

# ポリペプチドとたんぱく質の円偏光二色性に関する研究：ポリペプチドとたんぱく質のCD

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 紺谷, 俊也 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8733">http://hdl.handle.net/2297/8733</a>

## ポリペプチドとたんぱく質の円偏光 二色性に関する研究

— ポリペプチドとたんぱく質の CD —

金沢大学がん研究所分子生物学講座 (主任：亀山忠典教授)

紺谷俊也

(昭和53年7月25日受付)

円偏光二色性 (CD) は赤外線吸収スペクトル (IR), 核磁気共鳴 (NMR) とともに物質の構造を研究していく上で欠かすことのできない研究手段である。たんぱく質についても例外でなく、ここ数十年來、各種たんぱく質に関して温度、pH, 変性剤その他による変性過程での構造変化、あるいは化学修飾による構造変化を研究するために広く利用されてきた。

CD は施光性と同様、物質の光学活性から生ずるものであり、その理論は物理学、化学の進歩に伴って発展してきた。最初に量子力学の立場から光学活性を論じたのは Rosenfeld<sup>1)</sup> であり、約十年後に時を同じくして Kirkwood の coupling oscillator の理論<sup>2)</sup> と Condon らの一電子理論<sup>3)</sup> が展開された。1956 年には Moffitt<sup>4)</sup> によって exciton の理論が高分子に適用され  $\pi\pi^*$  遷移がらせん状高分子でらせん軸に平行な成分と垂直な成分に分離することが理論的に明らかにされた。1962 年には Tinoco<sup>5)</sup> が高分子の光学活性 (ORD, CD) を具体的に計算する方法を示し、その後の発展を基礎づけた。その後、彼のグループはこの理論をもとにして実際にポリペプチドの ORD, CD を計算してきた<sup>6)</sup>。一方 Schellman らは各種アミドに関する実験値をもとにしてアミドの波動関数を求め<sup>7)</sup>、振動計算に行列法を用いることによって、ジペプチド<sup>8)</sup>、ポリペプチド、たんぱく質<sup>9)</sup> の旋光強度を計算した。

$\alpha$ -Helix や  $\beta$ -structure はたんぱく質の 2 次構造として基本的なものであり、各種のホモポリペプチドが適当な条件のもとでこれらの規則構造をとり、それぞれに特徴的な CD の実験的な知識は早くから得られていた。そこでまずこれらの 2 次構造について上記のグ

ループを含むいくつかのグループは CD 計算を行ない、定性的な実験との一致をみた<sup>9)10)</sup>。その他、ポリチロシン<sup>11)</sup>、ジケトピペラジン等<sup>12)13)</sup> の旋光強度の計算も試みられている。

たんぱく質の中には筋たんぱくの一種であるトロポミオシン (TM) のように  $\alpha$ -helix が 2 本、束となってさらに大きならせん構造 ( $\alpha$ -helical coiled-coil ;  $\alpha$ HCC と略) を形づくっているものがある。この  $\alpha$ HCC ともとの  $\alpha$ -helix の構造上の相違が CD でどのように現われるかは興味のあるところである。さらに近接した 2 本の  $\alpha$ -helix が CD にどのような相互作用を及ぼすかはたんぱく質のようないろいろな 2 次構造間の相互作用が考えられるものに対して示唆を与えるであろう。

この論文では Bayley ら<sup>9)</sup> の方法を用いてまず、らせんの長さやピッチ等の構造パラメータを変化させることによって生じる  $\alpha$ -helix の構造変化と CD パターンの関係を調べ、次に  $\alpha$ HCC の CD を計算してもとの  $\alpha$ -helix の CD と比較してみた。さらにこの  $\alpha$ HCC の CD 計算の結果をトロポミオシンを使った実験結果と比較してみた。

次にたんぱく質の CD についてであるが、現時点ではそのまま理論計算で扱うには系があまりにも複雑すぎる。球状たんぱく質の CD はおおよそ  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -structure, その他の不規則構造の CD の重ねあわせと考えられている。そこで理論計算とは逆に球状たんぱく質の CD を知ってその 2 次構造を推測するといった試みがこれまでよく行なわれてきた<sup>14)15)</sup>。その場合重ねあわせのもととなる各 2 次構造の reference

Studies on the Circular Dichroism of Polypeptide and Protein. Toshiya Kontani, Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa.

spectra を定めておかねばならない。この定め方は大きく分けて2通りの方法がある。合成ポリペプチド(ポリリジンの場合が多い)のCDを利用する方法<sup>14)</sup>とすでにX線解析で構造のわかっているいくつかのたんぱく質のCDから統計的に定める方法<sup>15)16)</sup>とである。どちらを選ぶかによって結果はかなり異なる。又、どちらを選んだにしても常に満足な結果が得られるとは限らない。そこで単なる重ねあわせでなく改良した方法<sup>17)</sup>なども用いられたりしている。

この論文では matrix rank analysis<sup>18)19)</sup>の方法を用いて球状たんぱく質のCDが各2次構造のreference spectraの重ねあわせとして表わすことが可能かどうか調べてみた。そしてそれが可能な波長範囲で実際にreference spectraを求め、それに基づいて*E. coli*のRNAポリメラーゼの各2次構造の割合を計算してみた。

## 理 論

### I. CDの理論

#### 1. 一般理論

CDは光学活性を持った物質が入射した左円偏光と右円偏光に対して異なった吸光度を示すことにより生じる。旋光分散(ORD)もやはり物質の光学活性によって生ずるが、CDは吸収波長付近でしかその効果が現われないため、chromophoreが多いときや2つ以上の吸収に近い波長のところにある場合、解析がしやすいので便利である。

CDの大きさは一般に分子楕円率 $[\theta]$  (deg $\cdot$ cm<sup>2</sup> $\cdot$ dmol<sup>-1</sup>)で表わされる。

$$[\theta] = 3300 (\epsilon_L - \epsilon_R) \quad (1)$$

ここで $\epsilon_L$ ,  $\epsilon_R$ はそれぞれ左右円偏光に対する分子吸光係数である。 $[\theta]$ は実験的には次式より求めることができる<sup>20)</sup>。

$$[\theta] = \frac{\delta \times \omega}{10 \times d \times c} \quad (2)$$

( $\delta$ : 楕円率実測角 (deg),  $\omega$ : 分子量,  $d$ : 溶液の厚さ (cm),  $c$ : 濃度 (g/ml))

一方、量子力学理論によれば物質の光学活性は旋光強度Rと関係づけることができる。

$$R_{ba} = \text{Im} \langle a | \vec{\mu} | b \rangle \langle b | \vec{m} | a \rangle \quad (3)$$

ここで $|a\rangle$ ,  $|b\rangle$ は分子の量子状態を、 $\vec{\mu}$ ,  $\vec{m}$ はそれぞれ双極子モーメント、磁気モーメント演算子を表わし、 $\text{Im}$ は $\vec{m}$ が純虚の演算子であるため虚数部分をとることを意味する。旋光強度Rと分子楕円率 $[\theta]$ との間には次の関係式が成り立つ<sup>21)</sup>。

$$R = \frac{hc}{48\pi^2 N} \int_0^\infty \frac{[\theta(\lambda)]}{\lambda} d\lambda \quad (4)$$

ここでhはプランクの定数、cは光速、Nはアボガドロ数である。今、 $[\theta(\lambda)]$ は吸光波長を中心としてガウス曲線を描くと仮定すると適当な半値幅 $\Delta$ をとることによって、CD曲線のピークの高さ $[\theta]_{\text{max}}$ の高さが決まり、(4)式は次式のように変形される。

$$R = \frac{hc}{48\pi^2 N} \times \frac{\sqrt{\pi} [\theta]_{\text{max}} \Delta}{\lambda_{\text{max}}} \quad (5)$$

(5)式によりR,  $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\Delta$ を与えれば $[\theta]_{\text{max}}$ を求めることができる。したがってある分子のCD曲線を理論から計算して描くには1)分子の構造より量子状態を求め、2)(3)式より旋光強度Rを計算し、3)CD曲線がガウス曲線になるものと仮定して、その最大吸収波長を実験結果より定め、適当な半値幅を与えることによって、(5)式から $[\theta]_{\text{max}}$ を求める。これでCD曲線を描くためのパラメータは全部そろったので後はガウス曲線を描けばよい。異なる遷移によるCDが重なった場合にはたし合わせたものを描けばよい。

この方法からわかるように、理論から計算してCD曲線を得るときにはいろいろのパラメータが含まれる。その中でCD曲線の基本的な形を定めるもっとも重要なものはRの大きさである。したがって理論ではRをできるだけ正確に求めることが肝要であり、これは結局のところ、分子の量子状態すなわち波動関数を正確に得ることに帰するのである。

