

Application News

No. A592

光吸収分析

FTIR によるタンパク質の分析 - 卵白の熱変性による二次構造変化の解析 -

アプリケーションニュース No.A585 では、波形分離を使用したウシ血清アルブミンの二次構造解析についてご紹介しました。今回は、加熱可能な 3 回反射 ATR 測定装置を用い、タンパク質の豊富な鶏卵の卵白を 40℃から 100℃まで昇温しながら測定し、タンパク質の熱変性に伴う二次構造の変化を二次微分スペクトルと波形分離を用いて考察した例をご紹介します。

S. Iwasaki, R. Fuji

■ 試料の調製

鶏卵の卵白と卵黄を分け、卵白のみ分析しました。卵白タンパク質の主成分は Ovalbumin で、その他、Ovotransferrin や Ovomuroid など種々のタンパク質から成りますが¹⁾、ここでは卵白成分を分離することなくそのまま測定しました。

■ 卵白の測定

測定は、ATR 測定装置 MicromATR™ (マイクロメーター) に加熱型 3 回反射 ATR プリズム (ダイヤモンド/ZnSe) を設置して行いました。卵白は加熱すると固体へ変化するため、固体試料も測定できる 3 回反射 ATR プリズムを使用しました。また、アミド I のピークは水蒸気のピークと重なるため、乾燥空気を使用して光学系をパージしました。

測定条件を表 1 に示します。温度コントローラを使用して、プリズムの温度を 40℃から 100℃まで 10℃ずつ上昇させ、各温度において卵白に十分に熱が伝わるよう、昇温後に卵白を滴下し 2 分間保持してから測定を行いました。なお、卵白には水分が含まれ、解析時に卵白のスペクトルから水のスペクトルを減算する必要があります。水の水素結合は温度に依存するため、水のスペクトルも各温度で取得しました。

図 1 に各温度における卵白と水の差スペクトルを示します (アミド I バンドを構成する 1700~1600 cm⁻¹ 付近を拡大して表示)。卵白は 60℃に加熱すると変性し始めることが報告されています²⁾。図 1 を見ると、60℃のスペクトルから変化が現れ始め、1625 cm⁻¹ と 1675 cm⁻¹ 付近のピークが顕著に増加し、熱変性と相関が確認できます。

表 1 測定条件

装置	: IRTracer™-100、 MicromATR (加熱型 3 回反射 ATR プリズム)
分解	: 4 cm ⁻¹
積算回数	: 100
アポダイズ関数	: Sqr-Triangle
ゼロフィリング	: 4 倍
検出器	: DLATGS

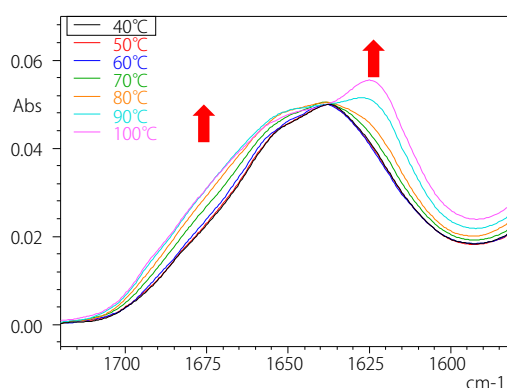


図 1 卵白のアミド I バンドの赤外スペクトル (差スペクトル処理後)

■ 二次微分スペクトルによる解析

二次微分スペクトルを求めると、吸収スペクトルの形状のわずかな変化を明瞭に示すことができ、タンパク質の二次構造 (α ヘリックス、 β シート、 β ターン、ランダムコイル) の変化を調べる際に有効です。

図 1 から求めた卵白の二次微分スペクトルを図 2 に示します。加熱されてタンパク質が熱変性すると、1693 cm⁻¹ と 1622 cm⁻¹ 付近の β シートは増加しますが、1637 cm⁻¹ 付近の β シートおよび 1655 cm⁻¹ 付近の α ヘリックスは減少していることがわかります。また、熱変性によりピークシフトも見られており、水素結合の状態が変化していることが推察されます。

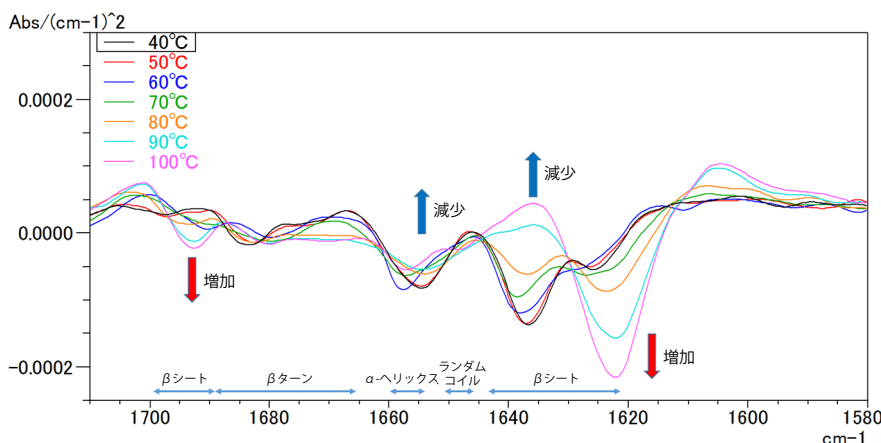


図 2 卵白の二次微分スペクトル

■ アミド I バンドの波形分離

次に、アミド I バンドを波形分離し、熱変性による二次構造の比率の変化を調べました。波形分離を行う場合、あらかじめフィッティングさせる吸収バンドの波形、本数などの設定が必要です。本数の決定については、二次あるいは四次微分スペクトルを参考にします。

