

## 表面増強ラマン散乱法を用いた各種ミオグロビン誘導体の高感度ラマン測定

(関西学院大学理工) 江頭優俊, 鈴木利明, 韓曉霞, 尾崎幸洋

Surface-enhanced Raman scattering study of various myoglobin derivatives  
(Kwansei Gakuin Univ.) Masatoshi Egashira, Toshiaki Suzuki, Xiaoxia Han, Yukihiro Ozaki

【序】表面増強ラマン散乱 (SERS) 法は、金属ナノ構造体近傍の増強電場を用いてラマン散乱を高感度に検出する手法であり、特に近年、生体分子への応用研究が多く試みられている。本研究ではミオグロビンに着目した。この分子は構造内に1個のヘム分子を持つヘムタンパク質で、中心にある鉄原子が各種の配位子を結合させることによって2価及び3価の異なる酸化状態、または高スピン、低スピンといったスピン状態を変化させることが知られている。また、この分子は可視光領域に吸収を持ち、共鳴ラマン効果を用いた表面増強共鳴ラマン散乱 (SERRS) も期待できる。本研究ではSERS法を用いて様々な状態のミオグロビン誘導体のスペクトルを測定し、その違いを調べた。

【実験】3価鉄の高スピン誘導体として0.2mMに調製したMb-H<sub>2</sub>O溶液と、この溶液に1000当量のNaFを加えることでMb-F溶液を準備した。また3価鉄の低スピン誘導体としてMb-H<sub>2</sub>O溶液に50当量のイミダゾールとNaN<sub>3</sub>を加えMb-ImとMb-N<sub>3</sub>溶液を調製した。また2価鉄の高スピン誘導体として50当量のNaBH<sub>4</sub>を添加したdeoxy-Mb溶液を調製した。

銀ナノ粒子を用いたSERRS測定では、銀ナノコロイド分散液を吸着させたガラス基板上に上記のサンプル溶液を滴下し、488 nmの励起光を照射してSERRSスペクトルを測定した。また、金ナノ粒子を用いたSERS測定では、金ナノコロイド分散液とサンプル溶液を2:1の割合で混合させ、その溶液に785 nmの励起光を照射することで、SERSスペクトルを測定した。

またpH依存性を調べるためpH2~12に調製したMb-H<sub>2</sub>O溶液を準備し、上記の方法を用いてSERRSスペクトルを測定した。

【結果と考察】各種ミオグロビン誘導体の共鳴ラマン散乱 (RRS) スペクトルとSERRSスペクトルを図1に示す。RRSスペクトルの方に注目すると、酸化状態を示すマーカーバンドが3価鉄の誘導体のスペクトルでは1370 cm<sup>-1</sup>付近に観測され、2価鉄の誘導体では1354 cm<sup>-1</sup>に低波数シフトしていることが分かる。またスピン状態を示すマーカーバンドに注目すると高スピン誘導体では1610 cm<sup>-1</sup>付近にバンドが観測され、低

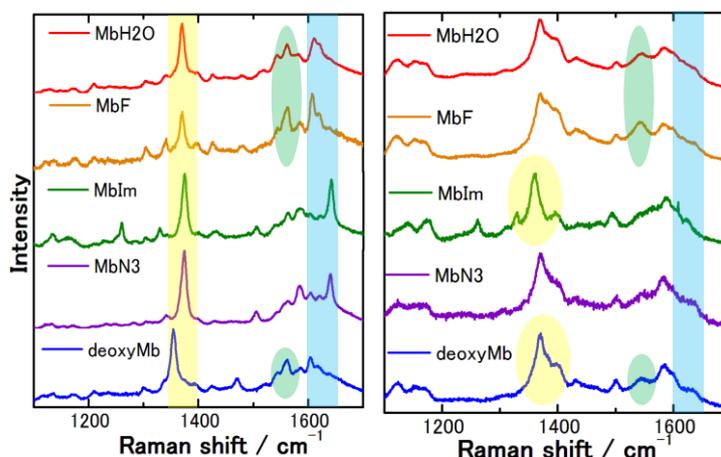


図1 各種ミオグロビン誘導体のRRSスペクトル(左)、SE RRSスペクトル(右)

