レーザーレター

低エネルギーレーザー光の蛋白質の
構造ゆらぎに及ぼす影響

岡田基広*・藤原 修*・加藤一夫*・阿座上 孝*

(1986年12月16日 受理)

Influences of Low Energy Laser Beam on
Fluctuation of Protein ConformationMotohiro OKADA*, Osamu FUJIWARA*,
Kazuo KATOH* and Takashi AZAKAMI*

(Received December 16, 1986)

For the investigation of a possible mechanism causing the bio-effect of low energy laser beam, this paper describes the influences of the laser beam irradiation on protein conformation (spatial structure of a protein) relating to biological activation. Measurements of the myoglobin conformation are made by using the circular dichroism (CD) spectra, and the variation of the conformation is examined with respect to the irradiation time. The results show that the low energy laser beam could promote the time fluctuation of the conformation content and might result in affecting the bio-effect.

1. まえがき

レーザー光の医学応用については、近年の半導体レーザーの発達・普及に伴い種々の治療・診断装置の研究が盛んである。とくに、治療分野においては、レーザーメス・光凝固装置などの高エネルギーレーザー光の熱作用を利用した医療機器が開発され臨床ですでに実用されている¹⁾。一方、最近になって低エネルギーレーザー光照射による創傷の治癒促進・ハリ効果・鎮痛効果・炎症の抑制効果などの臨床例が数多く報告されるに及んで、弱いレーザー光の医学応用

も注目されるようになった^{1,2)}。これらの生体効果は、波長500~700nmのレーザー光を数mWから数10mW程度の出力で患部周辺に数10秒ないし数10分間照射することによって生じる²⁾とされ、医療分野においては治療法の確立とともに、低エネルギーレーザー光に対する生体作用機序の解明が期待されている。

以上のような背景を踏まえて、筆者らは、低エネルギーレーザー光の生体影響を微視的レベルで解明することを目的として、以下の実験を行った^{3~6)}。まず、レーザー光が生体細胞に作用し得る対象として生体高分子(蛋白質)を取

* 名古屋工業大学工学部電気情報工学科 (〒466 名古屋市昭和区御器所町)

* Department of Electrical and Computer Engineering, Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology (Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466)

り上げ、これの生物活性度に関与する骨格構造（コンホメーション）に注目した。すなわち、コンホメーションの変化は酵素の触媒作用や生体膜機能などに何らかの影響を及ぼすものとされ⁷⁾、しかも構造の結合エネルギーが0.03 eV程度ときわめて小さいので、弱いレーザー光の照射でもコンホメーションを変え得るのではないかと考えた。そこで、構造研究で比較よく使用される蛋白質（ミオグロビン）に低エネルギーのHe-Neレーザー光（波長：632.8nm、量子エネルギー：1.96 eV）を照射した場合のコンホメーションを円二色分散計⁸⁾により調べた。この結果を本論文で述べる。

2. 蛋白質の構造と円二色性

2.1 蛋白質の構造⁹⁾

蛋白質は、分子量が一萬から百万の一次元的につながった長い鎖（ペプチド鎖）からなる生体高分子である。ペプチド鎖は20種類のアミノ酸からなり、これらの共有結合（炭素原子間の結合エネルギー：3.96 eV）に基づく配列順序を1次構造、水素結合（結合エネルギー：0.03 eV）による立体的な構造を高次構造と呼ぶ。高次構造はさらに2次構造、3次構造、4次構造とに分けられ、これらのうち2次構造をとくに骨格構造（コンホメーション）という。一般に、1次構造は蛋白質の物性・機能を決定し、これらの生物活性度はコンホメーションに強く依存するとされる。また、後者の結合エネルギーは前者のその1/100以下ときわめて小さいので、コンホメーションはpH、温度などの環境条件でも容易に変わり得る。コンホメーションはおおまかには α -ヘリックス、 β -構造、不規則構造の三つに分けられる。 α -ヘリックスとはペプチド鎖の代表的ならせん構造を称し、 β -構造とは鎖が十分に伸びて他の鎖と水素結合したシート状の構造をいう。両構造のいずれにも属さない無秩序な構造を不規則構造という。蛋白質のコンホメーションは上述した構造の占める割合（これを含有量という）で規定される。

Fig.1 Reference CD spectra for each conformation content of poly-L-lysine¹⁰⁾ and measured CD spectra of myoglobin.

