

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「物質現象の解明と応用に資する新しい  
計測・分析基盤技術」  
研究課題「多量子遷移 ESR による巨大分子の構造  
解析」

## 研究終了報告書

研究期間 平成16年10月～平成19年 9月

研究代表者：下山雄平  
(室蘭工業大学・教育研究支援機構・教授)

## § 1. 研究実施の概要

**要旨** 本研究の目的はタンパク質などの巨大分子の構造解析に用いる多量子遷移 (MQC) 電子スピン共鳴法 (ESR) によるナノメートルスケールの距離測定法開発の第一歩として、2 量子遷移 (DQC) を観測できる高性能の Ku バンドパルス ESR 装置を開発することにある。DQC を観測するために必要な広帯域励起、高速の位相操作・信号積算が可能な Ku バンド (17.5 GHz) パルス ESR 装置を開発し、ニトロキシドバイラジカルおよびニトロキシドラジカルバイラベルタンパク質について高感度での DQC を観測し、2-6 nm の距離測定、および実時間 (ESR スペクトル) とパルス間隔 (双極子スペクトル) の 2 次元測定による構造解析に成功した。さらに、距離測定データの解析システムの開発、新規 ESR 共振器の開発、複合タンパク質への応用の基礎研究を行った。

新規に開発した Ku バンドパルス ESR 装置について、マイクロ波システム、パルス制御・信号積算システム、装置性能検証のための距離測定結果につき、各項目の概要を述べる。

**マイクロ波システム** 本研究では周波数帯域が X バンドの 2 倍で、周波数増大によるスペクトルの広がりを見捨てる Ku バンド (17.5 GHz) をマイクロ波周波数として選択した。ESR 信号検出には Homodyne 方式を採用し回路の単純化を行った。ESR プローブには、マイクロ波磁場生成効率と ESR 信号の検出感度が高い誘電体共振器を開発して用いた。本プローブによって、マイクロ波パワー 2 kW、Q 値 50-100 において 4 mT のマイクロ波磁場を実現し、ニトロキシドラジカル ESR スペクトルの主要部分を励起することを可能にした。マイクロ波のパルス化には位相変調 1 段、パルス圧縮 2 段の計 3 段階の高速 PIN ダイオードスイッチを用い、最小パルス幅 2 ns を実現した。さらに高性能が期待できる共振器としてスロットアレイ共振器 (Slot Array Resonator, SAR) を新たに考案し開発した。

**パルス制御・信号積算システム** DQC 測定には位相サイクルに必要な最低 64 種のパルスパターン発生と、位相サイクルに付随した複素エコー信号の位相付き加算操作をナノ秒で高速処理することが必要である。本装置では市販で最高の時間分解能 (0.3 ns) を持つデータ・タイミング・ジェネレータ (DTG) でパルスパターンを生成し、分解能 1 ns の Analog to Digital Converter (ADC) でエコー信号を積算した。DTG の前処理時間および ADC の処理速度の問題を、独自のデータ構造に基づく制御・処理ソフトウェアを開発することによって解決し、100 kHz での高速の積算を可能にした。本装置の処理速度は現在の技術水準での最高のものである。

**データ解析** 観測データの前処理ソフトウェアおよび距離分布を考慮した距離解析ソフトウェアを開発した。距離解析では DQC 信号と DEER 信号 (電子-電子 2 重共鳴法、DEER) の統一的な解析を目指して、理論解析を行った。その結果、距離情報にはフーリエ変換法および Deconvolution 法を用いたが、更に距離分布情報をより正確に求めるために Tikhonov 正規化法 (TKIR) を適用し、解析ソフトウェアを構築した。

**測定例** 装置性能の検証のために、距離標準としての直線状バイラジカル、および 3 種のバイラベルタンパク質について DQC 距離測定を行った。

推定スピン間距離 2.7 nm の直線状バイラジカル (3 節のバイラジカル 1) は構造のばらつきによる距離分布が小さく、距離標準として有用である。2 ns パルスを用いた測定により明瞭な DQC の双極子変調を観測し、変調のフーリエ変換とスペクトルシミュレーションの比較によって歪のない双極子スペクトルであることを確認した。さらに、2 次元 ESR-双極子スペクトルからバイラジカルの異性体構造を決定した。構造をあらわに考慮したシミュレーションから得た平均ラジカル間距離は  $2.64 \pm 0.06$  nm であり、DQC 距離精度の高さを示すことができた。

バイラベルタンパク質系への応用として、トロポニン C およびラベル位置が異なる TF1-beta 2 種について DQC 距離測定を行い、いずれのタンパク質でも明瞭な DQC の双極子変調を観測できた。フーリエ変換による変調の解析からはトロポニン C で 2.7 nm、2 種の TF1-beta

ではそれぞれ 3.8 と 5.7 nm の距離を得た。より精密に距離分布を考慮した TKIR を用いた解析によるとトロポニン C では  $2.7 \pm 0.5$  nm、距離の長いほうの TF1-beta では  $5.0 \pm 1$  nm であった。これらは構造から推定された距離とよく一致し、本装置による距離測定の信頼性を示す。また、TF1-beta の 5 nm は現在報告されているタンパク質の距離測定例としては世界で最長距離の測定例の一つであり、本装置の性能の高さを示す。

## § 2. 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

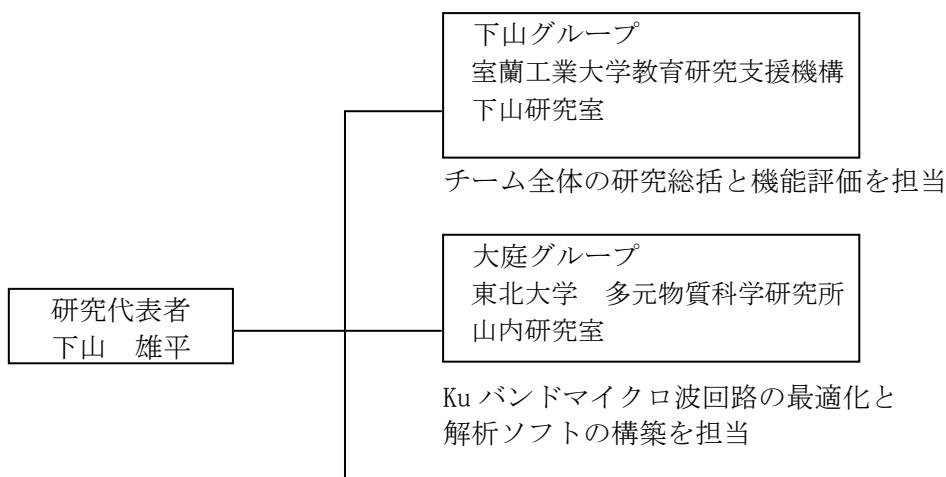
現在、巨大分子工業材料の多くは無秩序（アモルファス）状態にあり結晶化は困難を極める。例えば、合成高分子、無機ガラス、アモルファス半導体およびセラミックスは無秩序構造を有し、この特性が物性・機能を決定している。無秩序構造によって透明な光学材料が可能となるほか、特異せん断面が特定できないので力学的破壊が簡単には生じない。特にナノデバイスでは豊富な機能を持たせるために無秩序構造は不可欠とさえいわれる。それゆえ、無秩序なナノ構造の解析手段の開発が目下の工業技術にとって解くべき重要課題の一つである。

従来、巨大分子の構造解析には X 線回折法（XRD）が解析の主要手段とされてきた。しかし、XRD では目標物質の結晶化が必須である。一方、核磁気共鳴法（NMR）では結晶固体はもちろん無秩序固体や溶液状態での構造解析が可能であるが、0.5 nm 程度の短距離計測しかできない。また分子量 2 万を超える巨大分子では NMR の構造解析能力は発揮されない。この原因は NMR が核オーバーハウザー効果を用いる事による。近年、多次元 NMR の開発とともに分子量の壁を越える構造解析が可能となったが、それでも分子量 3 万が上限である。この欠落する距離情報（0.5–10 nm）の測定法と、それに伴う構造決定の困難性は ESR 法の適用によって解消されることが期待される。

市販の ESR である連続波（CW）ESR において距離に関連する双極子相互作用は超微細構造や g テンソルなどの磁氣的相互作用に邪魔され純粋に取り出せない。このため CW-ESR は 1 nm の距離測定が検出限界である。一方、パルス ESR 法はパルスシーケンスによって多量子遷移を誘起し、双極子相互作用を純粋に取り出すことによって距離情報が得られる。現在、この手法が巨大分子におけるナノ構造解析の有力な手法である。

現在解析が進められている生体高分子・タンパク質において解析機器として利用されている XRD や NMR には限界があり、パルス ESR 法を導入することにより巨大分子の解析技術の飛躍的な発展が期待できる。

### (2) 実施体制



小野 光弘グループ  
山形大学 工学部  
小野研究室

Ku バンド共振器および結合器の  
最適設計と開発を担当

水田グループ  
日本電子（株） 分析機器本部

高速AD変換装置の開発と、パルス  
発生器やAD変換装置を連携制御  
するソフトウェアの開発を担当

荒田グループ  
大阪大学・大学院理学研究科  
荒田研究室

バイラベルによる計測手法の開発による  
タンパク質の機能と構造の解析を担当

山崎グループ  
理化学研究所・横浜研究所

1. タンパク質試料の調製
2. NMR-ESR 統合的構造解析法 を担当

山本グループ  
京都大学 大学院・人間環境学  
研究科 山本研究室

多量子遷移ESR計測のための標識化  
化合物の合成を担当

Dzuba グループ  
ロシア科学アカデミー・化学反  
応研究所

Ku バンド TWTA の設計・製作を担当  
(H17 年度で終了)

中村グループ  
北海道教育大学 大学院教育学  
研究科

ラベル標品の合成を担当  
(H17 年度で終了)

## § 3. 研究実施内容及び成果

### 3. 1 成果の概要

ESR による構造決定では分子の 2 箇所に存在するラジカル間の距離を電子スピン間の双極子相互作用から求める。双極子相互作用を観測する方法として、二量子遷移は原理的に最良の方法であるが、広い帯域幅を持ち相互作用する 2 つの電子スピンを同時に励起できること、それに応じた短いマイクロ波パルスを生成できるマイクロ波回路、幅の狭いエコー信号を観測できる高速の信号サンプリング装置、複雑なパルス列を高時間分解能で作ることができるパルスパターン発生器が必要である。これらの装置性能に対する厳しい要請のため市販の X バンド (9 GHz) 装置で DQC 観測は困難である。本研究ではスピンラベルラジカルとして最もよく用いられるニトロキシドラジカルの DQC 観測に必要な上記の条件を満たす Ku バンドパルス ESR 装置を開発した。以下に、開発した Ku バンドパルス ESR 装置について、マイクロ波システム、パルス制御・信号積算システム、装置性能検証のための距離測定結果とその評価、さらに今後の展望について概要をまとめる。

#### 装置：1 マイクロ波システム

本研究では周波数帯域が X バンドの 2 倍で、周波数増大によるスペクトルの広がりを見ることができない Ku バンド (17.5 GHz) をマイクロ波周波数として選択した。ESR プロブはマイクロ波磁場 ( $B_1$ ) 生成効率と ESR 信号の検出感度が高い誘電体共振器と安定で結合可変度の大きい Gordon カプラーを用いて Ku バンド用に新たに開発した。この ESR プロブによって、マイクロ波パワー 2 kW、Q 値 50~100 において 4 mT のマイクロ波磁場 (励起帯域は 8 mT) を実現し、ニトロキシドラジカル ESR の主要部分を励起する条件を満たすことができた。検出方式には homodyne 検出を採用して回路構成を単純化した。マイクロ波の位相・パルス変調は 3 段階の高速 PIN ダイオードスイッチを用いて構成することにより、最小パルス幅 2 ns を実現した。将来さらに高性能の装置を開発する基礎として、新規パルス圧縮技術、およびさらに高性能が期待できる共振器として SAR を新たに考案した。

#### 装置：2 パルス制御・信号積算システム

高感度の DQC 測定には位相サイクルに必要な複雑多様なパルスパターン発生と、複素エコー信号の位相付きの加算操作をナノ~サブナノ秒の高速で行う必要がある。本装置では現在市販では最高の時間分解能 (0.3 ns) を持つ DTG でパルスパターンを生成し、分解能 1 ns の ADC で DQC 複素エコー信号を積算した。これらの装置は現在の技術水準では最高性能のものであるが、DTG の制御データ生成時間が長く、ADC の加算処理速度も十分ではない。そこで、独自のパターンデータ生成ソフトウェアを開発し、位相サイクルのためのパルス列とそのパルス列の双極子変調観測のためのパルス間隔の掃引をまとめて 1 つのパターンとして生成することによって、制御データ生成時間を大幅に短縮した。一方、現存する ADC ではこの速度で位相処理を含めた加算はできないため、ADC 上のメモリ空間にデータを分散して保存して単純な積算と位相付き加算処理を分離し、積算速度の高速化を行った。これによって一組の距離測定を正味 100 kHz の繰り返しで実行することを可能にした。

#### 性能の比較

本装置は世界で 2 例目となる Ku バンド ESR 装置である。現存する Ku バンドパルス ESR 装置 (Cornell 大) と性能を比較すると、励起帯域幅は約 1.5 倍、サンプリング時間分解能は 5 倍、パルス時間分解能はほぼ同等である。特にサンプリング時間分解能が高く、先鋭化した DQC エコー信号を効率よく正確に観測できる点で優れている。また市販の X バンド装置と比べると励起帯域幅は 2~4 倍、サンプリング時間分解能は 4 倍、パルス時間分解能は 3 倍であり、また試料の量が 1/10~1/5 である点でさらに感度が高い。

## データ解析

測定データの解析のために、観測データの前処理ソフトウェアおよび距離分布を考慮した距離解析ソフトウェアをあらたに開発した。距離解析では DQC 信号と DEER 信号の統一的な解析を目指して、理論解析を行った。その結果、距離情報にはフーリエ変換法および Deconvolution 法を適用し、その解析ソフトを開発した。また、距離分布情報をより正確に求めるために逆問題法を応用し、Tikhonov の正規化法 (TKIR) による解析ソフトウェアを開発した。

## 応用測定

装置の性能を評価するために、直線状のバイラジカル、および特定の位置にニトロキシドラジカルを付加した 3 種類のバイラベルタンパク質 (トロポニン、TF1-beta) で DQC 距離測定を行った。

推定スピン間距離 2.7 nm の直線状バイラジカル (3. 2 節のバイラジカル 1) は構造のばらつきによる距離分布が小さく、距離標準として有用である。2 ns パルスによる測定によって、従来の 3 ns パルス測定よりも明瞭な DQC の双極子変調を観測できた。変調のフーリエ変換スペクトルとシミュレーションスペクトルの比較から、双極子スペクトルの励起帯域の制限による歪が 2 ns パルスでは殆どないことを示した。また、実時間 (ESR スペクトル) とパルス間隔 (双極子スペクトル) の 2 次元測定による ESR-双極子スペクトル相関からラジカル配向を解析し、バイラジカルの異性体構造を決定した。これは 2 次元 DQC 法の有用性を示す。構造をあらわに考慮しシミュレーションによるラジカル間平均距離は  $2.64 \pm 0.06$  nm、分子の内部回転による寄与を除いた距離分布は 0.04-0.06 nm となり、DQC 法の距離精度の高さを示すことができた。

タンパク質系への応用としてトロポニン C およびスピンラベル位置の異なる TF1-beta タンパク質 2 種について DQC 距離測定を行い、いずれのタンパク質でも明瞭な DQC の双極子変調を観測できた。フーリエ変換による変調の解析からはトロポニン C で 2.7 nm、2 種の TF1-beta ではそれぞれ 3.8 と 5.7 nm の距離を得た。より精密な解析のために距離分布を考慮した TKIR 法を用いた結果、トロポニン C では  $2.7 \pm 0.5$  nm、TF1-beta の距離の長いもので  $5.0 \pm 1$  nm を得た。これらは構造から推定された距離とよく一致し、本装置による距離測定の高信頼性を示す。また、TF1-beta の 5 nm は現在報告されているタンパク質の距離測定例としてはもっとも長いものの一つであり、本装置の性能の高さを示す。

## DQC 法と DEER 法の比較

パルス ESR 法による距離測定には DQC 法と DEER 法がある。DEER 法では ESR スペクトルの一部分のみしか観測できないため、信号強度が小さく、また、双極子スペクトルの歪を避けることができない。これに対し、本研究で示した 2 ns パルス DQC 法ではスペクトルの殆どの部分を励起していることおよび DEER で見られる大きなベースラインが無いこと、双極子スペクトルに殆ど歪がなく、より正確な距離とその分布を与える。また DQC 法では 2 次元化によって配向に関する知見を得ることもできる。これらの情報は DEER 法では得ることができない。試料の量は Ku バンドでは 10-20  $\mu$ l で X バンドの 200-300  $\mu$ l よりもはるかに少ない。測定感度をこの試料の量を考慮して比較すると、Ku バンド DQC の感度は X バンド DEER の 5 倍程度であった。

## 今後の展望

装置性能の向上：マイクロ波周波数を上げ、Q バンド (35 GHz) を用いることによって感度、帯域幅を改善できる。感度の向上でより希薄な溶液を使えることは、分子の会合の問題や分子間の双極子相互作用を避けるうえで重要である。また、2 次元スペクトルの分解能の向上も期待できる。本研究で開発したパルスパターン発生システム、ADC システムなどはマイクロ波回路を除いて全て Q バンドでの DQC 測定に十分な性能を持っている。マイクロ

波回路の問題は本研究で開発したパルス幅圧縮技術およびヘテロダイン検出方式を採用することによって解決できると考えている。

応用：従来構造解析の難しかった系への応用、NMR と DQC-ESR と組み合わせた新規構造決定法の開発が期待される。本研究ではタンパク質複合体、膜タンパク質高次タンパク質複合体などについて予備研究を行った。

解析法：分子動力学を用いた距離分布の解析法の基礎研究を行ったが、これはタンパク質の構造の揺らぎと機能の相関の研究に有用であると考ええる。

### 3. 2 Ku バンドパルス ESR 装置組み立てと調整および測定 (東北大学 大庭グループ)

#### 目的

本プロジェクトの目的はラジカル間の双極子相互作用の観測によって、ナノメートルスケールの距離測定を行うことである。双極子相互作用は距離の3乗に反比例し、ナノメートルを超える長距離では数 MHz 以下となる。ここで目的とする有機ラジカルの電子スピン共鳴 (ESR) に寄与する様々な相互作用は数 MHz から 100 MHz のオーダーであり、その中から双極子相互作用のみを抽出するために、2量子遷移を観測する。東北大グループの目的はこの2量子遷移を観測できる Ku バンドパルス ESR 装置の開発である。

#### (1) 研究実施内容及び成果

#### 実施方法

- a) DQC による距離測定を目的としたパルス ESR 装置に必要な性能を検討し、その仕様を決定した。
- b) マイクロ波信号の生成・検出部である SHF Unit、SHF Unit 制御部、静磁場発生用電磁石システムとその制御部、パルス信号発生システム、高速データサンプリングシステムおよびそれらの制御ソフトウェアを日本電子グループが担当した。
- c) ESR プローブおよび He 冷却システムの設計と試作を行った。
- d) 上記をくみ上げてパルス ESR システムを構築した。
- e) マイクロ波信号そのものおよび ESR 観測に基づいて装置の性能評価および改良を行った。
- f) 距離標準としての化学合成されたバイラジカル、およびいくつかのスピラベルタンパク質についての DQC による距離測定を行った。
- g) 測定データの処理ソフトウェア、スピンハミルトニアンとモデル構造に基づいた DQC 双極子スペクトルの解析ソフトウェアの開発を行った。

#### 実施内容

##### (1) -1 装置の仕様の決定

距離測定に使用されるスピラベルラジカルは NO ラジカルである。NO ラジカル ESR パラメータに基づき DQC 信号を観測するのに必要な装置の性能を検討し決定した。

##### (1)-1-1 測定対象、条件

測定試料は固体、溶液を問わないが、観測する双極子相互作用はきわめて小さく、分子回転によって容易に平均化され消失する。したがって、試料温度は He 温度から窒素温度の範囲とする。

##### (1)-1-2 マイクロ波周波数とパルスパラメータ

DQC は2つの電子スピンが同時に励起されたときにのみ生成するため、できるだけ広い範囲のスペクトルを励起する必要がある。図 3-2-1 に示すように X から Q バンドの NO ラジカルの ESR スペクトル幅は 8~9 mT であるから、これを全て励起するにはマイクロ波磁場  $B_1$  は 4 mT 以上必要である。これに対応して、90°パルスの幅は 3ns 以下となる。現在一般的に使用されている ESR のマイクロ波周波数 9 GHz (X バンド) の最小パルス幅は約 5~8ns、 $B_1 = 1.8$  mT 程度であり、この値の実現は難しい。より強い  $B_1$  を得るためにはより高いマイクロ波周波数を用いて試料共振器体積を小さくし、単位体積あたりのマイクロ波パワーを大きくすることが必要である。図 3-2-1 から、Q バンド以上では g 値の異方性に比例してスペクトル幅が増大するため、必要な  $B_1$  も増大し、マイクロ波周波数をあげる効果がなくなる。したがって g 値によるスペクトルの広がり重要ではなく、X バンドよりも高い Ku バンド



