

テラヘルツ時間領域分光法によるトレハロースにコートされた
リゾチームの低振動ダイナミクス
(神戸大院・理¹、神戸大・分子フォト²)

○岡田 梨沙¹、山本 直樹¹、田村 厚夫¹、富永 圭介^{1,2}

Low-Frequency Dynamics of Trehalose-coated Lysozyme Studied
by Terahertz Time-Domain Spectroscopy

(¹ Graduate School of Science, Kobe Univ., ² Molecular Photoscience Research Center, Kobe Univ.)

○Risa Okada¹, Naoki Yamamoto², Atsuo Tamura¹, Keisuke Tominaga^{1,2}

【序】極度な温度変化や乾燥状態では細胞破壊やタンパク質の変性が起こるため、生体が生息することは困難である。しかし、このような条件下においても生き延びることのできる生物(クマムシ、ネムリユスリカなど)の存在が知られている。これらの生物は、生体の保護物質として水の代わりに大量の糖、特にトレハロース(2分子のグルコースが1,1-グリコシド結合してできた2糖類)を蓄積することが知られている。このことから、極度な温度変化や乾燥など外的ストレスからタンパク質・生体膜を保護するトレハロースの働きが注目を浴びている。トレハロースはガラス化しやすく、このトレハロースの高い粘度がタンパク質の変性や構造破壊を引き起こす運動を抑制すると考えられている。このような極度な温度変化や乾燥ストレスによって影響を受けるタンパク質の運動は、多くの原子が集団的に運動することによって起こる。この集団的な運動は数十 cm^{-1} 程度の低振動運動に相当し、中性子散乱¹や分子動力学計算²などの手法を用いて観測されている。また、近年のフェムト秒レーザーの発展により開発されたテラヘルツ時間領域分光法(THz-TDS)も、タンパク質の低振動領域の運動を研究する手段として用いられている。本研究では、トレハロースによるタンパク質の低振動運動の熱活性を理解することを目的とし、THz-TDSを用いて温度を変化させて測定を行った。

【実験】試料としてトレハロース、リゾチーム、トレハロースとリゾチームの混合物の3種類を作製した。またトレハロース以外に、同じ二糖類であるマルトース(2分子のグルコースが1,4-グリコシド結合してできた2糖類)、スクロース(グルコースとフルクトースが結合してできた2糖類)の測定も行った。それぞれの試料は凍結乾燥させ、ペレット状にした。

テラヘルツ電磁波の発生、検出にはフェムト秒レーザーパルス(中心波長 800 nm)と光伝導アンテナを用いた。THz-TDSでは、試料を透過したテラヘルツ波と参照となる電磁波の電場の時間依存性(図1)を測定し、フーリエ変換することによってスペクトルを得る。この電場の振幅の変化と位相の変化から試料の吸光係数や屈折率などの物理量を求めることができる。得られた吸光係数・誘電率の温度依存性、温度因子を除いた双極子のダイナミクスを表す量として定義した換算吸収断面積(Reduced Absorption Cross Section: RACS)³の傾きをあらわす振動数の指数依存性について議論した。温度変化はクライオス

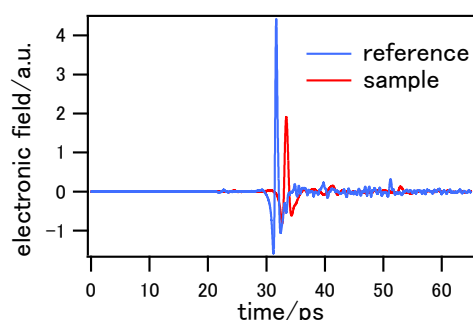


図1 電場の時間変化

タットを用いて 83 ~353 K の範囲で行った。また、常温の 0.2 ~20 GHz における複素誘電率の測定をネットワークアナライザー(アジレントテクノロジー、E5071C)を用いて行った。