#### 2. 高分子のCD

さてたんぱく質、ポリペプチドのような高分子のCDを理論的に求める場合も前節で述べた理論はそのままではあまり、やはり旋光強度Rを計算する必要がある。そのためにはこのような高分子のできるだけよい波動関数を得なければならない。しかし高分子の波動関数を分子軌道法等で直接求めることは不可能である。そこで次のような方法をとる。まず高分子の構成単位となっている単量体(たんぱく質、ポリペプチドの場合はアミド)の波動関数を求め、次にこれらの残基間の相互作用を摂動として取り入れる。すなわちモノマーの固有状態からポリマーの固有状態へと変換を行なうのである。

以下では残基番号をI, J, K..., モノマーの固有状態を $|a\rangle$ ,  $|b\rangle$ ,  $|c\rangle$ ..., 摂動の入ったポリマーの固有状態を $|A\rangle$ ,  $|B\rangle$ ,  $|C\rangle$ ..., 又基底状態を $|0\rangle$ で表わすことにする。基底状態のエネルギー準位は励起状態に比べて十分に低く摂動効果を及ぼさない、又

2 残基以上にわたって励起することがないと仮定すると状態  $|A\rangle$  は次式のように  $|a\rangle, |b\rangle, |c\rangle \dots$  の 1 次結合で表わされる.

$$|A\rangle = \sum_I \sum_a |Ia\rangle \langle Ia|A\rangle \quad (6)$$

ここで  $|Ia\rangle$  は I 番目の残基が状態 a で他の残基は基底状態にあることを意味している.  $\langle Ia|A\rangle$  は固有変換の係数である. ポリマーが基底状態から状態 A に遷移したときの旋光強度は次式で表わされる.

$$\begin{aligned} R_{0A} &= \text{Im} \{ \langle 0|\vec{\mu}|A\rangle \langle A|\vec{m}|0\rangle \\ &= \text{Im} \{ \sum_{I,J} \sum_{a,b} \langle 0|\vec{\mu}|Ia\rangle \langle Ia|A\rangle \\ &\quad \times \langle A|Jb\rangle \langle Jb|\vec{m}|0\rangle \} \end{aligned} \quad (7)$$

$\langle 0|\vec{\mu}|Ia\rangle, \langle Jb|\vec{m}|0\rangle$  等は各残基の双極子モーメント, 磁気モーメントである. 又,  $\langle Ia|A\rangle, \langle A|Jb\rangle$  等は固有状態を変換するときのユニタリ行列でこれは以下のようにして求められる.

残基間の相互作用も含めたポリマーのハミルトニアンを H とする次式が成り立つ.

$$\langle A|H|B\rangle = \sum_{I,J} \sum_{a,b} \langle A|Ia\rangle \langle Ia|H|Jb\rangle \langle Jb|B\rangle \quad (8)$$

$|A\rangle, |B\rangle$  は H の固有状態であるから (8) 式は行列 ( $\langle Ia|H|Jb\rangle$ ) の対角化に他ならない. すなわち  $\langle Ia|H|Jb\rangle$  を要素とする行列をつくり, それを対角化したときの係数が  $\langle Ia|A\rangle$  等であり, これを (7) 式に代入すれば R が求まる.  $\langle Ia|H|Jb\rangle$  は残基間の相互作用のエネルギーであり, その求め方については後の節で改めて述べることにする.

以上をまとめるとポリマーの旋光強度を得るには 1) モノマーの波動関数と双極子モーメント, 磁気モーメントを求める. 2) ポリマーの分子構造を定める. 3) 分子が遷移したときの各残基間の相互作用エネルギー, すなわち行列要素を求めてそれからできた行列を対角化し固有変換の係数を求める. 4) 1) で得たモノマーの双極子モーメント, 磁気モーメント, 3) で得た係数を (7) 式に代入して R を計算する.

以下の節ではこの論文で扱うポリペプチドについてのパラメータを各ステップごとに詳述する.

## II. アミドモノマーのパラメータ

アミドの紫外線領域における吸収として 190nm 付近に  $\pi\pi^*$  遷移の強い吸収, 220nm 付近に  $n\pi^*$  遷移の弱い吸収が存在する. ホルムアミド等では  $\pi\pi^*$  遷移よりも短い波長領域でさらにいくつかの遷移の存在が確認されており, 又  $\pi\pi^*$  遷移と  $n\pi^*$  遷移との間にも Rydberg 遷移があるという意見<sup>22,23)</sup>もあるが確かな同定はまだなされていない. これまで  $\alpha$ -helix や  $\beta$ -

structure の旋光強度を計算するとき, 190 ~ 250nm の波長範囲で主鎖のアミドの  $\pi\pi^*$  遷移,  $n\pi^*$  遷移以外はあまり影響を与えないとして, この 2 つの遷移のみが取り扱われることが多かった. これらの遷移に関する双極子モーメント, 磁気モーメント, 振動計算のための monopole の位置, 電荷等のパラメータを求めるには実験結果や分子軌道法によって得られた波動関数を利用する. ここでは Schellman ら<sup>9)</sup>によって得られたパラメータを用いて CD の計算を行なった.

この方法は  $n\pi^*$  遷移の吸収が小さいことからその双極子モーメントを 0 とし, 又  $\pi\pi^*$  遷移の磁気モーメントも 0 とする.  $\pi\pi^*$  遷移の双極子モーメントは myristamide の実験<sup>24)</sup>で得られたものをとり, その他のパラメータは各種アミドの実験結果<sup>25)</sup>を利用して求めた波動関数でもって計算した値をつかう. ここでは monopole の位置について新たに計算し直したので原論文<sup>9)</sup>と少し値が異なったが, そのために結果が変わるようなことはなかった.

先程述べた 190nm 以下の遷移や Rydberg 遷移の性格が現在のところはっきりしないため, これらの遷移が  $\pi\pi^*$  遷移,  $n\pi^*$  遷移の CD にどのような影響を及ぼすのかはわからない. しかしこの 2 つの遷移のみを取り扱う方法でも  $\alpha$ -helix と  $\alpha$ HCC の CD の比較といった定性的な議論は可能であろう.

## III. ポリペプチドの構造

### 1. $\alpha$ -Helix

前に述べたように残基間の相互作用をとり入れてポリペプチドの旋光強度を計算するにはポリペプチドに特定の構造を仮定し, 各残基のアミド chromophore の位置, 遷移時の双極子モーメント, 磁気モーメントの方向, 各 monopole の位置を計算しておかねばならない.

アミドの原子の位置に関してはペプチドは平面であると仮定し, Pauling の原子座標<sup>26)</sup>を用いた. このペプチドを連らねることによってポリペプチドをつくることできる.  $\alpha$ -helix の例を図 1 に示す. そのらせん構造はらせん軸についての 1 残基あたりのピッチ p と 1 残基あたりのらせんの回転角  $\theta$  によって表わされる. この 2 つのパラメータの値が変われば N-C $\alpha$ , C $\alpha$ -C 結合のまわりの内部回転角  $\phi$ ,  $\psi$  が変化する. 又, C $\alpha$  原子の結合角  $\tau$  を変えることによっても  $\alpha$ -helix の構造は変化するが, ここでは  $\tau = 109.47^\circ$  と固定した. 実際のポリペプチドでは  $\tau$  はもう少し大きい値をとるが計算の都合上, 上のような値にした. 又  $\alpha$ -helix の基本的な構造として  $p = 1.5 \text{ \AA}$ ,  $\theta = 100^\circ$  と定めた. Miyazawa ら<sup>27)</sup>の方法で p,  $\theta$ ,  $\tau$  の関数として  $\phi$ ,

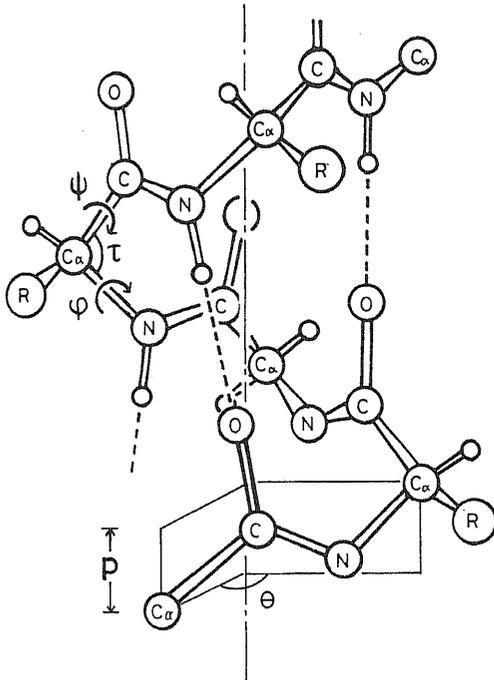


図1.  $\alpha$ -helixの構造

$\tau$ はCの原子の結合角,  $\phi, \psi$ はそれぞれN-C $\alpha$ , C $\alpha$ -C結合のまわりの内部回転角,  $p$ は1残基あたりのピッチ,  $\theta$ はらせん軸のまわりの1残基あたりの回転角.

