

## Application Note

# タンパク質分析用 FT-IR システム CONFOCHECK による 軽水中のタンパク質の二次構造解析

## はじめに

生体を構成する成分は、いずれも生命にとって重要な機能を果たしており、その中でもタンパク質は多岐にわたる働きを有するため、生命活動の仕組みを知る上で、その基本的性質の研究が必要不可欠です。タンパク質の機能と構造には非常に深い関連性があり、タンパク質が多様な働きを発揮できるのは、それぞれに適した高次構造を取ることができるためと考えられています。タンパク質の凝集やフォールディング現象などは、アルツハイマー病、プリオン病などの疾病にも関係を持つとされています。

赤外分光法を用いることで、タンパク質の二次構造の解析が可能となります。タンパク質の二次構造を解析する代表的な手法として、紫外可視域における円二色性 (Circular Dichroism: CD) 分光法が一般的に用いられていますが、固体や懸濁液では測定ができない、分解能が低いなどの問題があります。これに対して赤外分光法では、試料の状態に影響されることなく、二次構造の定量的な解析や、折り畳み、凝集などのプロセスの追跡が可能です。

タンパク質の二次構造の違いは、赤外スペクトルにおいて、図 1 に示すように Amide I 吸収帯 (1700 ~ 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) に反映されます。しかしながら、この波数領域は、タンパク質にとって重要な存在である水 (軽水) による強い吸収と重なるため、とくに水溶液中のタンパク質については、その二次構造の僅かな変化を精度よく解析するためには、高い感度と広い測光ダイナミックレンジを併せ持つ赤外分光計が求められます。

ブルカー・オプティクス社の“CONFOCHECK”は、このような要求に対応する FT-IR システムであり、軽水溶液中のタンパク質の定性および定量、二次構造の定量的解析、さらには環境に依存した二次構造の変化に関する動的解析を可能にします。ここでは、CONFOCHECK による、タンパク質の二次構造の温度依存性に関する解析事例について紹介します。

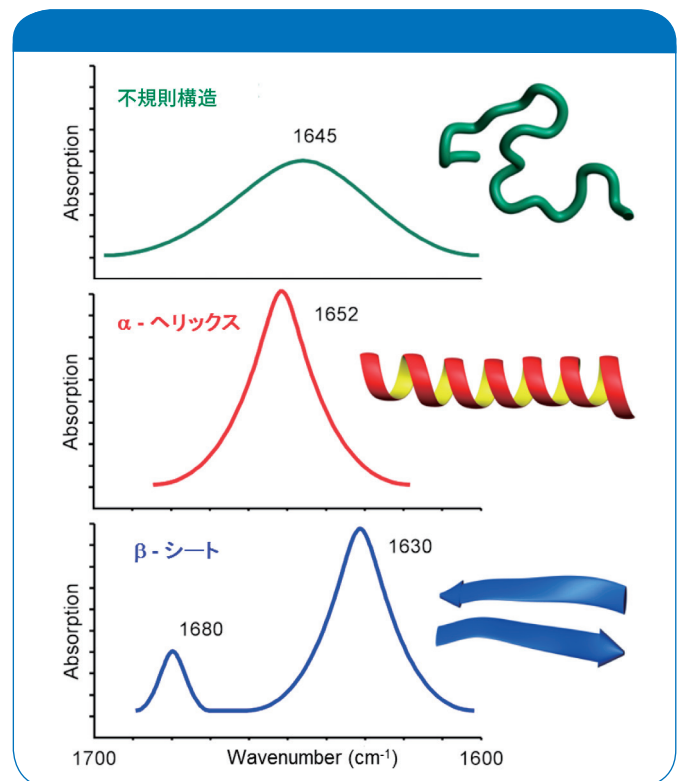


図 1. タンパク質の二次構造の違いを反映する Amide I 赤外吸収帯 (波数は各構造の平均的な値)

## 試料、分析システム

試料タンパク質としてリボヌクレアーゼ A (RNase A) を用い、その軽水溶液を 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調整しました。

測定には、タンパク質水溶液分析用 ATR アクセサリー“Bio-ATR II”を装着した CONFOCHECK を使用しました。この組み合わせは、水溶液中の微量タンパク質について、環境変動に伴う二次構造の変化の分析に適しており、溶液の量も 20  $\mu\text{l}$  程度と少量で測定が可能です。ここでは、試料溶液 20  $\mu\text{l}$  を 25  $^{\circ}\text{C}$  から 75  $^{\circ}\text{C}$  の間を昇降温し (2  $^{\circ}\text{C}$  間隔)、各温度での赤外スペクトルを連続的に測定することで、二次構造の変化とその可逆性に関する解析を行いました。

