

2D09 タンパク質高次構造ダイナミクスの検出にむけたピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置の製作

(JST CREST¹、神戸大 分子フォト²、JST さきがけ³) ○佐藤 亮^{1,2}、水谷 泰久^{1,2,3}

1. 序

タンパク質が機能するためには、それ自身の高次構造が変化することが必要不可欠である。ヘモグロビンにみられる協同的な酸素親和性はその代表例であるが、これはヘムにおける酸素の脱着に誘起されるタンパク質構造の変化によって生み出される。我々はこの機能発現機構を解明するため、ヘモグロビン(HbA)およびミオグロビン(Mb)について、リガンドの脱離に伴う構造変化を可視プローブ光を用いたピコ秒時間分解共鳴ラマン分光法により調べてきた。共鳴ラマンスペクトルに観測される、鉄—ヒスチジン伸縮振動[v(Fe-His)]にはタンパク質構造が反映されるため、この方法ではv(Fe-His)バンドをプローブとしてタンパク質の高次構造変化の情報を得ることができる。観測されたv(Fe-His)バンドの変化から、Mb および HbAにおいて一酸化炭素の脱離後ピコ秒の時間領域で起こるタンパク質の構造変化の存在が明らかとなった^{1,2}。しかし、可視光励起による共鳴ラマン測定ではヘムの振動やv(Fe-His)以外の振動を観測することは困難であり、v(Fe-His)バンドの変化とタンパク部分の構造変化が具体的にどのように関連しているのかについては不明である。

ラマン散乱励起光に 200-250 nm の紫外光を用いると、芳香族アミノ酸側鎖やポリペプチド主鎖の振動バンドが強い共鳴効果を受け、タンパク質部分を直接に観測することができる。トリプトファンの幾つかの振動ラマンバンドは側鎖周囲の環境を、また主鎖のアミド振動はタンパク質の二次構造を敏感に反映するので、時間分解測定によりタンパク質の部位特異的な構造ダイナミクスを調べることが可能である。本研究では、タンパク質高次構造変化の実体の解明にむけてピコ秒時間分解紫外共鳴ラマン分光装置を製作し、性能の評価を行なった。

2. 装置の構成と性能評価

図 1 に製作したピコ秒紫外共鳴ラマン分光装置の概略を示す。モード同期チタンサファイアレーザーおよび再生増幅器で構成されるレーザーシステムの出力を基に、第二高調波(波長 390-405 nm)を発生させ、これをポンプ光および紫外プローブ光発生用とに分割した。後者の光を 50 気圧のメタンガスもしくは水素ガスを封入したラマンシフターに集光し、誘導ラマン散乱を発生させた。この後、(1) 1 次ストークスラマン散乱光の第二高調波発生、(2) 1 次のストークスラマン散乱光とレーザー光の第二高調波との和周波発生の二通りの方法により、204-244 nm の範囲で連続的に波長可変なピコ秒の紫外プローブ光を発生させた。この広範囲の波長可変性は、共鳴効果を活用した部位選択的な観測が可能となる点でタンパク質の測定にはきわめて有効である。得られた紫外プローブ光の線幅は 16 cm⁻¹ であり、紫外プローブ光と可視ポンプ光との相互相關幅は 2.3 ps であった。

タンパク質試料に紫外共鳴ラマン分光法を応用する場合、分子量が大きいことによる

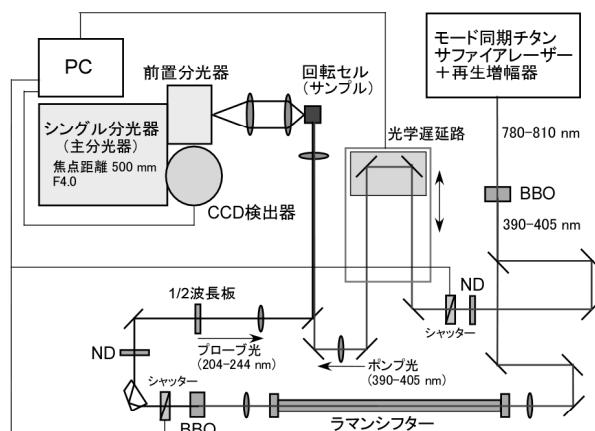


図1. ピコ秒時間分解共鳴ラマン分光装置の概略

強いレーリー散乱光やトリプトファンの蛍光が、測定上大きな問題となる。これら迷光を効率的に除去するフィルターとして働くプリズム型前置分光器³を製作し、CCD 検出器を装着した主分光器前段に設置した。図 2 にその概略を示す。入射光は凹面鏡で平行化された後に、リトロプリズムで分散され、主分光器の入射スリットに再び集光される。ここでラマン散乱光のみ主分光器入射スリットを通過し、レーリー散乱光と可視域の蛍光は入射スリットに遮られるように、この位置での分散を定めてある。前置分光器のフィルターとしての性能を評価するために、主分光器の入射スリット幅を変えて、HbA の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した結果を図 3 に示す。(a)にみられるレーリー散乱による高いバックグラウンドが、スリット幅を狭めた(b)では著しく低減されている。本前置分光器によって、タンパク質を測定対象とする場合でもレーリー散乱の妨害を受けずに質の良い共鳴ラマンスペクトルを測定できることが確かめられた。

