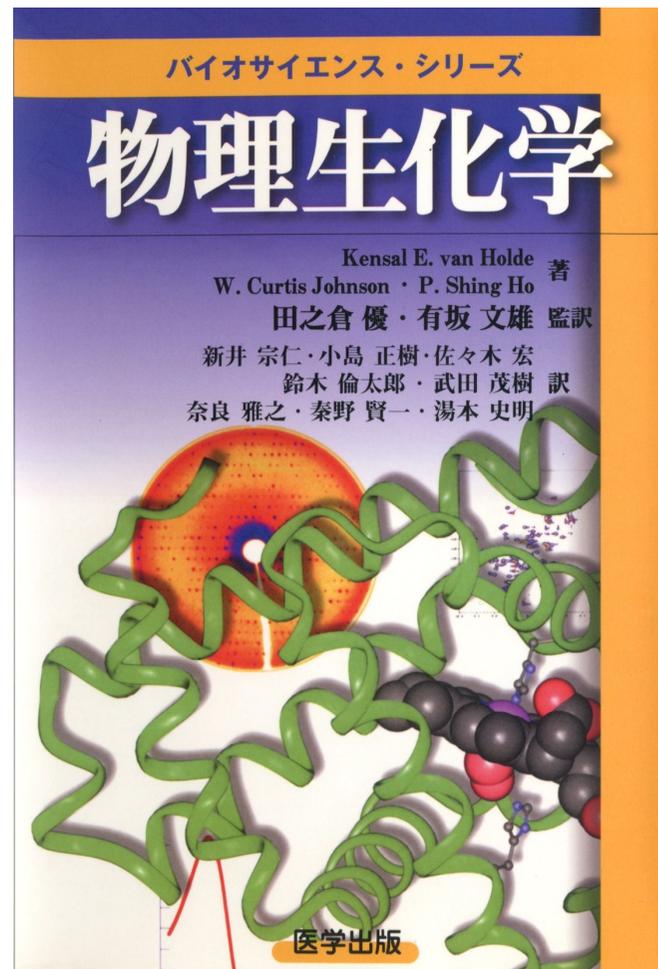


分光学の基本とUVスペクトル

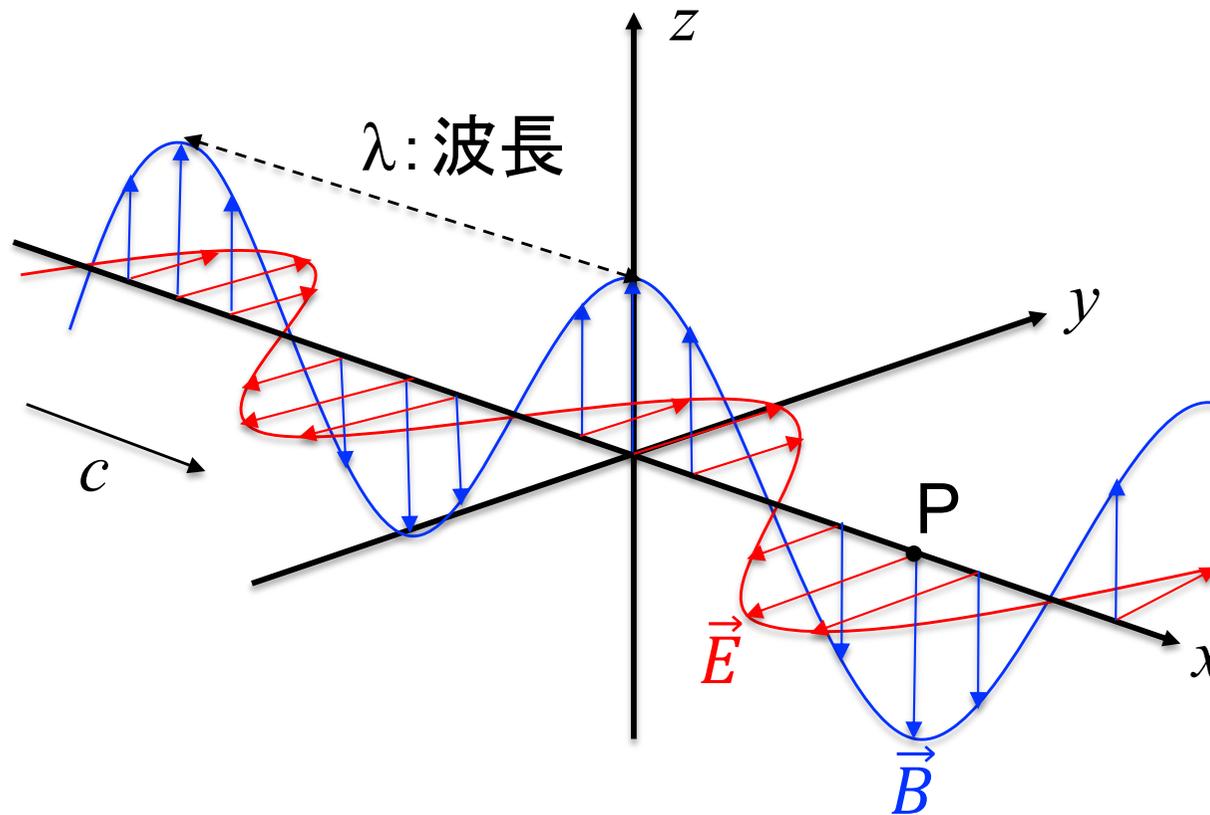
参考図書



光とは？・・・電磁波

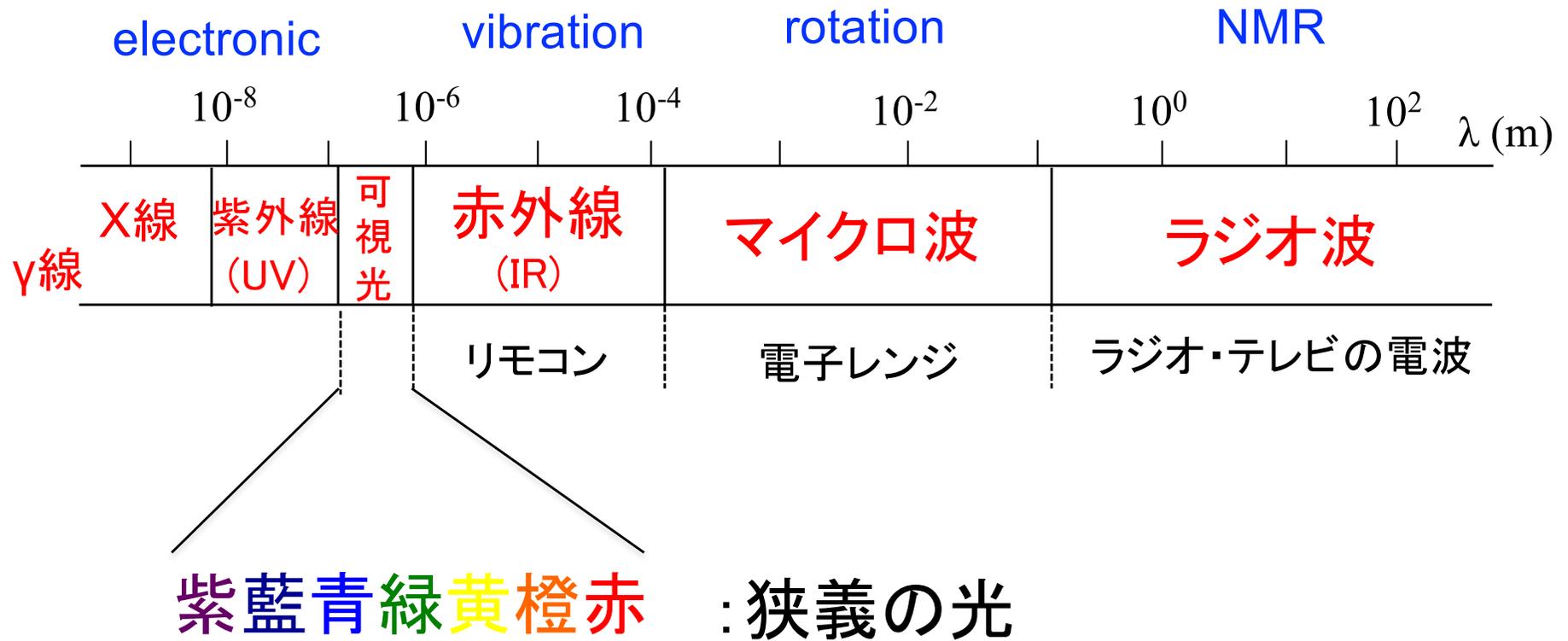
電磁場の伝播形態

電場成分 \vec{E} と磁場成分 \vec{B} からなる

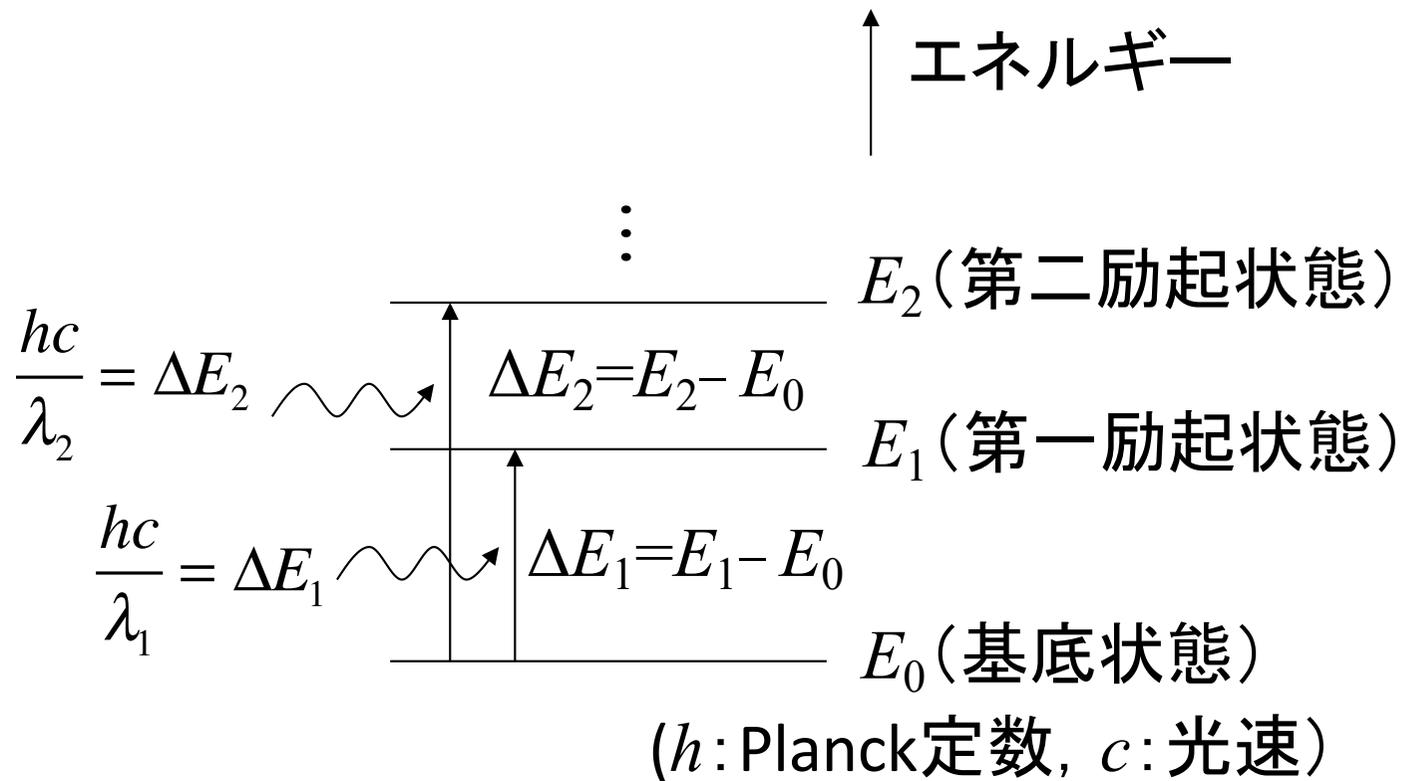


x 軸上の任意の点 P において \vec{E} と \vec{B} は直交している
(\vec{E} から \vec{B} へ右ねじを回したとき、ねじの進む向きに電磁波は進行する)

電磁波の種類



