

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655012

研究課題名（和文） 紫外共鳴ラマン分光法を用いた生細胞中タンパク質の選択的観測法の開発

研究課題名（英文） Technical development of selective observation of proteins in living cells by using ultraviolet resonance Raman spectroscopy

研究代表者

水谷 泰久（MIZUTANI YASUHISA）

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：60270469

研究成果の概要（和文）：

タンパク質の構造に基づいて作用機構を理解するには、精製したタンパク質だけではなく、生きた細胞中にあるタンパク質を対象とした研究が必要である。本研究課題では、生きた細胞中にあるタンパク質のラマンスペクトルを、高感度かつ選択的に観測可能とする計測手法を開発した。この方法を用いて、生細胞中に含まれるタンパク質の紫外共鳴ラマンスペクトルを測定し、過剰発現したタンパク質の種類やその発現量依存性を調べた。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate functional mechanism based on molecular structure of proteins, it is important to study not only purified proteins but also proteins in living cells. In this project, we developed measurement techniques to selectively observe Raman spectra of proteins in living cells with high sensitivity. We investigated dependences of overexpressed proteins and extent of overexpression on ultraviolet resonance Raman spectra of living cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：共鳴ラマン分光法、in-vivo 測定、タンパク質構造

1. 研究開始当初の背景

従来、タンパク質の構造解析は精製した試料の結晶や水溶液を対象に、X線結晶解析法や核磁気共鳴、電子顕微鏡を使って行われてきた。これらの研究は、タンパク質の立体構造や構造-機能相関の理解に大きな貢献を果たしている。しかし、こういった試験管内 (in vitro) で解析されたタンパク質の構造や機能、性質は、タンパク質の多くが実際に働く細胞内とは異なる場合があることが指摘されてきた。細胞内の環境は、非常に多くの量と種類のタンパク質、核酸、脂質で過密な状態にあり、試験管内の環境とは著しく異

なっているためである。したがって、細胞内のタンパク質の構造や性質が試験管内のものとの程度異なるのかを検証する必要があり、そのためには生細胞内にあるタンパク質と試験管内のタンパク質とを共通の方法で構造解析できる手法の開発が求められている。

紫外共鳴ラマン分光法は、タンパク質内の芳香族アミノ酸残基や主鎖（ペプチド結合）の振動スペクトルを選択的かつ高感度に観測できる特徴をもつ。しかし、この手法を細胞内のタンパク質の構造解析に応用した例はない。申請者はこれまでに、世界に先駆

けて、チタンサファイアレーザーを基にしたピコ秒時間分解共鳴ラマン分光システムを製作し、タンパク質の構造ダイナミクスに関する研究を行ってきた（*Science*, 1997; *PNAS*, 2007）。この研究で培ったラマン分光計測技術と遺伝子工学技術を組み合わせることによって、生細胞中のタンパク質のスペクトル観測を可能にする新規測定法を確立できると考え、本研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

タンパク質の構造に基づいて作用機構を理解するには、精製したタンパク質だけではなく、生きた細胞中にあるタンパク質を対象とした研究が必要である。ラマンスペクトルはタンパク質分子の構造について豊富な情報を与えるので、生細胞中のタンパク質に対してスペクトル測定が可能になれば、その構造、タンパク質間相互作用、動態について詳細な情報を与えてくれるであろう。本研究課題では、生きた細胞中にあるタンパク質のラマンスペクトルを、高感度かつ選択的に観測可能とする計測手法を開発する。

本研究では、紫外共鳴ラマン分光法を用いて、生きた細胞内のタンパク質分子の振動スペクトルを高感度かつ選択的に観測することができる新規観測法を開発を行う。まず、粘性の高い培養細胞の溶液を安定に送流できるように、フローシステムの開発を行う。次に、迷光を減らすため、現有のフィルター分光器を高性能化し、さらに高い迷光除去能をもつものにする。このシステムと現有の高感度の紫外共鳴ラマン分光装置を用いて、タンパク質を大量発現した生細胞試料を測定する。種々のタンパク質について測定を行い、細胞内の環境と試験管内の環境とでは、構造や動態にどのような違いがあるのかを明らかにする。