(17.5 GHz) もしくは Q バンドがマイクロ波周波数として望ましい。一方、マイクロ波回路を構成するデバイスの性能は周波数が高いほど劣化する。デバイスの成熟度を考慮し、本研究ではまず Ku バンドを選定した。

### (1)-1-3 試料共振器

試料共振器はマイクロ波を試料に照射し、発生した ESR 信号を検出するために用いられる。共振の鋭さを表す Q 値は高いほど感度が高くなり、また、照射するマイクロ波パワー当たりの  $B_1$  も大きくなるが、一方、励起および観測帯域は小さくなる。DQC 観測では 2 スピンの同時励起という条件があるので、帯域を優先した。共振周波数を  $\nu_0$ 、共振エネルギーが半分になる周波数を  $\nu_0 \pm \Delta\nu$  とすると  $Q = \nu_0 / (2\Delta\nu)$ 、また 8 mT に相当する周波数スペクトル幅は約 220 MHz であるから、Ku バンドでは  $Q \leq 80$  となった。Q 値が小さいことによる感度と  $B_1$  の低下を補うため、充填率の高い  $Al_2O_3$  (比誘電率 10) の誘電体共振器を採用した。数値計算による比較から、誘電体共振器は空洞共振器と比べて 25 倍程度充填率が高く、Q が 25 倍高い共振器と同等である。これより、誘電体共振器では空洞共振器と比べて約 5 倍の  $B_1$  と一桁高い感度を得ることができる。

試料共振器とマイクロ波回路を結びつけるデバイスが結合器 (coupler) である。結合器は単にマイクロ波パワーの伝達のみでなく、マイクロ波回路と共振器のインピーダンス整合を行う点で重要である。誘電体共振器そのものは 10000 を超える高い Q を持つため、結合器によるインピーダンスの不整合によって Q 値を落とす。ここでは整合の調整範囲が広く、機械的な安定度に優れていることから Gordon coupler を採用した。

### (1)-1-4 マイクロ波増幅器

短パルスで高マイクロ波磁場を発生するために高出力のマイクロ波源が必要である。4 mT のマイクロ波磁場を生成するために必要なマイクロ波パワーを 1.3 節で述べた誘電体共振器について計算した結果、必要なマイクロ波パワーは 1~2 kW となった。パルス動作が可能な 1 kW 以上の増幅器として、進行波管増幅器 (TWTA) を採用した。

### (1)-2 Ku バンドパルス ESR 装置

本プロジェクトで開発した Ku バンドパルス ESR 装置のブロック図を図 3-2-2 に示す。主要部分の仕様は表 3-2-1 にまとめた。各部分の動作の概要は以下のとおりである。各種制御パルスは PC で制御される 2 台の DTG および Pulse Generator で作り、SHF Unit、TWTA、ADC に供給される。マイクロ波パルスは SHF Unit で発振し TWTA で増幅後、サーキュレータを経て He クライオスタット内の ESR プローブ (試料共振器) に供給される。共振器から反射した ESR 信号はサーキュレータによってマイクロ波パルス入力と分離され、マイクロ波周波数と ESR 共鳴周波数の差周波数として SHF Unit 内の Mixer によって検出・増幅後 ADC

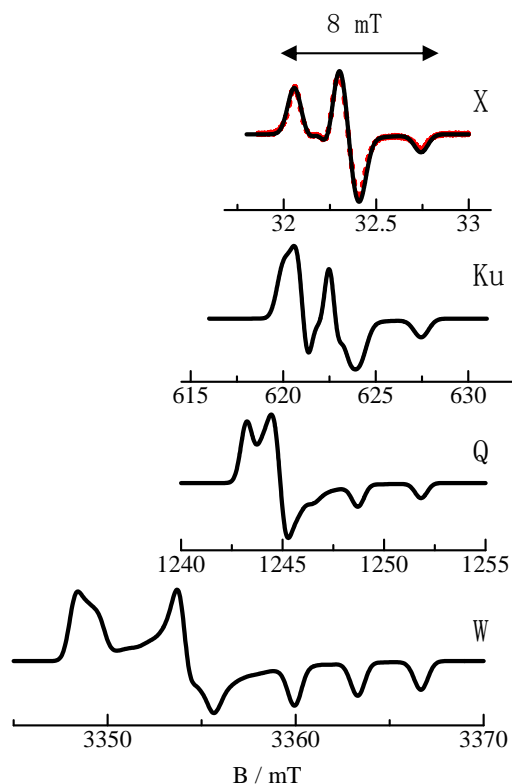


図 3-2-1 X, Ku, Q, W バンド (それぞれ 9.5, 17.5, 35, 95 GHz) マイクロ波周波数における NO ラジカルの ESR スペクトル

によってデジタル信号に変換してPCに取り込まれる。

東北大グループで開発を行った部分について、以下に詳細を述べる。

表 3-2-1. 主要部分の仕様

名称	仕様その他
TWTA	Applied Systems Co. 127Ku traveling wave tube amplifier, 2 kW
DTG	Tektronix DTG5334 data timing generator, 0.3 ns resolution, 16 channel
PG	Stanford Scientific Inc. DG535 pulse generator, 4 channel delay, 0.1 ns resolution
ADC	Acqiris AP240 analogue to digital converter, 1 G sample, 2 channel
Cryostat	JANIS Research Co. SUPERRAN-VP Cryostat System, STVP-200 He flow cryostat, 2~300 K
FC	Anritsu MF2414B microwave frequency counter
GM	Echo Electronics Co. EFM-200AX gauss meter

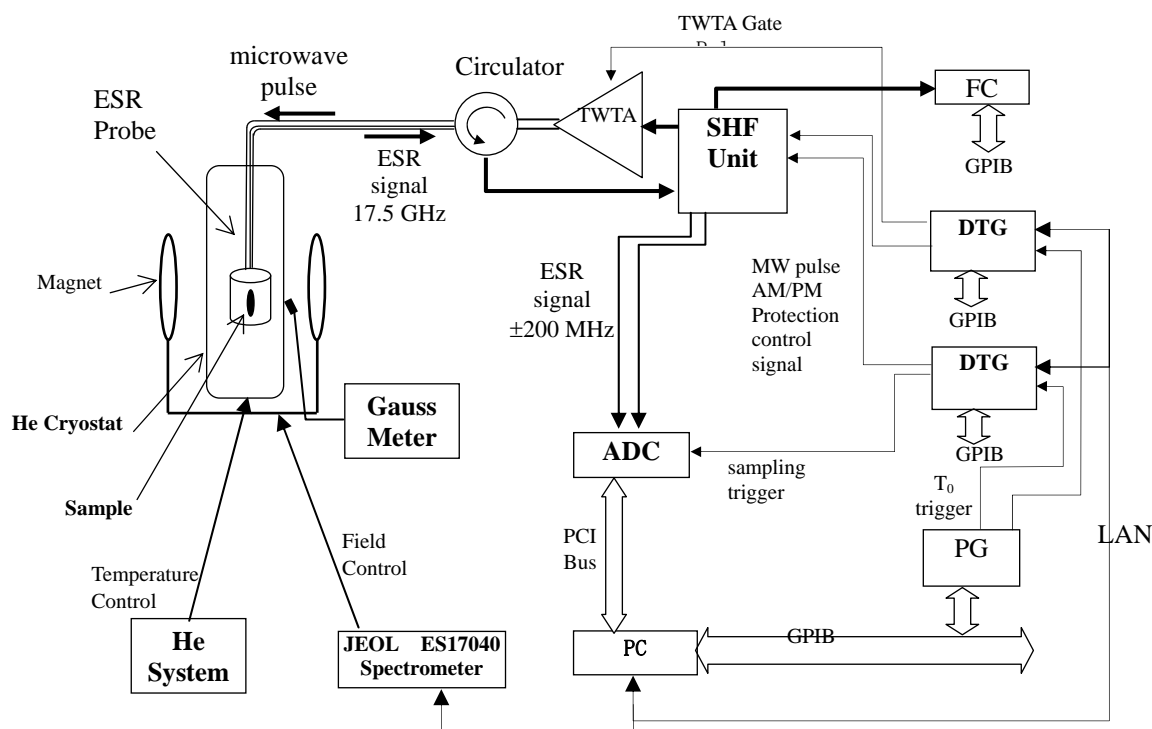


図3-2-2 Kuバンドパルス ESRのブロック図

図中MWと書いた信号はマイクロ波信号（～17.5 GHz） TWTA出力およびCirculatorと ESRプローブ接続は標準導波管WR62およびWR51 各部分の仕様は表3-2-1を参照

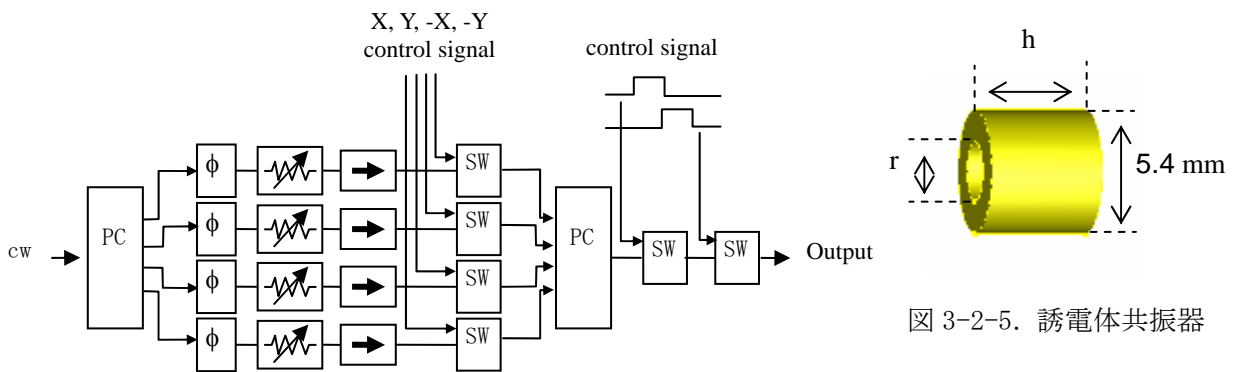


図 3-2-5. 誘電体共振器

図3-2-3 マイクロ波パルス化回路

φ: phase shifter, [attenuator symbol]:attenuator, [isolation symbol]:isolation, [SW symbol]: PIN diode switch, [PC symbol]: power coupler

(1)-2-1 マイクロ波パルス発生部

マイクロ波のパルス化装置を図 3-2-3 に示した。Gunn 発振器の連続波 (CW) 出力を互いに位相が 90°ずれた 4 つ (X, Y, -X, -Y) に分割し、それぞれを PIN スイッチを用いてパルス化した後、電力結合器を用いてひとつにまとめ、さらに 2 個の PIN スイッチによって整形する。

整形段の 2 個のスイッチに 10 ~ 20 ns ずらした制御信号を用いることによって、単独のスイッチでの最小パルス幅 5 ns よりもさらに短いパルスを生産する。同時に、整形段は各位相での PIN スイッチの特性の相違によるタイミングのずれを除くことができる。

(1)-2-2 ESR プローブ

本研究で開発した低温用 ESR プローブを図 3-2-4 に示す。図中 A から下の部分がクライオスタット内に挿入され、He ガスによって 2~300 K に温度設定される。B は外部との断熱のためのキュプロニッケル製導波管で、その先に Gordon Coupler と誘電体共振器を収めたシールドが付いている。

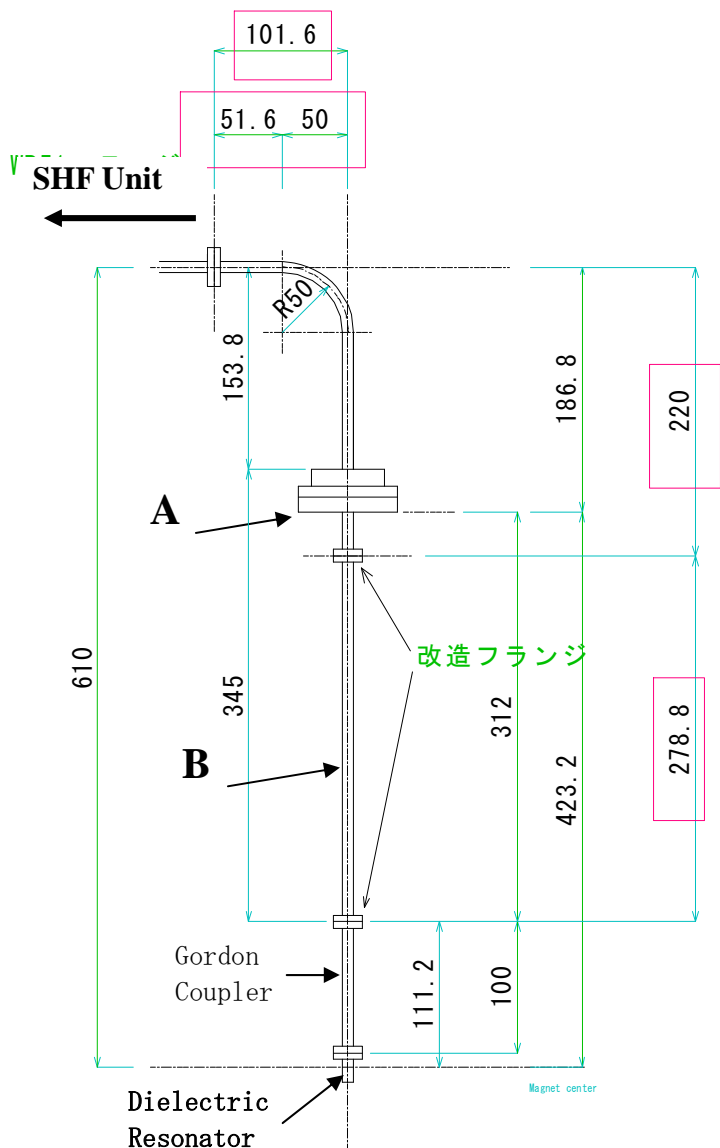


図 3-2-4 ESR プローブ.

a) 誘電体共振器

1 節で述べたように DQC 観測では強いマイクロ波磁場  $B_1$  が必要である。共振器に蓄えられるマイクロ波エネルギーは  $|B_1|^2$  を有効体積について積分した値に比例するから、DQC 観測では共振器は小さいほど良い。媒体中のマイクロ波の波長は誘電率の  $-1/2$  乗に比例するから、比誘電率の高い材質を用いることによって共振器を小型化できる。通信などの分野においても装置の小型化、周波数安定化などの目的で誘電体共振器が広く使われており、様々な誘電率のマイクロ波材料がある。本研究では比誘電率が 10~20 の  $MgO$ 、 $Ti_2O_3$ 、 $Al_2O_3$  などのセラミック誘電体を検討した。この中で、常磁性不純物が最も少ないことから比誘電率 10 の  $Al_2O_3$  のセラミック誘電体を選定した。

誘電体共振器はその外形寸法と同時に、外部のシールド、内部に置いた試料、周囲の支持構造などで共振周波数が大きく変わる。これを解析的に計算することは非常に難しいため、ここでは Maxwell 方程式の数値解を用いた電磁場解析 (MicroStripes) によって行った。一例として図 3-2-5 に示した形状の誘電体共振器について、共振周波数の共振器サイズ依存性の計算結果を表 3-2-2、3 に、また、共振器内の試料および支持構造の効果の計算結果を表 3-2-4 にまとめた。

表 3-2-2. 共振周波数  $\nu$  の高さ  $h$  依存性

h (mm)	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
$\nu$ (GHz)	18.866	18.352	17.917	17.612	17.351

表 3-2-3. 共振周波数  $\nu$  の試料穴径  $r$  依存性

r (mm)	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0	3.2
$\nu$ (GHz)	16.974	17.142	17.387	17.556	17.759	18.138	18.584

表 3-2-4. 共振周波数  $\nu$  の共振器環境依存性

環境条件	$\nu$ (GHz)	$\Delta\nu^*$ (MHz)
共振器単体	17.682	0
支持構造有 (テフロン)	17.150	-532
試料有 ( $\epsilon_r = 3.17$ )	16.958	-724
試料有 (凍結トルエン $\epsilon_r = 3.17$ )	17.043	-639

\* $\Delta\nu = \nu - \nu$  (共振器単体)

b) Gordon Coupler

Gordon Coupler は共振器を外部マイクロ波回路と結合するデバイスである。図 3-2-6 (A) に示したように、テーパーで導波管を狭めた部分にテフロンを挿入し、このテフロンが導波管内を移動できるようになっている。狭い部分は 17.5 GHz 信号が伝播できないが、テフロンを挿入することによって伝播できるようになる。したがって、テフロンの挿入度を変えることによって共振器に達するマイクロ波のパワーを調整できる。Ku バンドの Gordon Coupler の報告は無いので、本研究では数値解析を用いて、新たに設計した。主要なパラメータは導波管の絞り幅 (図 3-2-6 (B) の d) および絞りと通常幅部分の間のテーパー長さ (図 3-2-6 (C) の r) である。設計では 1) テフロンなしでは 17.5 GHz が cut off となること、2) テフロン挿入時に 17.5 GHz 信号が反射せず透過することを条件として、これらのサイズを決定した。

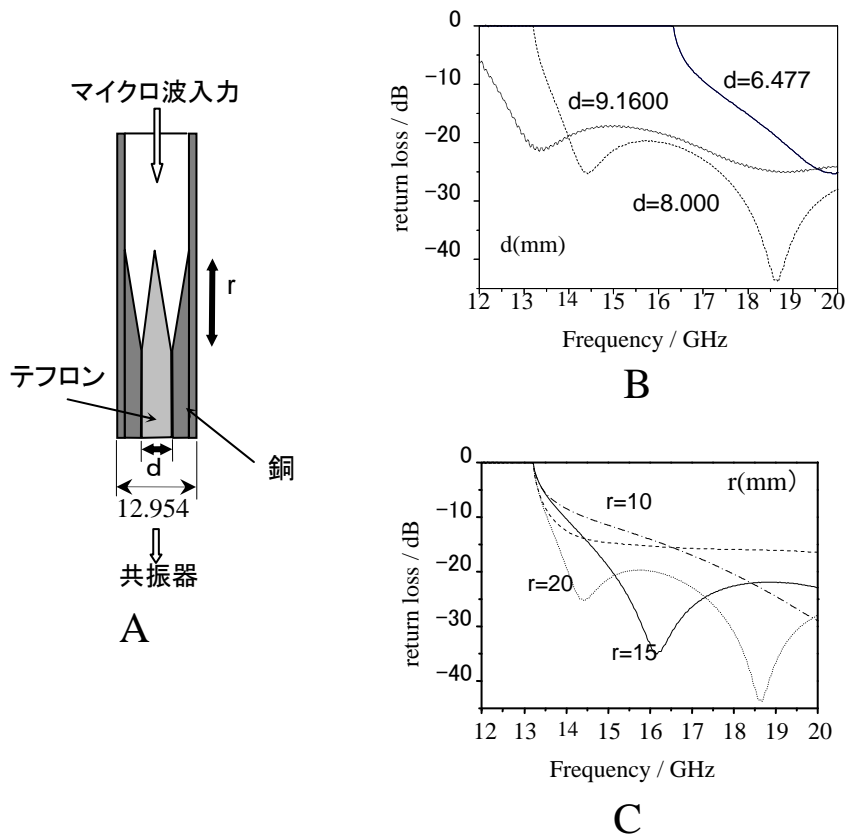


図3-2-6 Gordon Coupler (A)、と数値解析によるReturn Lossの絞り幅  $d$  およびテーパ長さ  $r$  依存性 (B, C)

### (1)-2-3 ヘリウムシステム

図 3-2-7 に JANIS Research Co. SUPERRAN-VP Cryostat System をもとに構築した He システムのブロック図を示す。液体 He は容器からトランスファーチューブを通して熱交換器で温度を調整した後、ESR プロブ・測定試料を冷却し、流量計バルブを通して回収ラインに導かれる。採用した JANIS 社のシステムは本来液体 He の移送を液体 He 容器の加圧で行うようになっているが、室温からの冷却の際はダイアフラムポンプを用いて吸い上げ方式で移送する。これによって、室温から 2 K (熱交換器の温度) までの冷却にかかる時間を 2 時間から 15 分程度に短縮できた。測定時は本来の加圧方式で移送し、He の流量はトランスファーチューブ先端と流量計のバルブで調整する。温度制御は熱交換器内のヒータと GaAs 温度センサーで行い、試料温度は ESR プロブの共振器シールドに取り付けた GaAs 温度センサーで測定する。約 40 L の液体 He で 5 ~ 6 日間の連続運転が可能で、その間の温度安定度は 50 K で  $\pm 0.5^\circ$  (試料温度センサーでの値) であった。

