

マイクロ流路セルを用いたミリ秒—フェムト秒二次元時間分解蛍光分光装置
の開発：生体高分子の高次構造形成過程追跡にむけた研究

(理研・田原分子分光) ○乙須拓洋、石井邦彦、田原太平

【序】我々は今回、生体高分子の高次構造形成過程追跡を目的とした新たな測定装置として、マイクロ流路セルを用いたミリ秒—フェムト秒二次元時間分解蛍光分光装置の開発を行った。蛋白質をはじめとする生体高分子の研究において、高次構造形成過程に関する研究は生体高分子の機能発現を理解するうえで非常に重要な研究テーマである。この課題に対する今日までの実験的アプローチとしては大きく分けて二つある。一つは異なる変性剤濃度条件のもと平衡状態で測定を行うもので、もう一つはストップフローによる溶液の高速混和に代表されるように溶媒環境を急激に変化させ、その後の構造変化を追跡するものである。特に後者のアプローチは生体高分子の構造変化を実時間観測できることから、平衡状態測定では埋もれてしまうような構造中間体の解析などが可能となる。近年になり、溶液の高速混和を可能とする新たな手法としてマイクロ流路セルの利用が報告されている[1,2]。この手法はストップフローに比べ汎用性が高く、さまざまな測定法との組み合わせが可能であることから近年報告数が増えている。本研究では生体高分子高次構造形成過程の実時間観測を目的とし、マイクロ流路セルと 200 フェムト秒の時間分解能を有する蛍光アップコンバージョン装置[3]を組み合わせた新たな測定装置の開発を行った。フェムト秒〜ピコ秒領域では蛋白質の溶媒和ダイナミクスの測定が可能であることから[4]、本装置により生体高分子構造転移に現れる構造中間体の局所的溶媒和構造変化を実時間観測することを目指している。

【マイクロ流路セル】

図 1 には本研究で用いたマイクロ流路セルを示す。本研究では溶媒の拡散混合による pH ジャンプを目的とし図のような流路を用いた。サンプルを含む溶液(A液)はA点から送液し、目的とする pH のバッファ溶液(B液)はB点から送液した。また送液する両溶媒の体積比はA液：B液=1：10とした。このマイクロ流路セルを通常の蛍光アップコンバージョン装置のサンプルセルとして使い、励起光を両液が交わるC点から異なる距離にフォーカスすることにより、混和後の異なる遅延時間でのデータを取得する。

【pH インディケータを用いたセルの評価】

本研究では生体高分子の構造変化を誘起するため、pH ジャンプを利用することとした。そこでまず pH インディケータであるアクリジンをサンプルとして使い、pH ジャンプに伴う蛍光スペク

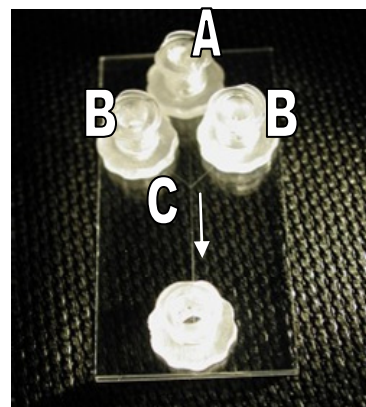


図 1 本研究に用いたマイクロ流路セル
(Y-channel, Translume)
材質：合成石英
流路サイズ：幅 100 μ m, 深さ 300 μ m

トル変化をモニターすることで今回用いたマイクロ流路セルの溶媒混和能に関する評価を行った。結果を図2に示す。pHジャンプによりpH4.7からpH7.3へと変化させることでアクリジンの蛍光スペクトルはブルーシフトした。これはアクリジンの脱プロトン化($K_a=5.5$)に伴うものであり、溶媒環境が酸性条件から中性条件へと変化したことを示唆している。図2(b)には各スペクトルをpH4.7、pH7.3下での蛍光スペクトルを用いた線形フィットすることにより得られたアクリジンの各分子種(protonated, neutral)の相対量変化を時間に対してプロットしたものを示しているが、この結果により今回用いたマイクロ流路セルによるpHジャンプのデッドタイムは1ms程度であることがわかった。これは市販のストップフロー装置と同等の時間分解能であり、マイクロ流路セルを用いた生体高分子の構造変化の実時間観測が可能であることを示している。

