

紫外共鳴ラマン散乱分光法による蛋白質解析法の開発

—第2報—

新関 智丈*, 加藤 健*

1. はじめに

ポストゲノム時代を迎え、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。なかでもラマン分光法は、分子量の制約がなく、サンプルの性状に関係なく分析可能であり、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。従来のタンパク質解析におけるラマン分光法は励起光として可視レーザーを用いており、その対象はほとんどが有色タンパク質であり、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、タンパク質の多くは無色であるため、可視レーザーによる解析は困難な場合が多い。そこで、紫外共鳴ラマン分光法では、タンパク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ことから、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、色の有無に関係なく芳香族アミノ酸について詳細な情報を得ることが可能である（図1）。

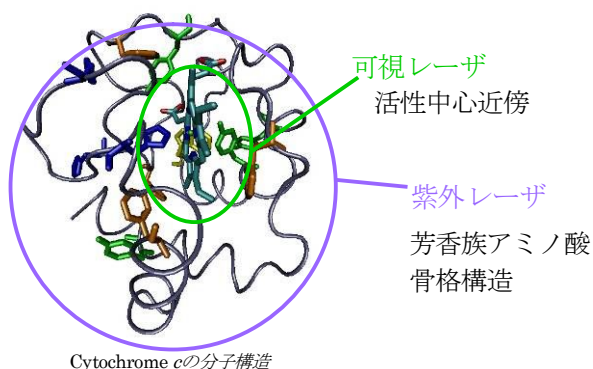


図1 紫外共鳴ラマンスペクトルのメリット

2. 目的

紫外共鳴ラマン分光法によるタンパク質解析の利点が多いが、溶液状態のタンパク質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、再現性などが問題になっている。本研究では、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。

3. 開発内容

本研究では、紫外レーザーを搭載した顕微ラマン分光装置とマイクロガラスチップを用いた測定方法の検討を行った（図2, 3）。開発した手法では、光学系の調整に高度な技術を必要としないため、従来の方法では

調整時間が半日程度かかるのに対し、本手法では数十分に短縮することができる。また、サンプルの交換も、シリンジ内のサンプルを交換するのみで光学系の再調整を必要としないため、容易な測定が可能である。タンパク質溶液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紫外レーザー照射によるダメージを抑えることができ、流路が微細なため少量のサンプルで測定が可能である。さらに、マイクロガラスチップは、さまざまな反応をチップ上で行うことができるという利点があり、酵素と基質やタンパク質と薬剤の反応をチップ上で行いそれに伴うタンパク質の構造変化をモニターすることもできる。

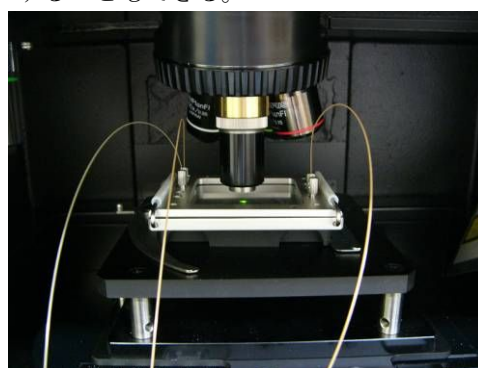


図2 顕微試料室とマイクロガラスチップ



図3 マイクロガラスチップとシリンジポンプ

4. 装置

測定には日本分光株式会社製の広帯域紫外用振動分光装置（図4）を使用した。

【広帯域紫外用振動分光装置仕様】

励起レーザー 244nm

試料室 顕微試料室

対物レンズ 紫外用×40, ×10

*先端技術部門

可視用×100, ×20, ×5
 分光器 シングルモノクロメーター (f=600mm)
 検出器 電子冷却方式 CCD (2048×512 ピクセル)
 測定波数範囲 200~4000cm⁻¹
 波数分解能 2cm⁻¹
 測定モード スペクトル測定, マッピング測定



図4 広帯域紫外用振動分光装置

5. 実験・結果

開発した測定法の検証実験として、ヘモグロビン(牛血液由来)、リゾチーム(卵白由来)、チトクロームc(馬心臓由来)の3種類の市販のタンパク質について244nm励起による紫外共鳴ラマンスペクトルの測定を行った。

ヘモグロビン及びリゾチームでは、軽水と重水について測定を行った結果、明瞭なスペクトルが測定できた(図5, 6)。また、両タンパク質共に条件の違いによるトリプトファン由来の1350cm⁻¹付近(W7)のラマンバンドの変化が確認できた。

