

液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた変性アルブミンイオンの 気相分光

学習院大理

○浅見祐也, 長谷川朋子, 河野淳也

Gas phase spectroscopy of denatured albumin ion produced by IR-ablation of droplet beam

○Hiroya Asami, Tomoko Hasegawa, Jun-ya Kohno

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University, Japan

【Abstract】 Denaturation of protein is one of the most important keywords in biochemistry. Recently the denatured structure has been observed by several spectroscopic techniques in aqueous solution, such as fluorescence, circular dichroism (CD) or small-angle neutron scattering. However in gas phase, such structural analyses have never been realized because the concentration of sample is extremely lower than those in the liquid or solid phases. In this study, we have measured the photoelectron detachment yield spectra of bovine serum albumin (BSA) and the conjugate with cetyltrimethylammonium bromide (BSA-CTAB) for discussing the structural difference between native and chemically denatured form in the gas phase. The spectral feature of BSA-CTAB is obviously different from that of BSA, which shows the secondary structural change occurring from α -helix to random coil structure. This result corresponds well to that of CD spectra observed in the same samples.

【序】 生体中で機能するタンパク質の変性を正確に理解することは、生命の機構を理解する上で極めて重要である。この変性状態は周囲の水分子の有無や温度、またタンパク質と相互作用する他の化合物の影響を受けるため、その構造は多種多様である。このような多様な要素を含むタンパク質の変性状態を分子論的に理解するためには、孤立気相状態での構造解析が有用である。特にタンパク質と界面活性剤が相互作用

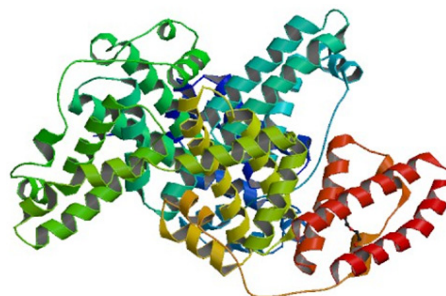


Fig. 1 Crystal structure of BSA (PDB 3V03)

することで生じる化学変性については、これまで蛍光[1]、円二色性(CD)[2]、中性子小角散乱[2]を用いた研究が盛んに行われてきたが、気相状態での構造の議論は全く行われていない。そこで本研究では、標的タンパク質としてウシ血清アルブミン(BSA)、変性剤として臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)を用いて、BSAとCTABの相互作用で生じる化学変性を孤立分子レベルで解明することを目指した。BSAは図1に示すように、その二次構造内に α -ヘリックスを多量に含むことで有名なタンパク質である。そのため、このBSAの化学変性では α -ヘリックス構造からランダムコイル構造への変化が顕著であると報告されている[2]。本研究では、BSA負イオンの光電子収量スペクトルを測定し、この構造変化を孤立気相状態で観測した。

【実験手法】 BSAを超純水に溶解させた試料溶液(100 μ M)とBSA(100 μ M)とCTAB(1 mM)を混合した試料水溶液を作成した。これらの溶液を市販の液滴ノズルから10 Hzでパルス射出し、直径70 μ mの液滴を生成した。この液滴をメカニカルブースターポ

ンプ及びターボ分子ポンプで 2.0×10^{-6} Torr 程度に差動排気された真空槽へ導入し、ワイリーマクラーレン型の4枚板加速電極部まで誘導した。この電極部へ誘導された液滴に、赤外レーザー光 3590 cm^{-1} を照射し、溶解した BSA を気相単離した。生成した様々なイオン分子はリフレクトロン型の TOF 質量分析計により観測した。また、BSA 負イオンから生成する光電子収量を測定するため、高出力の深紫外 OPO レーザー (Continuum, Horizon OPO) を用いて効率的な光電子の観測を行った。

【結果・考察】 図 2 に BSA 水溶液及び BSA-CTAB 混合水溶液で測定した質量スペクトルを示した。BSA では1価から4価までの異なる価数の負イオンが顕著に観測された。一方、BSA-CTAB 混合溶液では BSA に比べてこれらのピークが僅かに高質量側にシフトして観測されている。このシフト量から CTAB は BSA に対して 2~5 個程度結合しており、BSA-CTAB クラスタが顕著に生成していると考えられる。

