

紫外共鳴ラマン散乱分光法によるタンパク質分析法の開発

新関智丈 加藤 健

1. はじめに

タンパク質の構造および機能解析は、近年その重要性を増してきている。解析手段としてはX線構造解析法、NMR (Nuclear Magnetic Resonance)法、ラマン分光法が一般的である。なかでも微弱散乱光を検出して分析・解析するラマン分光法は、分子量の制約がなく、かつ固体、液体のいずれの状態にあっても分析可能であり、また時間的に推移する構造変化を詳細に検討できる利点をもっており、注目度の高い分析技術となっている。従来のラマン分光法は励起光として可視又は赤外レーザー光を用いており、得られる構造や結合状態に関する情報は限られた範囲にとどまっている。しかし、蛋白質の機能発現に重要な芳香族アミノ酸は紫外領域に吸収帯を示す(図1)。そこで、紫外共鳴ラマン分光法では励起光として紫外レーザーを用いることで共鳴ラマン効果を利用し、芳香族アミノ酸についてより詳細な情報を得ることが可能となる。このことから、生命科学や創薬分野での利用が期待できる。

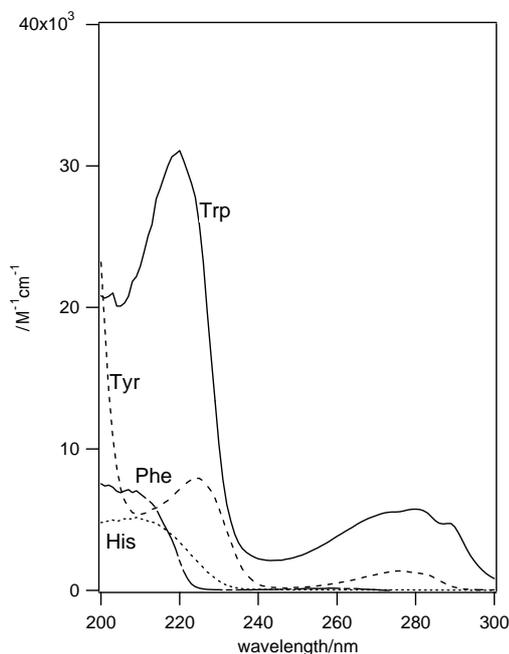


図1 芳香族アミノ酸の吸収スペクトル

2. 目的

ラマン分光法によるタンパク質解析の利点は多いが、タンパク質の溶液状態での解析に適した紫外レーザーラマン分光測定装置は広く市販されていない。そのため、

光軸調整、散乱光の集光などにおいて高度な操作技術が必要となり、操作性、再現性などに課題がある。また、タンパク質を溶液状態で解析するためのセルについても従来使われている石英ガラスセルでは、セル自身の散乱光によりタンパク質から微弱な散乱光の検出が妨害され(図2)、微小な変化を捉えることが困難となっている。

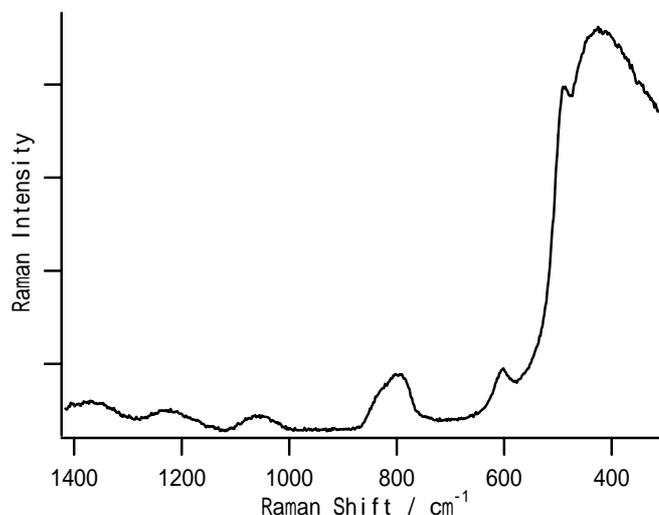


図2 石英ガラスのラマンスペクトル(532nm励起)

本研究では、紫外レーザーラマン分光法によるタンパク質解析用の石英及びフッ化カルシウム製の高精度セルの開発及び測定エキスパートを必要としない、容易な測定を可能にする測定手法についての検討を行う。

H16年度は、紫外励起ラマン分光測定用セルの材料及び顕微ラマン分光装置を用いた容易な測定手法についての検討を行った。

3. 検討内容

3.1 紫外励起ラマン分光用セル材料の検討

フッ化カルシウムをセル材料として用いることを検討した。フッ化カルシウム結晶のラマンスペクトルは300cm⁻¹付近にのみピークを示すため(図3)、セル自身の散乱光が測定に及ぼす影響は少ないと考えられる。

また、紫外共鳴ラマン分光測定に用いるレーザーの波長の1つである244nm励起でのフッ化カルシウム結晶の蛍光スペクトルを測定した結果、測定に影響するような蛍光は見られなかった(図4)。