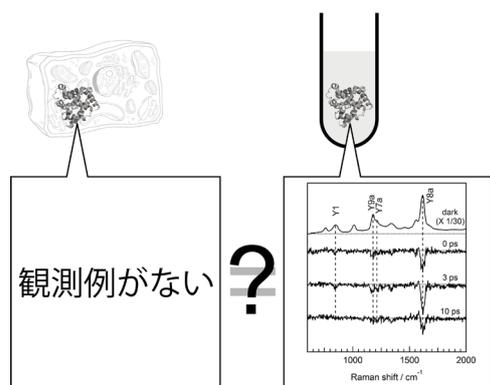


図1. 本研究の目的

3. 研究の方法

共鳴ラマン分光法は、共鳴ラマン効果（ラマン散乱を励起するレーザー光波長を分子の電子遷移に合わせることにより、散乱強度が 10^4 – 10^6 倍強くなる現象）を利用する振動分光法的一种である。この特徴を利用すると、タンパク質という巨大分子の中で、特定の部位のラマンスペクトルを選択的に観測することが可能になる。例えば、210–240 nm の範囲の励起波長を用いると、タンパク質に含まれる芳香族アミノ酸残基側鎖の振動モードが共鳴効果を受け、強く観測される。また、200 nm 付近の励起波長を用いると、ペプチド結合に由来する振動モード（アミドバンド）が選択的に観測され、ここからはタンパク質の二次構造に関する情報が得られる。

生細胞のラマンスペクトル測定は、これまでにいくつかの研究グループから報告があるが、いずれも非共鳴条件でのものである。非共鳴条件では、細胞中に多く含まれる脂質に由来するラマンバンドが強く観測され、タンパク質に由来するラマンバンドは脂質のバンドに埋もれてしまう。特に、タンパク質の二次構造を敏感に反映するアミドバンドは、もっとも強度の大きなアミド I バンドでも弱くしか観測されず、ここから二次構造の解析をすることは困難である。これに対して、紫外光を用いた共鳴ラマンスペクトルでは、タンパク質由来のラマンバンドを強く観測できると予想される。

4. 研究成果

(1) 高粘性の懸濁試料用のフローシステムの開発

ラマン散乱の励起に用いる紫外光はタンパク質試料に損傷を起こしやすい。そのため、測定試料は閉鎖循環系内をフローさせ、

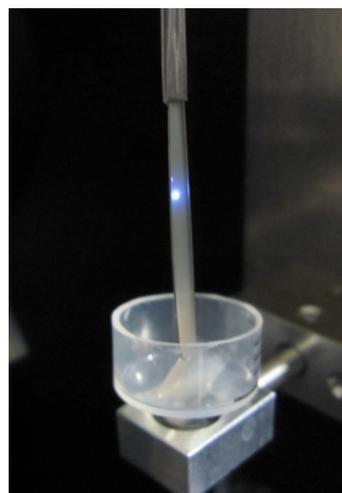


図2. 開発した高粘性の懸濁試料用のフローシステム

常にフレッシュな試料に紫外光が当たるようにする必要がある。本研究の測定試料には、培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、不活化したものをを用いた。この懸濁試料は粘性が高いため、安定な送流を行うにはフローシステムを新たに開発する必要があった。そこで、粘性の高い試料溶液であっても安定な液膜ができるよう、金属チューブの内径や断面の形状を最適化するとともに、脈流の小さなポンプ、低吸着性のチューブを用いて、長時間安定な送流が行えるようにした。

(2) 迷光低減のためのフィルター分光器の高性能化

高濃度の懸濁細胞溶液は紫外光の波長レベルで不均一性が存在する。このような試料ではレーリー散乱光が強く、低振動数領域のスペクトル測定が困難である。低振動数領域のスペクトルにはタンパク質の構造解析に重要なラマンバンドが多く観測されるため、その測定は必須である。そこで迷光をできるだけ抑え、かつ高感度の測定ができるよう、現有のフィルター分光器を改良した。また、主分光器内にも細かく仕切りを設けることで、低迷光で低振動数領域の測定が培養細胞に対して行えるようにした。