2.2 円二色性と構造測定^{8, 10)}

円二色性 (Circular Dichroism; 略してCDと呼ぶ) とは、溶液物質を通過する同じ強度の左右円偏光の吸収量が異なる現象をいう。このことを利用して蛋白質のコンホメーションが測定される。その通常の方法はつぎのとおりである。直線偏光に対する透過光（楕円偏光）の短軸・長軸の比（楕円率）は蛋白質のコンホメーションに固有な波長特性（CDスペクトルと呼ぶ）を示すので、これを測定することによってコンホメーションが逆に推定される。Fig.1の点線はポリ-L-リジンの各単独構造に対するCDスペクトル¹⁰⁾（基準スペクトル）を示す（実線は後述する）。図の蛋白質はpH、温度などの作成条件や触媒によりコンホメーションの各含有量を独立に変更できるので、各単独構造だけのCDスペクトルが得られる。それゆえ、これらを基準スペクトルとすれば任意の蛋白質の測定CDスペクトルからコンホメーションの推定が可能となる。

本論文では、測定CDスペクトルとFig.1の基準スペクトルとから最小2乗法を用いてコンホメーションの推定を行う。まず、 α -ヘリックス、 β -構造、不規則構造だけのポリ-L-リジン

Table I Conformation contents of several proteins¹⁰⁾.

	Myoglobin			Lysozyme			Ribonuclease		
	α	β	γ	α	β	γ	α	β	γ
Eq. (1)	69.0	3.8	27.1	30.3	7.9	61.8	10.5	30.7	58.8
	(r=0.998)			(r=0.995)			(r=0.981)		
X-Ray diffraction	74	0	26	30	10	60	15	36	49

r: correlation coefficient

の波長 λ [nm]に対する基準CDスペクトルをそれぞれ $[\theta_\alpha]_\lambda$, $[\theta_\beta]_\lambda$, $[\theta_\gamma]_\lambda$, 対象とする蛋白質の測定CDスペクトルを $[\theta]_\lambda$ とする。そのとき、コンホメーションの α -ヘリックス, β -構造, 不規則構造の各含有量をそれぞれ α , β , γ とすれば, これらは文献4) から

$$\begin{bmatrix} \alpha \\ \beta \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \Sigma ([\theta_\alpha]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda)^2 \\ \Sigma ([\theta_\alpha]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda) ([\theta_\beta]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda) \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \Sigma ([\theta]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda) ([\theta_\alpha]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda) \\ \Sigma ([\theta]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda) ([\theta_\beta]_\lambda - [\theta_\gamma]_\lambda) \end{bmatrix}$$

$$\gamma = 1 - \alpha - \beta \quad (1)$$

で与えられる。

Table Iは文献10) の各種蛋白質に対するCDスペクトルの測定データから式(1)を用いて求めたコンホメーションとX線回折によるそれとを比較して示す。表より式(1)は妥当であることがわかる。

3. 実験

3.1 試料

蛋白質としては構造がすでに判明しているミオグロビン (以下, Mbと略す) を用いた。これはは乳類の筋肉中に含まれるヘム蛋白質の一種で, ヘモグロビンと同じく酸素の貯蔵および運搬機能をもつ球状の赤色色素蛋白質である。本実験では馬の骨格筋より採取した粉末状のMb (SIGMA CHEMICAL COMPANY No. 0630 MYOGLOBIN TYPE I) をリンゲル液

Fig.2 (a) Schematic diagram of CD measurement apparatus and (b) configuration of sample in the cell for the measurement of CD spectra and the irradiation way of laser beam.

(NaCl 0.86, KCl 0.03, CaCl₂ 0.033 w/v%, pH 6.6) に溶かし, この0.1mg/ccの溶液 (褐色) を一つの試料とした。

3.2 実験装置と測定法

Fig.2 (a) は円二色分散計 (日本分光 J-40 S) とデータ処理装置のブロックダイアグラム

を示す。この装置では波長200～250nmのCDスペクトルを約40秒で測定できる。測定データはデータプロセッサに蓄えられ、これよりX-Yレコーダに出力される。本実験ではデータプロセッサの出力に通信回線RS-232Cを介してパーソナルコンピュータに接続した。これにより、CDスペクトルデータからコンホメーションの各含有量が式(1)を用いて瞬時に計算推定される。

Fig. 2 (b)はCD測定用セルの拡大図を示す。試料を注入孔よりセル(液相厚さ1.0mm, 容積0.06 cm³)に入れ、セル側面にレーザー光を照射(スポットサイズ1.0mm²)する。照射に用いたレーザーは最大出力2.5mWのHe-Neレーザー(波長632.8nm, 量子エネルギー1.96eV)である。ただし、本実験では円二色分散計に装着されたセル内の試料にミラーの反射を用いてレーザー光を照射したので、照射電力は試料直前では1.5 mWに減衰した(試料の透過光電力は入射光のそれとほとんど同じであった)。したがって、試料に吸収されるレーザー光の電力はきわめて小さいものとする。

なお、セル内にはFig. 2 (b)に示すように恒温水が還流しており、試料の温度が一定に保たれる。本実験ではこれを30±0.1℃に設定した。

Table IIは実験条件を示す。実験Aはレーザー光を照射しない対照群(試料数11)であり、CDスペクトルを1分毎に50分間測定する。実験B～Hはレーザー光照射群(照射時間に応じて7群に分ける)であり、この場合はレーザー光照射前後のCDスペクトルをそれぞれ1分毎

Table II Experimental condition.

