

研究報告書

「多周波電子核二重共鳴法による酸素発生機構の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：八代 晴彦

1. 研究のねらい

生命現象に不可欠な地球上の酸素の生成のほとんどをつかさどっているシアノバクテリアや緑藻、高等植物中の光合成系II(PSII)の酸素発生機構を解明するため、さまざまな研究が進められている。1970年代には4つの光子吸収し5つの酸化状態 S_n ($n=0\sim 4$)を経由して2つの水分子から1つの酸素分子が生成するコックサイクルが確立された(図1)。また、2001年からのX線構造解析の進展でPSII複合膜タンパク質の構造のおおよそが判明し、 Mn_4Ca 錯体が酸素発生反応を行っていることが分かった。しかし、各 S_n 状態での水分子が反応に関与しどう酸素を発生するかは依然として不明である。さらに、X線により Mn_4Ca 錯体が容易にダメージを受けてしまうことが問題になっている。そこで本研究では非侵襲型の磁気共鳴法である電子核二重共鳴法(ENDOR)を用いて酸素発生機構を解明することを目標とした。ENDOR法による反応機構解明の概略を図2に示す。 $S_0\sim S_3$ の状態では反応中心の Mn_4Ca 錯体が不対電子スピンを持つことが分かっており各 S_n 状態の電子スピンと ^{17}O (核スピンをもつ)で置換した水の磁気ダイポール相互作用を利用して Mn_4Ca 錯体周辺の反応に関与する水の位置情報を得ることから反応機構を解明することが可能と考えた。ENDORでは Mn_4Ca 錯体の電子スピン共鳴(ESR)下での核スピン(^{17}O)共鳴(NMR)をESRの強度変化として検出するため Mn_4Ca 錯体周辺の反応に寄与する水分子のみを検出できる。さらに、これらの複雑な構造を一意に決めるためにはESRの多周波数化が必須である。

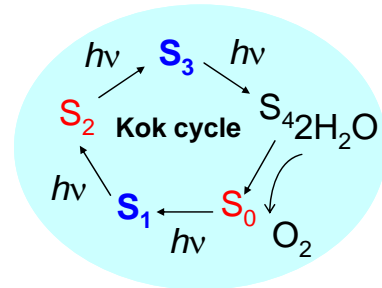


図1 コックサイクル

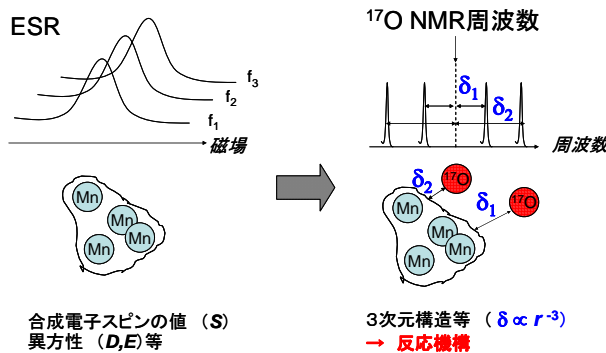


図2 電子核二重共鳴法による反応機構の解明

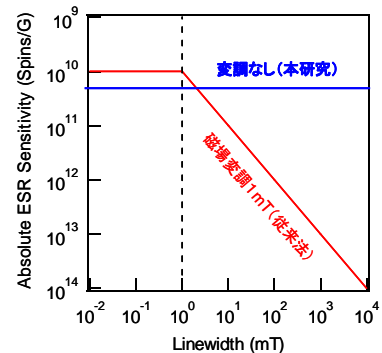


図3 ESR感度の線幅依存性

本研究者の測定法の主たる特徴は電子スピン共鳴法の部分にある。従来法(磁場変調法)は変調幅を超える広い線幅の系で劇的に感度が減少するが、我々の非変調法では感度が一定である(図3)。このため、従来方法ではほぼ不可能であった異方性の大きな整数電子スピンをもつ系の測定も可能であり、 $S=1/2$ を持つ S_0, S_2 状態に加え整数スピンを持つとされる S_1 と S_3 状態への応用を主なねらいとした。

2. 研究成果

■多周波電子スピン共鳴法の高感度化

ENDORの信号強度はESRの数%と小さいため整数電子スピン系のENDORを実現するためにはESR(さきがけ前は整数スピン系ESRのSN比=100程度)の高感度化が必要であった。