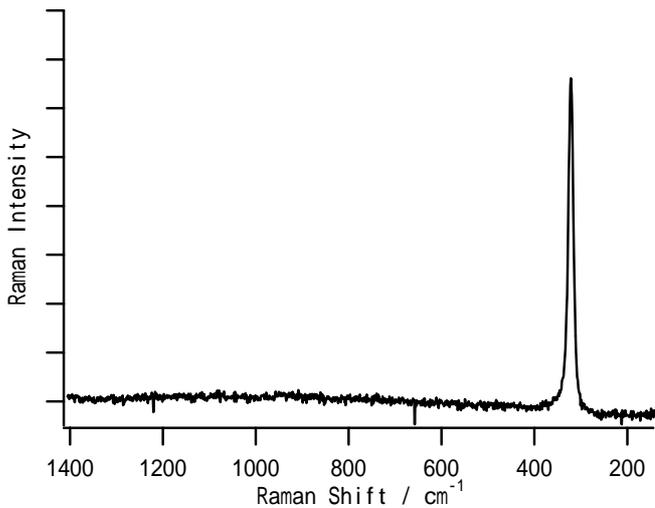


図3 フッ化カルシウムのラマンスペクトル
(514.5nm 励起, 出典:産総研 Rio-DB「鉱物/無機材料のラマンスペクトル・データベース」)

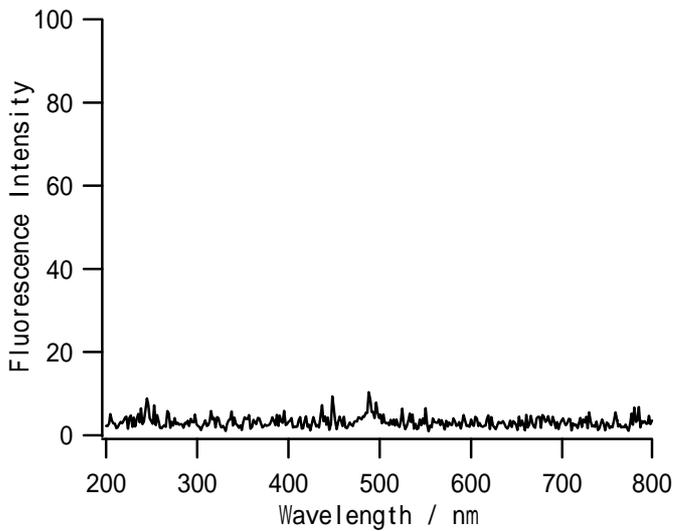


図4 フッ化カルシウム結晶の蛍光スペクトル(244nm 励起)

3.2 顕微ラマンシステムと集積化ガラスチップを用いた測定手法の検討

市販のラマン分光装置は顕微ラマン分光装置が一般的である。顕微ラマン分光装置と100 μ m以下の微細な流路を作成可能な集積化ガラスチップを用いた測定方法の検討を行った(図5)。

集積化ガラスチップは測定に応じたユーザーオリジナルの流路が設計できる(図6)。また,サンプルはシリンジポンプを用いてフローしながら測定するためレーザーによるタンパク質へのダメージを抑えることができ,サンプルの交換も容易である。

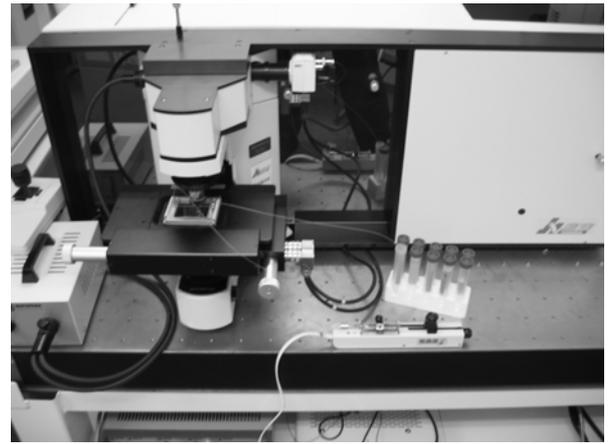


図5 装置セッティングの例(集積化ガラスチップ, マイクロシリンジポンプ)

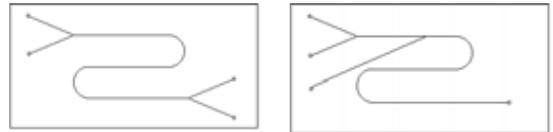


図6 集積化ガラスチップの流路例

4.まとめ

紫外共鳴ラマン分光測定用のセルとしてフッ化カルシウム製のセルを用いることで,セル自身の散乱光の影響を少なくし,タンパク質の微少な変化の観察が可能となると考えられる。また,顕微ラマン分光装置と集積化ガラスチップの使用により,エキスパートの必要がなく,容易で再現性の良い測定が可能となる。