

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685007

研究課題名(和文)糖鎖等の超高感度構造解析を目指した真空紫外域での顕微円二色性計測装置の開発

研究課題名(英文)Development of vacuum ultraviolet circular dichroism measurement system with reduction optics for conformational analysis of biomolecules

研究代表者

田中 真人(Tanaka, Masahito)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・主任研究員

研究者番号：30386643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円、(間接経費) 6,060,000円

研究成果の概要(和文)：円二色性分光装置と顕微装置とを組み合わせることで、糖・糖鎖やタンパク質などの重要な生体分子の真空紫外線領域における円二色性スペクトルの測定が可能な計測システムの開発を行った。シュバルツシルトミラーを用いて検出光サイズを40×80マイクロメートルにまで縮小化して真空紫外領域での円二色性スペクトル計測が可能であることを確認した。またタンパク質や糖・多糖試料の真空紫外領域での円二色性スペクトル計測を行い、糖の結合数によるスペクトル変化を系統的に観測することなどに成功した。

研究成果の概要(英文)：Circular dichroism spectrum measurement in the vacuum ultraviolet region has been widely applied to analyze the molecular conformation of chiral molecules. In this work, I have developed the circular dichroism measurement system in the vacuum ultraviolet region equipped with the reduction optics for conformational analysis of biomolecules such as protein and sugars. By using Schwarzschild mirror system as a reduction optic, the spot size of detection light was reduced to be about 0.04x0.08 mm at the focal point. The distortion of CD spectra was confirmed to be negligible. This system enables us to measure the CD spectra in the wavelength region from 140 to 350 nm. We succeeded in observing the circular dichroism spectra of some proteins and sugars in the vacuum ultraviolet region with the developing system.

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：糖・糖鎖 タンパク質 分子構造解析 真空紫外線 物性実験 キラリティ 化学物理 バイオ関連機器

1. 研究開始当初の背景

円二色性(Circular Dichroism:以下、CD と略)はキラリティを持つ物質の分子構造、高次構造に敏感に応答することが知られている。紫外域ではタンパク質の二次構造決定や薬剤等有機分子のキラリティ決定などに広く利用され、装置も広く市販されている。近年放射光を光源に用いることで真空紫外(Vacuum Ultraviolet:以下、VUV と略)領域での CD(以下、VUV-CD と略)を計測する装置が世界各地に建設されている。研究代表者は偏光アンジュレータを偏光光源として用いる VUV-CD 装置を開発し、世界初の波長 40nm までの CD スペクトル計測に成功してきた。

VUV 領域にまで CD スペクトルの計測領域を拡張することによって、紫外領域の CD スペクトルを用いたものよりも高精度なタンパク質二次構造解析や、可視紫外域には CD を発現しない糖・糖鎖などの立体構造に関する知見を得ることが期待される。例えば、タンパク質の二次構造解析に関しては、VUV 領域にまで拡張することで ヘリックスや シートの含有率だけでなくその本数も予測できることが知られている。

タンパク質同様に重要な生体分子である糖・糖鎖などはその CD が主に VUV 領域にしか発現しないため、VUV-CD 計測が不可欠である。例えば糖分子は 体、体といったアノマーと呼ばれる異性体を持つ。アノマー間の分子構造の差異は一部の OH 基の位置のみであるため、光吸収スペクトルは殆ど変化しないが、VUV-CD スペクトルはこの僅かな構造の変化に敏感に応答する。

次段階である糖鎖試料の VUV-CD 計測における問題点として、糖鎖試料の多くは微量 (ng, pmol オーダー)しか入手が困難である点が挙げられる。現状の CD システムは世界中の他の装置を含めて、これほど微量の計測には対応していない。そこで検出光のスポット径をマイクロメートルオーダーにまで縮小する顕微光学システムを VUV-CD 計測システムに導入した超高感度な顕微 VUV-CD システムを開発することで、希少試料の VUV-CD 計測とそれによる構造解析が可能になる。

2. 研究の目的

上記の背景を基にして、本研究では糖やタンパク質などの重要な生体分子の VUV-CD スペクトル計測とそれによる分子構造解析に資する、汎用のランプ光源を用いた VUV-CD 分光装置と顕微装置とを組み合わせた画期的な計測システムの開発と評価を目的とした。

光源としてランプ光源を用いることで、放射光施設利用時間にとらわれない使いやすいシステムが構築できる。縮小光学系として、シュバルツシルトミラー等を用いることで、通常数ミリメートル程度の検出光スポットをランプ光源でも数十マイクロメートル程度にまで縮小化でき、試料位置を二次元走

