

## SERRS法を用いた各種ミオグロビン誘導体の高感度識別

(関学大院理工) ○江頭優俊、鈴木利明、尾崎幸洋

The high-sensitive detection of various myoglobin derivatives by using surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS)

(Kwansei Gakuin Univ.) ○Masatoshi Egashira, Toshiaki Suzuki,  
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というヘムタンパク質に着目した。この分子は構造内に1個のヘム分子を持ち、ヘム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SERRS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。

銀ナノコロイド分散液の調製はLee-Meisel法(クエン酸還元法)を用いて行った[1]。また、銀ナノコロイド分散液、各種ミオグロビン誘導体水溶液、及び凝集剤として100 mMのNaCl水溶液を2:1:1の割合で混合した溶液に514 nmの励起光を照射してSERRSスペクトルを測定した。またpH依存性を調べるためMb-H<sub>2</sub>O水溶液を用いてpH2~12に調製した上記の混合溶液を用いて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スペクトルにおいては、スピン状態を示すマーカーバンドは高スピン誘導体(赤)では1610 cm<sup>-1</sup>付近にバンドが観測され、低スピン誘導体(青)では1640 cm<sup>-1</sup>付近に高波数シフトすることが知られている[2]。しかし、SERRSスペクトルでは、このスピン状態を示すマ

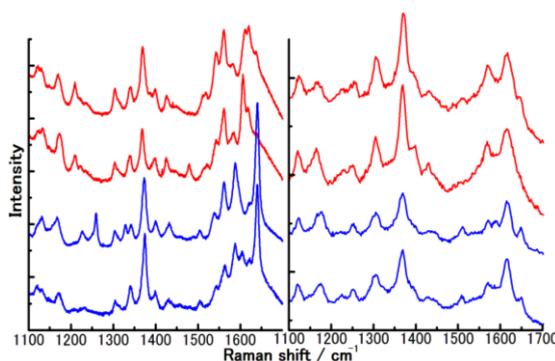


図1 各種ミオグロビン誘導体のRRSスペクトル(左)とSERRSスペクトル(右)

カーバンドは観測されなかった。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ことができるという可能性が示唆された。

そこで、pHを2~12まで1刻みに変化させた時のRRSスペクトルとSERRSスペクトルを測定した(図2)。RRSスペクトルでは、pH8以上で $1640\text{ cm}^{-1}$ 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pH8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[3]。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pHを下げてすぎてしまった故に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、pH8以上のサンプルにおいてRRSスペクトルでは観測された $1640\text{ cm}^{-1}$ 付近の低スピン誘導体のマーカーバンドは観測することができなかった。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った。そこで、横軸をpHとして $1560\text{ cm}^{-1}$ と $1620\text{ cm}^{-1}$ のバンドの強度比をプロットすると(図3)、これらの強度比がミオグロビンのスピン状態を反映して変化していることが分かった。これらの結果からSERRSスペクトルにおいては、 $1560\text{ cm}^{-1}$ と $1620\text{ cm}^{-1}$ のバンドの強度比を用いることで、ミオグロビンのスピン状態を高感度に判別することが可能になることが分かった。

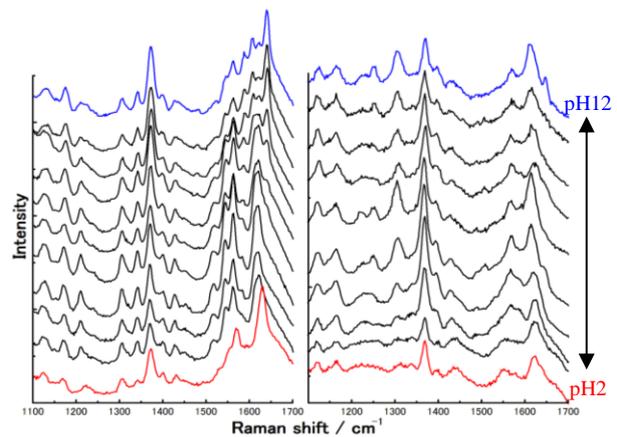


図2 ミオグロビンのpHを変化させた時のRRSスペクトル(左)とSERRSスペクトル(右)

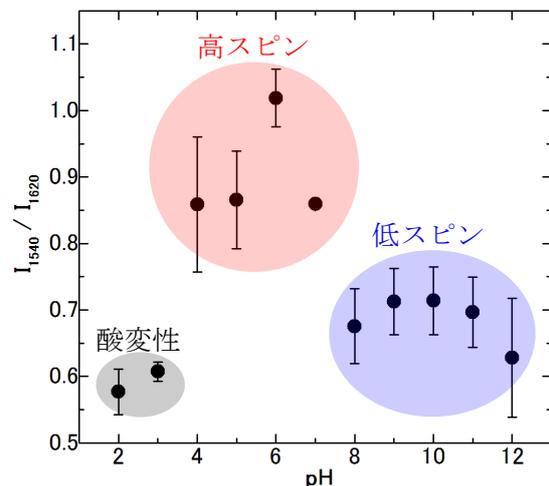


図3 SERRSスペクトルのpH変化における $1560\text{ cm}^{-1}$ と $1620\text{ cm}^{-1}$ のバンドの強度比プロット

[1]P. C. Lee and D. Meisel, *J. Phys. Chem.*, **86**, 3391 (1982).

[2]T. Kitagawa, Y. Kyogoku, T. Iizuka and M. I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5169 (1975).

[3]T. Kitagawa, Y. Ozaki and Y. Kyogoku, *FEBS Lett.*, **G2**, 369 (1976.)