozyme	7	6.0	3	3.0
Ovalbumin	13	17.5	16	13.0
Ribonuclease A	3	4.5	7	5.5
β -Lactoglobulin	5	2.0	10	12.5
Pepsin	11	1.5	25	26.0
Trypsinogen	3	5.5	13	13.0
α -Chymotrypsinogen	6	4.5	14	17.0
Soybean trypsin inhibitor	1	3.5	15	14.0
Concanavalin A	3	6.5	16	10.5

Table 2. Secondary-structure contents of 15 reference proteins determined by X-ray analysis and CD spectra in the wavelength region from 260 to 165 nm

Protein		α_R	α_D	β_R	β_D	Turn	Unordered	δ
Myoglobin	X-ray	54.9	20.9	0.0	0.0	12.4	11.8	0.035
	CD	60.2	20.5	1.5	-0.7	6.5	8.8	
Hemoglobin	X-ray	54.0	21.0	0.0	0.0	14.0	11.0	0.021
	CD	50.5	20.6	-1.4	-0.8	14.3	14.7	
Human serum albumin	X-ray	49.1	20.8	0.0	0.0	14.9	15.2	0.036
	CD	42.3	25.3	1.4	0.6	17.4	14.4	
Cytochrome c	X-ray	21.9	19.1	0.0	0.0	21.9	37.2	0.092
	CD	14.7	18.7	12.0	6.2	26.4	21.4	
Peroxidase	X-ray	29.2	20.8	0.7	1.3	25.6	22.4	0.030
	CD	23.4	20.5	3.4	4.8	25.8	22.1	
α -Lactalbumin	X-ray	19.5	24.4	1.6	4.9	23.6	26.0	0.069
	CD	26.8	16.4	5.4	3.0	21.1	27.4	
Lysozyme	X-ray	20.2	21.7	1.5	4.7	30.6	21.3	0.042
	CD	24.7	17.5	6.8	4.1	25.0	24.1	
Ovalbumin	X-ray	17.9	12.9	23.0	8.3	16.4	21.5	0.056
	CD	15.1	18.1	12.7	6.9	22.9	23.2	
Ribonuclease A	X-ray	11.3	9.7	21.7	11.3	21.8	24.2	0.044
	CD	12.2	14.7	14.1	8.7	20.6	28.9	
β -Lactoglobulin	X-ray	5.6	11.1	28.7	12.3	21.6	20.7	0.040
	CD	4.3	5.1	35.7	15.6	20.9	20.4	
Pepsin	X-ray	3.0	12.3	26.4	15.3	20.0	23.0	0.056
	CD	1.6	1.8	31.6	16.5	20.2	29.9	
Trypsinogen	X-ray	5.3	4.8	20.9	11.4	25.3	32.3	0.033
	CD	1.9	10.1	21.9	11.7	20.6	30.6	
α -Chymotrypsinogen	X-ray	5.1	8.4	20.0	12.0	21.0	33.5	0.015
	CD	3.5	6.9	19.0	13.7	20.0	35.5	
Soybean trypsin inhibitor	X-ray	0.0	1.7	19.3	17.7	17.1	44.2	0.080
	CD	1.8	8.3	19.7	15.2	25.9	28.4	
Concanavalin A	X-ray	0.0	3.8	32.9	13.5	23.6	26.2	0.080
	CD	8.6	11.0	22.1	8.6	21.4	24.0	

情報が含まれているため、 α_D と β_D の値からこれらの本数を予測することができる²³⁾。その結果を X 線結晶構造と比較して **Table 3** に示す。 α -helix の本数は、 α -helix-rich protein を中心に X 線結晶構造と近い値が得られ、 β -strand も全体的に高い予測精度が得られている。このように、CD スペクトルから二次構造の本数を予測することは、市販の CD 装置では困難であり、真空紫外領域まで CD スペクトルを拡張することにより可能になる。さらに基底タンパク質の数を増やし、より短波長までスペクトル測定を拡張することにより、これらの予測精度はより改善されるものと期待される。

4. おわりに

生物科学への放射光利用は、生体物質の構造解析や反応制御、生物の放射線障害や医学にいたる広範な分野で急速に広がりつつあり、その重要性は益々高まっている。特に、構造生物学の分野では、X 線結晶構造解析をはじめ、生体物質の構造解析に大きな威力を発揮している。生体物質においては水中の生の状態での構造解析が必須であり、各国で競って CD 測定装置の開発が進められている。幸い、本学に設置された放射光源は軟 X 線領域の研究に最適であり、その専用ラインを用いることにより、我々は水溶液中で 140 nm まで CD スペクトル測定が可能な VUVCD 分散計の開発に成功し、これまで未開拓であった高エネルギー遷移に基づいた生体物質やキラル分子のより詳細な構造解析を可能にした。十分なマシンタイムと研究室に密着した実験が可能で、生体物質の構造解析にとっては世界に類を見ない装置となっている。まだ、S/N 比の改良や吸収スペクトルの同時測定などいくつかの課題は残しているが、まもなく全国共同利用に供せられる予定であり、今後、広い分野での応用が期待される。本装置が生物科学の発展に貢献できれば望外の喜びである。