査することで、試料位置と検出光位置とを合致させることできる。

本課題の進展から、将来的には VUV-CD 計測による分子構造解析とそれを基にした薬剤開発などの分野での貢献を目指している。

3. 研究の方法

構築した VUV-CD 分光装置と顕微装置とを組み合わせた計測システムの写真と光学系の概要図を下の図 1 に示す。

本システムは主にランプ光源、前置鏡、分光器、後置鏡、直線偏光子 (MgF₂ ローションプリズム)、光弾性変調子 (CaF₂ 製)、シュバルツシルトミラー、XYZ 軸ピエゾステージ付試料セル、および検出器から成っている。

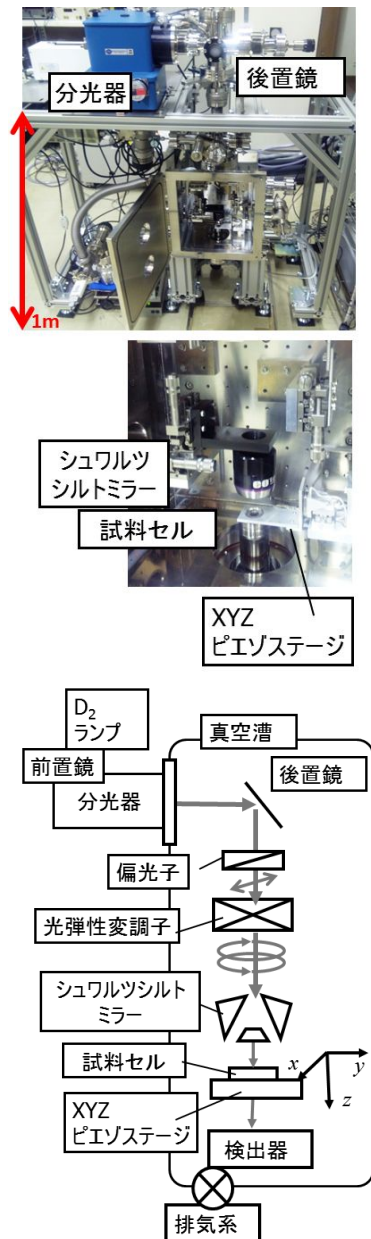


図 1 構築した縮小光学系を導入した VUV-CD 装置の写真 (上) と光学系の概要図 (下)

本システムでは、分光器からの真空紫外光の方向を二枚の反射鏡で水平方向から鉛直下方向に変えることで、試料の水平配置を可能にした。その光を直線偏光子と光弾性変調子を用いて、円偏光状態にした。この時左右円偏光状態は約 50kHz で切り替わるが、それと同じ周波数の信号成分だけをロックインアンプで検出することで微小な CD 信号を計測するシステムを構築した。また本システム全体は真空雰囲気下での計測に対応している。

また VUV 領域での計測に対応した溶液試料セルと真空雰囲気に対応した温度調節機構 (0~80、精度±0.1) の開発に成功した。これにより真空中に溶液試料を 24 時間以上保持でき、アミロイドタンパク質などの常温で構造変化が起きる試料の安定した計測などを可能にした。

4. 研究成果

上記のシステムにシュバルツシルトミラー (NA=0.28、15×) を組み込み、光学調整を行った結果、検出光のスポットサイズを通常の 7×7 ミリメートルから、40×80 マイクロメートルにまで縮小化することに成功した (図 2 参照)。

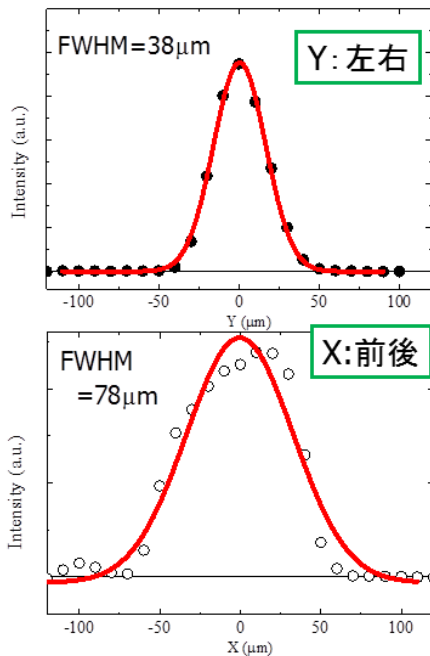


図 2 シュバルツシルトミラーを入れた際の左右方向(図 1、Y 軸方向に対応) (上) 前後方向(図 1、X 軸方向に対応) (下) の光強度プロファイル

さらにこの縮小化光を用いてアミノ酸の一種である L-チロシン薄膜の VUV-CD スペクトルを計測したところ、シュバルツシルトミラーの有無でスペクトルの変化は殆ど観察されなかった (図 3 参照)。チロシン薄膜は CaF₂ 基板上に真空蒸着法を用いて、50 ナノメ