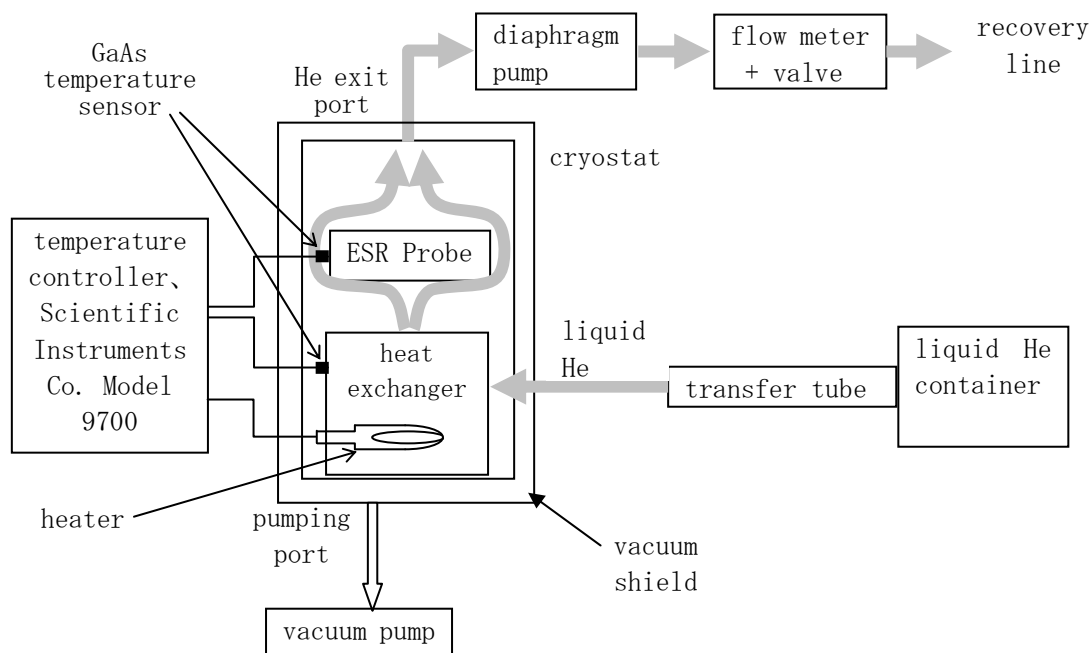


図 3-2-7. He システム

(1)-3 成果

(1)-3-1 Ku バンドパルス ESR の性能評価

ここでは開発した Ku バンドパルス ESR の主要な性能について評価した結果を述べる。最終的な装置性能を表 3-2-5 にまとめた。DQC 信号の測定による評価に当たっては阪大グループより提供されたスピンラベルヘリックス、京大グループよりのバイラジカル 1 (図 3-2-8)、山形大グループよりの $\gamma$ 線照射石英の E' センター、4-oxo-TEMPO を用いた。

表 3-2-5. Ku バンドパルス ESR 装置の主な性能

最小パルス幅	2 ns
最大マイクロ波磁場 $B_1$	5 mT
最小パルス間隔	30 ns
パルサー時間分解能	0.3 ns (パルス幅については 0.1 ns)
Q	50 - 5000
最大マイクロ波パルスパワー	2 kW
測定感度	$10^{15}$ スピン (1 ショットで SN=1 の DQC 信号)
試料温度	2~300 K
試料体積	10~15 $\mu$ l

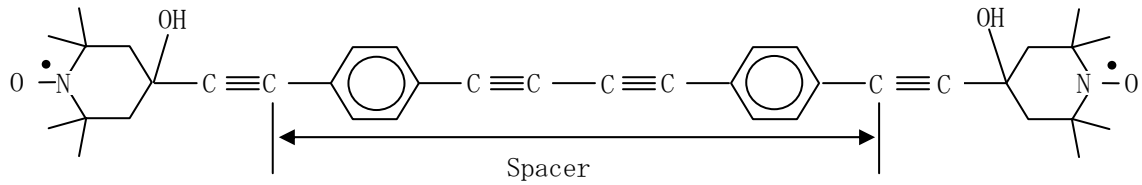


図 3-2-8. バイラジカル 1

DQC 測定には図 3-2-9 に示した 6 パルス列を用い、エコー信号から 64 ステップの位相サイクルで DQC 信号を選択した。DQC 双極子変調は図中の  $T$  を一定として、 $\tau$  を変えて行く観測されるエコー強度の変調である。

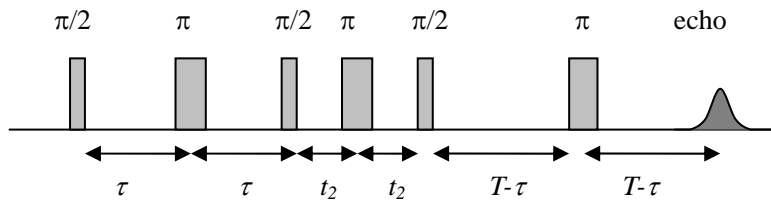


図 3-2-9. DQC 6 パルスシーケンス.

#### (1)-3-1-1 最小マイクロ波パルス幅

TWTA 出力の 40dB 結合器を用いて組み込んだ TWTA のモニタ出力を高速ダイオードで観測したマイクロ波パルス波形を図 3-2-10 に示す。PIN ダイオードスイッチ内部の信号遅れにより、スイッチ単体の最小パルス幅は 5 ns に制限されている。PIN スイッチの立ち上がり立下り時間は図 3-2-10 の 3 ns パルスを見ると分かるように 1 ns 以下であり、本来より短いパルスの生成が可能である。本装置ではこのスイッチを 2 個直列にし、10 ns 程度ずらして駆動することによって 5 ns 以下のパルスを作った。図 3-2-10 の 2 ns は本装置の最小パルス幅である。ほぼガウス型になっており、このスイッチの限界のパルス幅を達成することが出来た。

より高い周波数の ESR ではさらに短いパルスが必要になってくるが、一方、PIN スイッチの性能は悪化する。例えば、Q バンドの PIN スイッチの最小パルス幅は 10 ns である。本研究ではさらに高周波数への将来の進展を考慮し、周波数通倍技術を用いた新しいパルス幅の短縮技術を開発した。この技術は周波数通倍デバイスの非線形性を利用している。例えば入力周波数を 4 通倍するデバイスは入力信号の 4 乗の乗算を行うことと等価な動作をしている。したがって、パルス信号の立ち上がり/立下りの形を表す関数も 4 乗され、これによってその傾斜は急峻になる。即ち、ON/OFF の切り替え時間が短縮される。市販のデバイスではこのようなパルス動作を目的として設計されていないため、この原理のように単純ではないが、Gaussian パルスのような場合にはかなりのパルス幅の短縮が期待される。本研究では実際に 4.375 GHz の 2.5 ns パルス を 4 通倍して 17.5 GHz の 1.5 ns パルス を生成することに成功した。

(1)-3-1-2 マイクロ波磁場強度

幅  $t_p$  のパルスで磁化を角度  $\theta$  回転させるのに必要なマイクロ波磁場  $B_1$  は下式で計算される。

$$B_1 = \frac{h}{2\pi t_p g \beta} \theta$$

ここで、 $h$  は Plank' s Constant、 $\beta$  は Bohr 磁子である。この式からわかるように、パルス幅の短さに応じて大きなマイクロ波磁場  $B_1$  が必要である。ラジカルの  $g$  値を 2 と近似すると、2 および 3 ns 幅 90°パルスの  $B_1$  はそれぞれ 4.3 および 2.9 mT となる。本研究ではマイクロ波領域で試料に印加されている実際の  $B_1$  をもっとも精度良く測定できる過渡的章動法 (Transient Nutation) を用いた。これはパルス幅を変えながらエコーまたは自由誘導減衰信号 (FID: Free Induction Decay) を観測すると、その強度が章動周波数  $\nu_{TN} = g\beta B_1 / h$  の周波数で変調されることから、 $B_1$  を求める方法である。図 3-2-11 は  $\gamma$  線照射によって生じた石英中の E' センターの ESR 信号を用いて観測した 2 次元章動スペクトルである。ESR の offset 周波数 0 MHz での章動周波数とこのときのマイクロ波パワーから 2 kW 出力での  $B_1$  は約 4~5 mT であった。この値は 2 ns の 90°パルスを十分に発生できる値である。本装置では TWTA 出力以後の接続を全て導波管を用いて構成して極めて低損失な出力回路を構成したことによって、この高い  $B_1$  を実現した。

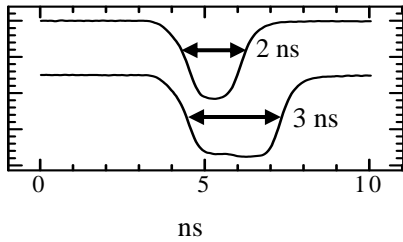


図 3-2-10. マイクロ波パルス波形  
TWTA モニタをダイオードで検出

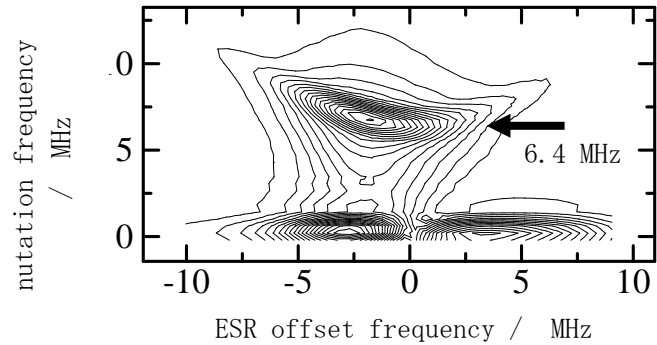


図 3-2-11.  $\gamma$  線照射石英中の E' センターの 2D Nutation スペクトル

(1)-3-1-3 マイクロ波パルス位相精度

DQC 測定では多数の不要なエコー信号から DQC を経過したものだけをマイクロ波パルスの位相サイクルで選択するため位相精度が重要である。本装置では日本電子製の 4 位相パルス発生器を Ku バンド用に改良した。また、TWTA のバイパス回路の追加により、QIFM (Quadrature Intermediate Frequency Mixer) でパルスの位相を直接観測し、容易に調整できるようにした。位相精度の見積もりは難しいが、QIFM、IF アンプの位相、強度バランスで決まる最良値に設定可能である。位相サイクル後の不要信号の残留量を指標としてみると 5% 以下である。

(1)-3-1-4 帯域幅

帯域幅を決める要因としてマイクロ波回路と結合したときの  $Q$  値、loaded  $Q$  ( $Q_L$ )、が重要である。広い帯域を要求される DQC 測定では、 $Q_L$  が小さいため、共振器からの反射電力測定やパルス応答などの通常の方法ではこれを観測することができなかった。そこでここでは  $Q_L$  を直接求めるのではなく、ESR の観測によって帯域を評価した。評価は以下に述べる二つの方法によった。



a) 図 3-2-12 は様々なマイクロ波周波数で測定した 2 パルススピンエコー信号である。この測定では励起パルスの条件が一定であるので、各マイクロ波周波数で共振器内に生成する横磁化の大きさは同じであるから、エコー強度のマイクロ波周波数依存性は主に  $Q_L$  値を反映した周波数による感度の違いを表す。図の結果から観測の帯域幅は $\pm 200$  MHz 程度と見積もった。

b) エコー信号をフーリエ変換し、実際に励起・観測された ESR スペクトルの幅で評価した。これは励起スペクトルと観測の帯域幅双方に依存するため、直接励起帯域と考えることはできないが、実質的にどの程度の範囲のスペクトルを観測しているかを見ることができる。図 3-2-13 は 2 および 3 ns  $90^\circ$  パルスで観測したバイラジカル 1 の DQC エコーのフーリエ変換スペクトルである。比較のためにシミュレーションによる周波数掃引スペクトルを破線で示した。3 ns、2 ns パルス測定を比較すると、ほぼパルス幅の短縮に応じた観測スペクトル領域の拡大が見られる。これより、 $Q_L$  値が低く、2 ns パルスでも有効に  $B_1$  が発生していることが確認できた。

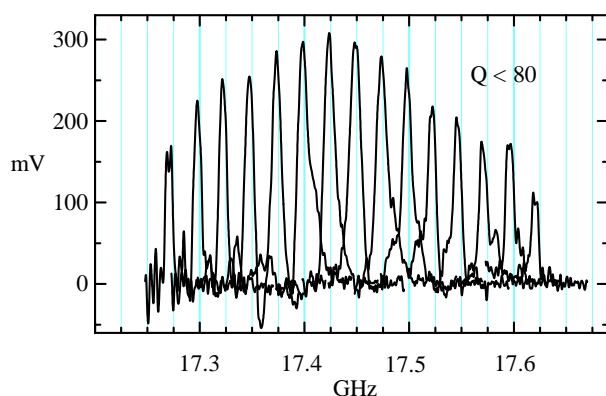


図 3-2-12. NO ラジカルをラベルしたヘリックス凍結溶液の 2 パルス ESE 信号、50 K 各マイクロ波周波数で共鳴条件を満たすよう磁場を設定し、 $120^\circ - \tau - 120^\circ$  パルス列を用いた。

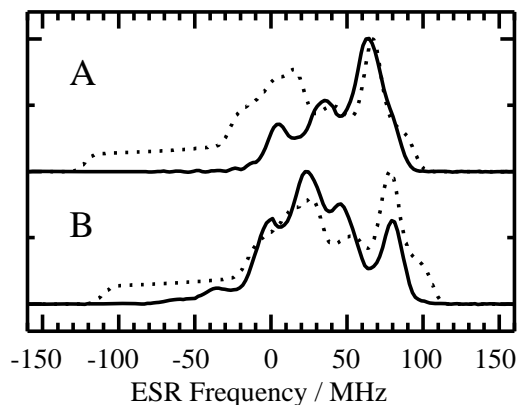


図3-2-13. バイラジカル 1 の 0.1 mM トルエン凍結溶液の DQC エコーのフーリエ変換スペクトル、50 K 測定は 6 パルスを用い、3 ns  $90^\circ$  パルス (A) および 2 ns  $90^\circ$  パルス (B) による測定である。180°パルスの幅はこの 2 倍である。図の破線は磁場掃引 ESR スペクトルので決定した  $g$ 、超微細相互作用、線幅行列を用いて計算したスペクトル。

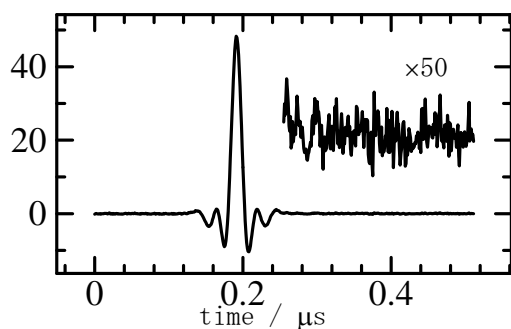


図 3-2-14. 0.125 mM バイラジカル 1 トルエン溶液の DQC エコーとノイズ 6 パルス 64 位相サイクルで測定、1000 回積算 (測定時間 64 秒)。

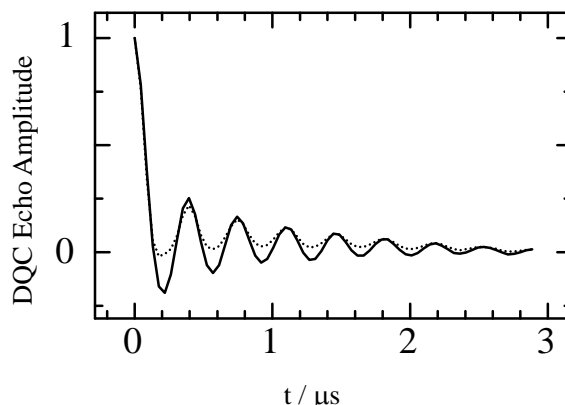


図3-2-15. バイラジカル 1 の 0.125 mM トルエン/THF (4 : 3) 凍結溶液で観測された DQC 信号の双極子変調、50 K 実線は 2 ns  $90^\circ$  パルス、破線は 3 ns  $90^\circ$  パルスによる測定。

### (1)-3-1-5 測定感度

ESR の測定感度で最も重要なのは  $Q_L$  値と検出系の損失である。感度は  $Q_L$  にほぼ比例するため高いほうが良いが、前にも述べたとおり、パルス ESR では帯域を優先して  $Q_L$  を大きくできない。検出系の損失は主にミキサ前段の GsAsFET 増幅器の保護回路によっている。GsAsFET 増幅器は過大入力に非常に弱いため、共振器から反射してくるマイクロ波パルスを防ぐために入力にパワーリミッタおよび PIN ダイオードスイッチを入れている。これらのデバイスの損失がそれぞれ 1~2 dB 程度あり、コネクタなどを入れると 3~4 dB の損失である。感度が必要な場合はパワーリミッタをバイパスして約 1.5dB 感度を向上できるが、パルスタイミングに注意が必要である。

実際の測定感度を求めるために実測の DQC 信号の信号雑音比 (SNR) を求めた。図 3-2-14 はバイラジカル 1 の 0.125 mM トルエン溶液の DQC エコーである。雑音振幅の最大値とエコー強度から求めた SNR は 58.6 であった。積算回数、位相サイクル数を考慮して、パルス列 1 回当たりの SNR に換算すると約 0.5 である。用いた試料溶液量は 10~15  $\mu\text{l}$  であるから、これから計算すると SNR が 1 となるスピンの数は  $1.3\sim 1.9\times 10^{-9}$  モル ( $0.7\sim 1.1\times 10^{-15}$  スピン) である。充填率の高い誘電体共振器を用いることにより、このような微量の試料の測定が可能になった。

### (1)-3-2 距離測定への応用

本プロジェクトで開発した Ku バンドパルス ESR で行った DQC 距離測定の例を、構造の明確なバイラジカル、およびいくつかのスピン・バイラベルタンパク質について述べる。

#### (1)-3-2-1 バイラジカル 1 (試料提供：山本グループ)

本プロジェクトで目標としているナノメートルオーダーの構造を持つ分子では一般に構造に自由度が多く、距離を明確に規定することが困難な場合が多い。バイラジカル 1 は堅固な構造を持ち、NO ラジカル間の距離が明確に規定できることが予想され、距離測定法の検討に好適な化合物と考えた。取り扱い上の問題として、これを良く溶かす溶媒が少ないことがあった。過去の文献 (R. E. Martin, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**, 2834-2837) においても polystyrene に希釈した状態で ESR 測定をおこなっている。我々はガラス状態で凍結するトルエンとの混合溶媒を用いてこの問題を解決した。バイラジカル 1 はトルエンにはほとんど溶けないが、混合溶媒では数 mM の濃度を得ることができた。図 3-2-15 に DQC 信号の双極子変調を示す。図からわかるように、90°マイクロ波パルス幅を 3 ns から 2 ns に短縮することによって変調信号の深さを大きく増大させることができた。これはパルス幅の短縮による励起帯域幅の増加によって、より多くのスピン対を励起したことによっている。また、変調が大変深く、信号が反転している (強度が負になっている) ことも注目される。図 3-2-16 (A) は DQC 双極子変調のラジカル濃度依存性を示したものである。ラジカル濃度の減少にしたがってベースラインが減少し、変調も深くなっていることがわかる。このことは双極子変調をフーリエ変換して求めた双極子スペクトル図 3-2-16 (B) に、より明瞭に現れている。スペクトルには双極子相互作用のスペクトル (Pake Pattern) のほかに 0 MHz のピークがあるが、このピークの強度はラジカル濃度が減少すると Pake Pattern と比べて相対的に減少している。DQC 信号において、0 MHz 成分は分子間の双極子相互作用によるものであり、これは小さいほど目的とする分子内のラジカル間距離の測定に好ましい。図 3-2-16 からは 0.1mM 程度の濃度にすればこの成分を十分小さくできることがわかる。

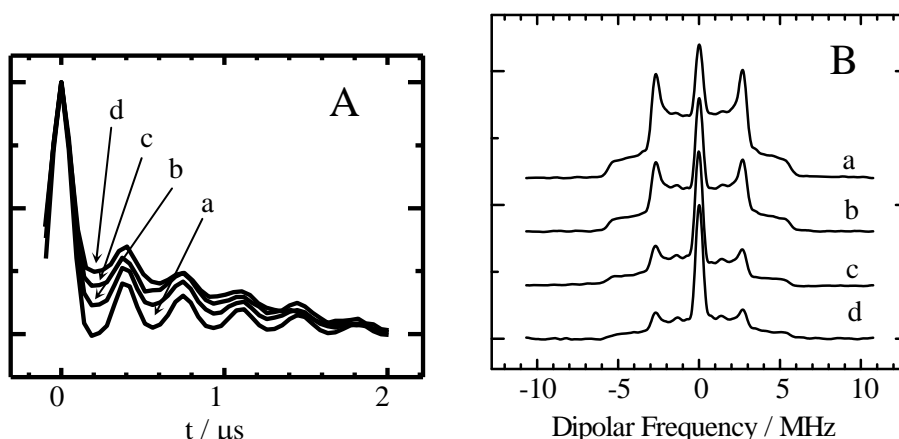


図3-2-16. バイラジカル 1 のDQC変調の濃度依存性 (A) とそのFFTによる双極子スペクトル (B) (a) 0.125 mM, (b) 0.25 mM, (c) 0.50 mM, (d) 1.00 mM.