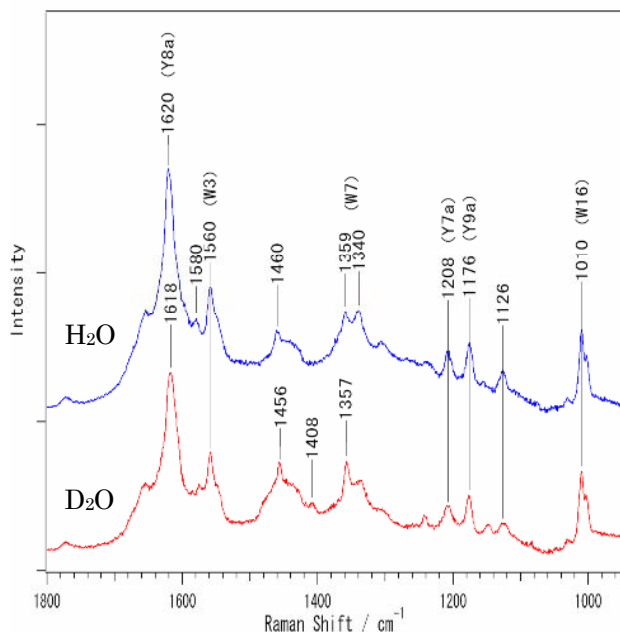


図5 ヘモグロビンの紫外共鳴ラマンスペクトル

チトクロームcでは、中性及び塩基性の条件で測定を行い、明瞭なスペクトルが測定できた。塩基性条件

では1602cm⁻¹にチロシネート由来のラマンバンドを示し、1173cm⁻¹(Y9a)と833cm⁻¹(Y1)のチロシン由来のラマンバンドにも変化が確認できた。

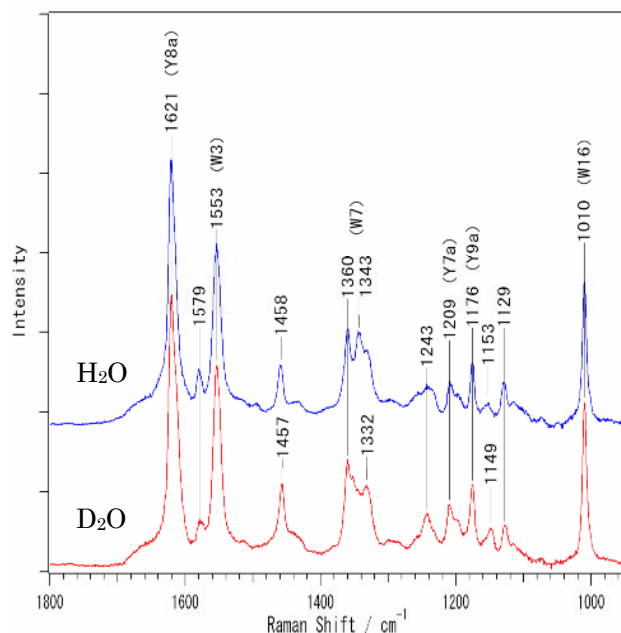


図6 リゾチームの紫外共鳴ラマンスペクトル

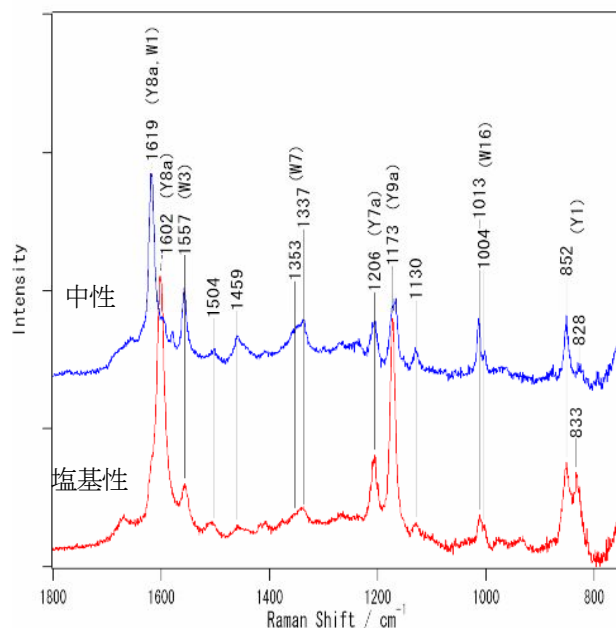


図7 チトクロームcの紫外共鳴ラマンスペクトル

6. まとめ

平成17年度は、開発した手法によりヘモグロビン、リゾチーム、チトクロームcの3種類のタンパク質について紫外共鳴ラマンスペクトルの測定を行い、いずれも明瞭なスペクトルを取得することができた。また、条件の違いによるスペクトル変化も確認することができた。このことから、開発した手法は、タンパク質の解析に十分対応できると考えられる。

平成18年度は、チップ上での条件変化や酵素と基質の反応に伴う構造変化などについて検討を行う予定である。