周波数先鋭化による多周波ESRの高感度化: 我々のESR、ENDORシステムはネットワークアナライザーをベースとしたシステムである(図4左)。また、変調を用いない直接検出法のため、発振器の微小な周波数揺らぎ($\sim 10^{-6}$)がノイズの主因と考えられた。このため、高精度の周波数基準を用いた発振器(図4中のSG、 $\sim 10^{-10}$)を組み込んだ。この結果、原理的には4桁の高感度化が可能となった。ここでは受信機の性能で頭打ちとなるが35GHzにおいて約17倍の高感度化(1.4×10^9 spins/G \cdot s $^{0.5}$ 、1.4K)に成功した。また、本手法ではこの基準発振器の通倍(HG)で発振するため8~700GHzでも同様の高感度を得ることが出来る。これにより幅広いESR周波数にわたりENDORが可能な感度が得られた。

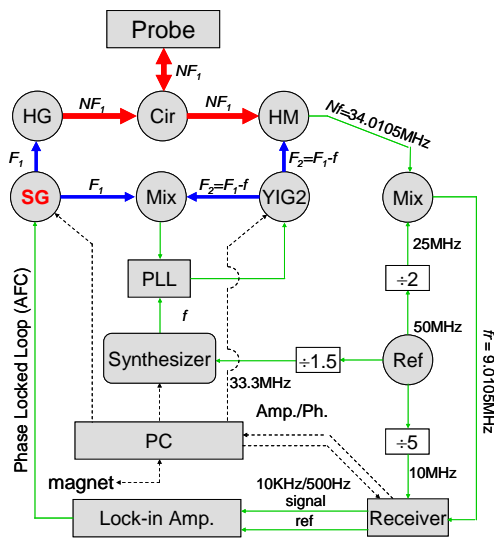


図4 多周波 ESR 概略図

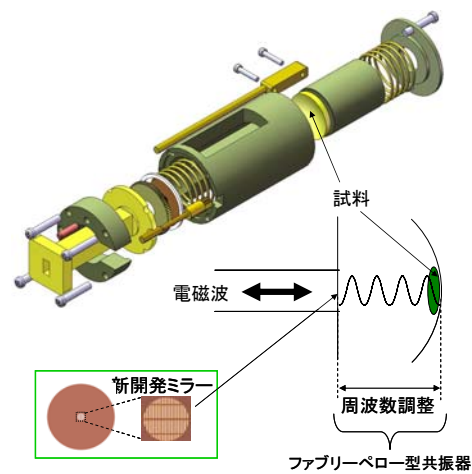


図5 新型 Fabry-Perot 共振器

高感度多周波ESR共振器の開発: PSII中のMn₄Ca錯体のように複雑で光や温度環境に対してデリケートな測定対象や、同時に存在するシトクロームb₅₅₉、非ヘム鉄、キノン等のESR活性種が混在する場合には、正確かつ一意な解析のため多周波ESR測定が有効である。単一周波数プローブは最高の感度を実現できるが、周波数毎の試料交換、光照射等で条件がばらつくため、周波数可変で高感度なESR、ENDORプローブが望ましい。そこで図5に示した新型のファブリーペロー共振器(FPR)を開発した。ESR測定に必要な強結合可能な従来の連続的に周波数が可変できるFPRの共振特性Qは常温で理論値の5~10%と非常に小さかったが、偏光を利用した新タイプのミラーを開発し40~120GHzの広範囲で94%の性能

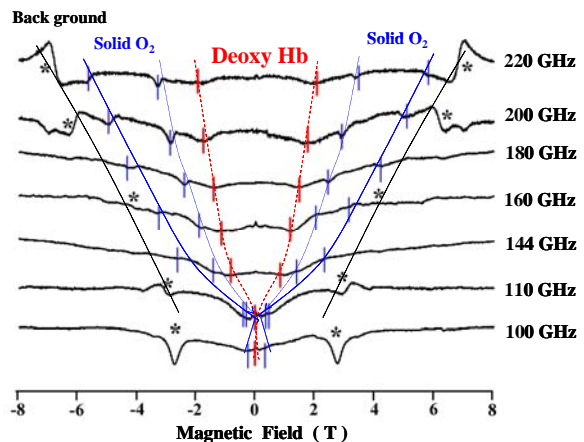


図6 デオキシヘモグロビンの多周波 ESR

を 2 枚の新ミラーでカバーできた。また、ESR測定条件であるヘリウム温度でQ値がさらに約 2.5 倍となり、単一周波数共振器とほぼ同等の高感度を実現した。しかし、周波数調整機構の不安定性のため信号の再現性が悪く線幅の広い信号が多数存在するPSII中のMn₄Ca錯体への応用は現時点で困難である。