バイラジカル 1 には図 3-2-17 に示したような 3 種類の構造異性体が考えられる。これらの構造に基づき、スペーサ軸周りでの自由回転を仮定し、スペーサの長さおよび各立体構造における距離分布の幅のみを可変パラメータとして DQC 双極子スペクトルのシミュレーションを行い、実測を再現するパラメータを決定した。得られたパラメータを表 3-2-6 に、もっとも良く実測を再現したスペクトルを図 3-2-18 に示した。表 3-2-6 の残差自乗和がいずれの異性体でも大きな差が無いことから、主にスペーサ長さの調整でいずれの異性体構造でも実測をよく再現できることがわかる。また、Eq-Eq 異性体の場合、同じスペーサ長さでの Eq-Ax 異性体をわずかに加えることによってさらに良くスペクトルを再現できた。Eq-Ax 異性体の場合は Ax-Ax 異性体を考慮して同様な改善を得た。この結果からラジカル間距離は平均で  $2.644 \pm 0.006$  nm と決定した。

双極子変調はパルス間隔 (時間) の関数として DQC エコー強度を見たものであるが、時間軸におけるエコーの形は ESR スペクトルのフーリエ変換である。したがって、この二つの時間軸で 2次元のフーリエ変換を行うことによって、ESR スペクトルと双極子スペクトルの相関を見ることができ。凍結試料の ESR 共鳴周波数は主に静磁場に対する NO 基のパイ軌道の配向で決まり、双極子相互作用の周波数は二つの NO 基間を結ぶベクトルの外部静磁場に対する配向で決まる。したがって、ESR 共鳴周波数と双極子相互作用の相関を見ることによって、NO ラジカルの相対配向を決定できる。この ESR-双極子相互作用 2次元スペクトルを各異性体についてシミュレーションしたものと比較することによって、バイラジカル構造が Eq-Eq 異性体に帰属した。

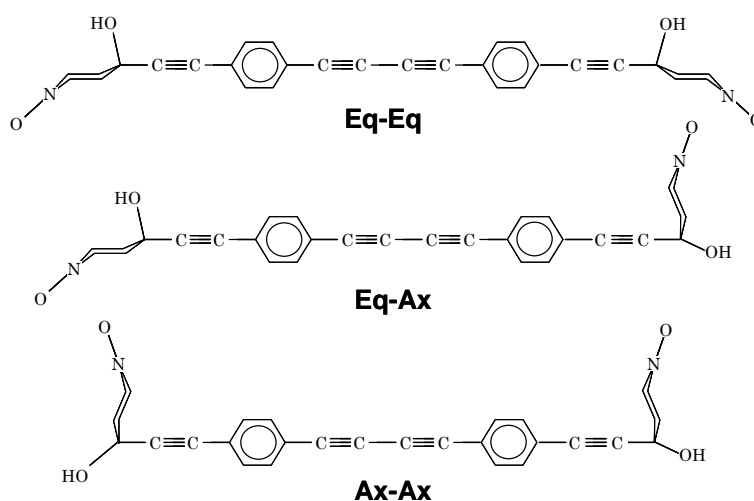


図 3-2-17. バイラジカル 1 の構造異性体  
ラジカル 6 員環へのスペーサ結合の立体配置の異性体

表 3-2-6. 双極子スペクトルシミュレーションの結果

Isomer	RSpacer <sup>(a)</sup> / nm	dRSpacer <sup>(b)</sup> /nm	NO-NO <sup>(c)</sup> Distance / nm	Fitting <sup>(d)</sup> Error
Eq-Eq	1.968	-0.075	2.650	0.034
Ax-Ax	2.350	0.313	2.633	0.038
Eq-Ax	2.160	0.123	2.643	0.035
Eq-Eq + Eq-Ax (1 : 0.08)	1.968	-0.075	2.650	0.026
Eq-Ax + Ax-Ax (1 : 0.07)	2.160	0.123	2.643	0.028

a) Rsp: スペーサの長さ

標準的な C-C 結合距離によるスペーサの長さ Rsp0 = 2.037 nm

b) dRsp = Rsp<sub>0</sub> - Rsp

c) N-O結合中点間の距離

d) Fitting Error = { $\Sigma(I_{obs} - I_{calc})^2 / \Sigma I_{obs}^2$ }<sup>1/2</sup>, I: intensity

(1)-3-2- トロポニン C タンパク質 (試料提供: 荒田グループ)

バイラジカル **1** とほぼ同じラジカル間距離を持つバイラベルしたトロポニン C タンパク質について DQC 距離測定を行った。分子構造からの推定値は 2.6 nm である。蔗糖 30% を含む 0.1mM 水溶液の DQC の双極子変調とその双極子スペクトルを図 3-2-19 に示す。図 3-2-19

(A) をバイラジカル **1** の場合と比較すると時間とともに減衰するベースラインが大きく、また変調が早く減衰している。ベースラインを差し引いて求めた双極子スペクトル図 3-2-19 (B) を見ると、変調の早い減衰に対応して、バイラジカル **1** よりもはるかにブロードになっている。これはバイラジカルと比べてトロポニンがはるかに複雑な構造を持つことによるラジカル間距離の分布による。精密な構造データを得るためには、この距離分布を含めた解析が必要であるが、スペクトルに示したピークの周波数から計算したラジカル間距離の近似値は 2.7nm であった。これは分子構造からの推定値とよく一致する。

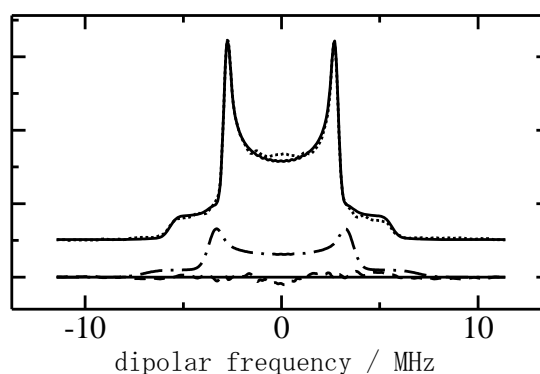


図 3-2-18. シミュレーションによる双極子スペクトルの fitting

実線: シミュレーション、点線: 実測、1点鎖線: Ax-Ax 異性体成分のスペクトル、破線: 残差。

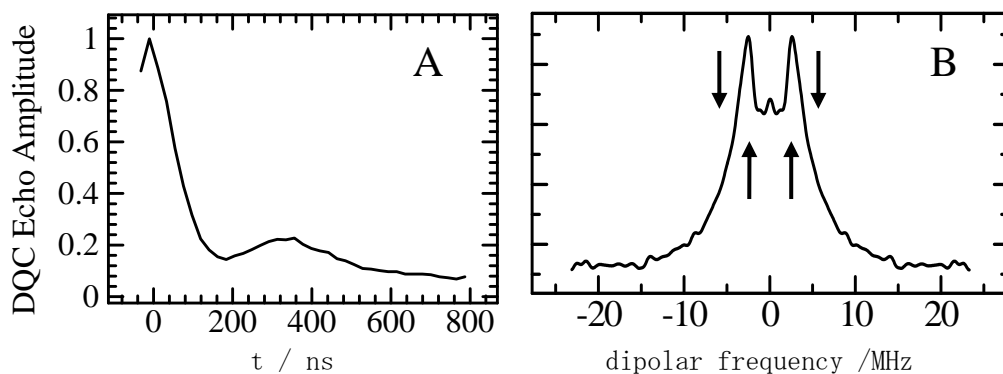


図 3-2-19 0.1 mM トロポニン C タンパク水溶液 DQC 変調 (A) と双極子スペクトル (B)、63 K  
 双極子変調スペクトルは双極子変調から分子間双極子相互作用によるベースラインを差し引いた後に FFT によって計算した。

(1)-3-2-3 TF1-beta タンパク質 (試料提供: 山崎グループ)

より長い距離の測定の試みとして、推定ラジカル間距離 3.7 および 5.7 nm の 2 種のスピンラベル TF1-beta タンパク質について DQC を観測した。結果を図 3-2-20、3-2-21 に示す。いずれも明瞭な双極子変調を観測できた。特に図 3-2-20 (A) の 0.4  $\mu$ s、図 3-2-21 (A) の 1.5  $\mu$ s 近傍で明瞭に信号が反転しており、同じ濃度であるが、トロポニン C の場合よりも分子間の双極子相互作用がはるかに小さいことがわかる。図 3-2-20 (B)、21 (B) いずれの双極子スペクトルも明瞭なピークを示しており、これらの周波数から計算したラジカル間距離は図 3-2-20 (B) について 3.8 nm、図 3-2-21 (B) では 5.7 nm であり、ほぼ推定値と一致した。

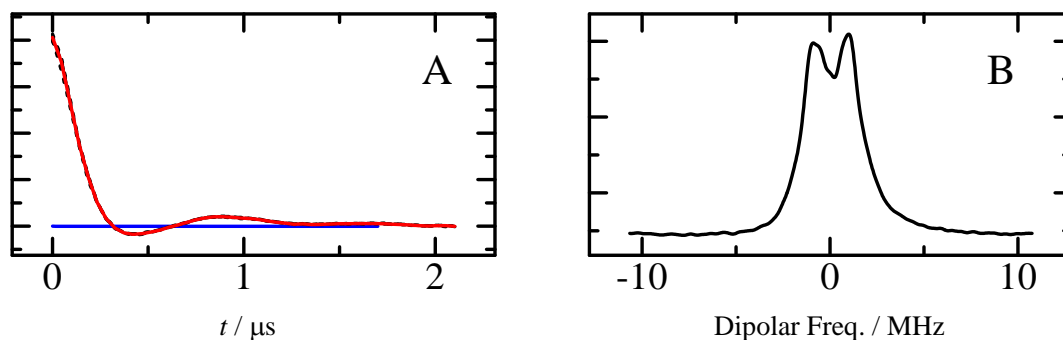


図 3-2-20. 0.1 mM TF1-beta (推定ラジカル間距離 3.7 nm) タンパク水溶液 (グリセロール 60%) の DQC 変調 (A) と双極子スペクトル (B)、50 K

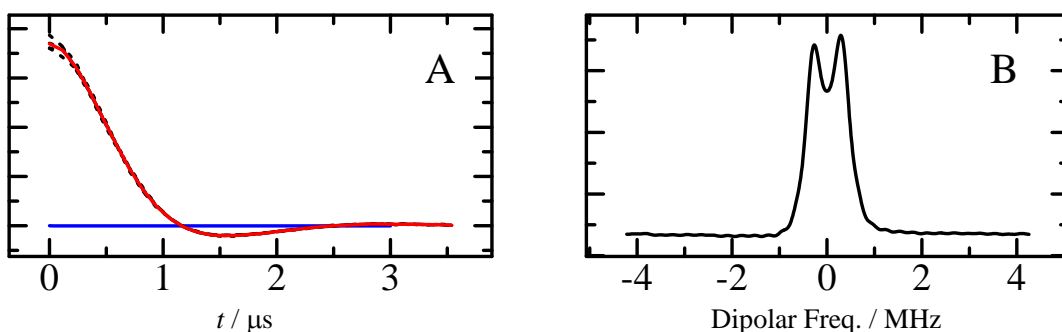


図 3-2-21. 0.1 mM TF1-beta (推定ラジカル間距離 5.7 nm) タンパク質水溶液 (グリセロール 60%) の DQC 変調 (A) と双極子スペクトル (B)、50 K

(1)-4 成果の位置づけ

(1)-4-1 装置性能

現在 DQC 測定に十分な性能を備えて稼動している Ku バンドパルス ESR 装置は本装置を除くと Cornell 大にある一台のみである (1)。ここでは、この Cornell 大の装置を含め、他の装置と本装置の性能を比較する。主な性能は表 3-2-7 にまとめた。市販 X バンドは市販装置の中の最良値である。

表 3-2-7. 装置性能の比較

項目	本装置	Cornell 大学	市販 X バンド
最小パルス幅 (ns)	2	2.5 (3.2)	8
$B_1$ (mT)	4	3	1.6
パルス列時間分解能 (ns)	0.3 (パルス幅は 0.1)	0.1	1
サンプリング時間分解能 (ns)	1	5	4

- a) 励起帯域 (パルス幅、 $B_1$ ) : ESR スペクトルの全体を励起することは DQC 測定においてもっとも重要なポイントであり、短いパルス幅と大きな  $B_1$  が必要である。スピンラベルのスペクトルをひずみ無く励起するためには、1 ns, 6 mT のパルスが必要である。Cornell 大の装置は FID 測定では最小 2.5 ns パルスで  $B_1 = 3.7$  mT が可能であるが (1)、実際の DQC 測定は 3.2 ns, 2.9 mT で行っている。また、Q バンド装置で 2 ns パルスが報告されているが (2)、マイクロ波出力が 100 と低く、 $B_1$  は 1mT 以下と考えられる。これに対して、本装置では 2 ns パルス、 $B_1 = 4.4$  mT で安定に測定ができ、スピンラベルの殆どの部分を励起することができる。感度の点からは、十分な帯域幅を持っている。市販のパルス ESR 装置と比較すると、X バンド装置では共振器体積が大きいこと、パワー (1 kW) および最小パルス幅 (5~8 ns) の制限より帯域幅が小さく、DQC の感度は低い。本装置では、励起帯域について現在の世界最高性能を達成したといえる。
- b) パルス列時間分解能 : 短いパルスを生成するだけでなく、幅およびその間隔を正確に制御することは重要であり、パルス列時間分解能は小さいほど良い。本装置の時間分解能 0.3 ns はパルス間隔に関しては充分である。しかし、パルス幅についてはこれでは不足するためさらに遅延線を用いて 0.1 ns の制御を行っている。時間分解能が上がると、ジッタ (パルスタイミングの揺らぎ) が重要になってくるが、本装置ではパルス列発生器のクロックの同期をとることによって、ジッタを 0.06 ns に抑えており、0.1 ns の制御を有効に行えている。Cornell 大の時間分解能は優れているが、測定が

難しいため、ジッタの値は公表されていない。市販装置の時間分解能 1 ns は 2~3 ns パルスを用いるには全く不十分である。

- c) 感度 (サンプリング時間分解能) : 測定感度について  $Q_L$  の値に大きく依存するため比較が難しいが、Cornell 大とほぼ同等であると考えられる。しかし、Cornell 大の装置では表 3-2-7 に見られるように ADC のサンプリング間隔が 5 ns と低い。そのため、広帯域励起によって幅が狭い (<20 ns) DQC エコーをサンプリングする際補間するために、サンプリング時間をずらした繰り返し測定が必要である。本装置の ADC は 1 ns の時間分解能をもち、補間の必要がない分測定感度が高い。
- d) Q (35 GHz)、W(95 GHz)、D(120 GHz) 装置 : 市販、自作のより高い周波数、Q, W, D バンド、の装置が存在するが、これらの装置では十分なマイクロ波パワーの増幅器を備えていないため、DQC 観測には不相当である。さらに、Q バンドより高い周波数では  $g$  値の異方性によってスペクトルがひろがるため、DQC 観測には不利である。

#### 【文献】

- [1] P. P. Borbat, et al., *J. Magn. Reson.*, 127, 155-167 (1997).  
[2] I. Gromov, et al., *J. Magn. Reson.*, 149, 196-203 (2001).

#### (1)-4-2 応用

一般に構造の自由度の大きなタンパク質では 4 nm 以上の距離を測定することは容易ではないと考えられている。本研究で測定した TF1-beta タンパク質における 5.7 nm の距離は、タンパク質について報告されているものの中でも最も長いものの一つであり、装置の性能の高さを示すものといえる。また、バイラジカルでは DQC 距離測定ではじめての 2 次元測定による構造決定である。この成果によって、DQC 法が距離のみでなく、より詳細な構造解析に応用できることを示すことができた。

#### (1)-5 類似研究との比較

距離測定には X 線結晶解析、蛍光消光法、NMR、ESR などがあるが、固体、液体、アモルファスなどに適用できる点で後 3 者が広く用いられている。中でもナノメートルスケールで適用できるものは蛍光消光法と ESR である。これらは巨大分子の特定の部位に化学修飾を施し、それをプローブとする点で類似している。蛍光消光法は非常に高感度であるのが特徴であるが、プローブ間の相対配向が直接計測距離に影響を与える点で、精度が低い。ESR はパルス法を使うことによって双極子相互作用のみを選択することが可能であり、測定条件などに測定精度が影響されにくい点で優れている。

パルス ESR 法による距離測定には DQC と DEER がある。DEER と比べると DQC は測定感度、距離精度が高いという利点を持つ。

しかし、装置性能に対する要求が厳しく、市販の装置では測定が困難なため、Cornell 大グループ以外ではほとんど用いられていなかった。また、大半のパルス ESR は X バンドで稼動しているが、試料体積は 100-200  $\mu$ l 程度が必要である。これに対して Ku バンドではわずか 10 $\mu$ l ですむという利点はタンパク質などの貴重な試料を扱う際に大きな利点となる。

本研究では従来距離測定のみであった DQC 法にさらに 2 次元解析を行って、より詳細な構造解析が可能であることを示した。ごく最近、W バンド (95 GHz) DEER で ESR スペクトルの部分的励起による配向選択によるラジカル配向を含めた類似の構造解析が報告された

(1)。これは本研究と同じ原理により、ESR 共鳴周波数と双極子周波数の相関を解析するものである。しかし、DEER では励起パルスと観測パルスの干渉を避けるために、ESR スペクトル上で観測できる部分がごく一部に限られる。すなわち、ごく一部の配向しか観測できない。一方、DQC では広範囲のスペクトルを励起し、フーリエ変換によって配向を分離するため、原理的には全ての配向を 1 回の観測で得られるという利点がある。これによって、

より精密な構造解析が可能になると期待される。

【文献】

[1] A. Savitsky, et al., J. Phys. Chem. B 111, 6245-6262 (2007).

