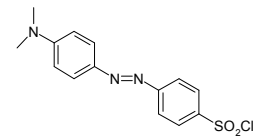


分子ラベリングを用いた近赤外顕微ラマン分光法によるタンパク質検出

(東大院理) ○安藤正浩、関栄根、濱口宏夫

【序】 ラマン分光法では、分子構造を反映したスペクトルを得ることができる。近年、顕微ラマン分光法などの発展に伴い、生体系への応用が強く期待されている。特に近赤外励起によるラマン分光は、試料からの蛍光の妨害を回避できるラマン分光として、有力な手法であると考えられる。しかしながら可視光励起に比べれば、より長い波長を用いていることで、ラマン散乱断面積の減少、検出器の感度低下などの理由により、検出面での困難が生じてくる。そこで本研究では、その検出感度を向上させるため、分子ラベリングの手法を導入し、タンパク質の近赤外顕微ラマン検出を試みた。すなわち、近赤外ラマン散乱断面積の大きな分子をラベル分子として、検出目的の分子に化学的に付加させることで、その目的分子を高感度で近赤外ラマン検出することが本研究の趣旨である。

【実験】 ラベル分子には、近赤外ラマン散乱強度が強く、またアミノ分子のラベル色素としても用いられているダブシルクロライドを用いた。一方、目的分子としては、フェニルアラニン、グルタミン酸、ウシ血清アルブミンなど、種々のアミノ酸、及びタンパク質を選定した。各々について、pH 9 の緩衝液中、65°Cで付加反応させ、目的分子をダブシル化した。



ダブシルクロライド

測定には、Ti:Sapphire レーザーからの CW 光(波長 785nm)を励起光とした、共焦点顕微ラマンシステムを用いた。サンプル位置でのレーザー光強度は約 15mW とした。また、励起光焦点に対する試料の位置をピエゾステージで制御することで、マッピングイメージを取得した。

【結果と考察】 ここでは、ウシ血清アルブミン(BSA)についての結果を示す。まず、ダブシルクロライド、BSA、およびダブシル化された BSA の固体の近赤外ラマンスペクトルを図 1 に示す。露光時間 6 分で、S/N のよいスペクトルを得た。ダブシル BSA のスペクトルからは、ダブシル部分のラマンバンド(1116, 1145 cm^{-1} , および 1400 cm^{-1} 付近など)が特に強く現れていることが分かる。また、それに加えて、BSA に特徴的な Phe-Trp (1003 cm^{-1})、アミド I (1654 cm^{-1})のバンドも

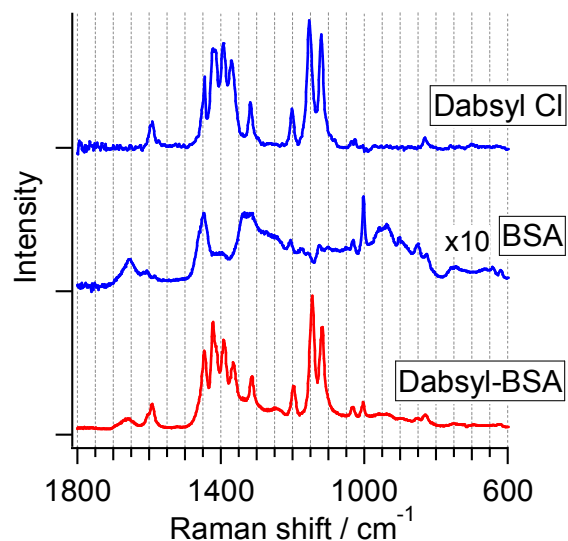


図 1. 近赤外ラマンスペクトル(6 分露光)

観測され、ダブシルと BSA を合わせたようなスペクトルであると言える。

ダブシル誘導体のスペクトルには、近赤外ラマン散乱強度の強いダブシル部分のバンドが非常に強く現れてくることから、これらのバンドを手がかりにすればより高感度、かつ短時間で目的となるタンパク質の存在分布を知ることができるかと期待できる。実際、露光時間 0.1 秒の測定では、ダブシル化によって十分良好なスペクトルが得られるようになった(図 2)。

そこで、BSA およびダブシル BSA の固体について、それぞれ最も強度の大きな 1003cm^{-1} 、 1145cm^{-1} のバンドを用いてマッピングした結果を図 3 に示す。こちらでも 1 点 0.1 秒という短時間でイメージングを行ったが、ダブシル化することによって初めて、非常に明瞭なコントラストでの存在分布確認ができるようになった。本方法を応用すれば、蛍光の妨害を回避し、かつ高感度で生体試料中のタンパク質の存在分布をラマンスペクトルを通して知ることができるようになるかと期待される。