受信系の高感度化: 35~220GHzにわたってハーモニックミキサーのランクを下げるシステムを構築した。結果、ノイズが 1/5(35GHz)~1/100(180GHz)の大幅な高感度化を実現した。このシステムを用いて、整数スピン金属タンパク質の中で最も基本的な(Fe(II) S = 2)デオキシヘモグロビン多周波EPR測定を行った(図 6)。結果 110GHz(~3.7cm⁻¹)程度のゼロ磁場ギャップがあること、110GHz 以上では非線形に共鳴磁場が増加していくことを初めて明らかにした。10~100GHzではゼロ磁場信号が常に存在し、その電子状態を解析する一般的なESRのスピハミルトニアン解析が出来ない特異な周波数依存性も観測され解析法を検討している。

■多周波 ENDOR の開発

低磁気回転比をもつ核スピン(¹⁷O)の共鳴を効率的に引き起こすため出来るだけコンパクトなNMR用RFコイルと試料の量を最大限確保できるESR共振器の両立が必要である。そこで、図 7 上に示したような試料ホルダーとRFコイル一体型のENDORプローブを開発した。RF強度 100W時、180 μsで¹⁷O核のπ-pulseを照射可能であり、コンパクトなRFコイルによって約1GHzまでのRF照射が可能である。35 GHz ENDORプローブの無負荷時のQ₀ ~23000 (T = 1.5K)と市販プローブの約3倍以上の感度を得ることが出来た。さらに、プローブの先端部分のみを交換可能にし、容易に多周波ENDORも可能とした。また、ソフトウェアによってRF周波数の高速ランダムスイープを導入しRF照射による熱揺らぎと飽和の影響を最小限に押さえた高感度ENDORシステムを開発した(図7下)。しかし、整数電子スピン系のENDOR信号の観測には適切な実験条件の探索が間に合わず観測には至っていない。

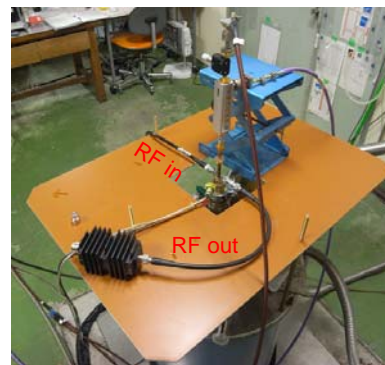
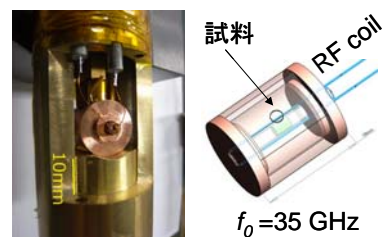


図 7 多周波 ENDOR プローブ (上) と ENDOR システム (下)

■PSII Mn₄Ca 錯体への応用

開発したシステムでS₂状態のESRは容易に観測可能になった。さらに、整数電子スピンを持つS₁状態のESRは観測されつつある。しかし、高感度になった分、試料中の溶存酸素が大きく観測され、S₁状態の信号との重なりによりS₁状態のスピン状態の解明には至っていない。今後ESRプローブ中での試料調整を工夫し解明を進める予定である。

3. 今後の展開

現時点でまだ整数電子スピン金属タンパク質の電子核二重共鳴(ENDOR)の観測にはいたっていないが、測定条件をつめ安定してENDORが測定できるようにしたい。これを用い特に構造がはっきり分かってきたPSIIのS₁状態の観測・解析を進めていく。また、多周波ESRの高感度化に伴って付加的に得られたFe(II) S = 2をもつデオキシヘモグロビンのESRから得られる電子状態とその酸素親和依存性やα、βユニット依存性も興味深く共同研究を進めていく予定である。依然問題が残っているが新型Fabry-Perot共振器の安定性を向上させ微量(~μL)の試料でも整数スピン金属タンパク質の多周波ESRも容易に観測できるようにしたい。これを用い金属タンパク質のみならず、これまでESR活性がありながら研究対象になりえ