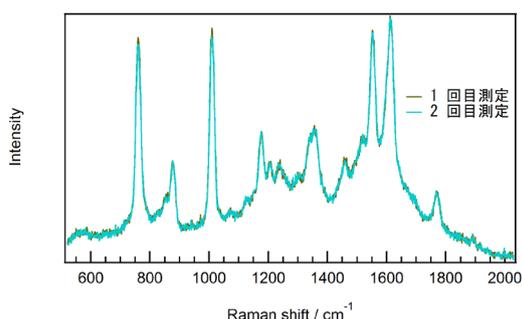


図3. 大腸菌試料の測定例。連続した2回の測定においてほぼ同一のスペクトルが得られていることがわかる。

(3) 高い生産効率をもつベクターを活用した培養細胞の調製

生細胞中のタンパク質の濃度を上げることができれば、そのスペクトルを観測しやすくなる。コールドショック遺伝子を利用したタンパク質発現システムを用いることによって、宿主細胞由来タンパク質の合成を抑制し、目的タンパク質のみを高効率で得ることを試みた。しかし、効率の大幅な向上はみられず、大腸菌におけるクローニングおよび組換えタンパク質発現用として広く用いられている pET ベクターの方が有利であると判断されたので、これを用いて生細胞の紫外共鳴ラマンスペクトル測定を行うことにした。

(4) 生細胞の紫外共鳴ラマンスペクトル測定：発現量依存性

プラスミドによって発現したタンパク質が紫外共鳴ラマンスペクトルに観測されているかどうかを調べるために、発現誘導後の大腸菌のスペクトルを観測した。発現誘導後、1時間おきに培養液から一部を取り出し、不活化した直後に紫外共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、ラマンバンドの相対強度に変化が観測された。これは、プラスミドによって大腸菌内で目的タンパク質が発現し、大腸菌自体の核 DNA によって発現したタンパク質との相対強度が変化したためだと考えられる。

このスペクトル変化について説明を加える。芳香族アミノ酸残基の紫外共鳴ラマンスペクトルは、タンパク質内における残基周辺の環境変化の指標となる。ラマンバンドの振動数については、トリプトファン残基では、 1550 cm^{-1} に現れる W3 バンドがインドール環周辺の構造歪みにより振動数がシフトする。チロシン残基では、 1620 cm^{-1} 付近に現れる Y8a および Y8b バンド、 1200 cm^{-1} 付近に現れる Y7a バンドの振動数が、ヒドロキシル基のプロトン供与能や水素結合強度に敏感である。また、 1180 cm^{-1} 付近に現れる Y9a バンドの振動数は、水素結合強度が増加する場合や、ヒドロキシル基の構造歪みに対して変化する。また、ラマンバンドの強度については、トリプトファン残基では、W3 バンド、および 1000 cm^{-1} 、 870 cm^{-1} 、 760 cm^{-1} にそれぞれ現れる W16、W17、W18 バンドが、チロシン残基では、Y8a、Y9a、および Y7a バンドが、側鎖周囲の環境変化に応じてその強度を変える。これは、水素結合強度や疎水性相互作用の変化によって励起プロファイルのシフトが起こるため、これらのバンド強度の変化を調べることによって、側鎖周囲の環境変化を知ることができる。