(2) 研究成果の今後期待される効果

(2)-1 成果の今後の展開見込

本プロジェクトで開発したパルス ESR 装置は 0.1 mM、10  $\mu$ l の極微量の試料でも距離測定が可能である。スピンラベル技術の進んでいるタンパク質系への応用がまず重要なものと考えられる。水溶液タンパク質についてはタンパク質多量体の間相互作用などさらに広い応用が可能である。本プロジェクトでもトロポニンについて、2 量体構造の研究の予備的な実験を行った。また、他の手法では難しい膜タンパク質などの非水溶性タンパク質への応用も興味深い。膜タンパク質は膜機能の鍵を握っており、膜の生理機能の解明において重要である。また、光エネルギー—化学エネルギーの変換においてナノメートルオーダーの遠距離電子移動の中間状態に生じるラジカル対など、化学反応の中間体に対する応用が、パルス ESR をパルスレーザー装置と組み合わせることによって可能になる。

距離測定の基礎技術に関しては、感度、精度の向上を目指して Q バンド (35 GHz) のパルス ESR の開発が重要である。マイクロ波技術としては困難が予想されるが、原理的には Q バンドがラジカルの距離測定に最適の周波数と考えられる。また感度および 2 次元法の分解能を向上し、緩和時間を長くして距離の測定限界を拡大する方法として、スピンラベルラジカルの開発も重要と考える。従来のラジカルも同位体置換を用いることによってスペクトルの分解能が向上し、同時に感度も向上する。

(2)-2 想定される科学技術や社会への波及効果

タンパク質の機能の研究においてタンパク質全体の構造、タンパク質間の構造などが重要になっており、ナノメートルオーダーの距離測定法はこれらの研究に大きな発展をもたらすと予想される。また、有機無機化合物のナノ構造の研究にも応用が可能である。特に物質の状態に対する制限が少ない点で、多様な系に適用できる手法である。

これまで、多くの研究は距離情報のみを取り扱っていた。一つの制限は DEER 法における配向選択の自由度の無さである。DQC ではこの制限を取り払うことができるため、格段に精密な構造解析が可能になる。これは物質機能の解析において重要になってきている理論計算に対して、その結果を比較検討する上でより正確なデータを提供する点でも重要である。



### 3. 3 高速AD変換装置の開発と、パルス発生器やAD変換装置を連携制御するソフトウェアの開発（日本電子株式会社 水田グループ）

#### 目的

多量子遷移 ESR の構築にあたり、一般的に利用される X バンド (9 GHz) ではなく Ku バンド (17.5 GHz) を採用することとなった。Ku バンドを採用するにいたった主な理由としては、X バンドと同等の共振器の Q 値において約 2 倍の広帯域が確保でき、またデッドタイムが半減する、約 2 倍の Zeeman 分裂による高感度検出が期待できる、パルスマイクロ波回路を構築するための高性能素子が入手しやすい等の理由が挙げられる。そこで我々は、まず X バンド用パルスマイクロ波回路を Ku バンドにて構築しなおし、パルス ESR としての性能検証を行った。

パルス ESR の対象となる電子スピンは、NMR で扱われる核スピンに比べてはるかに短い緩和時間を有するため、繰り返し時間を高速に設定することが許される。このため単位時間あたりに多数回の積算が可能であり、これにより感度の向上を図ることが期待される。今回のシステムでは、100 kHz 相当での繰り返し測定および信号積算に対応するシステムの構築を目指した。ただし多量子 ESR 信号には、一般に桁違いに大きなエコー信号等が同一タイミングで重畳するため、目的の信号を抽出するためには多数回の位相サイクリングが必然となる。したがって位相サイクリングで現れる Real、Imaginary 信号を高速に目的のメモリアドレスに振り分けることを基本コンセプトとした高速積算システムの構築を行った。

一方、多量子 ESR 信号を感度よく検出するには対象となる ESR 信号の帯域と同等の励起帯域の確保が求められる。NO ラジカルを全帯域励起する場合には 2~3 ns 幅のマイクロ波パルスによりスピン系を十分に励起する必要がある。このため共振器に対しては非常に高い  $B_1$  が求められる一方、このような短時間に励起を受けるスピンのフリップ角を正確に制御するためにはサブナノ秒スケールでパルス幅を制御できることが求められる。さらに多数のパルス系列の照射により目的の信号成分を抽出する上でもパルスの形状や照射タイミングをサブナノ秒で制御することが求められる。このような技術的要請に応えるため、我々は世界最高の時間分解能を有するパルス発生器を利用してサブナノ秒の時間分解能でパルス制御できるシステムの構築に取り組んだ。

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### (1)-1 Ku バンドパルスマイクロ波回路の設計・組立

#### 実施方法

X バンドパルス ESR 装置 (JES-MQ シリーズ) のマイクロ波回路を Ku バンドで駆動するよう素子の選定を行った。マイクロ波回路は、X バンドと同様ホモダイン検出方式を採用した。またパルス ESR としての性能を確認するため、室温のみで動作する TE102 矩形共振器 (治具) を試作した。

#### 実施内容

日本電子製 JES-MQ200 形パルス ESR 装置に採用されている X バンドパルスマイクロ波回路の技術をもとに、Ku バンドパルスマイクロ波回路の設計と組立を行った。Ku バンドのパルス ESR はこれまでに世界で 1 台しか組み立てられていない。今回の開発で取り入れた新規技術の一つとして、スピン励起用マイクロ波パルスの位相分解能を従来の  $\pi/2$  から  $\pi/4$  とした。これにより 3 量子以上の多量子遷移 ESR の計測にも対応させた。

#### 成果

Ku バンドパルスマイクロ波ユニットを用い Coal 試料において初めて得られた 2 パルスエコー信号を示す。X バンドパルスシステムと比較して同一 Q 値の空洞共振器を用いても、Ku バンドは波長短縮に伴う充填率の向上のため、より少ないマイクロ波電力でスピンを励起

できるほか、パルス照射後の不感時間が半減 ( $t_d = 100 \text{ ns}$ ) することが確かめられた。  
本ユニットは設計・開発を完了し平成 18 年 3 月に東北大学に納入された。

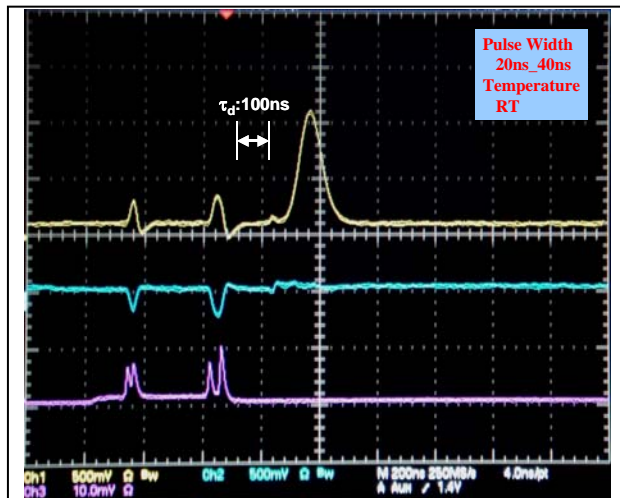


図 3-3-1. Ku バンドパルスマイクロ波システムにて得られたスピンエコー信号

#### (1)-2 新規ハードウェアに対応する制御システムの構築

##### 実施方法

対象として想定されるニトロキシドラジカルの全域を励起するためには、2 - 3ns 幅のパルスの照射が求められる。この際、同時に磁化のフリップ角をできる限り正確に制御することが求められるため、パルス幅やパルス間隔を 0.3ns の時間分解能で制御できるパルス発生器 (1 台につき 8 チャンネルまでの TTL 出力に対応) を採用することとした。システムを構成するすべてのスイッチ類を同期制御するため、本パルス発生器を 2 器、LAN 接続して 16 チャンネルまでの同期制御を行なった。多重パルスの照射においては、目的の信号を抽出するために多くの位相セットからなる照射パルスを組み合わせる必要が生ずるが、この点は計測時間を長大化する大きな要因となっている。この点を回避するため、1 GHz を上回るデータサンプリングレートを有し 100 kHz 相当で波形積算が可能な AD を利用するとともに、多種類の位相セットのパルス照射で得られる時間領域のデータを、AD 上のセグメント領域に一時格納することで全位相セットが一括して実行されるよう 2 台のパルス発生器および AD を制御するシステムの構築を行なった。同一の位相セットに対応するデータは同一セグメント上で積算し、すべての位相サイクリングおよび積算が終了した時点で、セグメント領域にあるデータは PCI バス経由で PC に移送して、位相テーブルに従って数値処理してメモリアドレスに格納した。この方式により位相サイクリングまで含めて信号の取得および積算を 100 kHz で実施できるシステムの構築を目指した。

##### 実施内容

システム制御には、3.3 GHz クロックの高速パルス発生器 2 台を LAN 接続にて並列動作させ、16CH から平行に TTL 信号を出力してパルス ESR 構成装置を同期制御させた。また信号取得においては 1-shot の時系列応答を取得できる高速 AD 変換器 (1GS/s) をベースにシステム構築を行った。システムのブロック図は、大庭グループ報告の図 3-2-2 に従う。スピン間距離を計測する上で一般的に標識として用いられる NO ラジカルは 200 MHz を超えるスペクトル帯域を有するため、その均一な励起には 3 ns 以下のマイクロ波パルスが必要となる。また 3 ns 相当で照射されるマイクロ波パルスで磁化ベクトルを所定の角度 (90° または 180°) 回転させるには、少なくとも 0.3 ns の時間分解能でパルス幅を制御する必要があった。今回採用したパルス発生器には 3.3 GHz クロックの高速パルス発生器 2 台を LAN 接続にて並列動作させ、16CH から平行に TTL 信号を出力してパルス ESR 構成装置を同期制御させることでパルス幅だけでなくパルス間隔も 0.3 ns の時間分解能での制御を可能とした。この時間分解能を有するパルス ESR システムは他に現存しない。

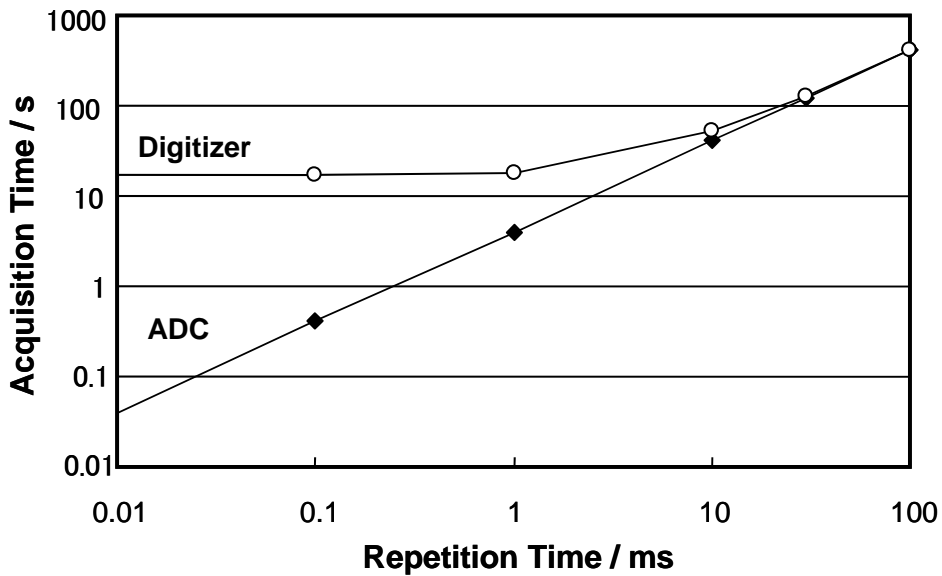


図 3-3-2. 繰り返し周期を 10 Hz～100 kHz の範囲で変化させた場合の時系列データ（データ長：500 点）の積算に要する時間（4096 回）

本研究で採用した AD 変換器のデータサンプリング能力を調べるため、繰返し周波数を 10 Hz～100 kHz の範囲で変化させ ESR スペクトルの積算に要する時間を調べた。実験の結果、デジタルオシロスコープのスペクトル積算速度は 400 Hz 程度で飽和に達することが判明した。一方、AD 変換器においては 100 kHz での信号積算にも適応することが確認された。

しかしながら一般的なパルス ESR 信号の計測においては、多くの不要信号の中から目的の信号のみを抽出するために位相サイクリングが必要とされる。例えば 6 パルスの照射により DQC 信号を検出する場合、少なくとも 64 通りの位相サイクリングを行い、得られた Real、および Imaginary 信号を Phase Table にしたがって入れ替えたり、極性を反転するプロセスが必要であり、この過程を同時に実施する、もしくは異なる Phase の組み合わせで得られる信号を異なる領域に高速に格納することが求められた。

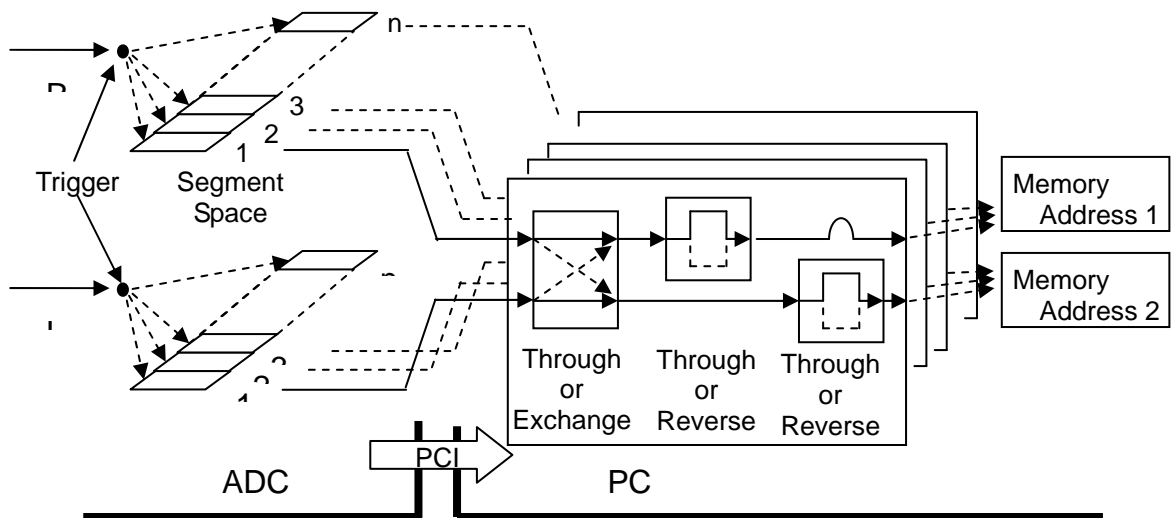


図 3-3-3. 多数回位相セットで得られる ESR 信号の分別・格納・積算（AD 上）と位相テーブルに従った演算処理（PC 上）により、2つのメモリアドレスに分配される。

上記の AD による高速アベレージ機能を最大限に活用するため、パルス発生器から不要信号除去に関わるすべての位相セットのパルスシーケンスを一括実行させるとともに、2チャンネル AD において、各チャンネルごとにメモリ領域を位相セット個のセグメント領域に分割し、異なる位相セットのパルス照射で得られる時間領域のデータを異なるセグメント領域に一時的に分別格納することとした。AD 変換機に TTL トリガを入力するとデータ書き込みアドレスが 1 番地から順次 n 番地まで変化し、その次のトリガで 1 番地に戻る。このプロセスにより n 通りの位相セットで得られる n 通りの信号を n 個のセグメント領域に格納するとともに、各セグメント領域で積算することが可能となる。また、各チャンネル上にはアキュジションプロセッサが 2 台搭載されているため、片方がデータを取得している間、もう片方がセグメント領域にデータを書き込むため、繰返し周期を 100 kHz とした場合でも同期して目的のセグメント領域に分配することが可能である。

各セグメント領域で所定回数積算されたデータは PCI バスを通じて PC に転送され、位相テーブルに従って演算した結果はリアルタイムで GUI 上に表示される。これにより目的とする信号成分(DQC 信号など)のみを抽出・観測しつつ実験条件の最適化が可能となった。

### 成果

このような時間分解能の有用性を示すため、以下に 6 パルス DQC シーケンスにおいて、DQC フィルターといわれる第 3～第 5 パルスを構成する  $90^\circ - \tau_2 - 180^\circ - \tau_2 - 90^\circ$  のパルス間隔  $\tau_2$  を掃引しながら DQC 信号の強度をプロットした結果を以下に示す。

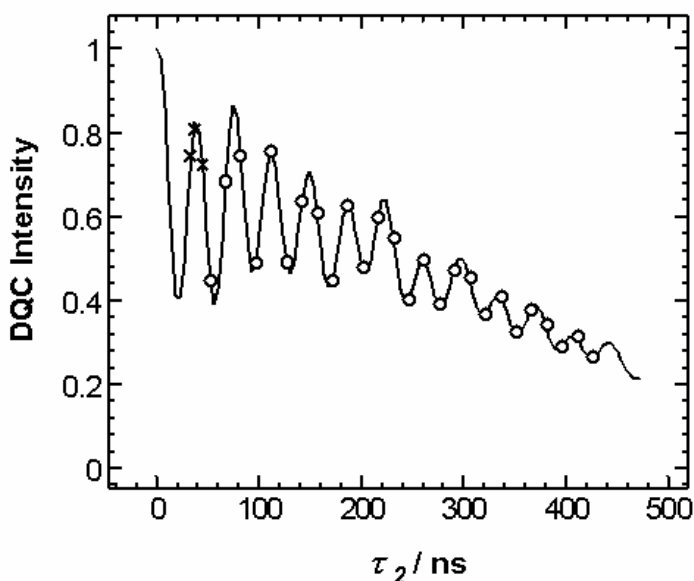


図 3-3-4. DQC 信号強度のパルス間隔 ( $\tau_2$ ) 依存性。サンプルは Tempone のトルエン溶液。測定温度 70K。○印および×印はともに実測の DQC 強度であるが、×印は  $\tau_2$  が短い場合の出力パルスの歪みを矯正して得たデータ。いずれも同一の LP (Linear Prediction) ライン上に並んでいる。

図 3-3-4 に示す DQC 信号は H 核の ESEEM (Electron Spin Echo Envelope Modulation) の影響を受けており、ほぼ 40 ns 間隔でピークトップが現れている。最適な DQC 信号強度を得るためには、少なくとも 0.3 ns 程度でパルス間隔  $\tau_2$  を設定する必要があることを意味しており、本研究で構築したシステムの有効性を示している。

測定時間の一層の短縮化をめざし、異なる位相セットに対して行ったパルスシーケンス一括実行を、異なるパルス-パルス間隔についても実施した。不要信号除去において p 通

りの位相セットが必要な信号を抽出する場合、 $n$ 通りにパルスーパルス間隔を変化させたパルスシーケンスを一括実行する場合には、AD上のメモリを $n \times p$ 個のセグメントに分割する。このようにして得られた2次元DQCデータの一例を図3-3-5に示した。このように2次元DQCの計測を52秒で行うことが可能となった。ここではとりわけ緩和時間が長いことで知られるE'中心を計測しているため繰り返し時間を10ms(100Hz)に設定しているが、電子スピンの緩和時間が短い系ではさらに高速の繰り返しが可能であるため計測所要時間を一層短縮することが可能である。本計測システムの構築により、パルスESR測定における計測所要時間は従来システムに比し2桁以上短縮できたと考えられる。

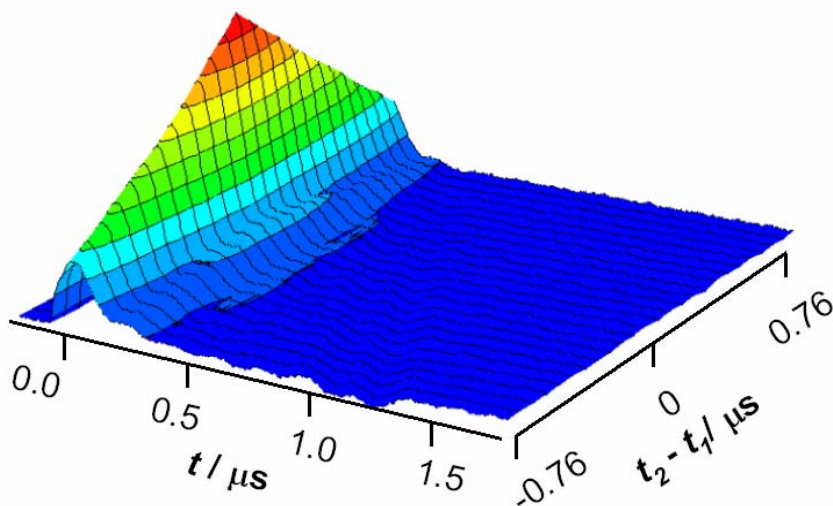


図3-3-5. 2次元DQC測定結果。試料： $\gamma$ 線照射石英、位相セット：64、パルス間隔：41、積算回数：20、繰り返し時間：10ms、計測所要時間：52s

#### (1) -3 パルサー制御方式の改良による実行開始時間の短縮

##### 実施方法

図3-3-5に示す2次元DQCを実行させるには7680個のパターンファイルが必要となるが、今回採用したパルサーの設定ファイル作成機能を利用するとファイル作成に8時間を要する。そこで設定ファイル作成から発振開始にいたる時間短縮のため以下の方法を試みた。

- 1) 設定ファイルをパルサー側で構築する代わりにPC側で構築することにより実行開始までの時間短縮を目指した。
- 2) パルス間隔が同じで位相のみが異なる波形チャンネルのファイルでは、位相情報が相違する部分のみを書き換える方式により実行開始までの時間短縮を目指した。
- 3) 2台のパルサーの制御方式を、Master/Slave方式からMaster/Master方式に変更し、各パルサーでメモリ展開を並列実行させることで実行開始までの時間短縮を目指した。

##### 実施内容

- 1) 設定ファイルをパルサー側で構築する代わりにPC側で構築することにより、設定ファイル生成時間の短縮を試みた。パルサーが認識する設定ファイル形式については製造元のTektronix社からの情報開示を受けつつソフトウェア開発を行った。この結果、図3-3-5に示す2次元DQCの実行に必要な7680パターンにおいて、設定ファイルの生成に必要な時間は8時間→21分に短縮された。設定ファイルはLANを用いることでパルサー側に瞬時に転送された。この後メモリ展開に9分が必要のため発振開始までの総所要時間は合計30分となった。
- 2) パルス間隔が同じで位相のみが異なる波形チャンネルのファイルでは、位相情報が相違する部分のみを書き換える方式を実施した。設定ファイル作成に要する時間は4分

に短縮された。メモリ展開には上記同様に 9 分が必要なため発振開始までの総所要時間は合計 13 分となった。

- 3) メモリ展開に必要な 9 分の内訳は、Master 側パルサーでの 16bit データ展開に要する 6 分と、半分 (8bit データ) を Slave 側パルサーに LAN 経由で転送し、これを展開するための 3 分からなることが判明した。そのため、2 台のパルサーは Master/Master 方式とし、これらに各々 8bit データを与えて同時にメモリ展開させることで時間短縮を行った。この結果、メモリ展開に必要な時間は 9 分→3分に短縮され、設定ファイル作成に必要な 4 分とあわせ発振開始までの総所要時間は合計 7 分となった。なお本方式では 2 台のパルサーは同期をとって発振させる必要があった。外部基準クロック (DG-535) による 2 台のパルサーに外部トリガを与えて発振させた場合の Jitter は最大 100 ps 程度であり実用的には問題ないと考えられた。