なかった様々な試料に応用していければと考えている。

4. 自己評価

独自の手法により、整数電子スピンの検出可能なENDOR装置に必要な多周波ESRの高感度化はほぼ実現できた。この高感度化の副産物として、40年来ベールに包まれていた鉄2価、 $S=2$ を持つデオキシヘモグロビン、ミオグロビンの多周波ESRを世界で初めて明確に出来た。この結果は、これまで不可能とされてきた様々な整数電子スピンをもつ金属タンパク質のESRを通して電子状態と機能相関等の研究に広く応用できることを示したといえる。酸素発生系に関しては、整数スピンを持つ S_1 状態のESRも観測できるようになったが、試料中の残存酸素の対処に手間取り、その解明が出来なかった点が悔やまれる。一方、ENDORに関しては高感度なハード、ソフトとも完成し測定可能になったが、目標とした整数電子スピン系の信号検出には温度、電磁波のパワー等の条件出しの段階であり、実現していない。このため、酸素発生機構(Mn_4Ca)のENDORによる測定、解析は手付かずとなってしまった。

5. 研究総括の見解

多周波 ESR の高感度化に成功したことは大いに評価出来る。これによって整数スピン ($S=2$)をもつデオキシヘモグロビンの ESR スペクトル測定に成功した。これは永年の課題が一応クリアされたといえるがその解釈も出来ればしていただきたかった。これは理論家との共同研究が必要であろうが、多周波ENDORもほぼ目処がついた。本研究の課題である光合成系の酸素発生中心である Mn_4-Ca クラスターの反応中間体で未解明のもの測定については今後に残された。2010年にこのクラスター部位の X 線結晶構造解析がなされたが肝心の水分子の位置はわかっていない。これを本研究で開発された ENDOR で解決してほしい。我が国ではこのような難易度の高い ESR 測定出来る施設は無いので是非とも今後継続的に研究出来る拠点にしてほしいものだ。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- M. Horitani, H. Yashiro, M. Hagiwara, H. Hori, “Multi-frequency and high-field EPR study of manganese(III) protoporphyrin IX reconstituted myoglobin with an $S = 2$ integer electron spin” *Journal of Inorganic Biochemistry* 102(4) 781–788 (2008) (2008/1/10)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)学会発表(国際)

学会発表(国際)

- H. Yashiro, M. Horitani, K. Takanari, M. Hagiwara, H. Hori, “Multi-frequency and high-field EPR study of a metalloprotein with a silent spin” *Asia Pacific EPR Society – EPR Symposium 2008* 2008/7/14 Cairns, Australia

学会発表(国内)

- H. Hori, K. Ninomiya, M. Horitani, H. Yashiro, M. Hagiwara, “The Low Lying Electronic States of the Ferrous High Spin ($S = 2$) Heme in Deoxy Hb Using High-sensitive Multi-frequency and High-field EPR Techniques” 第 48 回日本生物物理学会年会 (2010.9.21) 仙台

- 二宮謙太, 八代晴彦, 堀洋, 萩原政幸, “Development of a continuously frequency-variable EPR resonator to elucidate the electronic structures of deoxy-hemoglobin” 第 47 回日本生物物理学会年会 (2009.10.30–11.1) 徳島

・八代晴彦, 二宮謙太, 堀洋, 萩原政幸, “整数電子スピン系の測定に適した多周波 E
NDOR システムの開発” 日本物理学会 2009 年秋季大会 (2009.9.27) 熊本

・八代晴彦, 堀谷正樹, 柏木隆成, 堀洋, 萩原政幸, “High-Field and Multi-Frequency EPR
in Deoxyhemoglobin” 日本生物物理学会第 46 回年会 (2008/12/3) 福岡

・八代晴彦, 堀谷正樹, 柏木隆成, 堀洋, 萩原政幸, “周波数標準を用いた超高感度多周
波 ESR 装置の開発と整数スピン金属タンパク質への応用” 日本物理学会 2008 年秋季大
会 (2008/9/23) 岩手

(4) 招待講演

招待講演(国内)

・八代晴彦, 二宮謙太, 堀谷正樹, 堀洋, 萩原政幸, “High-field and Multi-frequency EPR
study of metalloproteins with non-Kramers ions” 第 47 回日本生物物理学会年会 シンポ
ジウム「生物物理と新世代の ESR」(2009.10.31) 徳島

・八代晴彦, 堀谷正樹, 幸田庄司, 柏木隆成, 堀洋, 萩原政幸, “整数スピン金属タンパク
質の測定が可能な高感度多周波 ESR 装置の開発” 分子研研究会「先端的 ESR
手法による分子性物質の新機能性探索」(2007/12/19) 岡崎