(5) 生細胞の紫外共鳴ラマンスペクトル測定：発現タンパク質依存性

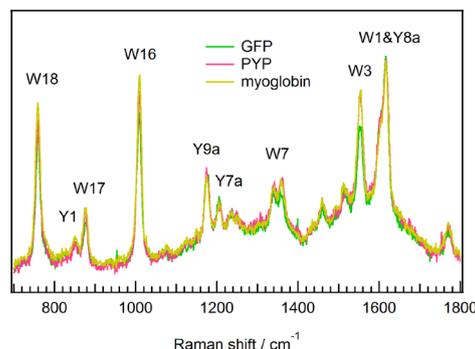


図4. 大腸菌発現タンパク質依存性。ミオグロビン (黄)、イエロープロテイン (赤)、緑色蛍光タンパク質 (緑) それぞれを過剰発現させた大腸菌を測定したもの。

プラスミドに導入する外来遺伝子を変え、大腸菌中で過剰発現するタンパク質を変化させた。具体的には、ミオグロビン、イェロープロテイン、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の3種類を試した。これらが発現した大腸菌の不活化した直後の紫外共鳴ラマンスペクトルを比較したところ、ラマンバンドの相対強度に違いが観測された (図4)。これは、大腸菌試料の紫外共鳴ラマンスペクトルに外来遺伝子由来のタンパク質の寄与が含まれていることを示している。

(6) 赤血球の時間分解共鳴ラマンスペクトル測定

赤血球内には 150 g/L のヘモグロビンが含まれており、これはモル濃度にして約 2 mM に相当する。この濃度は通常精製標品を用いた実験に比べ 10 倍以上高い。したがって、ヘモグロビンの置かれている環境は緩衝液中と赤血球中とは異なると考えられる。これまでヘモグロビンの四次構造変化ダイナミクスの研究は緩衝液中で行われたものばかりであり、赤血球中で行われたものは皆無である。そこで、赤血球のまま、ヘモグロビンのリガンド脱離に伴う構造ダイナミクスを、時間分解共鳴ラマン分光法を用いて観測した。

図5に、赤血球中のヘモグロビンと精製標品の時間分解共鳴ラマンスペクトル (ともに遅延時間は1マイクロ秒) を示す。赤血球そのままであっても、長時間のパルス光照射による影響はほとんどなく良質のスペクトルが得られた。1 マイクロ秒においては、赤血球中のヘモグロビンと精製標品のスペクトルには大きな違いはなかった。今後、より多くの遅延時間において比較を行うことによって、赤血球中のヘモグロビンについてそのダイナミクスを明らかにできると考えられる。

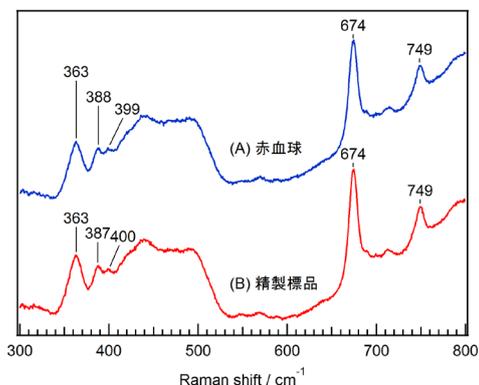


図5. 赤血球の時間分解共鳴ラマンスペクトル測定。遅延時間はいずれも 1 マイクロ秒である。低波数領域から良質な共鳴ラマンスペクトルが得られた。

以上の確認実験から、生細胞中に含まれるタンパク質の紫外共鳴ラマンスペクトル測定法の基礎をつくることができた。

生細胞中のタンパク質と精製標品とで、立体構造および構造ダイナミクスがどのように異なるかについて詳細な比較を行うところまでは進めることができなかった。今後はこの点について研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

①「時間分解共鳴ラマン分光法でタンパク質に起きていることを観る」、水谷泰久、日本化学会第93春季年会、立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、平成25年3月22日~25日。

②「時間分解振動分光法を用いたヘムタンパク質の構造ダイナミクス研究」、水谷泰久、第25回生物無機化学夏季セミナー、せせらぎ街道の宿「たかお」、平成24年8月24日~26日。

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/mizutani/index-jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 泰久 (MIZUTANI YASUHIKA)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60270469

(2) 研究協力者

石川 春人 (ISHIKAWA HARUTO)

大阪大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：40551338

水野 操 (MIZUNO MISAO)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10464257