スピン誘導体では $1640\text{ cm}^{-1}$ 付近に高波数シフトしていることが分かる。しかし、SERRSスペクトルでは、スピン状態を示すマーカーバンドは観測されなかった。また酸化状態を示すマーカーバンドに注目すると3価鉄の誘導体であるMb-Imのバンドは2価鉄を示す $1359\text{ cm}^{-1}$ の位置に観測され、それとは逆に2価鉄の誘導体であるdeoxy-Mbのバンドが3価鉄を示す $1371\text{ cm}^{-1}$ の位置に観測された。このことから、ナノ粒子表面において、ミオグロビンと銀ナノ粒子との間に何らかの相互作用が生じ、ミオグロビンの酸化状態が変化していることが考えられる。一方で、高スピン誘導体のRRSスペクトルでは $1560\text{ cm}^{-1}$ 付近に観測されたバンドがSERRSスペクトルでも似たような位置に強く現れており、スピン状態の変化によって強度が変化することが観測された。このことから、SERRSスペクトルではこれらのバンドをマーカーバンドとして扱う方が望ましいという可能性が示唆された。

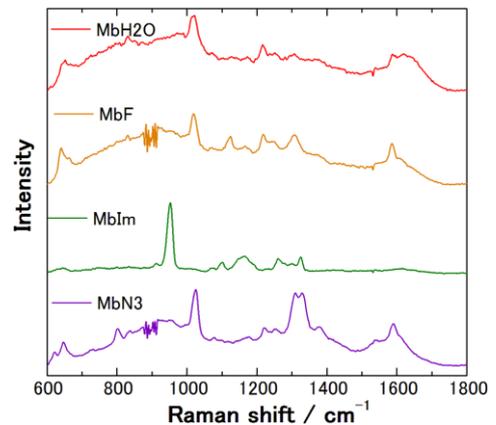


図2 金ナノ粒子を用いたミオグロビン誘導体のSERSスペクトル

金ナノ粒子を用いたSERSスペクトルを図3に示す。通常のラマン測定よりも高感度にシグナルは検出できたが、酸化状態及びスピン状態のマーカーバンドは観測されなかった。これは用いた励起光がヘムの吸収帯からはずれていたため共鳴効果が得られず、ミオグロビン内のペプチド鎖由来のシグナルが増強されたためであると考えられる。しかし、各スペクトルには若干の違いが見受けられ、これらのスペクトルの形状の違いからミオグロビンの状態が議論できるか検討中である。

pHを変化させた時のRRSスペクトルとSERRSスペクトルを図4に示す。RRSスペクトルでは、pH9以上で $1500\text{ cm}^{-1}$ と $1640\text{ cm}^{-1}$ に低スピン誘導体のマーカーバンドが観測された。これはミオグロビンがpH9以上では低スピン誘導体であるMb(OH)で存在するが、pH8以下では高スピン誘導体であるMb(H<sub>2</sub>O)に変化するためと過去に報告されている。またpHを3以下に下げた場合、高波数側に大きく変化が生じたが、これはミオグロビンが酸変性してしまったためと考えられる。SERRSスペクトルに注目すると、 $1640\text{ cm}^{-1}$ 付近のマーカーバンドは

pH9以上のサンプルでは定常的に観測されなかった。また $1500\text{ cm}^{-1}$ 付近のバンドはpH8以下の条件でも観測された。一方、高スピン誘導体のSERRSスペクトルにおいて見られた $1560\text{ cm}^{-1}$ 付近のバンドに注目すると、pHを下げるにつれてシグナル強度が強くなっている事が分かる。このことから、SERRSスペクトルにおいてスピン状態を議論する際は $1560\text{ cm}^{-1}$ 付近のバンドをマーカーバンドとして用いることが望ましいと思われる。

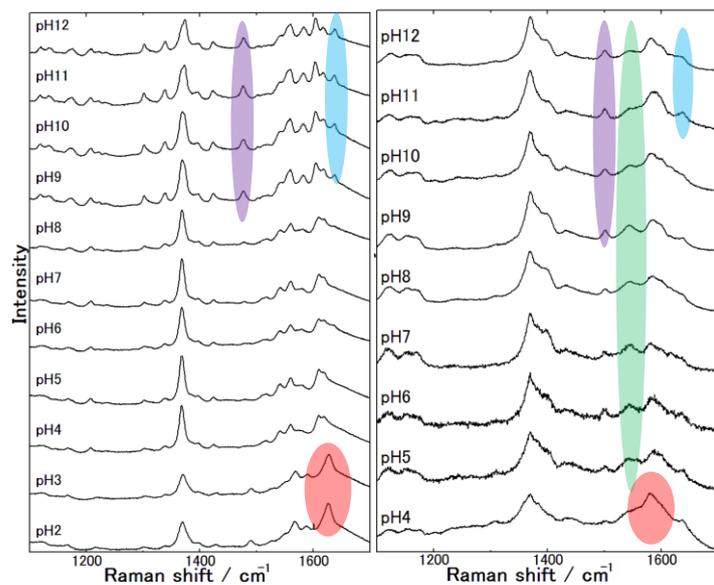


図3 Mb-H<sub>2</sub>OのpH変化。RRSスペクトル(左)、SERRSス