$\psi$ の値を計算することができ, 上の構造の場合,  $\phi = -51.4378^\circ, \psi = -52.7561^\circ$ であった.

2.  $\alpha$ -Helical coiled-coil ( $\alpha$ HCC)

前節の $\alpha$ -helixの構造をもとにして, Crick<sup>28)29)</sup>の方法を用いるとさらに大きならせん構造をもった $\alpha$ HCCをつくることができる. そのおおよその構造は図2に描いてある. 以下ではもとの $\alpha$ -helixの小さならせんをminor-helix, 新しくつくった $\alpha$ HCCの大きならせんをmajor-helixと呼ぶことにする.  $\alpha$ HCCの各原子の座標に関してはmajor-helixのピッチP, 半径R, 1回転あたりの残基数Mを与えることによって計算することができる. このP, R, Mの値を変えれば様々なcoiled-coil構造をつくることのできるものであるが, 実際の繊維状たんぱく質の構造から考えてR = 5.5 Å前後とすると適当なものは限られてくる<sup>30)</sup>.

$\alpha$ -Helixは1回転あたり3.6残基の右巻きのらせん構造であるが, これを少しゆがめて1回転あたり3.5残基としてcoiled-coilをつくれればmajor-helixが左巻きになった $\alpha$ HCCが得られる. トロポミオシンでアミノ酸の1次構造を3.5残基ごとに区切って並べる

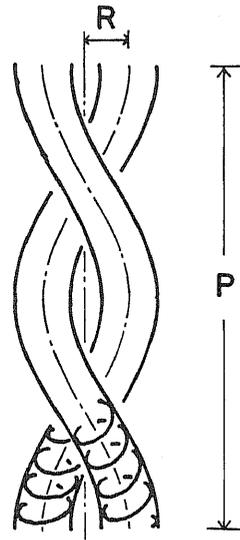


図2.  $\alpha$ -Helical coiled-coil ( $\alpha$ HCC)の構造

Pはmajor-helixの1回転あたりのピッチ, Rはmajor-helixの半径.

とちょうど疎水基が1回転ごとに現われて1列に整列する<sup>31)</sup>. この部分がcoiled-coil構造の2本鎖を結びつける疎水結合を形成する位置にくるので, トロポミオシンの構造は上記のモデルのようなものと考えられている. したがってここではこのモデルを採用し, 繊維状たんぱく質の観察からP = 186 Å, R = 5.5 Å, M = 126とした.

ポリペプチドはN端とC端と異なっているから鎖の向きが存在し, 2本鎖の $\alpha$ HCCではこの向きが同じものと逆のもの2種類が存在する. ここで計算では同じ向きのもをつくる場合は各鎖がmajor-helixの軸に関して線対称の位置にくるものとし, 逆向きのもをつくる場合には一方の鎖を上下逆転(図2)したものをつくり, 計算に必要な長さ(残基数 $20 \times 2$ )を切りとって計算を行なった.

IV. 残基間の相互作用

モノマーの固有状態からポリマーの固有状態に変換するにはハミルトニアン行列(要素 $\langle Ia|H|Jb \rangle$ )を対角化しなければならない. この要素は各遷移での電子の状態変化によって生じた残基間の相互作用エネルギーを表わしている. その値は実験そのものからは得られず, 計算によって求めなければならない. ところがこの値は計算方法や用いた波動関数に大きく依存し, その結果旋光強度やCDの計算に大きな影響を与える. ここで用いたBayleyらのパラメータによる計

算は比較的实验とよくあっているが、それでも計算結果のところのみるように  $\alpha$ -helix の  $n\pi^*$  遷の旋光強度が实验で得られたものに比べてかなり小さい。この点については考察のところで改めて検討する。

行列の対角要素はポリペプチドの遷移のエネルギーに相当し吸収波長から計算される。ここでは  $\pi\pi^*$  遷移の吸収波長を 192nm,  $n\pi^*$  遷移の吸収波長を 222nm とした。各行列要素が得られれば後は (8), (7) 式より旋光強度を求め (5) 式を使って CD を描くことができる。なお (5) 式での旋光強度から CD 曲線を描く際のガウス曲線の半値幅は 12nm とした。

#### V. 球状たんぱく質の CD の matrix rank analysis

I-IV で述べた理論をたんぱく質にも適用すればたんぱく質の CD を計算することが可能である。しかし実際にたんぱく質の研究から要求されるのはむしろ逆に CD パターンからその構造を推測する方法であろう。これまでによく行なわれてきた方法はたんぱく質の CD を  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -structure, その他の不規則構造の 3 つの 2 次構造の CD の重ねあわせとみなし、これら 2 次構造の含有率を最小 2 乗法を用いて求めるといった方法である<sup>16)32)</sup>。しかしこの方法では必ずしも満足の行く結果が得られるとはかぎらず、いろいろと改良されたり<sup>17)</sup>、検討されたりしている<sup>32)~34)</sup>。そこでまずここでは matrix rank analysis の方法を用いて重ねあわせの方法の是非を調べてみた。

CD 実験で得られたあるたんぱく質の分子楕円率  $[\theta]$  の値を  $y$ , これが  $l$  この reference spectra の重ねあわせにより成るものと仮定し、その比率を  $c_1, c_2, \dots, c_l$ , 各 reference の  $[\theta]$  の値を  $x_1, x_2, \dots, x_l$  とすると、

$$y = \sum_{j=1}^l x_j c_j \quad \left( \sum_{j=1}^l c_j = 1 \right) \quad (9)$$

が成り立つ。このたんぱく質の CD を波長  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$  と  $n$  この点で測定したとすれば、

$$y_i = \sum_{j=1}^l x_{ij} c_j \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (10)$$

と  $n$  この式が成り立つ。さらに  $m$  このたんぱく質について同じように  $n$  この点で測定したとすれば、

$$y_{ik} = \sum_{j=1}^l x_{ij} c_{jk} \quad \left( \begin{array}{l} i=1, 2, \dots, n \\ k=1, 2, \dots, m \end{array} \right) \quad (11)$$

と合計  $mn$  この式が成立する。(11) 式を行列で表現すると (12) 式のようになる。

$$Y = XC \quad (12)$$

ここで  $Y$  は  $(n, m)$  型,  $X$  は  $(n, l)$  型,  $C$  は  $(l, m)$  型の行列である。さて行列  $Y$  の階級を  $r$  とすると

行列の性質により  $r \leq \min(l, m, n)$  である。 $n \geq l$ ,  $n \geq m$  となるように  $m, n$  を適当に大きくとれば行列  $X, C$  が特別なもの (例えばある行の要素がすべて 0) でないかぎり一般に  $r = l$  である。行列  $Y$  は  $m$  このたんぱく質の波長  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$  の  $n$  この点での  $[\theta]$  の値で構成される。この行列  $Y$  の階級を調べることによってたんぱく質の CD のみから reference の数  $l$  を知ることができる。もし球状たんぱく質の CD が  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -structure, その他の不規則構造部分の CD の重ねあわせによるものとすれば  $r = l = 3$  となるはずである。

階級  $r$  を求めるにあたっては  $Y$  の行ベクトルあるいは列ベクトルの中で 1 次独立なものが  $r$  個あることを利用する<sup>19)</sup>。(13) 式操作により  $y_{11}$  以外の第 1 列目の要素がすべて 0 になるような行列  $Y'$  をつくる。

$$y'_{ik} = y_{ik} - \frac{y_{i1} y_{1k}}{y_{11}} \quad (13)$$

同じ操作を 2 列目以降に次々と行なっていく。もし  $Y$  の階級が  $r$  ならば (14) 式のような  $(r+1)$  行目以降の要素がすべて 0 になった行列  $Y'$  ができるであろう。

$$Y' = \begin{pmatrix} y'_{11} & \dots & y'_{1r} & \dots & y'_{1m} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ 0 & & y'_{rr} & \dots & y'_{rm} \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ \vdots & & \vdots & & \vdots \\ 0 & & 0 & & 0 \end{pmatrix} \quad (14)$$

実際の計算では 0 の判定をうまく行なうために行と列を入れ換えたりするが基本は変わらない。

さて  $r$  が求まったならば今度は reference spectra の形、すなわち行列  $X$  を求めなければならない。これは行列  $C$  を与えることによって (11) 式から求めることができる。ところが (11) 式は一般に未知数の数よりも方程式の数の方が多く係数  $c_{jk}$  が何らかの拘束条件を満たしていなければ解  $x_{ij}$  は求まらない。この係数の行列は X 線解析のデータより与えられるが必ずしもこの拘束条件を満たしているとはかぎらない。そこで一般には最小 2 乗法を用いて  $X$  を求めるのであるが、これはあくまで近似的なものであり、後の結果のみを参考にこれを reference spectra としたのでは重ねあわせはうまくいかない。そこでここでは  $C$  も未知数として (12) 式を解くことにした。

$$f = \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m \left( \sum_{j=1}^l x_{ij} c_{jk} - y_{ik} \right)^2 \quad (15)$$

(15) 式において最初に  $x_{ij}$  (あるいは  $c_{jk}$ ) を適当に与え、 $f$  が最小値をとるような  $c_{jk} (x_{ij})$  を求める。次にその値を再び (15) 式に代入し、 $f$  を最小化するような今度は  $x_{ij}, c_{ij}$  を求める。これらの過程を繰り返す。

返し,  $x_{ij}, c_{jk}$  の値を収束させることによって (15) 式の解が求められる. この方法では C も未知数にするので解は無数に存在することになるが, 初めに与える初期値や  $x_{ij}, c_{jk}$  に適当な条件を課することによって不合理な解が求まるのを避けることができる.

