

Application News

No. A585

光吸収分析

FTIR によるタンパク質の分析

- 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 -

タンパク質はペプチド結合のC=O基とN-H基がポリペプチド鎖内あるいは鎖間で水素結合し、 α ヘリックス、 β シート、 β ターン、ランダムコイルなどの二次構造と呼ばれる局所的な立体構造を形成します。二次構造に関係する赤外吸収は、複数の吸収が重なり合った状態で1650 cm⁻¹付近にブロードな1つのピークとして現れます。このピークは“アミドIバンド”と呼ばれ、ペプチド結合のC=O基の伸縮振動に由来するもので、アミドIバンドを解析することでタンパク質の二次構造に関する情報を得ることができます。

重なり合っている吸収バンドから、それぞれの吸収バンドのピーク情報を求める方法として波形分離（カーブフィッティング）があります。波形分離は、各吸収バンドの波形をローレンツ曲線やガウス曲線などの近似曲線で表した計算スペクトルと実測スペクトルとの差が最小になるように、各吸収バンドの近似曲線のピーク情報（位置、強度、半値幅）を最適化する方法です¹⁾。

ここでは、波形分離を使用して、ウシ血清アルブミンの二次構造解析を行った分析事例をご紹介します。

S. Iwasaki, R. Fuji

試料の調製

市販のウシ血清アルブミンを用い、水（H₂O）を用いて2 mMに調製しました。アミドIバンドは、H₂Oの吸収と重なるため、重水素（D₂O）を用いることも多くありますが、D₂OとH₂Oではタンパク質の形態や水素結合に差があり、H₂Oの方が自然に近い状態と考えられます²⁾。

ウシ血清アルブミンの測定

測定は、図1に示すATR測定装置MicromATR™（マイクロメーター）に9回反射ATRプリズムを設置して行いました。ATR法は試料をプリズムに密着させるだけでスペクトルを得ることができ、透過法に比べて測定後の洗浄も簡単です。また、9回反射ATRプリズムを用いることで、よく利用される1回反射よりも感度良く測定できます。9回反射ATRプリズムの利用は液体に限りますが、サンプル量も30 μ l以下と少量で分析できます。測定条件を表1に、ウシ血清アルブミンとH₂O、ウシ血清アルブミンの赤外スペクトルからH₂Oの吸収を差し引いた差スペクトル（縦軸強度を拡大して表示）を図2に示します。ゼロフィリングを4倍に設定してスペクトル測定を実施しました。これは、アミドIの狭い波数範囲に着目するため、フーリエ変換の計算点を多くし、滑らかなスペクトルを取得するためです。また、アミドIピーク内のH₂Oを除去するため、差スペクトルを求める際には、1900~1700 cm⁻¹の間が平坦になるように差し引きました（図2青色矢印）。なお、アミドIのピークは水蒸気のピークと重なるため、乾燥空気により光学系のパージを行いました。



図1 ATR測定装置MicromATR

表1 測定条件

装置	: IRTracer-100、 MicromATR (9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

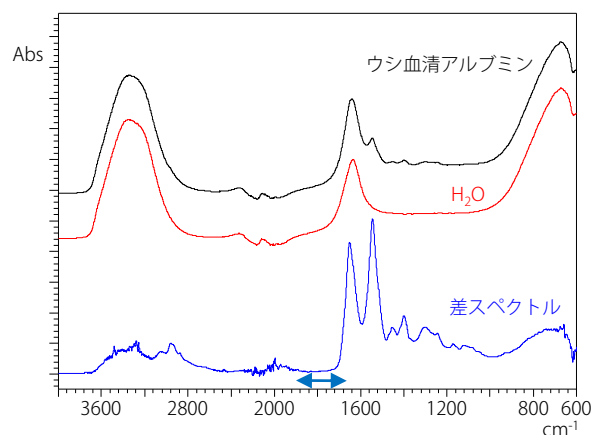


図2 ウシ血清アルブミンとH₂Oの赤外スペクトル、差スペクトル

■ 二次微分スペクトル

波形分離するには、あらかじめ吸収バンドの波形、本数などの初期値を設定する必要がありますが、本数の決定に際しては二次微分スペクトルを参考にします。ここでは、図3に示す二次微分スペクトルの1700~1480 cm⁻¹の範囲で負のピークの波数を読み取り、本数を決定しました。