【蛋白質構造転移過程の追跡】

本装置をヒト血清アルブミン(HSA)のアルカリ状態(pH11)から中性状態(pH7)への構造変化の追跡に適用した。蛍光プローブとしては極性環境に敏感なAcrylodanを用い、HSAのCys残基に共有結合させ実験に用いた。図3(a)に示すようにAcrylodan蛍光はミキシング後時間とともにレッドシフトを示した。この結果はpHジャンプによるHSAの構造変化により、Acrylodan周囲の環境がより親水的な環境へと転移してゆく過程を示している。図3(b)には蛍光アップコンバージョン装置で測定した異なる反応時間での蛍光減衰カーブを示しているが、これらは反応時間に依存した特徴的な減衰カーブを示した。この結果の詳細な議論は当日行う予定である。

【参考文献】

- [1] S.Takahashi et al. *Nat.Struct.Biol.* (1997) **4**, 44.
- [2] S.Akiyama et al. *PNAS*(2002) **99**, 1329.
- [3] S.Takeuchi and T.Tahara *Chem.Phys.Lett.* (2001) **347**, 108
- [4] S.K.Pal and A.H.Zewail *Chem.Rev.* (2004) **104**, 2099

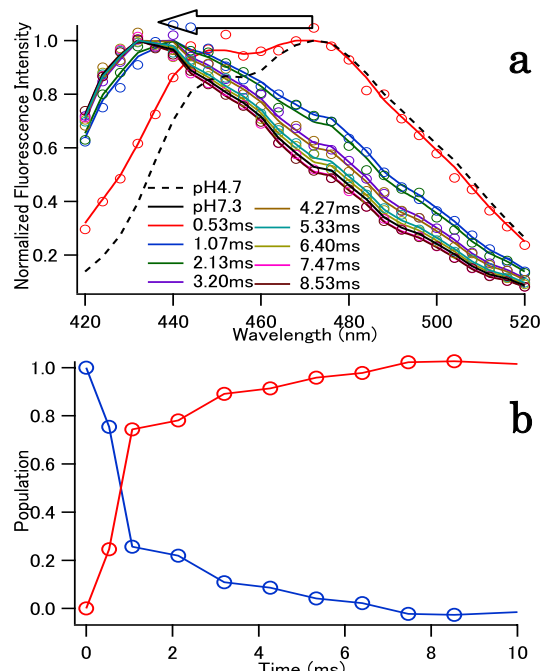


図2 (a) 異なる遅延時間でのアクリジンの蛍光スペクトル (b) フィッティングにより得られた各成分の相対量変化

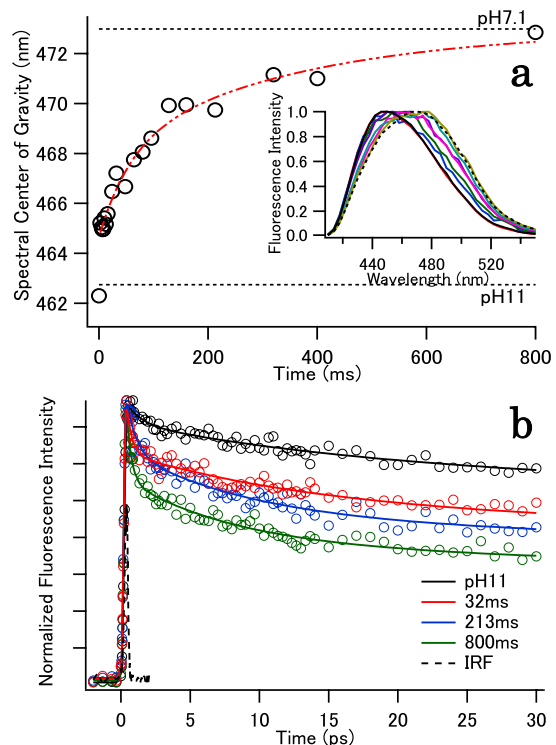


図3 (a) pH-jump後の蛍光スペクトル重心のシフトと指数関数によるフィッティング結果 (b) pH-jump後異なる反応時間でのサブピコ秒時間分解蛍光減衰カーブ