ここでは  $x_{ij}$  の初期値として Chen ら<sup>16)</sup> の求めた reference spectra を用い計算途中で  $x_{ij}$  の値が初期値と大きく異なった場合はその差が小さくなるように修正して次のステップの計算を行なった. 又  $c_{jk}$  については  $c_{3k} = 1 - c_{1k} - c_{2k}$  とし  $c_{1k}, c_{2k}$  が負になったときは 0 と置き直して次のステップに進んだ. 計算途中で  $c_{jk}$  の値と X 線解析のデータから求めたものとの差が 0.2 以上になった場合はその差を 0.2 に置き直して次のステップの計算を行なった.

計算結果

I. 旋光強度

以下ではポリペプチドのアミノ酸残基数を  $n$  とする. 図 3 に  $\alpha$ -helix で  $n = 10$  のときの旋光強度の分布を示した. 190nm 付近のものは  $\pi\pi^*$  遷移のらせん軸に垂直な成分のものであり, 200nm 付近の負のものはらせん軸に平行な成分のものである. 222nm の  $n\pi^*$  遷移の旋光強度は実験値から得られるもののおおよそ 3 分の 1 である. この旋光強度の分布から (5) 式を使って CD 曲線を得ることができる.

II.  $\alpha$ -Helix の長さによる CD の変化

図 4 に  $n = 10, 15, 20, 30, 40$  と変化させたときの  $\alpha$ -helix の CD 曲線の変化の様子を描いた.  $n$  が大きくなるにつれて  $\pi\pi^*$  遷移の 2 つのピークが高くあるいは深くなる. この効果は大きいので後の  $\alpha$ HCC の CD と  $\alpha$ -helix の CD の比較や, たんぱく質の CD を

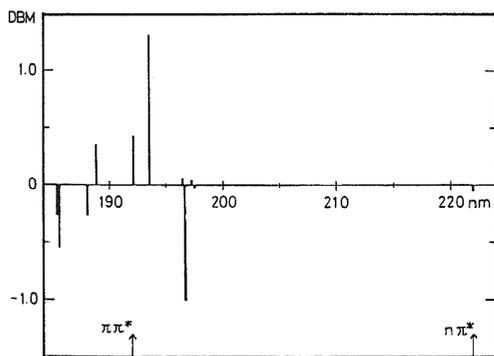


図 3.  $\alpha$ -Helix の旋光強度  
 $n = 10, p = 1.5 \text{ \AA}, \theta = 100^\circ$ . 単位 DBM は Debye  $\cdot$  Bohr Magneton.

考える際に留意しなければならない.

III.  $\alpha$ -Helix の構造変化と CD

図 5 は  $\alpha$ -helix ( $n = 20$ ) で  $p = 1.5 \text{ \AA}$  と固定し回転角  $\theta$  を  $96^\circ$  から  $100^\circ$  へと変えていったときの CD 曲線の変化の様子を描いたものである. 表 1 に  $\theta$  の変化に伴う  $\varphi, \psi$  の値の値を記した.  $\theta$  の変化によって  $\alpha$ -helix の CD は  $\pi\pi^*$  遷移のみならず  $n\pi^*$  遷移にも同程度の変化が生じることが図 5 で示されている.

図 6 は  $\theta = 98^\circ$  と固定し,  $p$  を  $1.48 \text{ \AA}$  から  $1.52 \text{ \AA}$  へと変えていったときの CD 曲線を描いたものである. 表 2 に  $p$  の変化に伴う  $\varphi, \psi$  の値を記した.  $p$  の変化は  $\alpha$ -helix がらせん軸の方向に伸縮することを意味する. このとき CD では  $n\pi^*$  にあまり変化が生じず,  $\pi\pi^*$  遷移, とくに 207nm 付近のらせん軸に平行な成分がかなりの変化を受けることが図 6 で示されている.

図 5, 図 6 の結果から,  $\alpha$ -helix の構造が少し変化すれば, それに伴ってその CD パターンもある範囲内で様々な形をとることが予想される. 長さまでも変化すると一層その傾向が増す. したがって球状たんぱく質中の  $\alpha$ -helix のようにこれら 3 つのパラメータにか

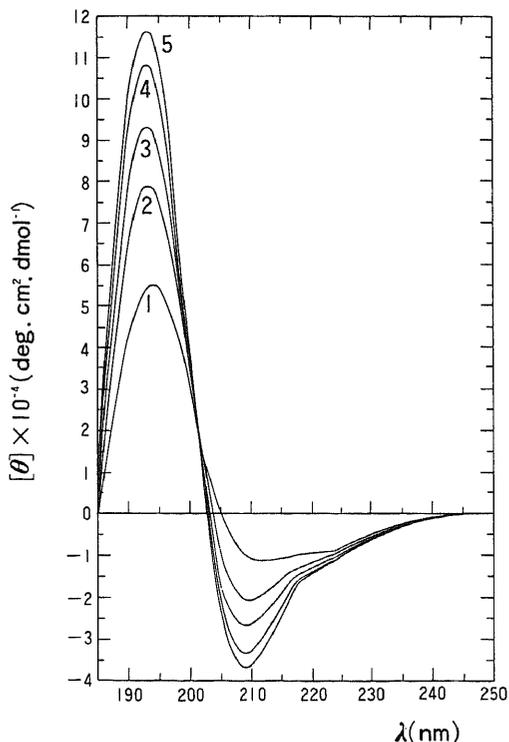


図 4. 残基数  $n$  による CD の変化  
 $p = 1.5 \text{ \AA}, \theta = 100^\circ$ . 1,  $n = 10$ ; 2,  $n = 15$ ; 3,  $n = 20$ ; 4,  $n = 30$ ; 5,  $n = 40$ .

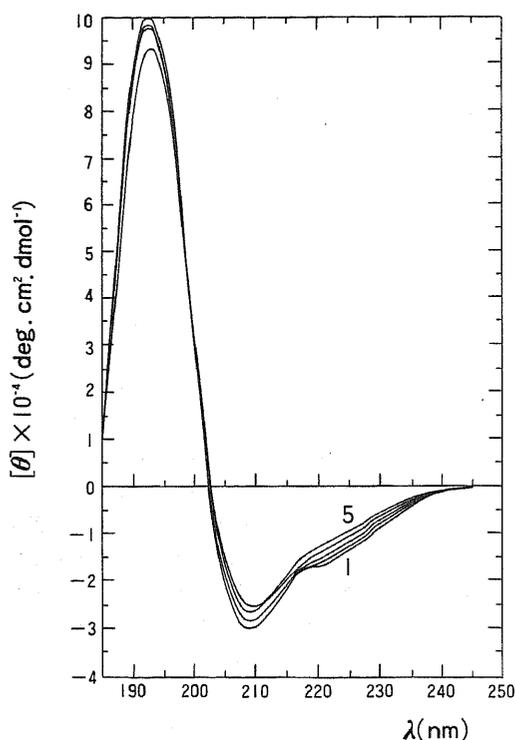


図5. 回転角  $\theta$  による CD の変化  
 $n = 20$ .  $p = 1.5 \text{ \AA}$ . 1 ~ 5.  $\theta = 96 \sim 100^\circ$ .  $\theta$  は 1 度ずつ変化.

表1 回転角  $\theta$  による  $\varphi$ ,  $\psi$  の変化  
 $p = 1.5 \text{ \AA}$ .  $\theta$ ,  $\varphi$ ,  $\psi$  の単位数は度

	$\theta$	$\varphi$	$\psi$
1	96.0	-36.392	-70.932
2	97.0	-39.305	-67.088
3	98.0	-42.611	-62.923
4	99.0	-46.511	-58.268
5	100.0	-51.438	-52.756

なりのばらつきがあるものはその CD パターンもかなり変化に富んでいることが予想される.