図 4 に 226.3 nm のプローブ光で測定した定常状態におけるデオキシ HbA (a)、一酸化炭素結合形 HbA (b) の紫外共鳴ラマンスペクトル、および(a)から(b)を差し引いた差スペクトル(c)を示す。観測されているラマンバンドは、タンパク質中のトリプトファン(W)およびチロシン(Y)の側鎖によるものであり、(c)に現れる信号は、HbA の四次構造変化に伴ってこれらの残基の周辺環境に変化が起ったことを反映している。以上のように本測定装置は、HbA の高次構造変化に伴う芳香族アミノ酸の振動ラマンバンドの微小な変化を十分に検出可能な性能を備えていることが確かめられた。今後時間分解測定を行い、リガンド脱離後の高次構造ダイナミクスについて調べていく予定である。

【参考文献】

- Y. Mizutani and T. Kitagawa, J. Phys. Chem. B, 105, 10992 (2001)
- 水谷泰久, 2003 年分子構造総合討論会要旨集, 3Tp03
- S. Kaminaka and R. A. Mathies, Appl. Spectrosc. 52, 469 (1998)

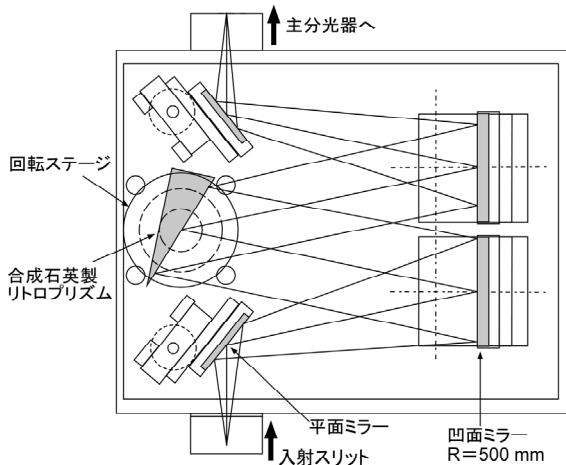


図2. プリズム式型前置分光器

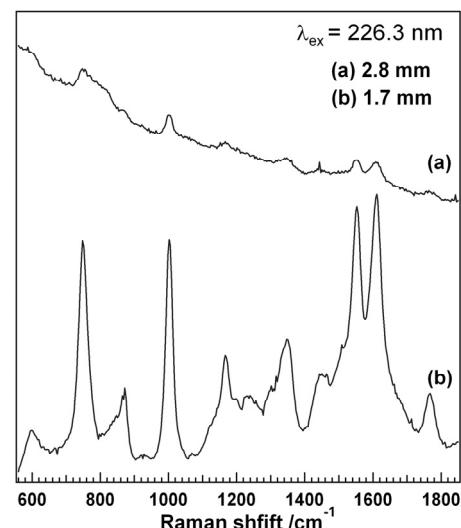


図3. HbAの紫外共鳴ラマンスペクトル
(a)主分光器スリット幅:2.8 mm
(b)主分光器スリット幅:1.7 mm

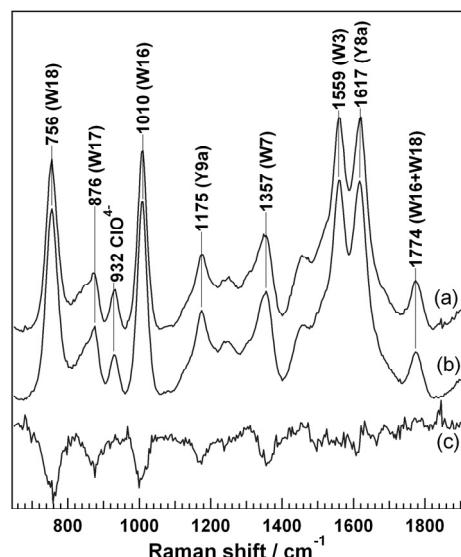


図4. HbAの紫外共鳴ラマンスペクトル
(a) デオキシ形, (b) 一酸化炭素結合形
(c) 差スペクトル: (a) - (b) を3倍に拡大