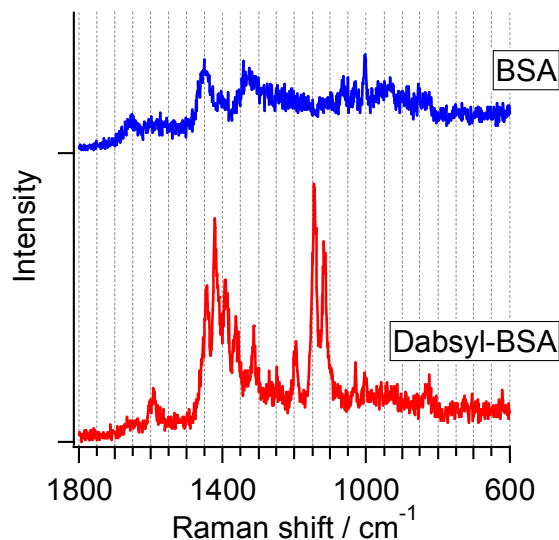


図 2. 近赤外ラマンスペクトル(0.1 秒露光)

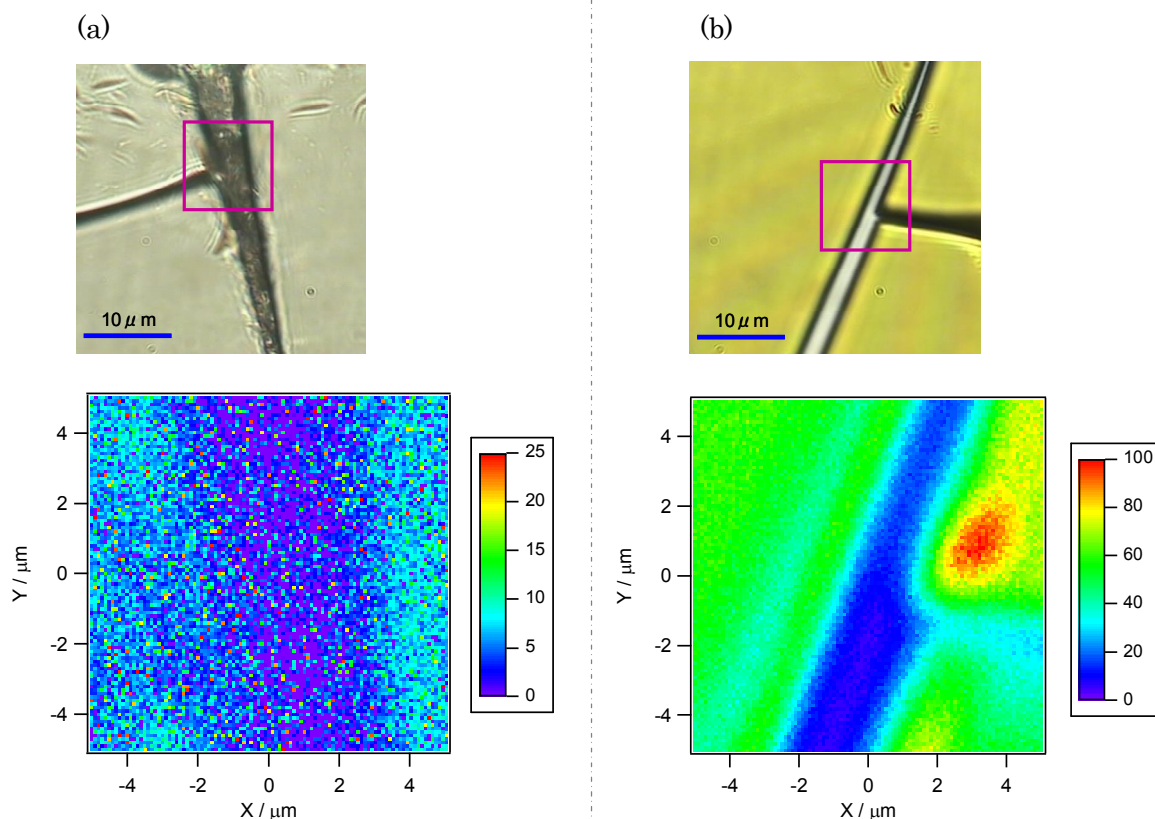


図 3. (a) BSA, (b) Dabsyl-BSA 固体の光学像(上: 赤枠内を測定)と近赤外ラマンイメージ(下).