#### IV. $\alpha$ -Helical coiled-coil の CD

2本のポリペプチド鎖が同じ向きを持った  $\alpha$ HCC ( $n = 20 \times 2$ ) についてその CD を計算した結果を図7に描いた.  $\alpha$ HCC をつくる際, そのもととなった  $\alpha$ -helix についての結果も比較のために入れておいた.  $\alpha$ HCC の CD パターンは major-helix の半径 R

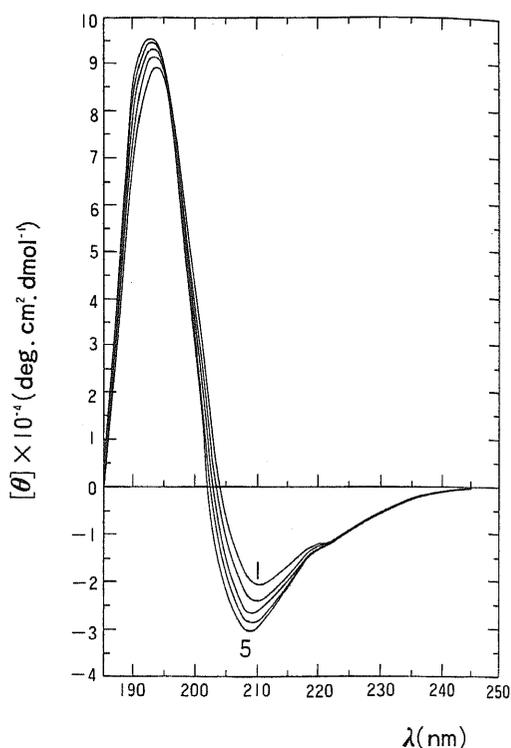


図6. ピッチ  $p$  による CD の変化  
 $n = 20$ .  $\theta = 98^\circ$ . 1 ~ 5.  $p = 1.48 \sim 1.52 \text{ \AA}$ .  
 $p$  は  $0.01 \text{ \AA}$  ずつ変化.

表2 ピッチ  $p$  による  $\varphi$ ,  $\psi$  の変化  
 $\theta = 98^\circ$ . ピッチの単位は  $\text{\AA}$ .  $\varphi$ ,  
 $\psi$  の単位は度

	$p$	$\varphi$	$\psi$
1	1.48	-56.371	-48.645
2	1.49	-53.746	-50.832
3	1.50	-51.438	-52.756
4	1.50	-49.351	-54.497
5	1.52	-47.431	-56.100

を  $5.3 \sim 5.6 \text{ \AA}$  と変化させてもほとんど変わらなかった. 又,  $\alpha$ HCC の 1 本鎖だけをとりだして CD を計算しても  $\alpha$ -helix (1 本) の CD とほとんど変わらなかった. このことは図7に見られる  $\alpha$ HCC と  $\alpha$ -helix の間の  $\pi\pi^*$  遷移の小さな相違が,  $\alpha$ HCC の 2 本鎖間の相互作用によって生じたものであることを示している.

図8は2本鎖の向きが逆になった  $\alpha$ HCC についての結果であるが同じ向きのものとほとんど差がない.

図7, 8の計算結果は次のことを示唆する。CD実験から $\alpha$ HCCの構造を $\alpha$ -helixの構造と区別して見つけだすのはむずかしい。仮りにそれができたとしても、2本鎖の向きまでも識別するのは不可能であろう。

図9はトロポミオシン(TM)とマレイル化トロポミオシン(MTM)のCD実験の結果である<sup>35)</sup>。TMは前に述べたようにminor-helixは1回転あたり3.5残基で上の計算で用いたものと同じ構造をしていると考えられている。MTMはTMのリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基をマレイル化したもので超遠心の測定<sup>35)</sup>によればMTMの濃度が小さいときには大部分の $\alpha$ HCCの構造がこわれて、1本鎖の $\alpha$ -helixになっているものと思われる。207nm付近ではTMはMTMに比べてわずかばかりピークが浅くなり計算結果と一致している。ところが192nm付近ではTMの方がピークが大きくなり、これは計算結果とは逆の傾向である。

この実験と計算結果の食い違いについては次のようなことがその原因として考えられる。まずマレイン酸が210nm付近に吸収を持っておりマレイル基もこの

付近に吸収があると思われるのでこの効果がCDに現われてくる。しかしマレイル基はリジン残基のみに結合し、リジン残基はTM全体の約7分の1しか含まれておらず、側鎖のマレイル基どうし、あるいはマレイル基と主鎖のアミド間の距離はアミドどうしの間距離に比べて大きいので、マレイル基の影響は小さいものと思われる。

次にTMとMTM中の $\alpha$ -helix含量の相違が原因となっていることが考えられる。TMとMTMの $[\theta]_{222}$ の値はポリリジン等の合成ポリペプチドの $\alpha$ -helixで得られるものの約4分の3であり、したがって両者とも100% $\alpha$ -helixの構造をしているとは思われない。ということは両者での $\alpha$ -helixの含量が異なることもあり得るわけである。しかし $[\theta]_{222}$ の両者の値はほとんど同じであり、この値が $\alpha$ -helixの含量に依存するものとする両者の間のhelix含量に差があるとしてもわずかであろう。又、helix含量が多くなれば $\pi\pi^*$ 遷移の2つのピークはどちらも大きくなるはずであり、実験結果のように一方だけが大きくなるということはありません。

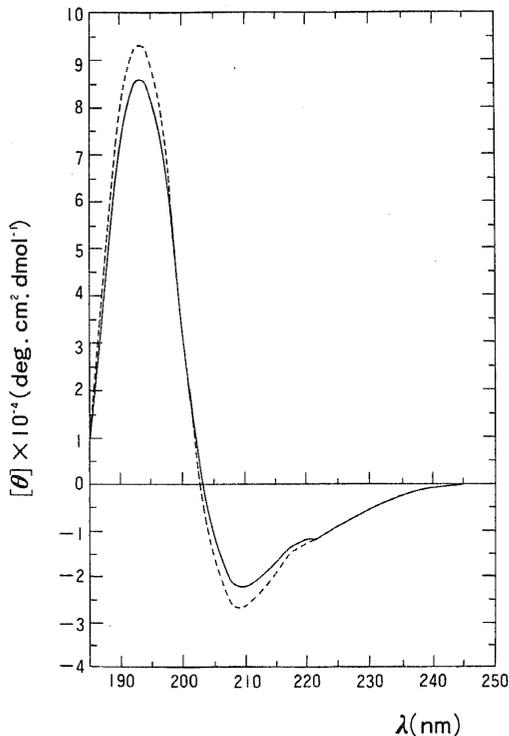


図7.  $\alpha$ HCCのCD (2本鎖の向きが同じ場合)  
破線は $\alpha$ -helixで $n = 20$ 。実線は $\alpha$ HCCで $n = 20 \times 2$ 。

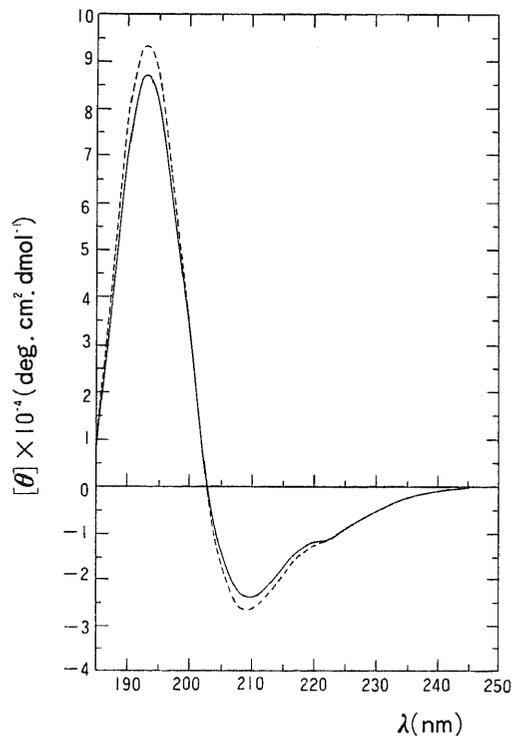


図8.  $\alpha$ HCCのCD (2本鎖の向きが逆の場合)  
図7の説明参照。

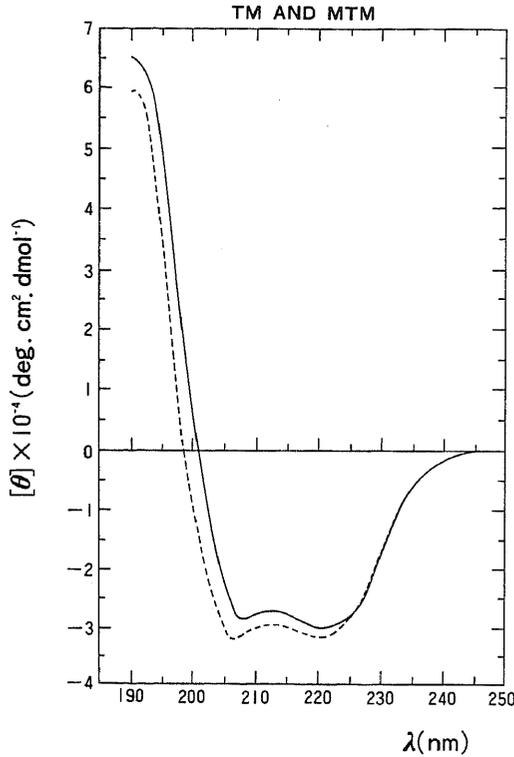


図9. TMとMTMのCD<sup>9)</sup>  
 TM, 2.4mg/ml. MTM, 0.1mg/ml a)上野・  
 窪田(未発表)