原子や分子のエネルギーは不連続 (離散化: とびとびの値をとる)



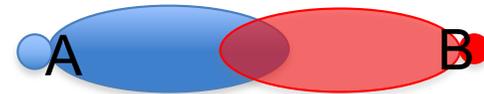
基底状態にある原子(分子)は、準位間のエネルギーにちょうど等しいエネルギーの電磁波を吸収して、励起状態に遷移する
(上図の場合、波長が λ_1 , λ_2 の電磁波を吸収する)

紫外線 (UV) の波長は, 電子のエネルギーと同程度
電子状態の遷移 \Leftrightarrow UVの吸収

化学結合 (共有結合) の原因: 電子対の形成
電子軌道の重なり

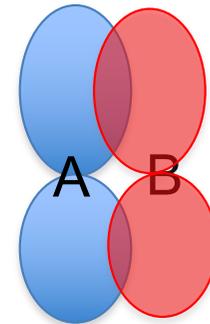
原子A—原子B

σ 結合: 結合軸と電子軌道が平行



単結合に存在

π 結合: 結合軸と電子軌道が垂直



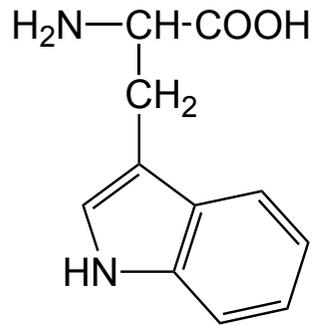
二重結合の2本目の結合
三重結合の2本目と3本目の結合

この他に, 非結合性の電子対 (lone pair) がある \rightarrow n 軌道という

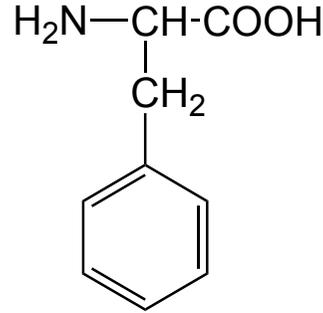
生体分子のUVスペクトル

タンパク質

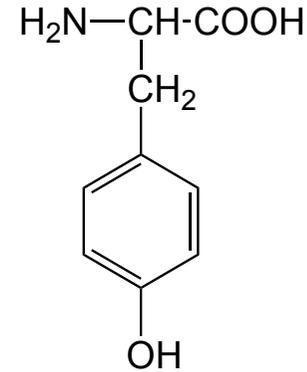
芳香族アミノ酸の側鎖・・・280 nm付近のUVを吸収する



トリプトファン



フェニルアラニン



チロシン

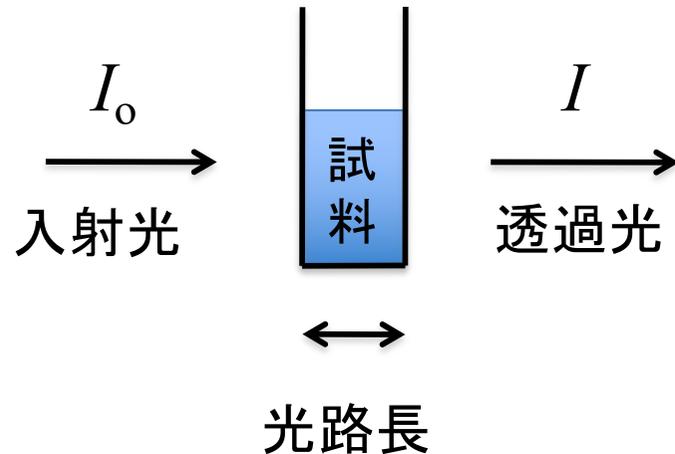
ペプチド結合・・・220 nm付近のUVを吸収する(弱い)

