

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3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、サンプルの形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)。

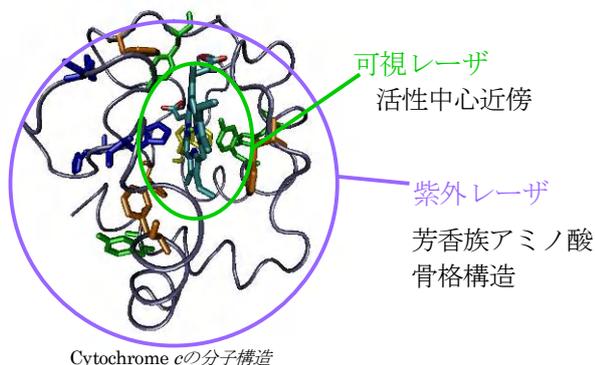


図1 紫外共鳴ラマンスペクトルのメリット

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は多いが、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可能である。

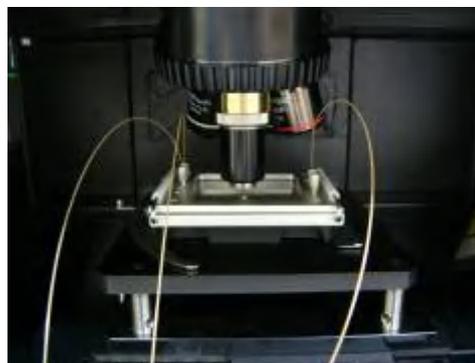


図2 顕微試料室とマイクロガラスチップ



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
可視用×100, ×20, ×5

*先端技術部門

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

2 種類の溶液が混合可能なマイクロガラスチップを用いて、馬心臓由来の Cytochrome *c* 溶液と水酸化ナトリウム溶液を混合し、pH の変化に伴う構造変化を 244nm 励起紫外共鳴ラマンスペクトルにより解析を行った (図 5)。

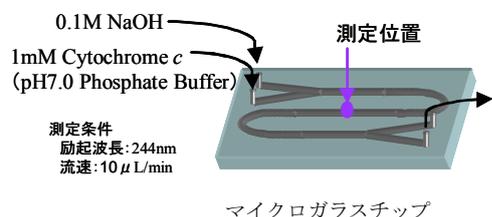


図 5 Cytochrome *c* 溶液と NaOH 溶液の混合による pH の変化

測定結果を図 6 に示す。また、比較実験として Cytochrome *c* 溶液を塩基性にあらかじめ調整して測定した結果を図 7 に示す。Cytochrome *c* は中性及び塩基性条件の紫外共鳴ラマンスペクトルにおいて、おもにチロシンとトリプトファン由来のラマンバンドを示した。また、塩基性ではチロシネートに特徴的なラマンバンドを 1600cm⁻¹ 付近に示した。図 6 の混合後のスペクトルでは、1603cm⁻¹ にチロシネートに特徴的なラマンバンドを示しており、図 7 の溶液条件を調整して測定した結果と同様の結果が得られた。このことから、チップ上で 2 つの溶液がきちんと混合し、Cytochrome *c* の構造変化を紫外共鳴ラマンスペクトルにより確認することができたと言える。

6. まとめ

開発した手法により、Cytochrome *c* 溶液と NaOH 溶液の混合による pH の変化に伴う構造変化を測定することができた。このことから、開発した手法はチップ中

で、タンパク質の pH 変化や酵素と基質の反応に伴う構造変化の解析に十分対応できると考えられる。

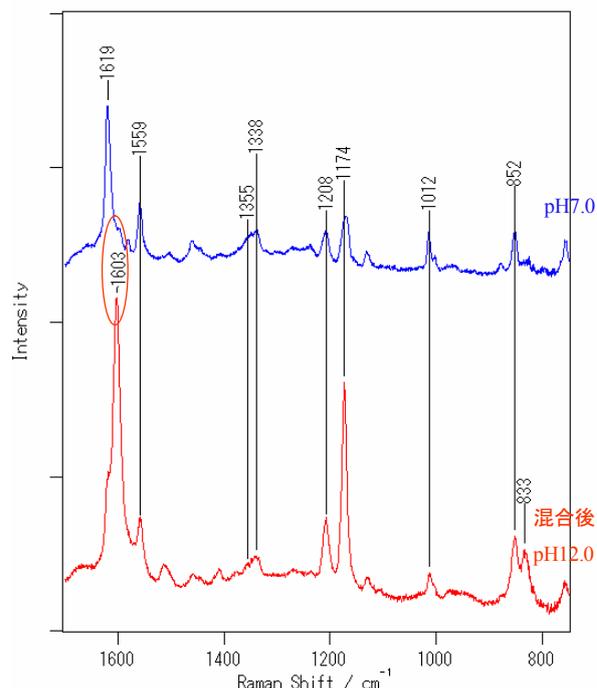


図 6 Cytochrome *c* と NaOH 溶液混合による pH 変化

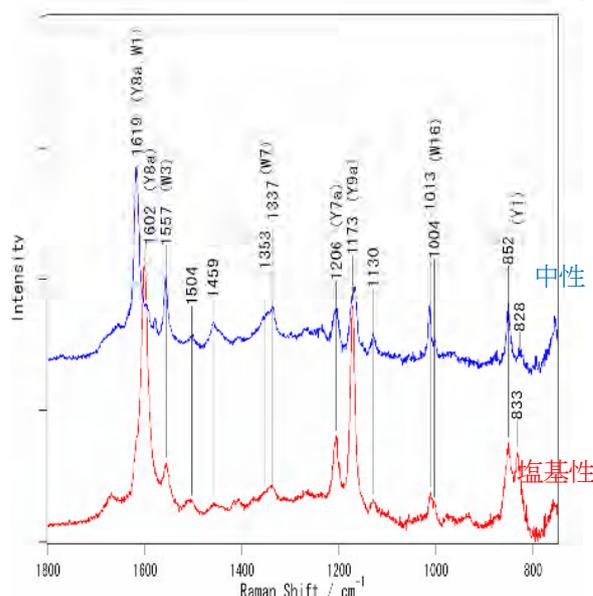


図 7 Cytochrome *c* の中性及び塩基性条件の紫外共鳴ラマンスペクトル

7. 研究成果活用による産業界への波及効果

蛋白質の構造・機能解析はポストゲノム研究の中でも重要な分野であり、今後は蛋白質の機能解析の需要が伸びると考えられる。また、本県では、2008 年に J-PARC が稼動し中性子によるタンパク質の構造解析が本格化する。したがって、蛋白質関連解析サービス分野においても市場の拡大が見込まれるため、タンパク質の解析関連装置メーカーや関連部品のメーカーなどのベンチャー企業の派生、育成が期待できる。また、生体分子、薬物などの分析を行う受託分析サービス事業の創業が期待できる。