ートル程度製膜したものをを用いた。これにより縮小光学系を用いても正確な円二色性スペクトルが計測できることを明らかにした。現状の計測波長領域は約 140~350 ナノメートル程度であり、タンパク質などの生体分子試料の構造解析に十分な波長領域をカバーできている。

また本システムの更なる高度化として、円偏光を発生させる光弾性変調子の光学配置などを変えて計測することで、ベースライン強度を大幅に減少させる手法を考案・開発した。これにより試料のないブランクスペクトル計測が不要になるなど、本システムの更なる高度化に成功した。加えて本システムの偏光度を計測するシステムの構築にも成功した。

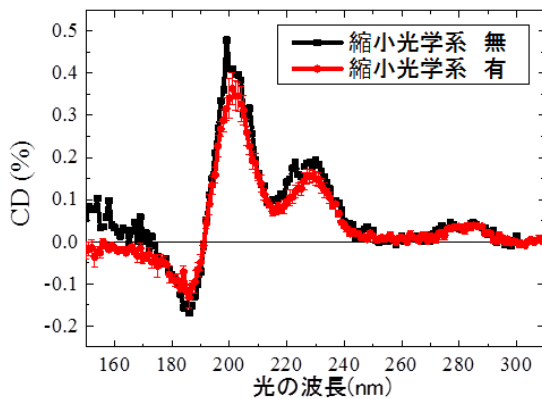


図 3 シュバルツシルトミラーを入れた際の VUV-CD スペクトル変化。試料: L-チロシン薄膜、(シュバルツシルトミラー無: 黒線、シュバルツシルトミラー有: 赤線)

開発した VUV-CD 計測装置と溶液セルを用いて、アミロイドタンパク質の部分ペプチドや単糖水溶液試料の VUV-CD スペクトル計測を行った。

アミロイドタンパク質である α_2 ミクログロブリンの部分ペプチド重水溶液 (濃度 6.7mM、セル長 20 マイクロメートル) の VUV-CD スペクトルをミラー無し条件、温度 4 で計測した。CDPro ソフトウェアを用いてそのスペクトル結果から二次構造解析をした結果、シートの含有量は約 60%、本数は 2 本と予測した。これは一次構造からの予測とほぼ合致している。

さらに、糖・多糖の重水溶液試料 (濃度 0.2~0.5M、セル長 20 マイクロメートル) の VUV-CD および吸収スペクトルの計測を上記同様に行った (室温条件)。試料として、単糖である D-グルコース、二糖である D-トレハロース、三糖であるマルトトリオースを選択した。これらはグルコースがグルコシド結合して形成されたものである。

その結果を図 4 に示す。吸収スペクトルの強度 (吸収係数) は糖の長さで変化するが、形状は上記の試料間でほとんど変化しない。

これに対し、CD スペクトルの構造・強度にはいくつかの相違点を確認された。正方向の CD ピークを持つことは共通しているが、三糖であるマルトトリオースには波長 185 ナノメートル付近に CD が見られないなどの違いが見られている。

現在この違いの原因を分子軌道計算などにより解析している。このように糖の結合数の変化による VUV-CD スペクトルの変化を系統的に観測した。

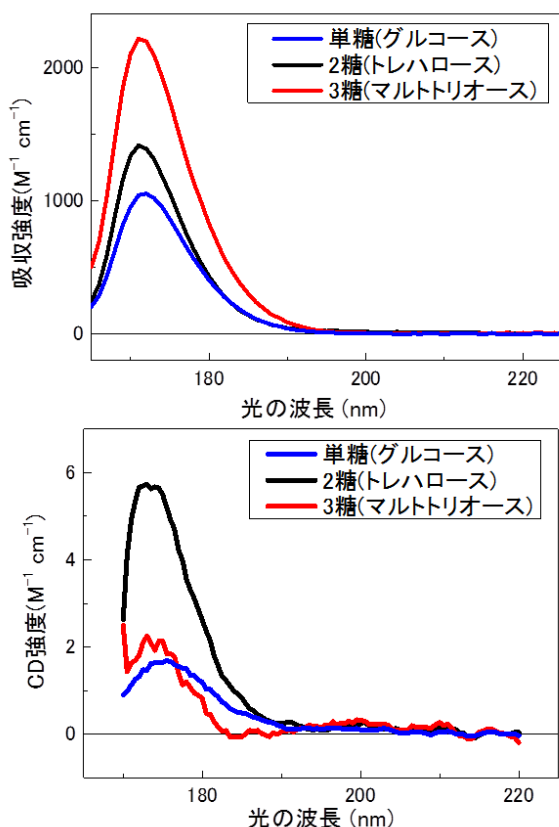


図 4 D-グルコース（青線）、D-トレハロース（黒線）、マルトトリオース（赤線）重水溶液の光吸収(上)、CD スペクトル（下）

今後は更に多くの試料を計測することで、分子構造と VUV-CD スペクトルとを対応づけたデータベースの構築や、本システムの更なる高度化（微量試料に対応した試料セルの開発、試料位置自動調整機構、装置の高感度化など）を進めていき、多くのバイオ科学者が利用可能なユーザーフレンドリーな装置・分子構造解析手法として確立させていきたい。