### 成果

以上の改良により、設定ファイル作成から発振開始に至る時間の大幅な短縮が可能となった。一例として図 3-3-5 に示す 2 次元 DQC の実行に必要な 7680 パターンにおいて、設定ファイル作成から発振開始に至る時間は 1/70 (8 時間 → 7 分) に短縮できた。ただし同一パルス条件にて繰り返し実験を行う場合には、すでにメモリ上に展開されたパターンファイルをもとに即座に発振が開始されるため、ここで述べた待ち時間は問題にならない。

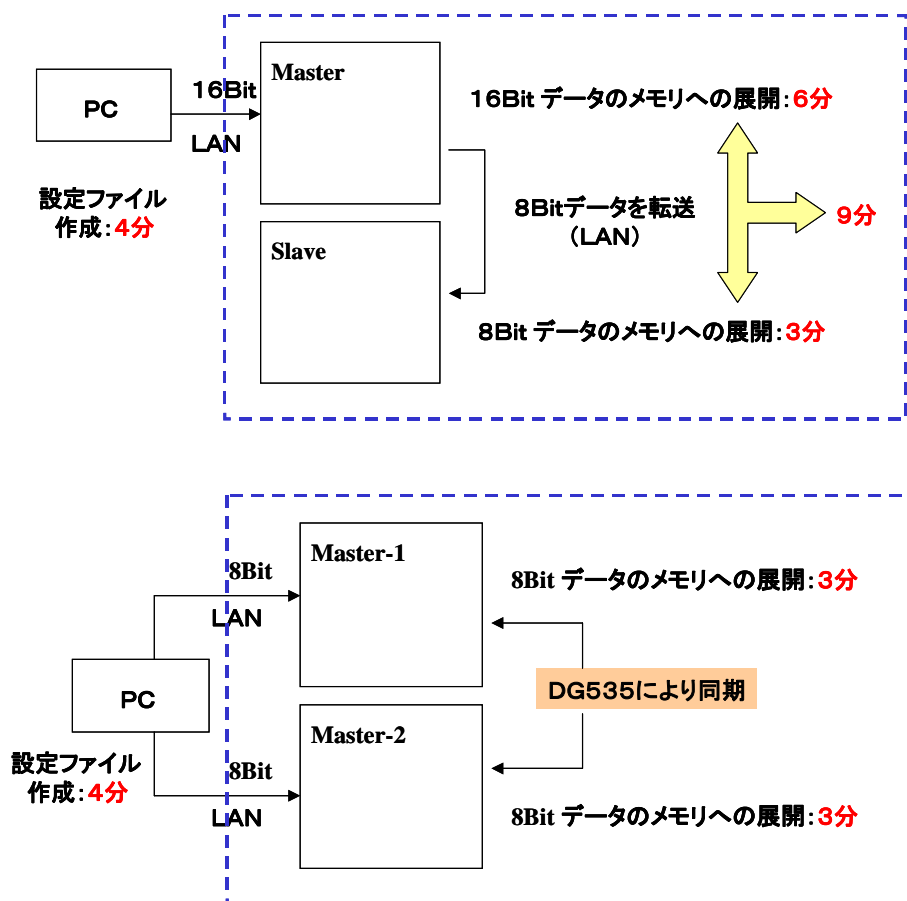


図 3-3-6 (上) 方式 I : 2 台のパルサーを Master/Slave 方式により動作させた場合 (下) 方式 II : 2 台のパルサーを Master/Master 方式により動作させた場合 設定ファイル作成からメモリ展開までの総所要時間はそれぞれ 13 分 (方式 I)、7 分 (方式 II)

## 成果の位置づけと類似研究との比較

本研究では世界では二例目となる Ku バンドマイクロ波ユニットの開発と、パルス ESR システムとしては他に類のない高時間分解能 (300 ps) パルス発生器と高速データサンプリング (1 GHz) AD 変換器を利用した制御システムの構築を行った。

パルスマイクロ波ユニットを Ku バンドで構築することにより、X バンドに比べ約 2 倍のゼーマン分裂が生ずるほか、同一帯域のパルス励起において共振器の Q 値を 2 倍確保できることは低濃度のスピン検出に有利なだけでなく、パルス ESR 分光としては未開である MQC の検出をより有利に検出できる条件が整ったといえる。波長短縮に伴い、より小さな共振器を利用できるため共振器内部に高いマイクロ波磁束密度を発生させることができることもまた、ESR スペクトル帯域全体を励起しうる極短パルス幅 (2~3 ns) において、スピンプリップ角を十分に確保する上で有益である。

### (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、高分子や巨大タンパク質に 2 つの NO ラジカルを導入し、これらの間にはたらく双極子相互作用を DQC の計測を通じて抽出し定量化することでスピン間の距離計測が行えることを実証したが、今回開発したマイクロ波ユニットにはまた、「同一パルス強度でパルス幅が異なる」 $90^\circ$ 、 $180^\circ$  パルスを照射するための回路だけではなく、「同一パルス幅でパルス強度が異なる」 $90^\circ$ 、 $180^\circ$  パルスを照射するための回路を設けたことで一層の広帯域励起が可能となっており、この機能を活用していくことでより双極子変調をより明瞭に観測することが期待できる。さらに照射パルスの位相分解能を、一般的に用いられてきた  $\pi/4$  から  $\pi/8$  にしたことで世界初となる 3 量子遷移 (TQC) の観測にも期待が高まる。本研究プロジェクトの応用担当グループからは、これまでに 2 つの NO ラジカルを導入した高分子やタンパク質が調整されてきたが、今後 3 つの NO ラジカルを導入した試料を調整し世界初となる TQC の観測を行うことによりラジカル間の空間配置を立体的に理解することが期待される。

高速 AD の利用においては多数回の位相サイクリングやパルス-パルス間隔の掃引を一括して 100 kHz 相当でスペクトルを積算・取得することが可能となった。これにより、十分濃度の高いバイラジカル系では DQC スペクトル取得を短時間 (データ取得にかかる正味の時間は数秒) に取得することが可能となった。NMR が対象とする核スピンの比較して電子スピンは桁違いに短い緩和時間をもつことから、繰り返し周期を縦緩和時間の数倍に設定することで単位時間当たり多数回の積算を行うことができ (100 kHz 周期の場合は、毎秒 10 万スペクトルを積算する) 微量しか入手できないバイラジカルからも信頼性の高い距離情報を取得するうえで有効な技術になると期待される。



### 3. 4 空洞共振器の開発 (山形大学 小野グループ)

#### 目的

MQC-ESR 共振器が備えるべき要件は、①広帯域共振特性、②マイクロ波磁束密度  $B_1$  が大きく、かつその均一度が高い、③試料の冷却効率が低いことなどである。幾つかのタイプの共振器の中で誘電体共振器(DR、大庭グループ担当)及びループ・ギャップ共振器(LGR)はそれぞれ大きな  $B_1$  が容易に得られる優れた共振器と考えられる。

小野グループの目的は上記①～③の要件を満たし、かつ、使いやすさを主眼とする新しいタイプの共振器及びブリッジループ・ギャップ共振器(Bridged Loop-Gap Resonator, BLGR)の開発を行うことである。開発目標は周波数 17.5 GHz において負荷  $Q(Q_L)=100$  のとき  $B_1=3$  mT 以上である。

#### (1) 研究実施内容及び成果

#### 実施方法

##### (I) SAR について

次の順序で行う。

- ①新しいタイプの共振器として SAR の着想を得たのでその原理を明らかにする。
- ②SAR の開発は、TLM 法による SAR の電磁界解析及びパルス ESR 装置による共振器の実験が必要である。解析ソフトは既設、パソコンは新規購入による。Ku バンドパルス ESR 装置本体が使用可能になるまでの間、実験には日本電子(株)X バンドパルス ESR 装置 JES-MQ200 型を用いて、X バンドで行なうことにする。これは X バンドにおける電磁界解析及び実験結果が得られれば Ku バンド SAR の形状寸法の全部又は一部が、電磁気学的相似の理によって x バンドと Ku バンドとの波長比によって定めることができ、また、電磁界も同一のものが得られるからである。
- ③SAR は、①X バンドフィン付 SAR、②Ku バンドフィン付 SAR、③Ku バンド円筒シールド付 SAR の順に、これら 3 種類の共振器の電磁界解析、設計、製作、DQC-ESR 実験を行う。

##### (II) BLGR について

既に明らかにされている基本的な設計法を参照し、要求の性能が実現される BLGR の設計、製作、DQC-ESR 実験を行う。

#### 実施内容

##### (I) SAR について

###### (a) SAR の原理

SAR の原理を以下に述べる。図 3-4-1 に示すように、導体平板に開けたスロットにマイクロ波電圧を印加すると、スロット周辺に電流が流れて磁界が発生する。図 3-4-2 は中空円筒導体に設けた 4 個のスロットの電流が円筒内外に生じる磁界の TLM 法による数値解析結果を示したものである。このような軸スロットはアンテナとして用いられてきたが[1]、このままでは円筒外側への電磁界の放射が大きいため本研究の目的とする共振器としては使用できない。共振器として機能させるためにはスロットからの円筒外側への電磁界の放射を防げばよい。そのために用いる蓋としての長さ約 1/4 波長の終端短絡平行平板回路(フィン)を図 3-4-3 に示す。この蓋をスロット部の円筒外側に設けることにより円筒はキャビティ共振器になる。

この共振器はパッチアンテナアレイ[2]にバビネの原理を適用することによっても得られる。



スロットの形状は長方形だけでなく種々のものが用いられる。スロットは 3 個以上であることが望ましい。蓋は終端短絡導波管でもよい。スロット付き円筒の内径は試料の大きさに応じてある範囲内で定めることができる。蓋の寸法は設計共振周波数と円筒内径に依存する。

上記の蓋の代わりにスロット付き円筒の外側に導体円筒（シールドケース）を用いることもできる。

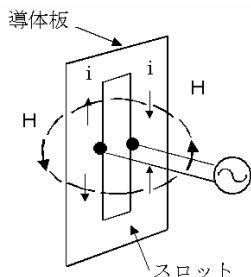


図 3-4-1  
スロット周辺の電  
流  $i$  と磁界  $H$

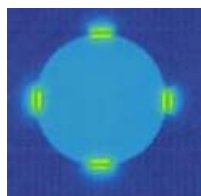


図 3-4-2  
4 個のスロットを  
持つ円筒内外の  
磁界

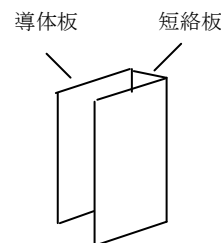


図 3-4-3  
蓋としての  
終端短絡平行平板  
回路(フィン)

(b) SAR の電磁界解析から DQC-ESR 実験まで

(i) X バンドフィン付き SAR

図 3-4-4 に、電磁界の数値解析結果に基づいて設計した X バンドフィン付き SAR (設計周波数 9.6GHz、8 スロット、各スロット幅及び長さ 2.0 mm×55.0 mm、各フィンの深さ 10.5 mm) の外観とキャビティ内部の磁界分布を示す。磁界は円筒キャビティ内に比較的均一に分布していることが分かる。キャビティ中心部の磁束密度  $B_1$  の理論値は CW 入力電力 1 kW のとき 4.0 mT である。なお、マイクロ波の SAR への結合は 1 巻き微小コイルによった。

マイクロ波の給電は同軸ケーブルを用いて行い(同軸結合式)、SAR への結合は実験においても 1 巻き微小コイルによった。マイクロ波共振周波数の実測値は、冷却用石英二重管、試料管、試料各挿入時に 9.2GHz であった。DQC-ESR 測定は、 $\pi/2$  パルスの幅 25ns、試料の温度 60 K、6 パルス法を用い、16 回の位相) サイクリングによって行った。その結果、図 3-4-5 に示す  $\gamma$  線照射石英砂 (100 Mrad、適量) 内の  $E^+$  センターを得ることができた。信号の中心部が上に凸状になり、かつ、信号全体にうねりが生じているので正しい距離情報は得られないが、 $E^+$  センターが得られたことにより複数個の共振素子を持つ SAR が単一周波数で動作することが実験によって確かめられた。なお、図 3-4-5 中の凸部はパルスの位相精度が悪いために生じたものである。

電磁界のうち本研究に用いるのは磁界のみで電界エネルギーの多寡は関係ないことと、誘電損失の考慮が不要なのでこれまで電界の分布は示さなかった。数値解析によれば発生電界は小さいので本研究のみならず小動物～大型動物 (ヒト) の *in vivo* ESRI/NMR/MRI にも極めて有用と考えられる。

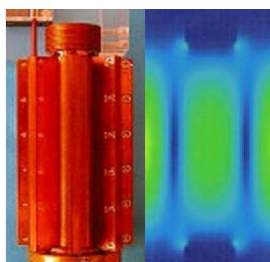


図 3-4-4 8 スロット SAR の外観(左)と  
キャビティ内部の磁界分布

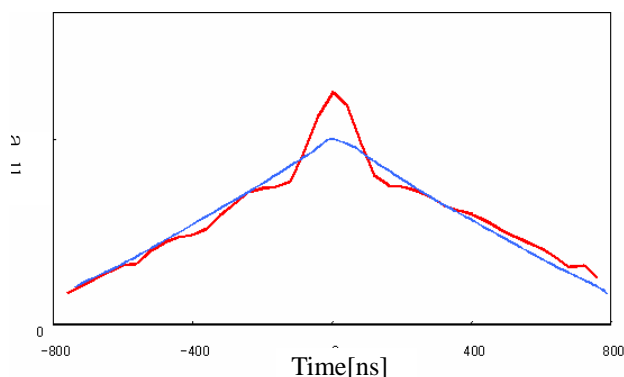


図 3-4-5  
 $\gamma$ 線照射石英砂の E' センター  
 — 本研究による測定値  
 周波数 : 9.2GHz  
 温度 : 60K  
 パルス列 : 6 パルス  
 $\pi/2$  パルス : 25ns  
 — Peter P. Borbat らによる測定値[3]

(ii) Ku バンドフィン付き SAR

Ku バンドフィン付き SAR の形状は X バンド SAR と相似形で、寸法は波長比で縮小して得られる。各寸法は円筒キャビティの内径 6.4 mm、各スロット幅及び長さ 1.0 mm  $\times$  29 mm、各フィンの深さ 5.5 mm である。電磁界分布は X バンドと同様に得られたので図示を省略する。X バンドと同様に、マイクロ波の給電は同軸ケーブルを用いて行い、SAR への結合は 1 巻き微小コイルによった。

Ku バンド DQC-ESR 関連測定は大庭グループ及び水田グループが開発した Ku バンドパルス ESR 装置を用い、東北大学にて行った (以下、同じ)。図 3-4-6 は製作した Ku バンドフィン付き SAR による  $\gamma$  線照射石英砂 (100 Mrad、24 mg) 内の E' センターの 2 次元スタックプロットである。これまで DR によって得られた E' センターと同等のものであることが分かる [3]。この結果を用いての距離分布解析は今後行う予定である。

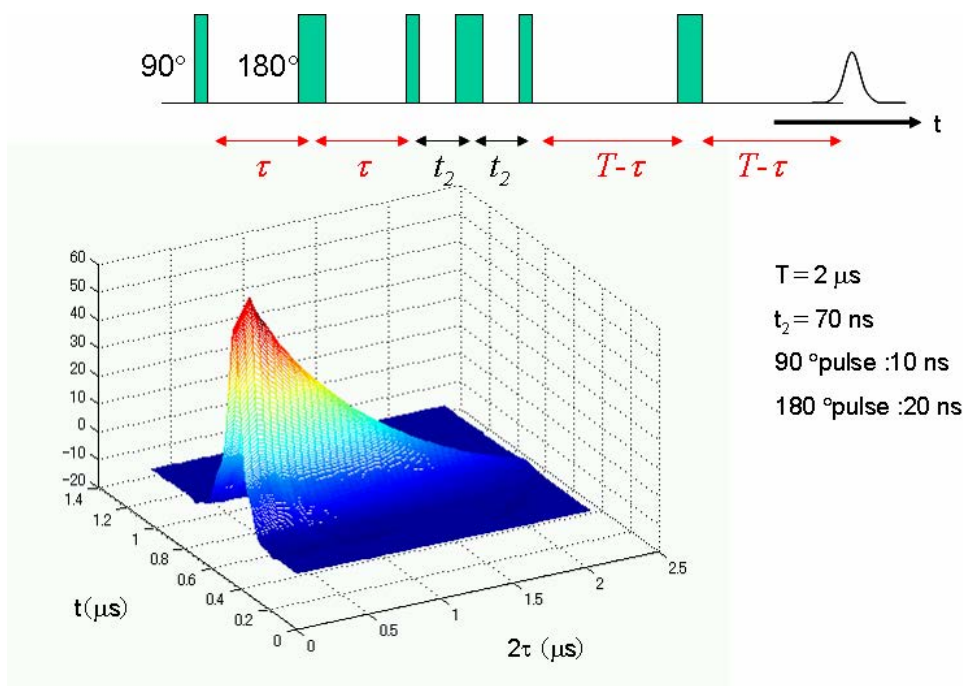


図 3-4-6 Ku バンドフィン付き SAR 使用による  $\gamma$  線照射石英砂の E' センター

(iii) Ku バンド円筒シールド付き SAR

Ku バンド円筒シールド付き SAR の構造は上記のフィン付き SAR と同形状、同寸法のスロットを設けた厚さ 0.1mm の銅製円筒キャビティの外側に、同軸の銅製円筒シールドケース

を取り付けたものである。図 3-4-7 に Ku バンド円筒シールド付 SAR の表面電流及び磁界分布を示す。石英砂を充填した 2mmφ 石英試料管を円筒キャビティに挿入した際の磁界分布を図 3-4-8 に示す。 $B_1$  均一度 ( $B_{\min}/B_{\max}$ ,  $B_{\max}$ :  $B_1$  の最大値,  $B_{\min}$ :  $B_1$  の最小値) は半径 0.6 mm、軸長 6.0 mm の円筒形試料内で 0.94 なので極めて良好である。

$\gamma$  線照射石英砂 (100 Mrad、24 mg) 内の E' センター測定結果を図 3-4-5 に示す。期待の曲線が得られた。Tikhonov の正規化法 (TIKR) による距離分布を図 3-4-6 に示す。2 つのピークが得られたが、3.7nm は SiO 鎖の分子内相互作用 Aggregation、6.0 nm は分子間相互作用によるものと思われる。ただし、2 箇所ピークのあることについては引き続き今後の検討が必要であろう。

Ku バンド SAR の現状を表 3-4-1 に示す。表 3-4-1 から分かる様に  $B_1$  が目標値 3 mT に比べて極めて小さい。しかし、SAR は設計の自由度が大きい利点があるので、今後その利点を生かし、かつ、3 mT を実現する設計の可能性があると考えられる。