## 結果

図 2-a に、昇温過程における RNase A の赤外スペクトルの Amide I 吸収帯を示します (溶媒のスペクトルを差し引いたデータ)。まず、昇温開始直後の Amide I 吸収帯においては、ピークトップが  $1640\text{ cm}^{-1}$  以下と比較的低い波数にあることから、室温付近の軽水中における RNase A には、 $\beta$ シート構造が多く存在していることが分かります。続いて、昇温とともにこの構造が減少、 $70^\circ\text{C}$  以上ではほぼ崩壊し、これに代わって高波数側の吸収強度が増加していることが分かります。このことは、昇温により不規則構造、あるいはそれに近い構造の比率が増加していることを示唆しています。これらの挙動は、各温度で測定したスペクトルについて、初期状態 ( $25^\circ\text{C}$ ) におけるスペクトルとの差分を求めることで、より明確に捉えることができます (図 2-b)。

さらに、各構造に帰属されるピークの強度変化を追跡することで、二次構造の温度依存性をより正確に理解することが可能となります。そこで、試料温度に対して、 $\beta$ シート構造と不規則構造に由来するそれぞれのピークについて積分強度をプロットした結果を図 2-c ( $\beta$  sheet/ $1649\sim 1610\text{ cm}^{-1}$  および disordered structure/ $1700\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ ) に示します。この結果から、RNase A は、昇温から降温の過程において、可逆的に構造を変化させていることが確認できます。これに加え、各ピークの強度から定量的な評価へ展開することも可能になります。

## まとめ

この解析例が示すように、赤外分光タンパク質分析システム CONFOCHECK を用いることで、軽水溶液中における微量タンパク質の二次構造の変化を解析することが可能です。測定に必要な試料の量は  $20\ \mu\text{l}$  と微量であり、貴重な試料についても高い精度で解析を行うことができます。ここでは、温度依存性に関する解析例を紹介しましたが、CONFOCHECK は、pH やストレスなどの環境変化に伴う変性の追跡や、リガンドとの相互作用の解析などにも応用することが可能であり、CD 法等の他の手法と併用することで、タンパク質の高次構造に関するより詳細な知見が得られるものと期待できます。

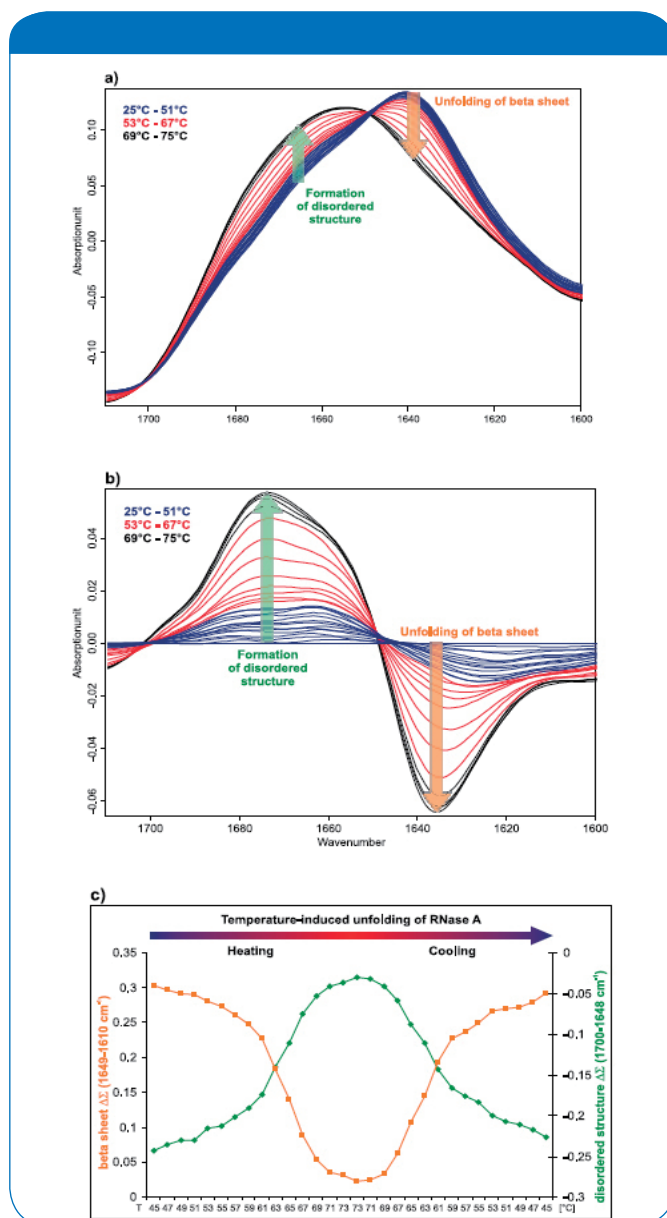


図2. 軽水中におけるRnase Aの赤外スペクトルの温度依存性  
a) 昇温過程における赤外スペクトル  
b) 昇温過程における赤外差スペクトル ( $25^\circ\text{C}$  との差分)  
c)  $\beta$  シートおよび不規則構造に由来するピークの強度変化

## 参考文献

Alexander Wittemann, Matthias Ballauff, *Analytical Chemistry*, 76(10), (2004)

Amanda S. Lee, Charles Galea et al, *J. Mol. Biol.* 327, 699 (2003)