核酸(DNA, RNA)

塩基・・・260 nm付近のUVを吸収する

正確には、260 nm付近を極大として、その近傍の波長の光も吸収するため、280 nm付近のUVも吸収される

吸光度 (Absorbance) とは？・・・光吸収の程度を表す量



$$\text{吸光度} = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

280 nmにおける吸光度を、 A_{280} または
 OD_{280} と書く(他の波長でも同様)

問題

- ① ある波長の光を試料にあてたところ、90%が吸収された。
このときの吸光度はいくらか。
- ② 同様に、入射光の99%が吸収されたときの吸光度はいくらか。

吸光度の値が大きくなると、精度が悪くなる

ランベルト・ベールの法則・・・吸光度測定の基本式

ランベルト(Lambert)の法則とベール(Beer)の法則からなる

$$\text{吸光度} = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon cl$$

l : 光路長 (cm), c : 試料のモル濃度 (mol/L)

ϵ : **モル吸光係数** (物質固有の定数)

使い方

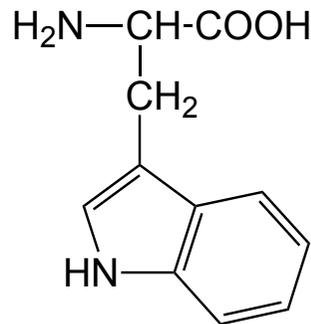
吸光度は、光路長と試料濃度に比例する (ϵ は比例定数)

光路長 (セルで決まる) が一定の場合、**吸光度は試料濃度に比例**

試料溶液を入れる容器をセル (cuvette) という
UV測定の場合は、石英製のセルが用いられる

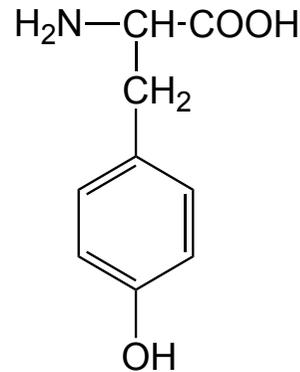
発色団のモル吸光係数(280 nm)

トリプトファン(Trp)



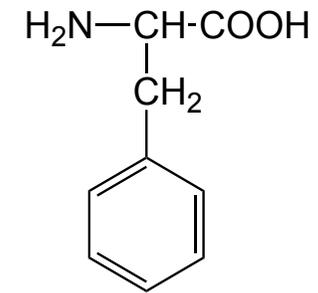
$$\varepsilon = 5550$$

チロシン(Tyr)



$$\varepsilon = 1340$$

フェニルアラニン(Phe)



わずか

他に、ジスルフィド結合1本あたり200

問題

あるタンパク質は分子量が1万で、分子中にTrp2個、Tyr5個、ジスルフィド結合を1本含む。このタンパク質1mg/mLの吸光度はいくらか。

**タンパク質の単位濃度あたりの吸光度は、アミノ酸配列から概算できる
(ただし、溶媒効果の影響を無視した場合)**

プログラミング言語Rubyで作成したWebアプリケーション

タンパク質の分子量・等電点・吸光度の計算

アミノ酸配列（1文字表記）を入力欄にコピー&ペーストするか、ファイル名（FASTA形式）を指定してください。

分子量は、質量分析スペクトルと比較可能な数値です。Cysはすべて還元型（-SH）として扱っています。

等電点は、N末端（pK=7.5）、C末端（pK=3.5）、Asp側鎖（pK=3.9）、Glu側鎖（pK=4.3）、His側鎖（pK=6.0）、Lys側鎖（pK=10.5）、Arg側鎖（pK=12.5）、Tyr側鎖（pK=10.1）、Cys側鎖のSH基（pK=8.3）を解離基として考慮しています。各pKでの解離は、Henderson-Hasselbalchの式に基づいて計算しています。

吸光度は、Trp側鎖のモル吸光係数を5550、Tyr側鎖のモル吸光係数を1340として計算し、ジスルフィド結合の寄与は含みません。必要であれば、出力値に「（ジスルフィド結合の数）×200 / 分子量」を足してください。また、立体構造に基づく溶媒効果の影響などは考慮していません。光路長は1 cmです。

以上を参考にして、使用してください。

ファイル指定：

https://www.ls.toyaku.ac.jp/~bioinfo/cgi-bin/amino_acid_seq_analysis.cgi

紫外吸収法を用いたタンパク質濃度の測定

問題1

あるタンパク質溶液を10倍に希釈して吸光度を測定したところ、0.72であった。このタンパク質1mg/mLあたりの吸光度が1.80のとき、原液のタンパク質濃度はいくらか。