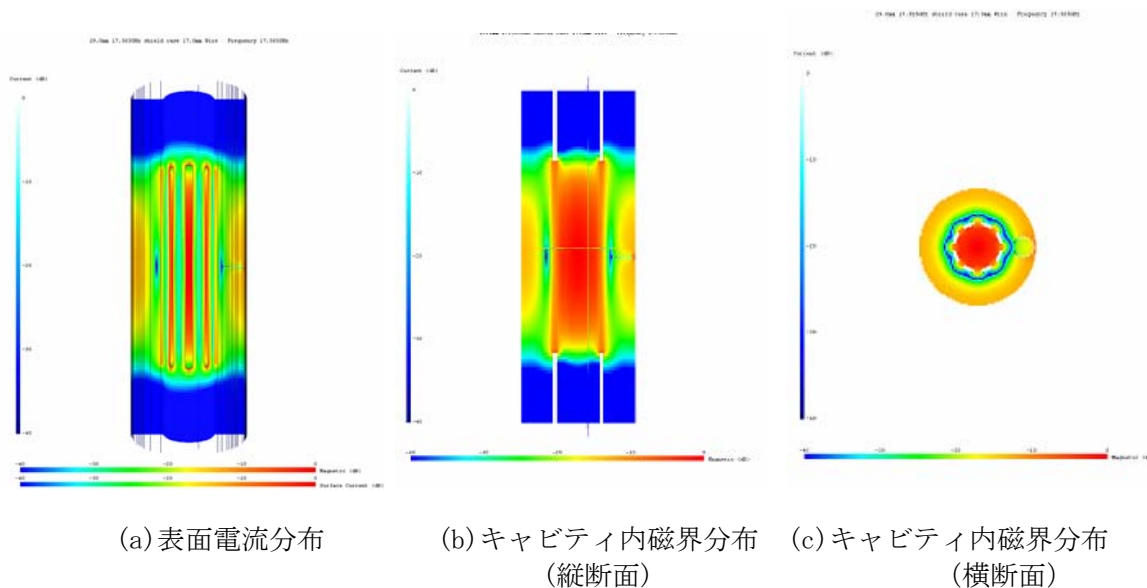


図 3-4-7 Ku バンド円筒シールド付 SAR の磁界分布

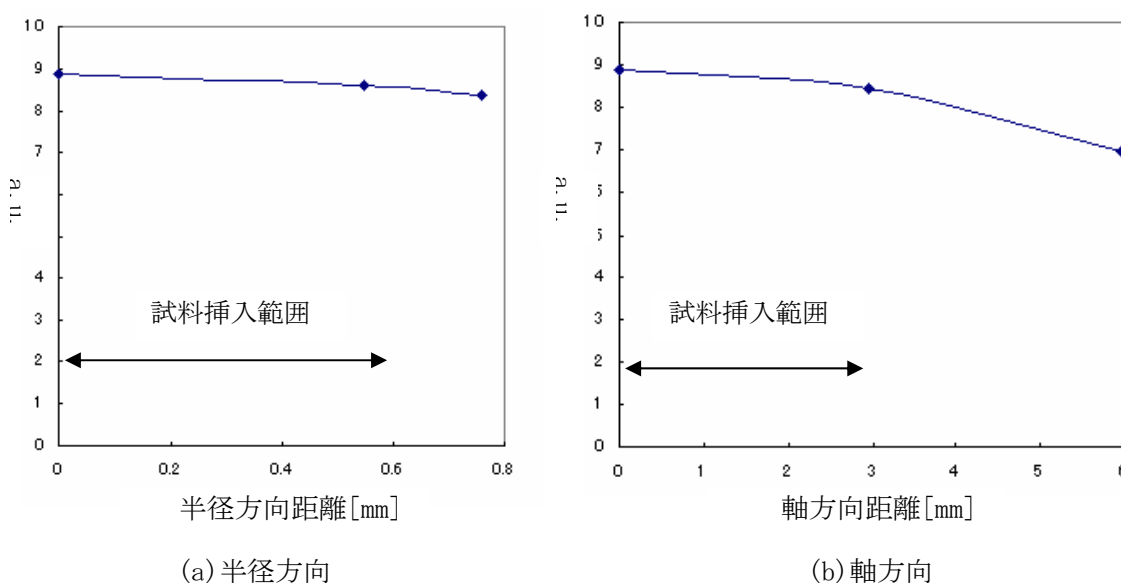


図 3-4-8 SAR の磁界強度変化

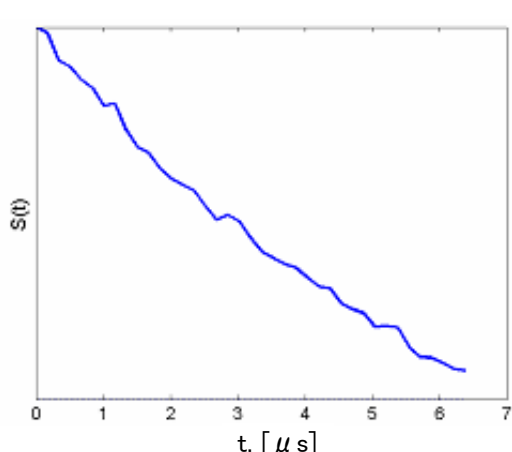


図 3-4-9 円筒シールド付き SAR 使用による  $\gamma$  線照射石英砂内の  $E^{\wedge}$  センター

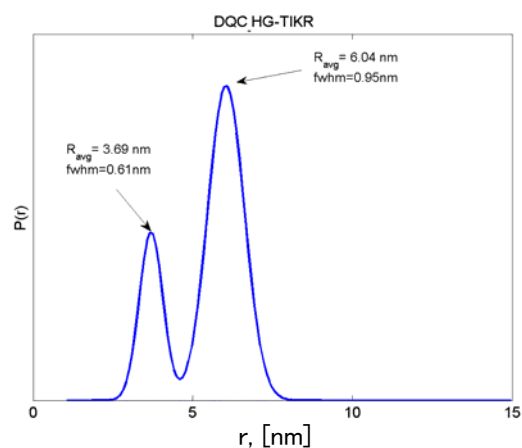


図 3-4-10 Tikhonov の正規化法によって得られた距離分布

表 3-4-1. Ku バンド SAR の現状

	シールド形状	QL	B1/mT		DQC測定 ( $\gamma$ 線照射石英、 100Mrad、24mg)
		理論値及 び実測値 *	理論値 (CW)	実測値 (パルス)	
同軸結合式	終端短絡平行 平板(フィン)	臨界結合	3.6	----	済
		1300 密結合 120*	0.33	----	
導波管結合式	円筒	臨界結合	13	----	済
		2200 密結合 250*	1.5	0.46	
		100	0.59	----	

## (II) BLGR について

BLGR の  $B_1$  均一度が高いことは実験的には既に示されている [4]。図 3-4-11 に X バンド BLGR の一設計例を示す。この BLGR とブリッジを外した通常の LGR の  $B_1$  分布を比較するために自由空間内での数値解析により求めた磁界を図 3-4-12 に示す。各図の左側がループ部、右側がギャップ部である。ギャップ部、特にギャップ近傍のループ内では変位電流が多く流れるために磁界の均一度が低下していることが分かる。本研究による数値解析によっても既に実験によって示されたように BLGR の  $B_1$  均一度は通常の LGR に比較して格段に良いことが証明された。今回の数値解析では共振器に試料管と試料が挿入されていないが、それらを挿入することにより試料内の  $B_1$  均一度は所謂レンズ効果によってさらに向上することが期待される。なお、実際の MQC-ESR 測定時には共振器はシールドケース内に収納されるので磁界分布は若干変化する。

以上の基礎的な検討により、今後、実用的な Ku バンド MQC-ESR 測定に用いる BLGR を開発する予定である。

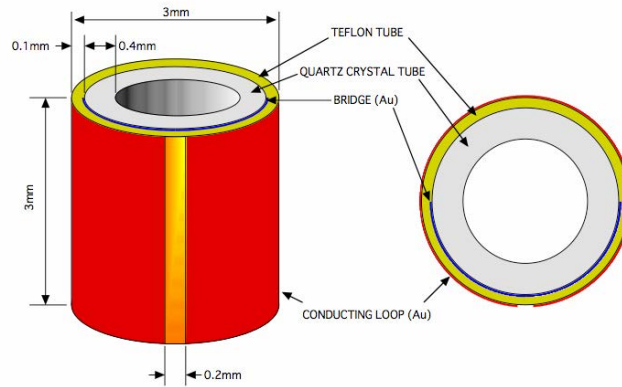


図 3-4-11 Xバンド BLGR の一例

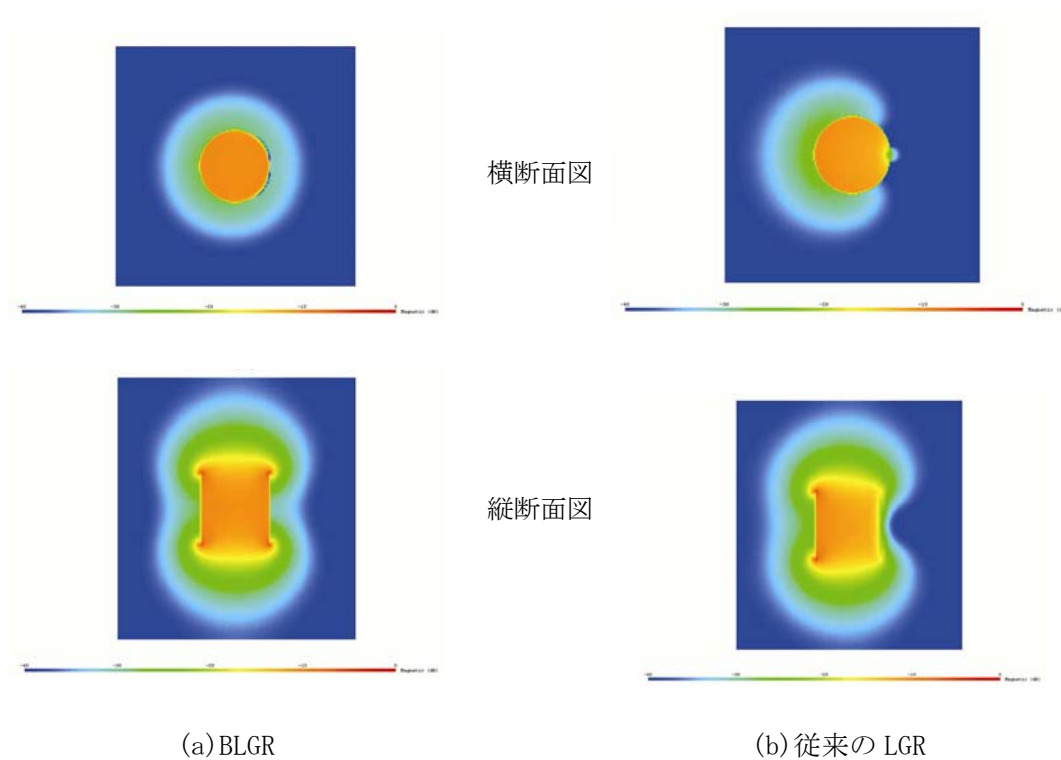


図 3-4-12 BLGR と従来の LGR の磁界分布の比較  
(図の左側がループ部、右側がギャップ部である)

### 成果

本研究の成果は次の通りである。

- ① これまでスロット/スロットアレイは NMR/MRI のコイル (共振器) として用いられてきたが、ESR の共振器、或いは共振素子としては用いられていなかった。本研究によりアレイ化した各スロットに蓋をすることにより軸スロットが共振器としての機能を持つことを示すことができた。
- ② SAR が X バンド及び Ku バンドのマイクロ波帯で ESR に用い得ることを初めて示すことができた。

- ③ 本研究ではスロット蓋の形状の違いによるフィン付きと円筒シールド付きの2種の SAR を開発することができた。
- ④ SAR により  $\gamma$  線照射石英砂 (100 Mrad、24 mg) の距離分布を求めることができ、Tikhonov の正規化法 (TIKR) によれば、3.7 nm と 6.0 nm の2箇所ピークのあることが示された。ただし、2箇所ピークのあることについては引き続き今後の検討が必要であろう。
- ⑤ 未だ  $B_1=3$  mT 以上が得られていないためにニトロキシラジカル間の距離測定には至っていない。しかし、SAR の設計の自由度が大きいため円筒キャビティの容積を縮小することが出来ればマイクロ波電力密度が増加し  $B_1$  の向上が期待される。今後、 $B_1$  向上のための検討を行う。
- ⑥ SAR 円筒キャビティ内の電界は小さいので、本研究のみならず VHF、UHF 帯における小動物～大型動物 (ヒト) の *in-vivo* WholeBody ESRI (ESR イメージング)/NMR/MRI にも極めて有用と考えられる。

### 成果の位置づけ、類似研究との比較

これまでスロットを用いた共振器は MRI には使用されてきたが、ESR には用いられていなかった。本研究により初めて ESR に用いるスロットアレイ共振器が開発された。

DR は DQC-ESR 測定用共振器として現在市販されているが、SAR 及び BLGR は未だである。その理由は目的欄に記述した DQC-ESR 用共振器の具備すべき要件を満たし得ていないためと考えられる。現時点では SAR が今後  $B_1=3$ mT を確実にクリアできるか否か不透明であるが、BLGR はこれまでの研究経過から問題なく全ての要件を満たすことが出来ると考えられるので、少なくとも BLGR は今後完成まで余り時間を要しないと思われる。

#### (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究による SAR 及び BLGR は挿入型なので、 $f=17.5$  GHz、 $P=1\sim 2$  kW のマイクロ波入力時に  $B_1=3$  mT の SAR 或いは BLGR が実現されれば、巨大高分子の距離測定が極めて容易に行えるようになる。

SAR は分布定数型の共振器なので共振周波数を下げれば大型試料を挿入しての測定は比較的容易である。この性質を利用して、本研究の目的以外であるが、ヒトのホールボディ ESRI 測定用共振器としての発展を期待したい。

#### 【文献】

- [1] R.T. Compton, Jr. and R. E. Collin, Slot antennas in Antenna Theory Part1, Chapter14, McGraw-Hill Book Company (1969).
- [2] Eiji Yoshitome, and Iwao Nakajima, Development of a New RF Volume Coil – Patch Antenna Array, Present Status and Future Trends of Ultra-high Magnetic Field MRI, The NIRS International Symposium, 2 Oct. 2005.
- [3] P. Borbat and J. H. Freed, Biological Magnetic Resonance Vol. 19, Chapter 9, Plenum Publishers, New York.
- [4] Mitsuhiro Ono, Akihiko Suenaga, and Hiroshi Hirata, Experimental investigation RF magnetic field homogeneity in a bridged loop-gap resonator, Magn. Reson. Med., 2002; 47: 415-419.

### 3.5 多量子遷移 ESR 信号の解析理論と解析ソフトの開発 (室蘭工業大学 下山グループ)

#### 目的

本研究計画では機器の開発が最重要の目的であるが、信号解析の理論と解析ソフトウェアの開発は距離情報に直接つながり、開発を急がねばならなかった。

距離計測に利用している DEER 法は、既存の分析機器で簡便に実施されてきたが、この手法はスペクトルの特定位置のみを励起・観測するため、得られたラジカル間距離情報には配向選択性が残るほか、感度面でも不利である。一方、DQC 法ではスペクトル全体を励起するため DEER 法より高感度であるほか、より信頼性の高い距離情報が得られる。

一般に、DEER 法と DQC 法は双極子相互作用を純化して検出する為に、観測される双極子信号より距離情報を理論的解析が可能である。これらは 1) 積分変換法を用いた次元の距離解析 (Deconvolution 法) と 2) 逆問題法による距離分布解析 (Tikhonov の正規化法) である。

図 3-5-1 にパルス ESR 装置において DQC による双極子信号 (Dipolar Signal) の計測とその解析法を図示する。双極子信号にフーリエ変換を施すと、図の中央の二本の角を持つ Pake の二重項 (Pake Doublet) の信号が得られる。この角 (ピーク) 間の分離幅を計測し距離が評価できる。図 3-5-1 の中央下部の双極子信号に TIKR 法を適用すると、下部左上の距離分布がえられる。このようにして、元々あるタンパク質内に存在するラベル間の分子運動や分子配向による距離分布情報を得ることが出来る。

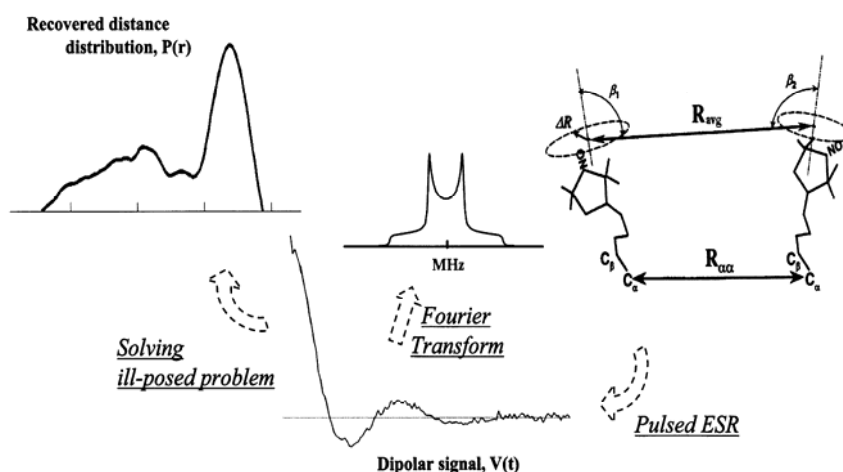


図 3-5-1 バイラベルしたタンパク質の DQC 信号 Pake Doublet と TIKR 法による距離分布

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### 実施方法

- ① DQC 信号と DEER 信号の統一的な解析を目指して、理論解析を行った。その結果、距離情報には Deconvolution 法を適用し、その解析ソフトを開発した。
- ② 距離分布情報には逆問題法を応用し、Tikhonov の正規化法アルゴリズムを開発した。更に DQC と DEER 信号の双方に適用可能な解析ソフトを開発した。

##### 実施内容

#### ① DQC 信号に含まれる距離と距離分布の解析理論

##### Deconvolution 法

DQC 信号をフーリエ変換し周波数軸に展開したいわゆる Pake Doublet よりラジカル間の一次的な距離情報が得られる。即ちピーク間の分離幅を計測し距離が評価できる。本研究



ではフーリエ変換に FFT の数値計算法を採用した。その際に問題となる基線補正を線形、多項式近似及び Spline 近似を用いた。最大エントロピー (MEM) 法による変換も採用したが、収束が極端に悪く実用には向かなかった。距離のみならず結合角の決定には Pake Doublet のスペクトルシミュレーションが必須となる。理論形式は研究代表者によって開発された。このプログラムを含めて上述の MEM 変換などのソフトウェア群は構造解析法に必須のツールで、これらによってより高精度の距離計測が可能となった。

#### Tikhonov の正規化法

一次元の距離のみならず距離分布を得るためには逆問題を解く事になる。即ち Fredholm の積分方程式を一般的に解く方法、即ち結果より原因を探る一逆問題一を採用した。本研究では逆問題の一手法である Tikhonov の正規化 (以下 TIKR) 法を採用し、距離分布を数値計算法によって求めた。即ち、双極子信号に TIKR 法を適用して、カーネルの内部相互作用関数に従う距離分布関数が理論的に得られる。巨大分子であるタンパク質内に存在するアミノ酸残基の分子運動や分子配向の原因による距離分布情報を得る理論的基礎を確立した。

#### ②解析ソフトウェアの開発

DQC 信号の解析原理についての理論的検討は 18 年度に終了した。この検討を踏まえ 18 年度に信号解析ソフトウェアの開発が完了した。バイラベルした標準有機分子の双極子変調信号から標識スピン間の距離分布情報を高精度で求めることが可能となった。その際、1) 基線補正を信号-雑音比が最低の基線で行う、いわば前提の無い方法と 2) 正規分布を採用した。特に後者では、距離分布の裾には確率分布により雑音を伴った信号分布から、裾に無用の分布が無い正規分布を用いて Fitting し解決した。なお TIKR 法による処理の検証を既知の分布から出発し、逆 TIKR 操作を経て元の分布に戻る事を下記文献に示した。

#### 【文献】

- [1] Y. W. Chiang et al., Proceedings of 16<sup>th</sup> Conference for the International Society of Magnetic Resonance pp.276 (2007).