【結果と考察】THz-TDS によって得られたトレハロースにコートされたリゾチームの吸光係数の温度依存性の結果を図 2 に示す。吸光係数のスペクトルは波数とともに単調に増加した。温度上昇に対する吸光係数の増加について詳しく検討するため、リゾチームと糖(トレハロース、マルトース、スクロース)にコートされたリゾチームの 25 cm^{-1} での吸光係数、その吸光係数を温度で微分した吸光係数の傾きを温度に対してプロットした(図 3)。リゾチームの吸光係数は温度上昇に伴って単調に増加するのに対し、糖を加えた試料では 300 K 付近から吸光係数の傾きが大きくなっていることがわかる。この吸光係数の傾きが大きくなる温度は、示差走査熱量測定(DSC)⁴によって観測されたトレハロースとリゾチームの混合試料のガラス転移温度に近い。このことは、THz 帯のスペクトル成分はピコ秒オーダーのダイナミクスに相当するため、ガラス転移によってピコ秒オーダーの運動が活性化されたことを示唆する。また、糖の種類の違いによる吸光係数の傾きの変化は観測されなかった。

ネットワークアナライザーと THz-TDS によって得た GHz ~THz 領域の複素誘電率のスペクトルを Cole-Cole 型の緩和モードと減衰振動モードの和⁵で再現を試みた(図 4)。THz 領域では、緩和モードはほとんど含まれず、減衰振動モードであらわされることから、各温度における THz-TDS による複素誘電率のスペクトルを一つの減衰振動モードであらわした。これらの解析結果から、THz-TDS によって得られた低振動運動の変化がどのような運動と関係しているのか議論する。

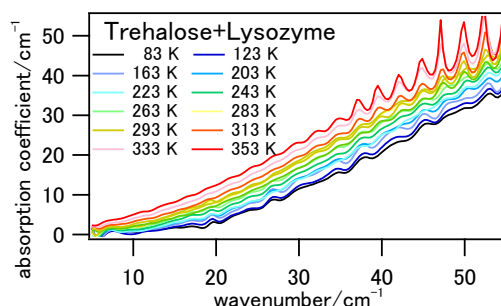


図 2 トレハロースにコートされたリゾチームの吸光係数の温度依存性

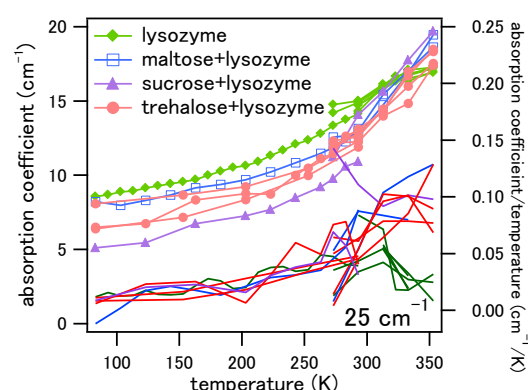


図 3 25 cm^{-1} での吸光係数の温度依存性

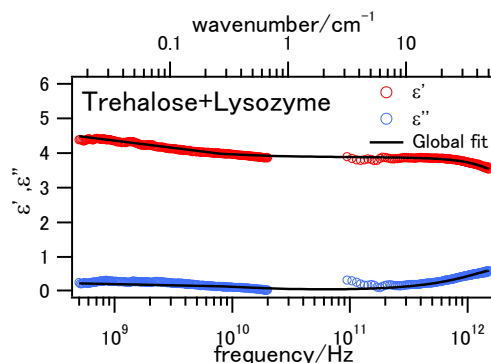


図 4 トレハロースにコートされたリゾチームの複素誘電率のスペクトル(293 K)とその線形解析

¹ L. Cordone, M. Ferrand, E. Vitrano and G. Zaccai, *Biophys. J.*, 1999, **76**, 1043.

² A. Lerbret, F. Affouard, A. Hédoux, S. Krenslin, J. Siepmann, M.C. Bellissent-Funel and M. Descamps, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**(36), 11103.

³ K. Yamamoto, K. Tominaga, H. Sasakawa, A. Tamura, H. Murakami, H. Ohtake and N. Sarukura, *Biophys. Lett.*, 2005, **53**, L22.

⁴ Y. H. Liao, M. B. Brown, T. Nazir, A. Quader and G. P. Martin, *Pharm. Res.*, 2002, **19**(12), 1847.

⁵ H. Yada, M. Nagai, K. Tanaka, *Chem. Phys. Lett.*, 2008, **464**, 166.