

高感度ラマン光学活性装置の開発とそれによるタンパク質アミロイド線維 の立体配座解析

Conformational Analysis of Protein Amyloid Fibril by Using Newly-Developed Highly-Sensitive Raman Optical Activity Spectrometer

大阪大学 山本 茂樹

アルツハイマー病やヤコブ病など、所謂アミロイド病においては、特定のタンパク質が β シート構造へ高次構造の変化を起こし、不溶なアミロイド線維を形成し、脳内などにおいて沈着を起こす。このアミロイド線維の形成過程および、その逆反応であるアミロイド線維の天然化過程を理解し、反応を制御する為には、アミロイド線維の変化を高分解能で構造解析し、その変化原因を分子的観点で明らかとする必要がある。しかし、既存の分析方法では、アミロイド線維およびその構造前駆体など、時間的揺らぎを持ったタンパク質高次構造を立体配座の分解能において解析することは依然難しい。

研究代表者は、ラマン光学活性 (Raman Optical Activity; ROA) がアミロイド線維の構造解析法として有用であると考え、装置開発、実験、および理論計算の点から研究を進めている。ROAは分子のキラリティ（対掌性）を振動準位において測定する分光法であり、分子の立体配座を極めて鋭敏に反映する。ラマン散乱は非常に速い現象であるため、速い構造平衡にある分子系においても、エネルギーが平均化されることなく測定が行える。量子力学計算を用いて ROA スペクトルを解析することで、分子立体配座とその存在分布を決定できる。これらの利点から、ROA 分光はアミロイド線維の有用な構造解析法として期待されるが、解決されるべき課題点が幾つか存在する。一つは、測定時間の長さであり、現状ではタンパク質溶液の測定に数時間～数十時間かかる。測定に必要な試料濃度も高く、タンパク質溶液では約 10%の濃度が必要となっている。

本研究においては、上記課題を解決するために、高感度な ROA 測定装置の開発を行った。高強度レーザーを用い、半周囲検出系を開発することで、検出効率を飛躍的に高める装置を設計し、作製した。この装置には透過型回折格子を組み込んだ、明るい (F/2) レンズ分光器が含まれているが、それによってスリット像が湾曲する収差が起こる。この収差を解消するために、収差とは逆向きに湾曲した出射端形状をもつバンドルファイバーを作製し、分光器入り口に設置し、スリットの代替として用いた。このバンドルファイバーの入射端は2分岐しており、試料内の検出部位の像と対応し、散乱光を効率良く捕集する。

アミロイド線維のモデルとしてインスリンアミロイド線維を研究対象とし、線維内におけるインスリン単量体の2次構造および積層構造を、ROA スペクトルの実験と量子力学計算との比較から考察した。インスリン分子は大きいため、通常の方法では量子力学計算を適用できない。これを解決するために、我々がこれまでに研究してきた分子断片化法を用いた。 β シート構造をとるインスリン単量体のモデル構造を作製し、このモデルについて周期的境界条件を考慮した分子動力学計算を行い、線維内における積層構造を予想した。得られた構造に基づき、ROA およびラマンスpektrルの計算を行った。実験において得られた ROA スペクトルの変化をよく再現する計算結果が得られたことから、我々のモデル構造が適切であることが分かった。