3番目にTMとMTM中の $\alpha$ -helixの構造が異なることによる可能性がある。これは図4~6の結果からして充分考えられることである。

最後にこの計算で扱った $\pi\pi^*$ 遷移,  $n\pi^*$ 遷移以外の遷移が微妙な影響を及ぼしていることも考えられる。もちろん上に述べた原因のいくつかが複合していることもありうる。いずれにせよ計算の方は単純化したモデル, 方法で行なっているので現時点では断定を下すことはできない。

#### V. 球状たんぱく質のCDのreference spectra

X線解析により3次構造が明らかになっていて, しかもCDが文献に載っている11この球状たんぱく質を選び(表3), CD測定値のmatrix rank analysisを行なった。各たんぱく質の分子橢円率 $[\theta]$ の値は文献に載っている数値を用い, 数値の載っていないものはグラフから読みとった。実際にmatrix rank analysisを行なった際正確に0になることはないから, CD実験による誤差を測定値の絶対値の5%としerror-propagationの式<sup>9)</sup>を用いて0の判定を行なった。

11この球状たんぱく質について測定点を適当に選んでmatrix rank analysisを行なったところ210~240nmの波長範囲で $r=3$ となった。200nm以下の領域ではたんぱく質の数を減らしても $r>3$ となり, この波長領域で重ねあわせの方法を適用するのは困難なことがわかった。210~240nmの範囲ではmatrix rank analysisに用いる測定点の数を変化させても $r=3$ であることに変わりはなかった。したがってこの

表3 Matrix rank analysis に用いた11個の球状たんぱく質

Protein	Origin	References
Myoglobin	Sperm whale	16
Lysozyme	Egg white	16
Lactate dehydrogenase	Dogfish	16
Ribonuclease	Bovine pancrease	16
Papain	Papaya	16
Insulin	Porcine	37
Ferrocycytochrome c	Tuna	38
Elastase	Porcine	39
Chymotrypsin	Bovine	39
Alkaline serine protease B	<i>Streptomyces griseus</i>	40
Flavodoxin	Clostridium	41

波長領域では 11 の球状たんぱく質の CD は 3 つの reference spectra の重ねあわせとして表わすことが可能である。

そこでこの波長領域での reference spectra を求めてみた。まず Levitt ら<sup>36)</sup>による  $c_{ijk}$  の値(彼らの方法による turn 構造はここでは不規則構造として扱った)を用いて各波長ごとに最小 2 乗法で求めた reference spectra を図 10.a に示した。そこで二、三のたんぱく質についてこの reference spectra ( $x_{ij}$ ) と  $c_{ijk}$  とで計算した CD を実験から得られたものとの CD と比較してみた。(図 10. b, c, d). 最小 2 乗法で求めた reference spectra では必ずしも重ねあわせがうまくいっていないことがわかる。

次に理論のところでも述べたように  $c_{ijk}$  を未知数として扱って得られた reference spectra を図 11.a に示した。このとき求めた  $c_{ijk}$  と  $x_{ij}$  とで計算した

CD ともとの実験の CD と比べたものを図 11. b, c, d に示した。この方法で求めた reference spectra を用いれば、重ねあわせがうまくいくことがわかる。表 4 にこの方法で求めた  $c_{ijk}$  と Levitt ら<sup>36)</sup>によって求められたものを比較しておいた。

最後にこの reference spectra を用いて、*E. coli* の RNA ポリメラーゼ<sup>42)</sup>の 2 次構造の比率を計算してみたところ、 $\alpha$ -helix 34%、 $\beta$ -structure 34%、不規則構造 32%となった。図 12 に重ねあわせの結果を示した。重ねあわせて計算した CD と実験の CD の一致の程度は良好である。

考 察

1.  $\alpha$ -Helix の構造と CD

規則的な構造をもった  $\alpha$ -helix はパラメータとして、 $p, \theta, \tau, \phi, \psi$  が与えられればその構造は決まる(図 1)。これらのパラメータのうち 3 つだけが独立で後の 2 つはそれらの従属変数になる<sup>27)</sup>。ここでは  $\tau = 109.47^\circ$  と固定してしまい、 $p, \theta$  を独立変数として扱った。それはらせんの構造を特徴づけるパラメータと

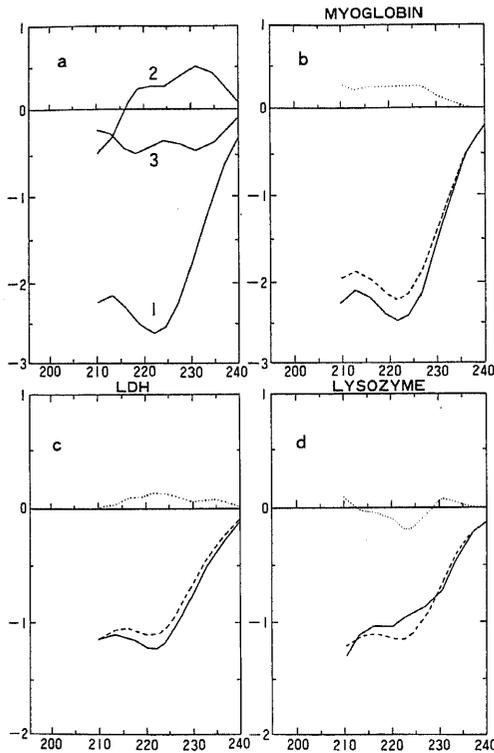


図 10. 最小 2 乗法による reference spectra  
a. 1.  $\alpha$ -helix ; 2.  $\beta$ -structure ; 3. 不規則構造。b, c, d. 実線は実験で得られた CD, 破線は計算による CD, 点線は両者の差を表わす。横軸は波長 (nm), 縦軸は分子楕円率 ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ )。LDH は lactate dehydrogenase の略。

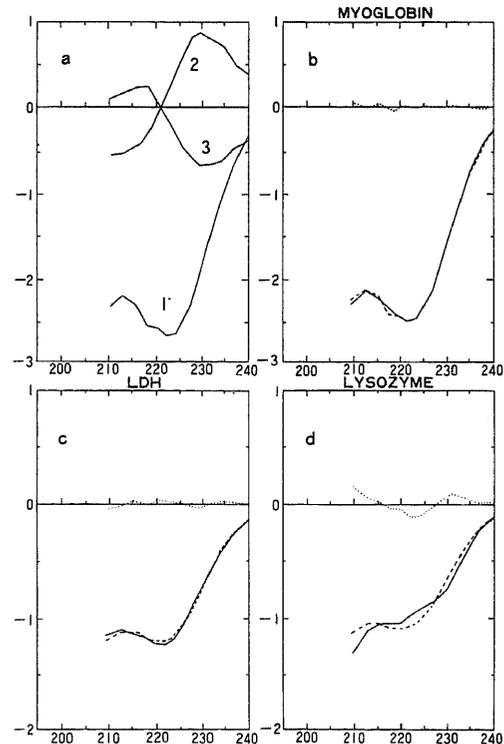


図 11. 修正された reference spectra  
図 10 の説明参照。

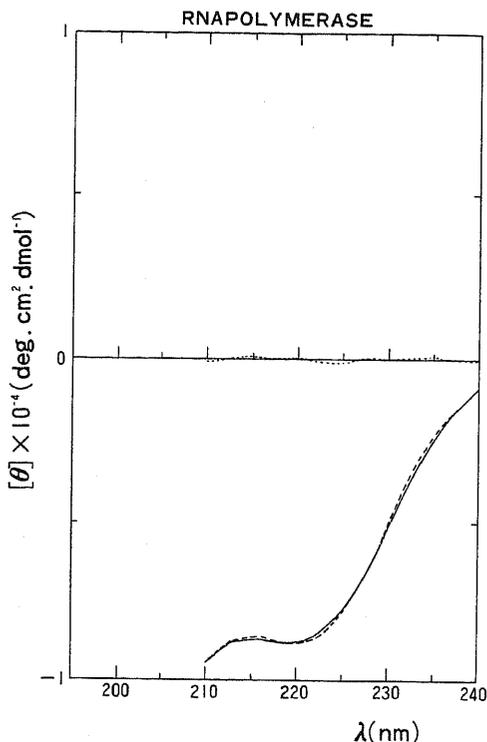


図12. RNAポリメラーゼのCD  
実線は実験で得られたCD. 破線は計算によるCD.