Group	Duration		Number of Sample
	Control	Irradiation	
A	50 min	0 min	11
B	20 min	2 min	10
C	20 min	5 min	10
D	20 min	7 min	15
E	20 min	10 min	13
F	20 min	15 min	5
G	20 min	20 min	5
H	20 min	30 min	9

Fig. 3 Conformation contents obtained from the measured CD spectra of myoglobin.

に10分間測定する。なお、レーザー光照射による試料の温度変化はいずれも±0.1℃以内であり、照射しない場合のそれとほとんど同じであった。

3.3 実験結果と考察

Fig. 1の実線は対照群のMbに対する実験開始直後のCDスペクトルの測定例を示す。Fig. 3は1分毎の測定CDスペクトルから式(1)を用いて求めたコンホメーションの各含有量を示す。レーザー光照射中はCDスペクトルを測定でき

Fig.4 Dependence of ratio of mean and variance of conformation content on the irradiation time.

ないので、この期間での同図 (b) の含有量は空白にしてある。図によると、コンホメーションの各含有量はいずれも不規則に動揺していることが知られる。この動揺のレーザー光照射による影響を調べるために、照射前後の10分間をそれぞれ領域Ⅰと領域Ⅱとに分け、両者の含有量の統計量をつぎに比較する。

Fig.4はコンホメーションの各含有量の平均値と分散値の領域Ⅰに対するⅡの比を示す。この図より、レーザー光の照射によりコンホメーションの平均値比は変化していないのに対し分散値比のほうは大きく変化していること、すなわち分散値比は10分間の照射で最大となり、それ以上の照射では逆に減少していること、などがわかる。この結果は、短時間のレーザー光照射に限ってコンホメーションのゆらぎを促進させることを示唆するものである。なお、レーザー光の照射による試料の上昇温度は対照群のそれとほとんど変わらないため、上記の促進効果はレーザー光の熱エネルギーに起因するものではないと考える。低エネルギーレーザー光照射によるコンホメーション動揺の促進効果と臨床効果との関係は現時点では明らかでないが、蛋白質コンホメーションの動揺促進は少なくとも生体効果のプロモーターになり得るものと筆者らは推察する。

4. むすび

低エネルギーレーザー光照射による生体効果には目ざましいものがあり、医学分野においては、この機構の解明が期待されている。本論文では、低エネルギーレーザー光照射による生体作用機序の微視的解明を目的に、その第一段階として生体構成物質である蛋白質 (Mb) を取り上げ、これに低エネルギー (出力2.5mW) のHe-Neレーザー光 (波長632.8nm, 量子エネルギー1.96eV) を照射した場合のコンホメーションをCDスペクトルにより調べた。その結果、Mbのコンホメーションの各含有量は時々刻々と動揺していること、その時間的動揺は10分間程度のレーザー光照射により促進されること、などが判明した。

レーザー光照射による蛋白質コンホメーションの動揺促進効果については、その発現機序および生体効果との関係などが今後に残された研究課題であろう。

謝辞

実験の遂行に当たり測定装置の便宜を計って下さいました名古屋工業大学物質工学科教授滝沢章先生、同助教授辻田義治先生、同助手木下隆利先生に厚く御礼申し上げる。また、実験を協力して頂いた同電子工学科卒研究生山崎哲也君に感謝する。

参 考 文 献

- 1) 渥美和彦監修：“レーザーの臨床,” (Medical planning 1981年) p. 35.
- 2) “International Symposium on Low Energy Laser in Medicine and Surgery, Tokyo '85”, (昭60-07) p. 22.
- 3) 岡田, 加藤, 阿座上, 藤原 “低エネルギーレーザー光の蛋白質の骨格構造に与える影響”, 昭和60年東海連大, (1985. 10) p. 414.
- 4) 岡田・藤原, 加藤, 阿座上 “低エネルギーレーザー光の蛋白質の骨格構造に及ぼす影響”, 信学技報, ENCJ-85-118 (1986年3月) p. 35.
- 5) 岡田, 藤原, 加藤, 阿座上 “微弱電力レーザー光を照射した蛋白質コンホメーションの動的測定”, 昭和61年東海連大 (1986年10月) p. 363.

- 6) 山崎, 岡田, 藤原, 加藤, 阿座上 “微弱電力レーザー光照射による蛋白質コンホメーション変動の促進効果,” 昭和61年東海連大 (1986年10月) p. 364.
- 7) 布施, 多気: 生体電磁環境研究会資料, (1986年2月) p. 15.
- 8) 高分子学会高分子実験学編集委員会編: “高分子における分光学,” 共立出版, (1980年1月)
- 9) 田伏岩夫: 酵素反応機構 (学会出版センター, 1977年) p. 3.
- 10) N.Greenfield and G.D.Fasman: “Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation”: Biochemistry **8** (Oct. 1969), p. 4108.