図 3 に BSA 及び BSA-CTAB クラスタの負イオンで測定された光電子収量スペクトルを示した。スペクトル(a)では、194 と 205 nm 付近に信号の極大が観測された。これは α -ヘリックスを形成したポリペプチドで測定された水溶液の紫外吸収スペクトル[3]の形状と良く一致していることから、 α -ヘリックス構造を多量にもつ天然体の BSA の特徴を孤立気相レベルで測定できている結果と言える。一方、スペクトル(b)では、198~201nm の付近でスペクトル(a)とは大きく異なる信号の極大が観測された。CTAB の有無で BSA 構造にどのような変化が生じているのかを明らかにするため、(a)、(b)の差スペクトルをスペクトル(c)に示した。その結果、193 nm 付近で BSA 天然体由来の α -ヘリックス構造を示す信号が大きく減少することに伴って、198~201nm 付近の信号が増大していることが明らかになった。このことは、CTAB が BSA に結合することによって α -ヘリックス構造が変化することを意味しており、孤立気相状態で化学変性した BSA を観測することに成功したと考えられる。従来、CD スペクトルの測定から天然体で 195 nm 付近に観測される α -ヘリックスを示す信号が、CTAB と結合することによって 5 nm 程度レッドシフトして観測されることが報告されている[2]。このことは、 α -ヘリックス構造がランダムコイル構造に変化している特徴と理解されており、本研究においてもこれと一致する結果が得られたと考えられる。発表では、観測された光電子収量のレーザー強度依存性や試料水溶液の紫外吸収スペクトルの結果も交え、より詳細に BSA の化学変性について議論する。

【参考文献】

- [1] I. M. Vlasova, V. V. Zhuravleva, A. A. Vlasov, A. M. Saletsky, *J. Mol. Struct.*, **1034**, 89 (2013).
 [2] N. Gulla, S. Chodankarb, V. K. Aswal, P. Senc, R. H. Khanc, K.-Dina, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **69**, 122 (2009).
 [3] K. Rosenheck, P. Dand, *Biochemistry*, **47**, 1775 (1961).

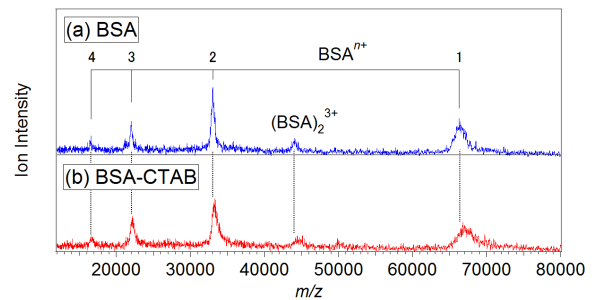


Fig. 2 Mass spectra obtained by using (a) BSA and (b) BSA-CTAB aqueous solution.

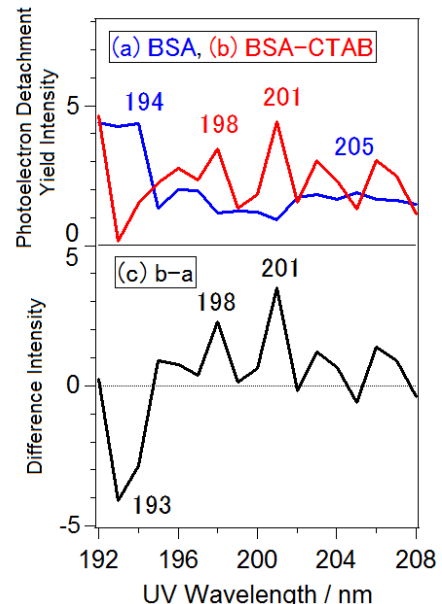


Fig. 3 Photoelectron detachment yield spectra of (a) BSA and (b) BSA-CTAB. The difference spectrum (b)-(a) is indicated in (c) on the bottom panel.