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）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

田中 真人、アンジュレータ放射光による真空紫外～軟 X 線領域における自然二色

性研究、放射線化学、査読有、92 巻、2011、29-32

<http://www.radiation-chemistry.org/kashi/no92.html>

〔学会発表〕(計 16 件)

田中 真人、郡司 康弘、中川 和道、Development of circular dichroism system in the vacuum ultraviolet region and conformational analysis of biomolecules、Trombay Symposium on Radiation & Photochemistry、2014/01/06、BARC Training School Hostel (ムンバイ、インド)

田中 真人、小川 博嗣、キラル分子の構造解析及び磁石の磁気特性分析の為に偏光分光手法、平成 25 年度産総研本格研究ワークショップ in 中部、2013/12/10、メルパルク NAGOYA(愛知県)

田中 真人、郡司 康弘、中川 和道、Correlation between experimental and theoretical electric circular dichroism spectra of biomolecules in the vacuum ultraviolet region (招待講演)、5th JCS International Symposium on Theoretical Chemistry、2013/12/03、東大寺総合文化センター(奈良県)

田中 真人、郡司 康弘、中川 和道、卓上型真空紫外円二色性計測装置の開発と生体分子構造解析、第 56 回放射線化学討論会、2013/09/28、広島大学(広島県)

田中 真人、朝日 透、中川 和道、実験・理論的円二色性分光法によるプロリン・ヒドロキシプロリン溶液の構造異性体解析、第 7 回分子科学討論会 2013、2013/09/27、京都テルサ(京都府)

田中 真人、小川 博嗣、円二色性計測によるタンパク質構造解析および磁性体分析手法の開発、計測フロンティア研究部門第 10 回シンポジウム、2013/09/06、幕張メッセ(千葉県)

田中 真人、中川 和道、真空紫外域における卓上型マイクロビーム円二色性計測装置開発の現状、Symposium on Molecular Chirality 2013、2013/05/10、京都大学(京都府)

田中 真人、中川 和道、真空紫外域における顕微円二色性計測装置開発の現状、第 5 回アストロバイオロジー・ワークショップ、2012/11/24、国立天文台(東京都)

田中 真人、韓 立彪、朝日 透、キラルリン化合物の実験・理論的円二色性分光研究、第 6 回分子科学討論会 2012 東京、2012/09/20、東京大学(東京都)

田中 真人、真空紫外～軟 X 線領域の円偏光を用いた生体分子・磁性体の分析、計測フロンティア研究部門第 9 回シンポジウム、2012/09/06、幕張メッセ(千葉県)

田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、Experimental and theoretical study of

vacuum ultraviolet circular dichroism study of amino acid films for molecular structure analysis、Symposium Molecular Chirality ASIA 2012、2012/05/18、九州大学(福岡県)

田中 真人、真空紫外円二色性測定によるタンパク質等キラル分子の立体構造解析、平成 23 年度産総研産技連 LS-BT 合同研究発表会、2012/1/31、産業技術総合研究所(茨城県)

田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、産総研 TERAS における偏光アンジュレータを用いた真空紫外円二色性計測ビームラインの総括と今後の展開、第 25 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2012/1/9、鳥栖市民文化会館・中央公民館(佐賀県)

田中 真人、渡辺 一寿、中川 和道、アミノ酸薄膜の真空紫外円二色性分光研究、第 5 回分子科学討論会、2011/9/21、札幌コンベンションセンター(北海道)

田中 真人、他 7 名、Experimental and theoretical study of circular dichroism of amino acid thin films in the vacuum-ultraviolet region、The 23rd International Symposium on Chiral Discrimination (Chirality 2011)、2011/7/11、リバプール大学(イギリス)

田中 真人、他 3 名、プロリン・ヒドロキシプロリンの円二色性分光による分子構造解析、シンポジウム・モレキュラー・キラリティー 2011、2011/5/20、東京工業大学(東京都)

[その他]

ホームページ

Masahito Tanaka の研究紹介

<http://staff.aist.go.jp/masahito-tanaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 真人 (TANAKA, Masahito)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測フロンティア研究部門・主任研究員

研究者番号：30386643