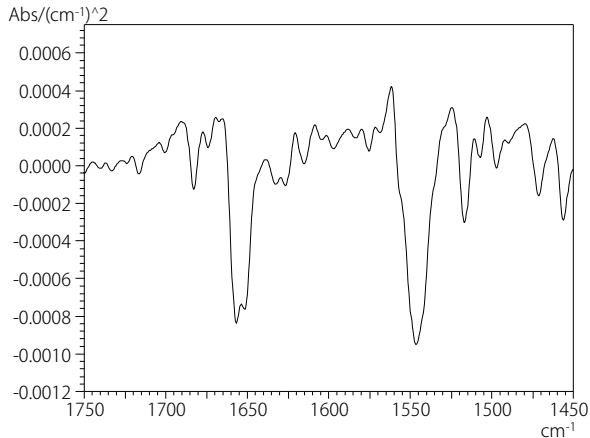


図3 ウシ血清アルブミンの二次微分スペクトル

■ 波形分離

二次微分スペクトルの情報を元に、図2で求めた差スペクトルの1760~1480 cm⁻¹の範囲で波形分離処理を行いました。

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4に示します。良好な波形分離ができれば、測定したスペクトルと波形分離の合成スペクトルがよく一致します。

表2 波形分離条件

ピーク曲線の種類	: ローレンツ関数
ベースライン	: Offset 1Pt
範囲	: 1760~1480 cm ⁻¹
最大誤差	: 0.01 %

■ タンパク質の二次構造解析

アミドIバンドを構成する1700~1600 cm⁻¹付近の波形に対してピーク検出を行い、ピーク波数と補正面積を求めました。表3に結果を示します。文献²⁾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ました。以上より、 α ヘリックス、 β シート、 β ターン、ランダムコイルの割合は、それぞれ、23.31%、37.14%、27.56%、12.00%となりました。

表3 波形分離のピーク解析

ピーク波数	二次構造	補正面積	面積比
1685.78	β ターン	0.221	2.50 %
1679.52	β ターン	0.335	3.80 %
1673.25	β ターン	0.48	5.44 %
1667.47	β ターン	0.617	6.99 %
1662.17	β ターン	0.779	8.83 %
1656.87	α ヘリックス	0.988	11.19 %
1652.05	α ヘリックス	1.069	12.11 %
1646.75	ランダムコイル	1.059	12.00 %
1640.96	β シート	1.078	12.21 %
1634.70	β シート	1.108	12.55 %
1626.99	β シート	1.092	12.37 %

■ まとめ

ウシ血清アルブミンの分析を行い、アミドIバンドの波形分離により、水溶液中のタンパク質の二次構造を解析することができました。FTIRにより、少量の試料で簡単に解析を行うことができます。

参考文献:

- 1) 田隅三生編著「赤外分光測定法 基礎と最新手法」株式会社エス・ティ・ジャパン
- 2) Jilie KONG, Shaoning YU. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. Acta Biochim Biophys Sin 2007, 39(8): 549-559

IRTracerは、株式会社島津製作所の商標です。
MicromATRは、Czitek, LLCの商標です。

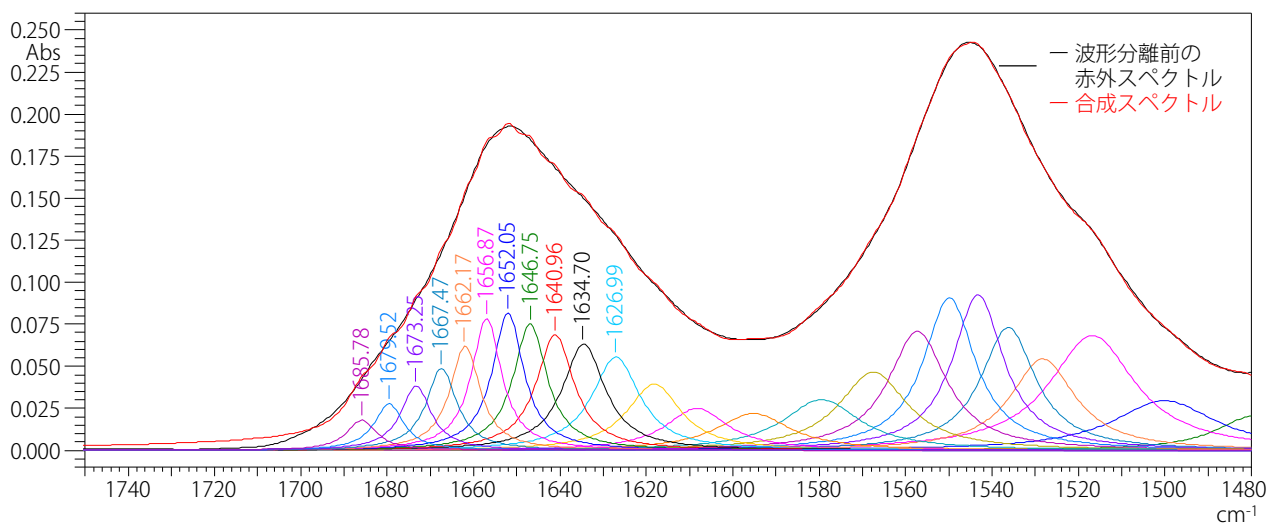


図4 波形分離により求められた個々のピークと合成スペクトル

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：2018年11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。