謝辞

本研究は、広島大学放射光科学研究センターのスタッフをはじめ、共同研究者各氏の多大な貢献があって初めて可能となったものです。また、日本分光株式会社をはじめ内外の多くの方々のご指導と、科学研究費 (12559007) および原子力研究所 (黎明研究) の支援を得て行われました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) G. D. Fasman: Circular dichroism and conformational analysis of biomolecules (Plenum Press, New York, 1996).
- 2) N. Berova, K. Nakanishi and R. W. Woody: Circular dichroism (Wiley-VCH Press, New York, 2000).
- 3) B. A. Wallace: *J. Synchrotron Rad.* **7**, 289 (2000).
- 4) D. T. Clarke, M. A. Bowler, B. D. Fell, J. V. Flaherty, A. F. Grant, G. R. Jones, M. L. Martin-Fernandez, D. A. Shaw, B. Todd, B. A. Wallace and E. Towns-Andrews: *Synchr. Rad. News* **13**, 21 (2000).

- 5) B. A. Wallace: *Synchr. Rad. News* **15**, 20 (2002).
- 6) 谷口雅樹: 日本放射光学会誌 **13**, 246 (2000); 島田賢也: 日本放射光学会誌 **16**, 213 (2003).
- 7) N. Ojima, K. Sakai, T. Fukazawa and K. Gekko: *Chem. Lett.* **832** (2000).
- 8) N. Ojima, K. Sakai, K. Matsuo, T. Matsui, T. Fukazawa, H. Namatame, M. Taniguchi and K. Gekko: *Chem. Lett.* **522** (2001).
- 9) K. Matsuo, K. Sakai, Y. Matsushima, T. Fukuyama and K. Gekko: *Anal. Sci.* **19**, 129 (2003).
- 10) T. Takakuwa, T. Konno and H. Meguro: *Anal. Sci.* **1**, 215 (1985).
- 11) K. Matsuo, Y. Matsushima, T. Fukuyama, S. Senba and K. Gekko: *Chem. Lett.* **826** (2002).
- 12) T. Inagaki: *Biopolymers* **12**, 1353 (1973).
- 13) P. A. Snyder, P. M. Vipond and W. C. Johnson, Jr.: *Biopolymers* **12**, 975 (1973).
- 14) K. Matsuo and K. Gekko: *Carbohydr. Res.* **339**, 591 (2004).
- 15) I. Listowsky and S. England: *J. Am. Chem. Soc.* **30**, 329 (1968).
- 16) P. M. Collins and R. J. Ferrier: *Monosaccharides* (John Wiley & Sons, New York, 1995) p41.
- 17) Y. Nishida, H. Hori, H. Ohru and H. Meguro: *J. Carbohydr. Chem.* **7**, 239 (1988).
- 18) R. U. Lemieux and J. T. Brewer: *Adv. Chem. Ser.* **117**, 121 (1973).
- 19) K. Gehring, P. G. Williams, J. G. Pelton, H. Morimoto and D. E. Wemmer: *Biochemistry* **30**, 5524 (1991).
- 20) K.-H. Ott and B. Meyer: *Carbohydr. Res.* **281**, 11 (1996).
- 21) K. Matsuo, R. Yonehara and K. Gekko: *J. Biochem.* **135**, 405 (2004).
- 22) N. Sreerama and R. W. Woody: *Anal. Biochem.* **287**, 252 (2000).
- 23) N. Sreerama, S. Y. Venyaminov and R. W. Woody: *Protein Sci.* **8**, 370 (1999).

著者紹介



月向邦彦

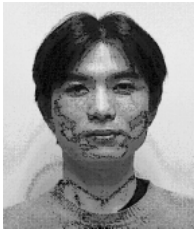
広島大学大学院理学研究科

E-mail: gekko@sci.hiroshima-u.ac.jp

専門: 生物物理, 生体高分子物理化学

略歴:

- 1968年 3月 広島大学大学院理学研究科修士課程修了
- 1968年 4月 愛知教育大学助手
- 1971年 6月 名古屋大学農学部助手 (理学博士取得)
- 1985年 4月 名古屋大学農学部助教授
- 1995年 4月 広島大学理学部教授
- 2000年 4月 広島大学大学院理学研究科教授



松尾光一

広島大学大学院理学研究科

E-mail: pika@hiroshima-u.ac.jp

専門：CD 分光学，生物物理

略歴：

1999年3月 広島大学理学部物性学科卒業

2004年3月 広島大学大学院理学研究科博士課程修了
博士（理学）

2004年4月 日本学術振興会特別研究員（PD）

Structure Analyses of Biomolecules using Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectrophotometer

Kunihiko GEKKO Graduate School of Science, Hiroshima University,
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan
Hiroshima Synchrotron Radiation Center, Hiroshima University,
2-313 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

Koichi MATSUO Graduate School of Science, Hiroshima University,
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

Abstract

We constructed the vacuum-ultraviolet circular dichroism (VUVCD) spectrophotometer, which is capable of measuring circular dichroism spectra to 140 nm for aqueous solutions at temperature from -30 to 70°C , using a small-scale SR source at Hiroshima Synchrotron Radiation Center (HiSOR). This spectrophotometer was used for structural analyses of amino acids, saccharides, and proteins in water. The obtained results demonstrate that a synchrotron radiation VUVCD spectroscopy provides more detailed and new information on the structures of biomolecules, based on the high energy transitions of chromophores such as hydroxyl, acetal, and peptide groups.