温度 40 °C と 100 °C の赤外スペクトルについて、波形分離を行いました。波形分離の条件を表 2 に示します。波形分離前の赤外スペクトルと波形分離により求められた個々のピーク、その合成スペクトルを図 3、4 に示します。波形分離が適切に行えていることを確認するには、波形分離前のスペクトルと分離ピークの合成スペクトルとの一致度合を確認することが有効です。ここでは、図 3、4 の黒線と赤線（元のスペクトルと合成スペクトル）がよく一致しているため、波形分離の結果が良好であると判断しました。

表 2 波形分離条件

ピーク曲線の種類	: ガウス関数
ベースライン	: Offset 1 Pt
範囲	: 1710~1580 cm ⁻¹
最大誤差	: 0.01 %

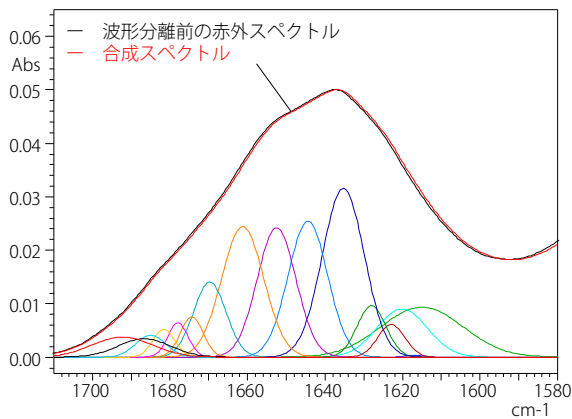


図 3 波形分離により求められた個々のピークと合成スペクトル (40 °C)

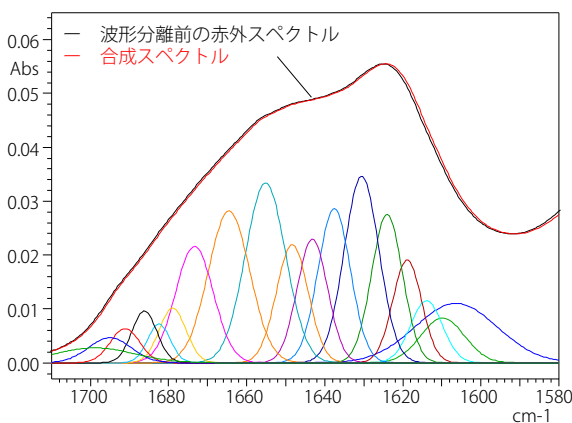


図 4 波形分離により求められた個々のピークと合成スペクトル (100 °C)

■ 波形分離により求められた個々のピークの解析

波形分離により求められた個々のピークに対して、ピーク検出機能を使用して、ピーク波数と面積値を求めました。文献³⁾を参考に、各波形に対して二次構造を割り当て二次構造の比率を求めた結果を表 3 に示します。40 °C と 100 °C を比較すると、βシートとβターンが温度上昇と共に増加することがわかりました。βシート由来の各ピークを確認すると、1693 cm⁻¹ 付近、1622 cm⁻¹ 付近は増加し、1637 cm⁻¹ 付近は減少しました。図 2 に示す二次微分スペクトルの傾向と同様の結果となりました。また、αヘリックスが減少していることも二次微分スペクトルの傾向と一致しています。

表 3 タンパク質二次構造の温度変化

	αヘリックス	βシート	βターン	ランダムコイル
40 °C	30.3 %	37.9 %	16.4 %	15.4 %
100 °C	15.1 %	47.6 %	29.7 %	7.7 %

■ まとめ

鶏卵の卵白の分析を行い、アミド I バンドの波形分離により、タンパク質の二次構造を解析しました。40 °C から 100 °C まで加熱したところ、60 °C でタンパク質が変性しはじめ、αヘリックスは減少、βシートは増加することがわかりました。熱変性により、二次以上の高次構造は崩れやすく、αヘリックスの一部がほどけることが報告されていますが⁴⁾、ここに示す波形分離の結果と一致します。FTIR 分析により、タンパク質の熱変性による二次構造の変化を簡単に測定し、考察することができました。

参考文献:

- 1) JENNIFER KOVACS-NOLAN. Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 8421-8431
- 2) Yoshinori Mine, Tatsushi Noutomi, and Noriyuki Haga Thermally induced changes in egg white proteins. J. Agric. Food Chem., 1990, 38 (12), pp 2122-2125
- 3) Jilie KONG, Shaoning YU. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. Acta Biochim Biophys Sin 2007, 39(8): 549-559
- 4) A. Kato and T. Takagi, Formation of intermolecular .beta.-sheet structure during heat denaturation of ovalbumin. J. Agric. Food Chem. 1988, 36, 1156-1159

IRTracer は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
MicromATR は、Czitek, LLC.の商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年2月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。