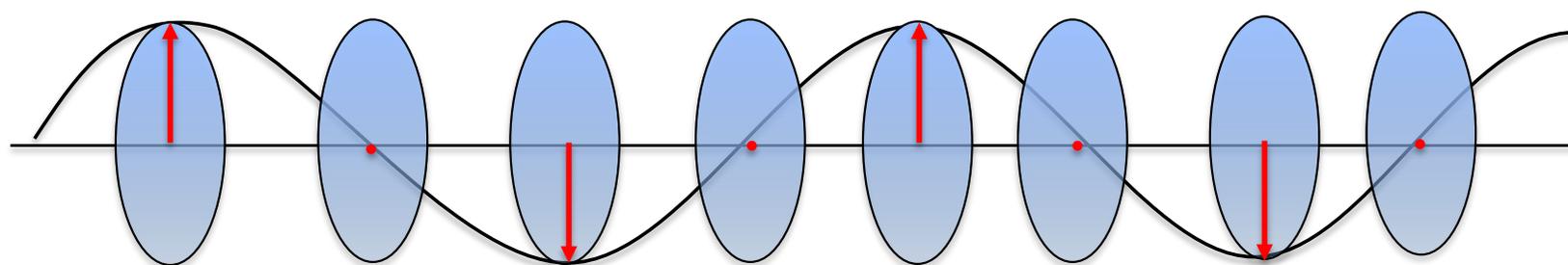
問題2

高濃度タンパク質溶液を、吸光度1以下で測定するには、どのようにしたらよいか。

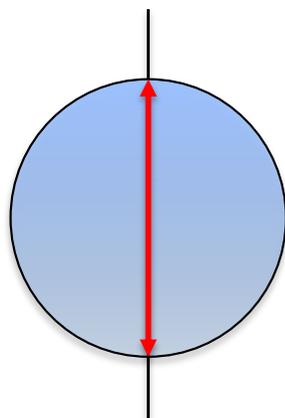
CDスペクトルとタンパク質の二次構造

再び光について

電場成分のみ考える(磁場成分でも同様)
電場ベクトルの振動する面を**偏光面**という

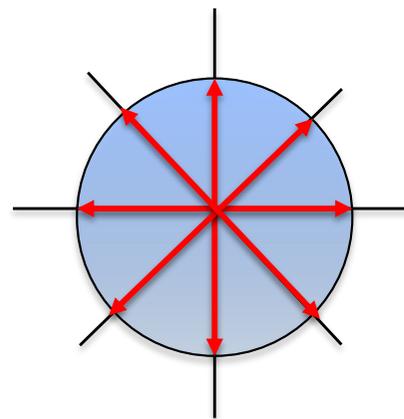


進行方向から見ると



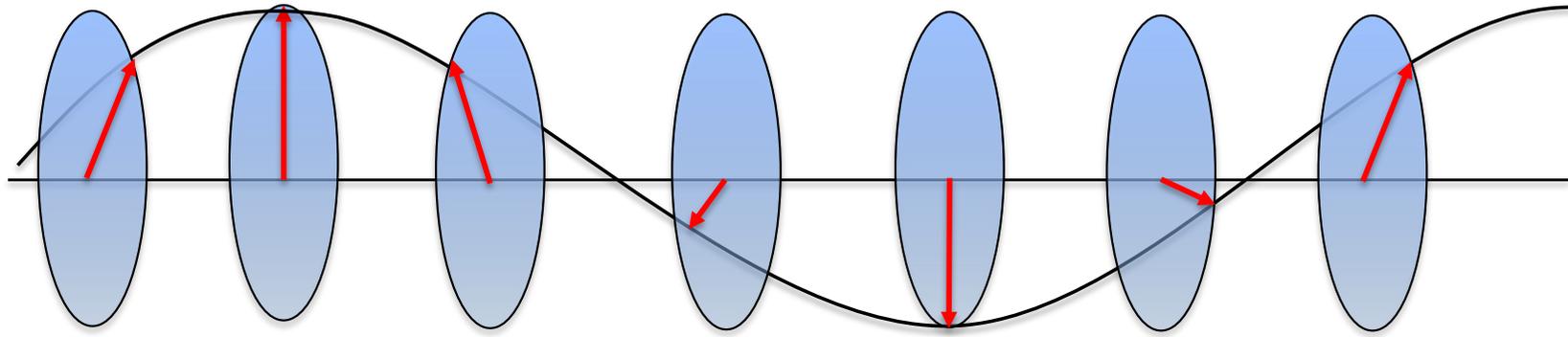
直線偏光

自然光では

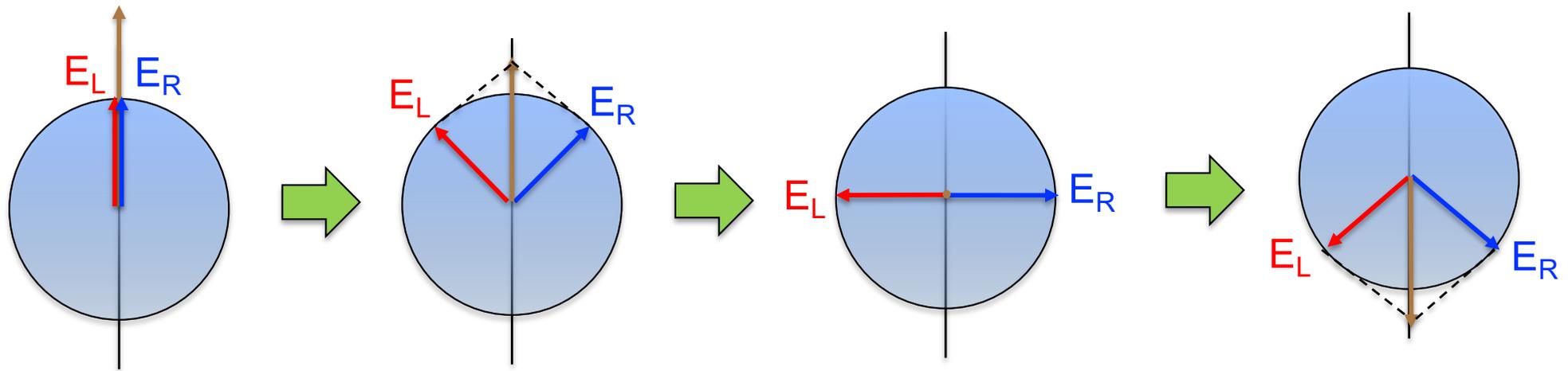


あらゆる角度の
偏光面をもつ

直線偏光・・・電場ベクトルの向きが一定で大きさが変化
円偏光・・・電場ベクトルの大きさが一定で向きが変化



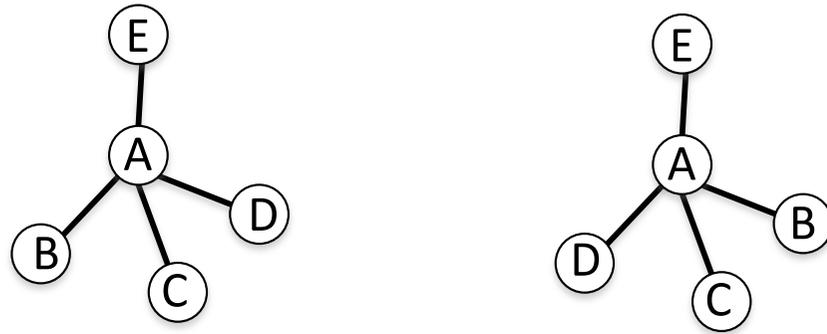
右円偏光・・・進行方向から見て電場ベクトルの先端が右回り
 左円偏光・・・進行方向から見て電場ベクトルの先端が左回り
 円偏光はらせんを描く



直線偏光は、右円偏光 E_R と左円偏光 E_L の重ね合わせとみなせる

円偏光と光学活性

掌性(キラリティー)のある分子は, 電子軌道も掌性がある



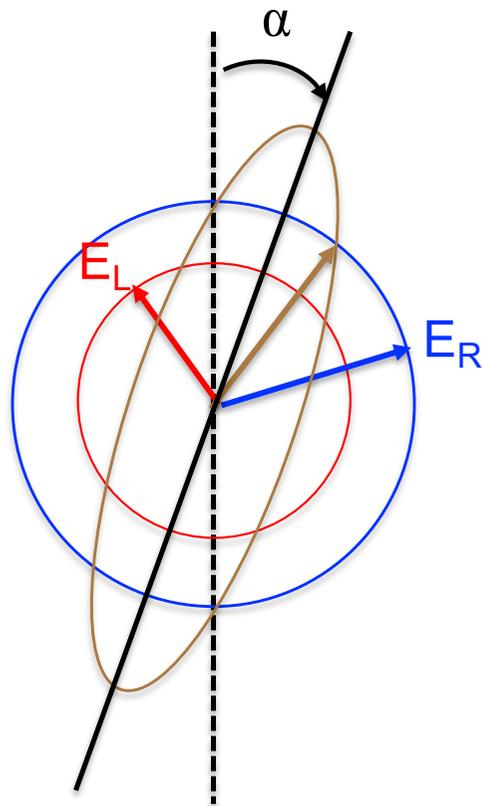
掌性(キラリティー)のある物質は, 右円偏光に対する吸光係数 ϵ_R と左円偏光に対する吸光係数 ϵ_L が異なる

←軌道の空間配置により電子状態の遷移の様相が異なるため

$\epsilon_L - \epsilon_R$ を円偏光二色性(CD)と呼び, 光学活性の程度を表す

CDと楕円偏光

CDが観測されると、直線偏光が楕円偏光になる



右円偏光の振幅 E_R と左円偏光の振幅 E_L が異なるため、合成ベクトルは楕円軌道内で振動する

楕円の長軸は、元の直線偏光の偏光面から角度 α だけ回転する→旋光性