しては  $p, \theta$  の方が適当だからである.

結晶解析から得られるポリアラニンの  $\alpha$ -helix については  $p = 1.495 \text{ \AA}$ ,  $\theta = 99.57^\circ$  である<sup>43)</sup>. 溶液中の  $\alpha$ -helix については水溶液中, 有機溶媒中で各種アミノ酸の homopolymer, copolymer の CD がとられているがそれらにあまり大きな相違は見られず, せいぜい図5, 6の程度である. このことから  $\alpha$ -helix の CD が, 側鎖の違いによる影響はあまりなく, 主として主鎖の構造で決まり, また溶液中での  $p, \theta$  の変化の幅はこの計算で用いた程度以上には生じていないことが推測される.

## 2. $\alpha$ HCC の CD について

計算では  $\alpha$ HCC の CD と  $\alpha$ -helix の CD の差は小さかった. この差は2本鎖間の相互作用によって生じたものであり, これが小さいのは2本鎖の残基間の距離が  $10 \text{ \AA}$  以上離れているものが多くて相互作用が弱いからであろう. とくに  $n\pi^*$  遷移に関する相互作用を計算するとき, その monopole は四重極モーメントとなるので残基間の距離が大きくなった場合にその効果は非常に小さくなる.

$\alpha$ HCC と  $\alpha$ -helix の CD の差が小さいということは次のようなことを示唆する. たんぱく質中では  $\alpha$ -helix が何本かあり, それらが  $\beta$ -structure とともに super secondary structure といったものをつくっているものがある. このようなものも含めていくつかの2次構造が集まってさらに大きな構造をつくった場合でも, その位置関係によって CD が大きく変わるよ

表4 計算による各球状たんぱく質の2次構造の含有量 (%)

Protein	Calculation			Levitt and Greer		
	$\alpha$	$\beta$	$\rho$	$\alpha$	$\beta$	$\rho$
Myoglobin	94	8	-2	88	0	12
Lysozyme	42	31	27	46	19	35
LDH	46	27	27	43	25	32
RNase	35	52	13	23	46	31
Papain	35	32	33	28	29	43
Insulin	41	35	24	61	15	24
Ferrocycytochrome c	47	31	22	49	11	40
Elastase	10	46	44	10	46	44
Chymotrypsin	13	36	51	7	55	38
S, G. Protease	13	39	48	11	58	31
Flavodoxin	46	14	40	45	34	21

$\alpha$  は  $\alpha$ -helix,  $\beta$  は  $\beta$ -structure,  $\rho$  は不規則構造を表わす.

うなことはないであろう。したがって球状たんぱく質の CD は主として各 2 次構造の重ねあわせで決まり、逆にたんぱく質の CD からその 2 次構造を予測するのも妥当であるといえるであろう。

### 3. 計算方法の検討

さてこの節では今回の CD の計算で用いた Bayley ら<sup>9)</sup>の方法並びにそのパラメータについて検討する。まず  $\alpha$ -helix について計算した CD 曲線を見てすぐに気がつくことは  $n\pi^*$  遷移のピークの大きさが実測値の 3 分の 1 にしかならないことである。 $n\pi^*$  遷移の CD は主として一電子理論の効果、すなわち励起状態にある電子が遷移するときのモーメントと基底状態にある他の残基の荷電分布との相互作用に起因するものである。ここで用いられた  $n\pi^*$  遷移の磁気モーメントの大きさは 1.14 Bohr Magneton であり、けっして小さな値ではない。又、そのモーメントの方向を CO 軸と平行としているがこれも妥当であろう。基底状態のペプチドの荷電分布は求め方によって変わるが大きく変わることはない。一番問題となるのはハミルトニアン of 行列要素となる残基間の相互作用エネルギーの求め方であろう。これは前にも述べたように計算方法、波動関数に大きく依存する。この項の計算は厳密に行なえば 4 中心積分となり容易には行なえない。そこで積分を点電荷間の相互作用に置きかえる monopole 近似で計算を行なうのである。点電荷の位置、電気量は波動関数に依存し、波動関数が広がっているほど相互作用エネルギーは大きくなる。Woody<sup>44)</sup> は励起状態にある波動関数が広がっていることを考慮して monopole の位置を O 原子からより遠くへ離し四重極モーメントを大きくすることによって  $n\pi^*$  遷移の旋光強度を実測値に近く合わせている。

こういった計算方法の問題以外にここでは無視してきた他の遷移が  $n\pi^*$  遷移の旋光強度に影響を与えることは十分に考えられる。もちろん  $\pi\pi^*$  遷移の方にも影響があるであろう。例えば  $\alpha$ -helix についての計算では 185nm 以下の CD は負になるが実験では 170nm ぐらいまでは正で両者で食い違っている。これは 190nm 以下に存在する遷移によるものであろう。しかしこのような遷移についての知識は現在のところまだ不十分であり CD の計算に組み入れることができない。最近では n 軌道、 $\pi$  軌道に加えて  $\sigma$  軌道さらには 3s, 3p 軌道も含めた分子軌道法が発展しており、真空紫外領域における実験とともにアミドの電子状態のより詳しい研究が望まれるところである。

### 4. 球状たんぱく質の CD について

Matrix rank analysis によれば球状たんぱく質の

CD は 210 ~ 240nm の波長領域で 3 つの reference spectra の重ねあわせとして表わすことができる。しかしこの波長範囲で reference spectra を求めようとした際、最小 2 乗法を用いると重ねあわせはうまくいかない。これまでも最小 2 乗法で得られた reference spectra を用いて満足いく結果が得られなかったので単なる重ねあわせではない改良された方法が考えだされた。

例えば Chen ら<sup>17)</sup> は球状たんぱく質中の  $\alpha$ -helix の長さが各たんぱく質で異なることを考慮に入れて 2 次構造の予測を行なった。この長さによる影響は計算結果からも示されており、球状たんぱく質中の  $\alpha$ -helix の CD が合成ポリペプチドのものとは異なることは十分に考えられる。彼らの方法では  $\pi\pi^*$  遷移、 $n\pi^*$  遷移の CD の比較から長さの見つもりを行なうのであるが、もしこの見つもりが正しくなければ、含量の予測も間違ってしまう。図 5, 6 の計算によれば  $\alpha$ -helix の構造変化によっても CD は少なからず変化する。球状たんぱく質中の  $\alpha$ -helix の構造は詳細にみればかなり変化に富んでおり、したがってこれらを無視して長さだけを正確に読みとるのは困難なように思われる。

$\alpha$ -HCC の CD の計算の結果から球状たんぱく質中の各 2 次構造の相互作用が小さいことが示唆された。これは球状たんぱく質の CD を各 2 次構造の CD の重ねあわせと仮定するのに有利な結果である。しかしこれまでの経験からみて実際にはそう単純なものではない。球状たんぱく質の CD については主鎖に  $\pi\pi^*$ 、 $n\pi^*$  遷移以外にも遷移が存在し、又側鎖 chromophore の影響もあって未知の部分が多い。さらにたんぱく質の立体構造の多様性がある。現時点では CD からその立体構造についての詳しい知見を得るのは困難である。したがって球状たんぱく質の構造についてからの知見を得る手段として重ねあわせの方法も評価すべきであろう。

## 結 語

本研究では、まず  $\alpha$ -helix の構造を n, p,  $\theta$  をパラメータとして変化させそれに対応する CD 曲線を計算で求め、これらパラメータとの関係を調べた。次により大きなせん構造である  $\alpha$ HCC をつくり、その CD を計算して  $\alpha$ -helix の CD と比較した。さらに計算による  $\alpha$ HCC と  $\alpha$ -helix の CD の差を TM, MTM の CD 実験の結果と比較してみた。そしてこれら一連の計算に用いた Bayley ら<sup>9)</sup>の方法、パラメータに関する検討を行なった。

また Matrix rank analysis を用いて 11 の球状

たんぱく質の CD が  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -structure 不規則構造の CD の重ねあわせになっている波長領域を求め、そこでの reference spectra を計算した。最後にこの reference spectra を使って *E. coli* の RNA ポリメラーゼの 2 次構造の比率を計算した。以上から得られた結論は次のとおりである。