楕円の形状は、短軸と長軸の比(の逆正接)で表される

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad \theta \text{ を楕円率という}$$

CDを楕円率で表す

ランベルト・ベールの法則より,

$$\log_{10} \frac{I_0}{I_R} = -\frac{1}{2.303} \ln \frac{I_R}{I_0} = \varepsilon_R cl \quad (I_L \text{ についても同様})$$

すなわち

$$I_R = I_0 \exp(-2.303\varepsilon_R cl) \quad (I_L \text{ についても同様})$$

強度 I は振幅 E の2乗に比例するので

$$\tan \theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} = \frac{\sqrt{I_R} - \sqrt{I_L}}{\sqrt{I_R} + \sqrt{I_L}}$$

すなわち

$$\begin{aligned} \theta &= \arctan \frac{\sqrt{I_R} - \sqrt{I_L}}{\sqrt{I_R} + \sqrt{I_L}} = \arctan \frac{\exp(-2.303\varepsilon_R cl / 2) - \exp(-2.303\varepsilon_L cl / 2)}{\exp(-2.303\varepsilon_R cl / 2) + \exp(-2.303\varepsilon_L cl / 2)} \\ &= \dots \simeq \frac{2.303}{4} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) cl \quad (\because \exp(x) \simeq 1 + x, \arctan x \simeq x) \end{aligned}$$

CDをモル楕円率で表す

$$\theta \simeq \frac{2.303}{4}(\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl \quad \theta \text{ の単位はラジアン}$$

$$\theta \simeq \frac{2.303 \times 180}{4\pi}(\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl \quad \theta \text{ の単位は度(deg)}$$

c (mol/L) = c' (mol/dL), l (cm) = l' (dm)とすると, $c = 10 c'$, $l = 10l'$

$$[\theta] = \frac{\theta}{c'l'} = \frac{100\theta}{cl} \text{ をモル楕円率という}$$

$$\therefore [\theta] = \frac{100\theta}{cl} = \frac{100 \times 2.303 \times 180}{4\pi}(\varepsilon_L - \varepsilon_R) = 3298(\varepsilon_L - \varepsilon_R)$$

モル楕円率(単位はdeg·cm²/dmol)は, $\varepsilon_L - \varepsilon_R$ に比例する

吸光度の差とCDとの関係

左円偏光の吸光度を A_L , 右円偏光の吸光度を A_R とすると,
ランベルト・ベールの法則: $A_L = \varepsilon_L cl$ および $A_R = \varepsilon_R cl$ より,

$$\Delta A = A_L - A_R = (\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl$$

また, θ の単位が度(deg)のとき,

$$\theta \simeq \frac{2.303 \times 180}{4\pi} (\varepsilon_L - \varepsilon_R)cl = 32.98 \Delta A$$

したがって,

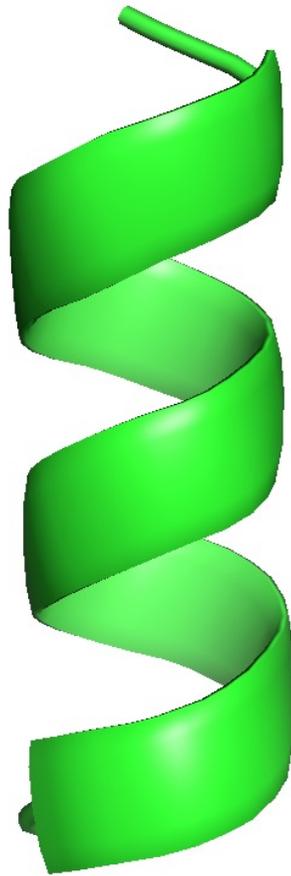
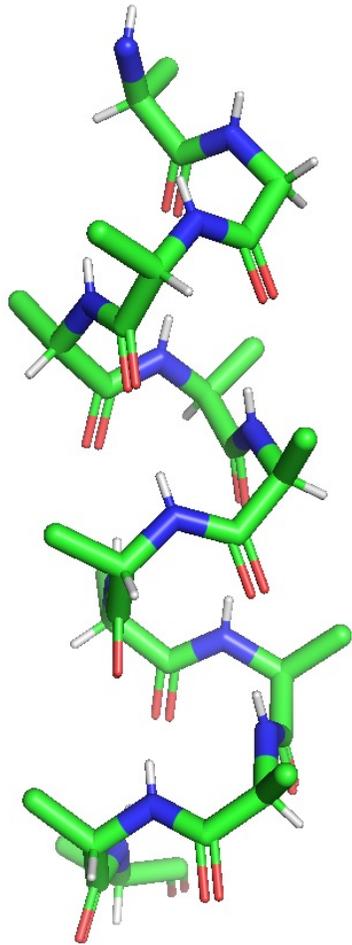
- ・吸光度の差 ΔA および楕円率 θ : 試料濃度 c や光路長 l に依存する
- ・ $\Delta\varepsilon (= \varepsilon_L - \varepsilon_R)$ およびモル楕円率 $[\theta]$: c や l に依存しない

→通常は, ΔA の方をCDと呼び, $\Delta\varepsilon$ をモルCDと呼んで区別する

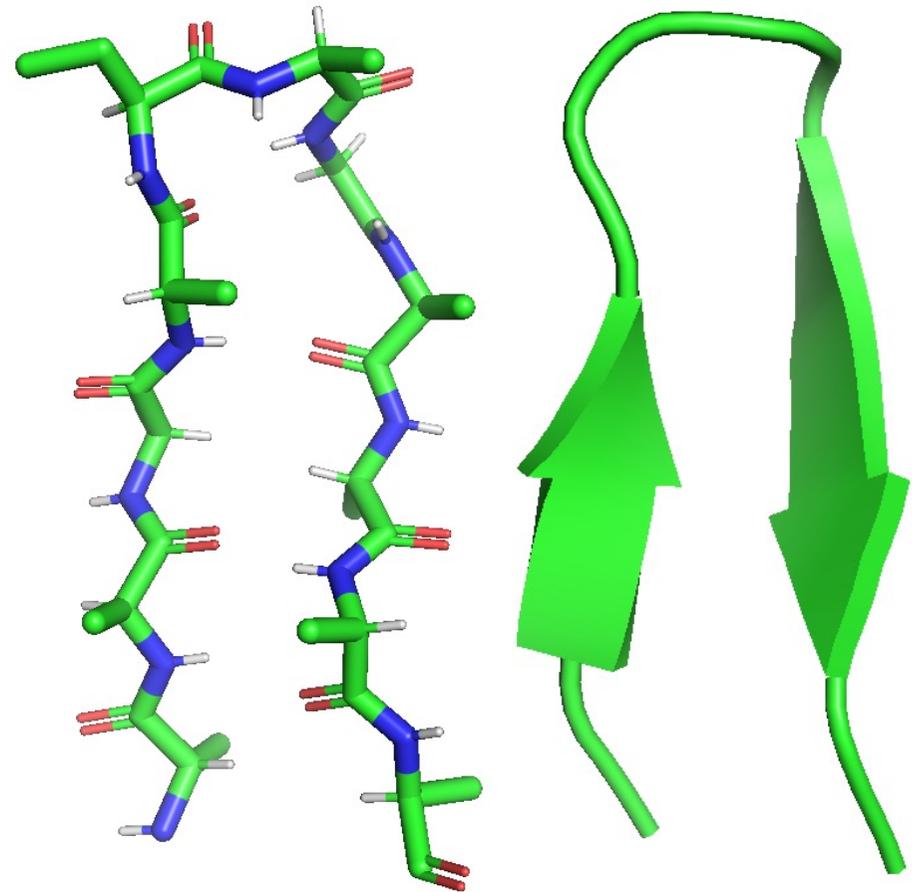
(掌性の分子には $\Delta\varepsilon$ が存在するため, 現象として ΔA が観測される)