1.  $\alpha$ -helix の CD はその長さに大きく依存し、 $\pi\pi^*$  遷移でその効果は著しい。
2.  $\rho$  と  $\theta$  をパラメータとして  $\alpha$ -helix の構造を変化させたときの CD は両者で  $\pi\pi^*$ ,  $n\pi^*$  遷移における変化の様子が異なる。
3.  $\alpha$ HCC の CD は  $\alpha$ -helix の CD に比べて  $\pi\pi^*$  遷移のピークが少し小さくなった。 $\alpha$ HCC の 2 本鎖の向きが同じ場合と逆の場合とではほとんど差がなかった。この程度の差からみて、 $\alpha$ HCC と  $\alpha$ -helix を CD で区別することは困難であり、その 2 本鎖の向きまで識別することはなおさらむずかしいであろう。
4.  $\alpha$ HCC と  $\alpha$ -helix の CD の差は  $\alpha$ HCC の 2 本鎖間の相互作用から生ずるものである。その 2 本鎖間の距離が 5.5 Å 前後では  $\alpha$ HCC の CD は距離の変化による影響をほとんど受けない。またこの相互作用による効果が小さいことは球状たんぱく質の CD は基本的には 2 次構造の CD の重ねあわせとみなしてよいことを示唆する。
5.  $\alpha$ HCC,  $\alpha$ -helix についての計算結果と TM, MTM の CD 実験とは波長 207nm のピークでは合ったが 192nm のピークでは合わなかった。この原因については現在のところ断言することはできない。
6. 上の一連の計算で用いた Bayley らの方法はまず不十分なものであり実験値との一致をみるよう改善するためには、アミドの電子状態に関する研究をさらに進める必要がある。
7. 11 この球状たんぱく質の CD について matrix rank analysis を行なったところ、210 ~ 240nm の波長範囲で 3 つの reference spectra の重ねあわせになることがわかった。
8. さらにこの波長領域での 3 つの reference spectra の形を求め、これを用いて *E. coli* の RNA ポリメラーゼの 2 次構造について分析してみたところ、 $\alpha$ -helix 34%,  $\beta$ -structure 34%, 不規則構造 32% であった。

稿を終えるに臨み、御指導、御援助を賜りました亀山忠典教授ならびに京都大学化学研究所の大井龍夫教授に謹んで謝意を捧げるとともに本研究に種々の御教示、御助言を与えて下さった京都大学化学研究所 酵素化学部門の高橋敬助教授ならびに研究者諸兄に深く感謝いたします。また本研究推進

のために終始、御協力、御鞭撻頂いた森敬子さんはじめ分子生物学教室の皆様方に篤く感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Rosenfeld, L. : Zeits. f. Physik, 52, 161 (1928).
- 2) Kirkwood, J. G. : J. Chem. Phys., 5, 479 (1937).
- 3) Condon, E. U., Altar, W. & Eyring, H. : J. Chem. Phys., 5, 753 (1937).
- 4) Moffit, W. : J. Chem. Phys., 25, 467 (1956).
- 5) Tinoco, I. : Advan. Chem. Phys., 4, 113 (1962).
- 6) Woody, R. W. & Tinoco, I. : J. Chem. Phys., 46, 4927 (1967).
- 7) Schellman, J. A. & Nielsen, E. B. : J. Phys. Chem., 71, 3914 (1967).
- 8) Bayley, P. M., Nielsen, E. B. & Schellman, J. A. : J. Phys. Chem., 73, 228 (1969).
- 9) Madison, V. & Schellman, J. A. : Biopolymers, 11, 1041 (1972).
- 10) Pysh, E. S. : J. Chem. Phys., 52, 4723 (1970).
- 11) Chen, A. K. & Woody, W. : J. Amer. Chem. Soc., 93, 29 (1971).
- 12) Richardson, F. S., Shillady, D. D. & Bloor, J. E. : J. Phys. Chem., 75, 2466 (1971).
- 13) Grebow, P. E. & Hooker, T. M. : Biopolymers, 14, 1863 (1975).
- 14) Greenfield, N. & Fasman, G. D. : Biochemistry, 8, 4108 (1969).
- 15) Saxena, V. P. & Wetlaufer, D. B. : Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 969 (1971).
- 16) Chen, Y. H., Yang, J. T. & Martinez, H. M. : Biochemistry, 11, 4120 (1972).
- 17) Chen, Y. H., Yang, J. T. & Chau, K. H. : Biochemistry, 13, 3350 (1974).
- 18) Wallace, R. M. : J. Phys. Chem., 64, 899 (1960).
- 19) Wallace, R. M. & Katz, S. M. : J. Phys. Chem., 68, 3890 (1964).
- 20) 高橋 敬・大井龍夫：タンパク質(生命科学講座 2), 74 頁, 東京, 朝倉書店, 1976.
- 21) 中崎昌夫：旋光性理論入門, 121 頁, 東京, 培風館, 1973.
- 22) Basch, H., Robin, M. B. & Kuebler, N. A. : J.

- Chem. Phys., 47, 1201 (1967).
- 23) **Basch, H., Robin, M. B. & Kuebler, N. A.** : J. Chem. Phys., 49, 5007 (1968).
- 24) **Peterson, D. L. & Simpson, W. T.** : J. Amer. Chem. Soc., 79, 2375 (1957).
- 25) **Nielsen, E. B. & Schellman, J. A.** : J. Phys. Chem., 71, 2297 (1967).
- 26) **Pauling, L.** : Nature of the Chemical Bond, 3rd ed., New York, Cornell University Press, 1960.
- 27) **Miyazawa, T.** : J. Polymer Sci., 55, 215 (1961).
- 28) **Crick, F. H. C.** : Acta Cryst., 6, 685 (1953).
- 29) **Crick, F. H. C.** : Acta Cryst., 6, 689 (1953).
- 30) **Nishikawa, K. & Scheraga, H. A.** : Macromolecules, 9, 395 (1976).
- 31) **Hodges, R. S., Sodek, J., Smillie, L. B. & Jarasek, L.** : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 205 (1972).
- 32) **Grosse, R., Malur, J., Meiske, W. & Repke, H.** : Biochim. Biophys. Acta., 359, 33 (1974).
- 33) **Rosenkranz, H.** : Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 12, 415 (1974).
- 34) **Baker, C. C. & Isenberg, I.** : Biochemistry, 15, 629 (1976).
- 35) 上野 均・窪田 綏 : 未発表
- 36) **Levitt, M. & Greer, J.** : J. Mol. Biol., 114, 181 (1977).
- 37) **Ettinger, M. J. & Timasheff, S. N.** : Biochemistry, 10, 831 (1971).
- 38) **Myer, Y. P.** : Biochim. Biophys. Acta, 214, 94 (1970).
- 39) **Visser, L. & Blout, E. R.** : Biochemistry, 10, 743 (1971).
- 40) **Olafson, R. W. & Smillie, L. B.** : Biochemistry, 14, 1161 (1975).
- 41) **Edmondson, D. E. & Tollin, G.** : Biochemistry, 10, 125 (1971).
- 42) 齊藤綱男・高橋 敬 : 未発表
- 43) **Arnott, S. & Wonacott, A. J.** : J. Mol. Biol., 21, 371 (1966).
- 44) **Woody, R. W.** : J. Chem. Phys., 49, 4797 (1968).

## A b s t r a c t

The circular dichroism (CD) of  $\alpha$ -helix was calculated in terms of the structural parameters such as the number of residue,  $n$ , the pitch per residue,  $p$ , and the rotational angle of a residue around the helical axis,  $\theta$ . Although the calculated CD depends on all structural parameters ( $p$ ,  $\theta$ , and  $n$ ), the way of its dependence varies among these parameters.

The calculation was extended to the CD spectra of a coiled-coil of two  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ HCC), which may be classified into two types, i.e., one with two parallel polypeptide chains and the other with two anti-parallel polypeptide chains. The calculated patterns of these two  $\alpha$ HCC have little, if any, difference between the two and show slightly smaller peak in the  $\pi\pi^*$  region than that of  $\alpha$ -helix. This difference in the CD pattern of  $\alpha$ HCC and  $\alpha$ -helix is not due to the conformational difference, but to the interaction of two chains in  $\alpha$ HCC. The calculated CD spectra of  $\alpha$ HCC and  $\alpha$ -helix were compared with the experimental spectra of tropomyosin and maleylated tropomyosin.

Finally the CD spectra of eleven globular proteins were analyzed by the matrix rank method whether or not these spectra could be superposed by the reference spectra of three secondary structures in protein, i.e.,  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -structure and irregular conformation. The analysis showed that the superposition of three reference spectra was found to be valid in the wave length region of 210–240nm. The reference spectra in this region were calculated by the least squares method with some modification. The experimental CD spectra could be reproduced by superposition of the reference spectra

weighing the extent of the three secondary structures of each protein. The secondary structures of *E. coli* RNAPolymerase were estimated to be composed of 34%  $\alpha$ -helix, 34%  $\beta$ -structure and 32% irregular conformation based on the reference spectra obtained here.

---