タンパク質の二次構造

主鎖原子間の水素結合により形成



α ヘリックス
右巻きらせん, 1周3.8残基



β シート(ストランド間に水素結合)
平行型と逆平行型がある

CDが観測されるための条件

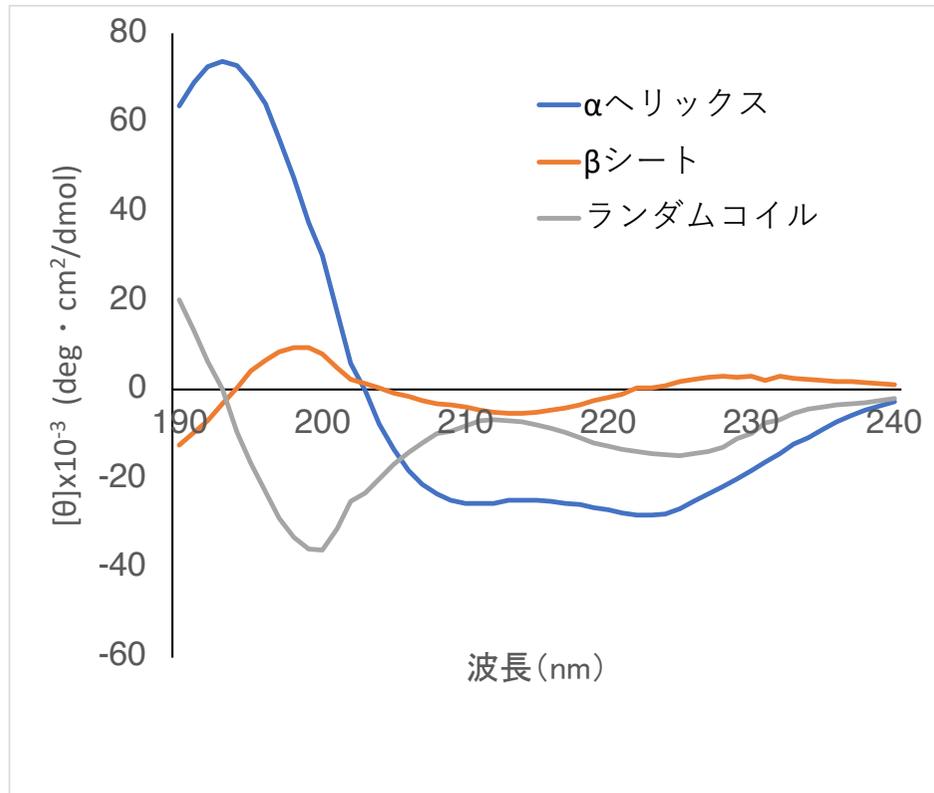
1. 吸光度がある
2. 対象分子に掌性がある

タンパク質の主鎖は遠紫外部(190~250 nm)でCDが観測される

1. ペプチド結合は220 nm付近に極大吸収をもつ
2. 二次構造によって発色団の空間配置に掌性が現れる

- ・二次構造によって特徴的なCDスペクトルが得られる
- ・ペプチド結合の数はアミノ酸残基数に比例するため、**平均残基モル楕円率**で表す

CDスペクトルとタンパク質の二次構造



α ヘリックス

$n\pi^*$ 遷移 (222 nm),

$\pi\pi^*$ 遷移 (平行成分 208 nm, 垂直成分 190 nm)

β シート

$n\pi^*$ 遷移 (218 nm), $\pi\pi^*$ 遷移 (195 nm)

ランダムコイル

196 nm付近に大きな負の極大をもつ

実際のタンパク質のCDは、これらのスペクトルの重ね合わせとして観測される

問 α ヘリックスを50%, β シートを20%, ランダムコイルを30%含むタンパク質のCDスペクトルはどのような形状になるか？

→ 実測したCDスペクトルから各二次構造の含量が計算できる

CD測定時の注意点

CDは右円偏光と左円偏光の吸光度の差を見ているので、吸光度自体が大きくなると精度が下がる

1. 酸素分子はUV照射によりラジカルを発生し、遠紫外部に吸収をもつ → 測定中は試料室に窒素ガスを流して酸素を追い出す
2. 遠紫外部に吸収をもつ溶媒(DMSOなど)は、CD測定の障害となる
3. 測定中はフォトマル電圧で吸光度をモニターし、基準値を超えないようにする
→ 試料濃度をあまり濃くしてはいけませんが、薄いとS/Nが悪くなる(積算を繰り返す)