#### 研究成果

①DQC 信号と DEER 信号に含まれる分子内・分子間の距離の統一的な解析を目指して、理論的基礎を確立した。その結果、距離情報には Deconvolution 法を適用し、その解析ソフトを開発した。

②逆問題法を距離分布情報解析に応用し、Tikhonov の正規化法アルゴリズムを開発した。更に DQC と DEER 信号の双方に適用可能な解析ソフトを開発した。

#### 成果の位置づけ、類似研究との比較

DQC 信号より、Pake Doublet の分離幅を計測し距離を評価する事は直裁な作業である。距離のみならず結合角の決定には Pake Doublet のスペクトルシミュレーションが必須となる。他方、本研究では距離分布の計測に、逆問題の一手法である TIKR 法を採用し数値解析によって求めた。これによりタンパク質内に存在するラベル間の分子運動や分子配向による距離分布情報を得ることが出来、これをシステム化した。

本研究では、従来あまり顧みられる事のなかったニトロオキシド・スピンラベルの化学構造の改良を目指し、安定同位体を用い高感度化を図った。重水核のみならず、窒素や酸素についても置換をほどこし結合角の解析を可能にした。

(2) 研究成果の今後期待される効果

#### ①生体高分子の構造解析への展開

上述の距離分布の解析法は生体高分子特にタンパク質の構造解析に威力を発揮する。現



在進行中の研究を含めて二つのタンパク質系で構造解析の研究を進めている。今後の研究を述べる。

その一つは筋肉のモータータンパク質である Troponin C にニトロオキシドをバイラベルしたタンパク質系の構造解析である。スピン間の距離は分子動力的計算により、2.6 nm と求められた。図 3-5-2A に Ku-バンド周波数における DQC パルス系列による双極子変調信号を示す。この信号では標準バイラジカル 1 (図 3-2-8) の双極子信号の減衰挙動に比べて波打ちが一箇所のみで、全体に細かい波動が観測されている。この双極子変調信号にフーリエ変換を適用した場合に得られる Pake Doublet は 2.65 nm の一次元情報を与えた。一方、TIKR 法の解析結果を図 3-5-2B に示す。ここではスピンラベル間距離は 2.7 nm を中心として左右に 0.5 nm 幅での分布が得られた。ともに分子動力学な予測値 (2.6 nm) に近いが、TIKR 法で見られる分布幅はタンパク質主鎖や残基の分子配向のゆらぎを示唆しており意義深い。

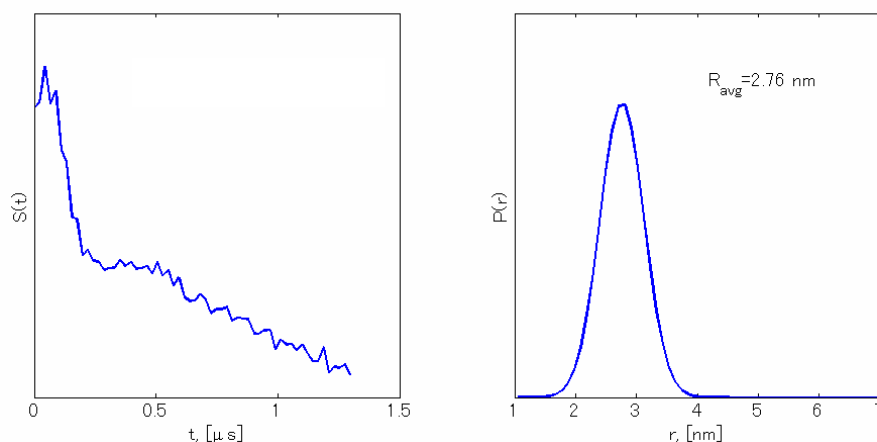


図 3-5-2 Troponin C の Ku-バンド A) 双極子信号と B) TIKR 法による距離分布

図 3-5-3 に、スピンラベルされた膜タンパク質である TF1-beta の DQC 信号を示す。この DQC 信号の TIKR 解析は約 5 nm を中心とした 1 nm の幅の分布となった。一方 Pake Doublet は 5.45 nm で、測定には齟齬がないと思われる。膜タンパク質の有効な構造解析法が無い現在、DQC と TIKR 法による距離分布は将来の強力な手法と思われる。

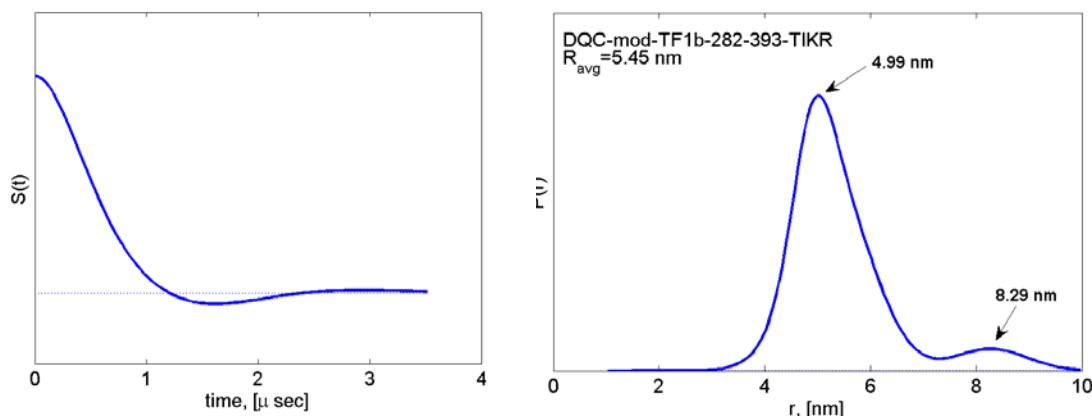


図 3-5-3 スピンラベルした TF1-beta の DQC 信号とその TIKR 解析結果。

## ② 機能性高分子への応用

本研究の独創性・新規性としてA) ナノスケール(1-10 nm)の距離計測、B) 無秩序状態の構造情報の検出、C) 極微量な試料の高分解能計測を挙げた。技術的側面から言えばこれら三点は極短マイクロ波パルス生成、信号フローの制御装置そして高感度ラベル剤の開発に依存している。本手法は構造の複雑な機能性高分子におけるナノスケールの構造のみならず物性を予測できる可能性を示唆する。現在、新規情報材料はナノスケール構造情報なしには開発不可能で、MQC-ESRによる距離情報は材料設計に必須である。

機能性高分子、特に無定形アモルファス高分子の構造と材料機能の解析においては、有力手法が無い現状ではDQCとTIKR法は必須の手法となる。巨大分子材料の開発において最終プロダクトの構造解析はもちろんその合成過程での反応生成高分子の3次元構造情報を得ることができれば、新機能性材料の開発時間の短縮をもたらす工業生産に資するところ大である。巨大分子の溶液状態での構造距離解析が出来れば、構造解析装置をon-line化し、on-siteで微量、高感度解析が可能となろう。

### 3. 6 バイラベルによる計測手法の開発 (大阪大学 荒田グループ)

#### 目的

DQC-ESR 試作機の標準距離スピラベル試料を作ること、および試作機による生物試料(タンパク質)への応用を目的とした。そこで、筋収縮の引き金となるカルシウム結合性タンパク質トロポニンCを標準タンパク質としてスピラベル化を行った。また当初予定ではなかったが、固体標準試料についても試作した。さらに、応用研究として高次タンパク質試料を作成しスピラベル化をおこなった。

#### (1) 研究実施内容及び成果

##### 実施方法

- 1) 化学合成した $\alpha$ ヘリックスペプチド(システイン基を2個含む)を購入し、スピラベルMTSSLを加えた。さらに非ラベルのペプチドで希釈後、凍結乾燥した。
- 2) トロポニンC(TnC)およびトロポニンI(TnI)遺伝子を1カ所ずつ、また2カ所をシステインに改変し、大腸菌に発現させた。大腸菌破碎後、抽出物を硫酸分画、イオン交換カラム等で精製した。スピラベルMTSSLを数倍モル量加えた。過剰のスピラベルはゲル濾過カラムで除去した。
- 3) トロポニンI過剰で、トロポニンC-I結合物は尿素中で形成させ、透析により尿素を除去した。不溶物(トロポニンI)を遠心で除去した。スピラベルタンパク質は、遠心限外濾過法で $>0.1\text{mM}$ まで濃縮した。最終試料中には40%グルセリンまたは蔗糖を加え凍結損傷は抑えた。以下はその行程である。
  1. TnC(C84) + MTSSL (x4), TnI(C80) + MTSSL (x4)
  2. 2.6M 尿素, 1M KCl 溶液中, TnC:TnI = 1:2 で両液を混合
  3. 透析により、サンプル中の尿素, KCl 濃度を段階的に減少
  4. 遠心により、未反応 TnI を除去
  5. 濃縮  $\sim 0.1\text{mM}$その他の試料についても、同様の方法を用いて行った。
- 4) シングルラベルサンプルのCW-ESRスペクトルは、非スピラ性のラベルとスピラベルを3:1で混合した試料をつくり、ダブルラベルのスペクトルを差し引いて求めた。
- 5) タンパク質の純度はSDS-PAGE(SDSポリアクリルアミド電気泳動)で行い、スピラベル量はCW-ESRスペクトルの二重積分値から見積もった。

##### 実施内容

- 1) 固体標準試料として、 $\alpha$ ヘリックスペプチド(1.9nm)凍結乾燥標品を作成した。 $\text{NH}_2\text{-Ala-Lys-Ala-CysSL-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-CysSL-Ala-Ala-Ala-COOH}$ システイン(Cys)のSHをスピラベル(SL)化した。マトリックスに希釈。距離はCW-ESRで測定し確認し(図3-6-1)、東北大へ送付してDQC測定した。信号強度は十分大きくなかった。

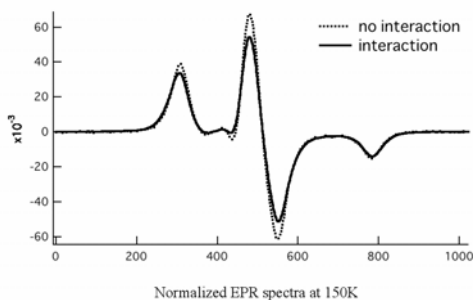


図 3-6-1

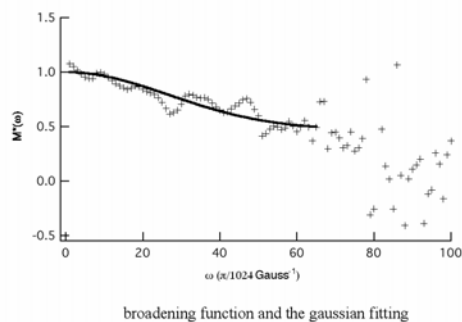


図 3-6-2

2) 応用タンパク質試料としてトロポニン単量体バイラジカル(2.6 nm)を作成した。図 3-6-3 のように 35, 84 番目のアミノ酸システインにニトロキドスピンラベルを結合した。濃度は 0.1–0.5mM までに濃縮できた。DEER 測定で距離を確認した(図 3-6-4)。その結果、DQC 測定で良好な信号強度を得ることに成功し、最初の距離計測例となった(下山グループ、大庭グループ報告参照)。

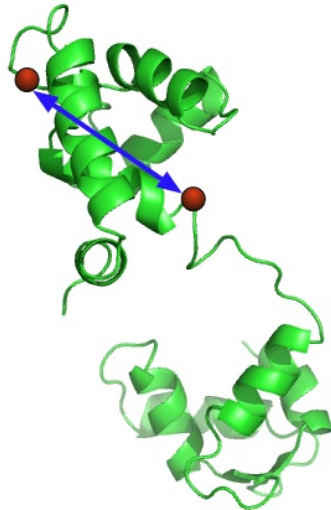


図 3-6-3

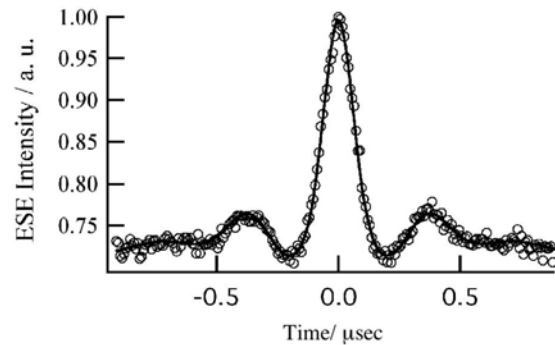


図 3-6-4

3) トロポニン C-I 複合体バイラジカル (3.4, 5.7nm, 7.5nm) を合成した(図 3-6-6)。以下のような Cys 置換変異体を合成して 2 量体を形成させた。SDS-PAGE により 1:1 複合体形成をチェックした(図 3-6-5)。

- TnC(S98C)-TnI(Cys80) : 3.4 nm
- TnC(C84)-TnI(Cys80) : 5.7 nm
- TnC(C35)-TnI(Cys80) : 7.5 nm

5.7nm サンプルの SDS-PAGE

これらの試料の DQC 信号は小さく、プロジェクト期間内には完成できなかったもので、引き続き改良する予定である。

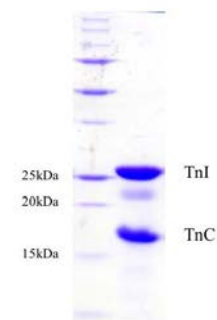


図 3-6-5

その他の試料としてトロポニン C 単量体 C84/98C(2.37nm) を作成した(図 3-6-7)。ESR スペクトル(図 3-6-8)は C84(遅い回転運動)と S98C(速い回転運動)の各シングルサンプルのスペクトル和となった。高濃度 0.2mM に濃縮した。

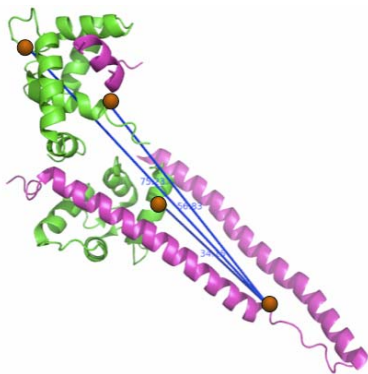


図 3-6-6



図 3-6-7

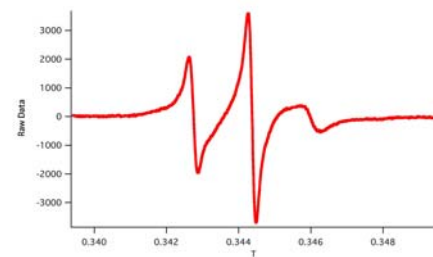


図 3-6-8

- 4) 膜タンパク質試料等の DQC 測定の可能性を調べた。網膜光受容タンパク質ロドプシンについて調べた。天然の反応性の高い Cys をスピンラベル化した。予備実験で DEER 測定したところ、タンパク質間接触によるスピン-スピン相互作用が強く、4~5 nm 以上の距離測定は困難であった。そのため、膜を界面活性剤で溶かし非スピンラベルタンパク質で希釈して再構成膜サンプルを作ることが必要であることがわかった。
- 5) バクテリア膜のナトリウム-水素イオンアンチポーター-NhaA のスピンラベル標品を作った。CW-ESR では pH 変化で側鎖運動性がわずかに変動する部位があることがわかった。この試料は G. Jeschke が 2 量体間の DEER 距離測定に成功しているので、ロドプシンのような問題点は少なく、DQC 測定の標準膜試料に適すると考えられる。
- 6) 高次タンパク質複合体について。上記を含め多様なタンパク質を用いてスピンラベル化し、CW-ESR 距離測定に成功しており、今後は DQC 長距離測定に期待がかかる (図 3-6-9)。特にモータータンパク質キネシンではネックリンカー間距離 (歩幅) や微小管結合ループ内の距離分布の CW-ESR 測定に成功し、微小管結合やヌクレオチドによる変化を見つけた。距離分布は広く、2.5nm を超える成分もあった。トロポニンの作用点として働くと推定されているトロポミオシン (2 量体コイルドコイルヘリックス) については、システイン-スピンラベルスキヤニングを行い、アクチンフィラメント上へトロポニンとともに再構成したサンプルを CW-ESR 測定した。側鎖運動性から構造変化 (アクチンとの接触変化) 部位を探索したが、トロポニンへのカルシウム結合では変化がなかった。

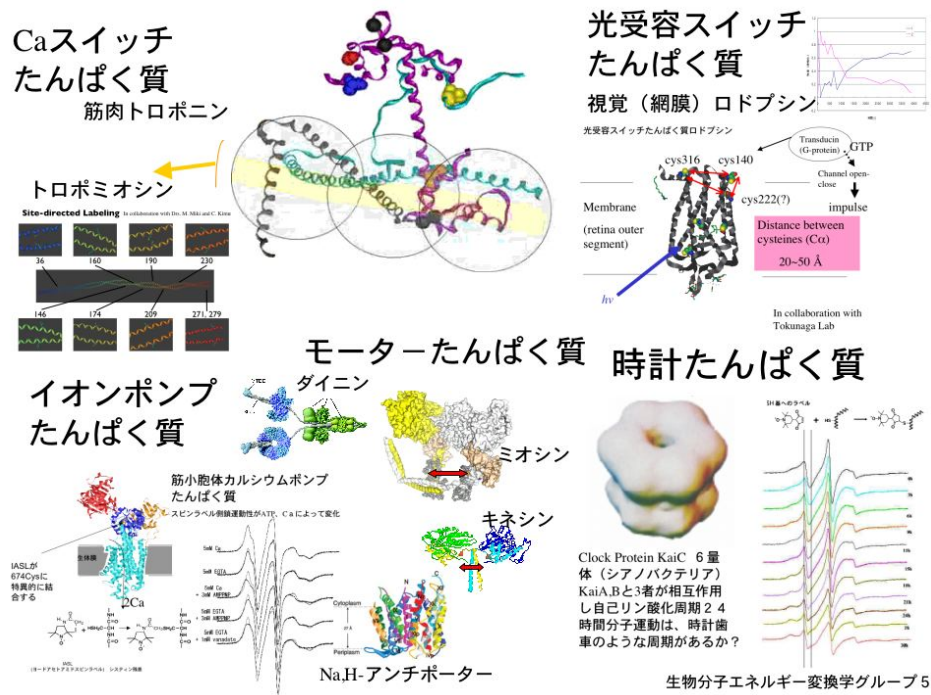


図 3-6-9

## 成果

生物試料への応用ができるかを性能評価した。

- 1) スピンラベルヘリックス固体試料試作について。凍結乾燥前の溶液状態の CW-ESR 測定では成功したが、固体試料の DQC では信号が小さく、今後検討の余地がある。
- 2) スピンラベルトロポニン C について。高濃度化が可能で距離分布が小さいことから、標準試料として最適である。2.6 nm 試料は開発機として初めて信号を測定するとともに距離解析にも成功した。

- 3) トロポニン C-I 結合物について。ほとんどすべての試料作成に成功し、DQC 測定のために東北大へ送付またはスタンバイ状態になった。継続して DQC を行い、サンプルの改良をおこなう予定である。
- 4) 膜タンパク質試料について。準備段階ではあるが、ロドプシン、NhaA についてはスピラベル化に成功した。問題点としては、タンパク質は膜内では凝集状態にあるので、分子間の非特異的なスピンスピン相互作用が無視できない。天然試料では困難ではあるが、界面活性剤で可溶化-再構成できるものは非ラベルタンパク質で希釈することにより回避できると思われる。
- 5) 高次のシステムについて。微小管に結合したキネシンネックリンカー間、微小管結合ループ内の広い距離分布は、これらの部位は普通のタンパク質とは異なりダイナミックでモーター機能に関与することを示唆した。2.5 nm を超える成分があるので DQC による測定を計画している。

アクチンフィラメント上のトロポミオシンの構造変化については、カルシウムによる側鎖運動性変化はほとんどなかったが、他のタンパク質、トロポニン、アクチン間で DQC 距離測定を行い、カルシウム効果を探索し、新しい筋収縮制御機構を構築したい。

このような巨大タンパク質系(分子量 10 -100 MDa)で、DQC は原子レベルの距離情報を与えてくれ、威力を発揮することは間違いない。

#### 成果の位置づけと類似研究との比較

- 1) スピラベルヘリックス固体試料について。アイデアとしては斬新であったが問題点は多く成功しなかった。そのためかヘリックス溶液試料はよく用いられるが、固体の研究は全く類似研究がない。
- 2) スピラベルトロポニン C およびトロポニン C-I 複合体について。タンパク質を距離標準試料とする場合、タンパク質が安定でバックボーンだけでなく側鎖スピラベルのゆらぎが小さいことが重要である。この目的にはこれまで部位特異的にスピラベルしたリゾチームが標準タンパク質として、CW-ESR 距離測定 (Hubbell ら)、DQC 距離測定 (Freed ら) に用いられた。トロポニンも同様に距離標準タンパク質として最適であった。DEER 距離測定では、P. G. Fajer らもトロポニンの異なる部位をスピラベルし、距離標準に用いている。
- 3) 膜タンパク質試料は可溶化してから結晶をつくるのが容易ではない。高等生物も膜タンパク質は発現も難しい。膜中での構造を知ることは大変重要な研究である。スピラベルした膜タンパク質の CW-ESR による距離測定 (<2.5 nm) は、膜貫通ヘリックスの配置を知る上で威力があった (Hubbell ら)。ところが、DEER などのパルス ESR 長距離測定は、ほとんど報告がない。本研究で原因となる分子間スピンスピン相互作用を抑える工夫が生まれたことは世界に先駆けると期待できる。スピラベルを用いずに、光合成膜ではクロシンラジカルー Mn イオンクラスター間距離を計測した河盛らの先駆的な DEER 距離測定があり特筆すべきである。
- 4) 膜タンパク質では数多くのスピラベル ESR 距離測定があるが、それ以外の高次タンパク質複合体システムについては、世界的にはほとんど行われていない。CW-ESR を用いてはクリスタリン、シンタキシン、プリオン(下山グループ)、DNA 結合タンパク質-DNA 複合体など数少ない。DEER 計測ではトロポニン、ユビキチンなどがある。しかし、本研究開発で測定しようとしているキネシン-チューブリン (微小管)、トロポニン-アクチンフィラメント、筋肉標本のように、100 MDa 近い巨大タンパク質複合体や組織を用いた例はない。

#### (2) 研究成果の今後期待される効果

- 1) タンパク質構造がかたく、距離分布が小さい場合に、DQC 測定は、十分な性能がある。タンパク質がやわらかくダイナミックか、側鎖運動が大きいときは、距離分布が大きい

く、見かけの精度が落ちるので、分子動力学法を併用する等の工夫が必要である（山崎グループ報告）。また、構造未知の場合の三次元構造決定に際しては、誤差を生むことになる。しかしながら、距離分布はタンパク質本来の柔らかさ（ダイナミクス）を示し、溶液中のそれを知るとともに、分布のシフトは分子形態（構造）変化をあらわし、それを測定できる方法としてDQCは期待が大きい。

- 2) タンパク質濃度を上げることは困難な場合が多い。今後感度の更なる改善に期待がかかる。
- 3) 膜タンパク質試料は凝集体ができるものは非特異的分子間スピンスピン相互作用のため、測定が難しいので、試料の改善が必要であることがわかったが、期待は大きい。非スピン性タンパク質分子希釈による解決法は今後試してみなければならない。

上記の課題があるとしても、この開発成果を応用した生体系、特にタンパク質の距離計測によって、現在の XRD でも NMR でも不可能なナノスケール構造解析が可能となり、国内の生物学の高いレベルでの研究成果が出てくることは間違いない。引き続き、DQC を含めたナノ長距離測定法の生物応用に関する分野横断的研究に対し、研究費用や人的支援を期待したい。

### 3. 7 タンパク質試料の作製と NMR による評価 (理化学研究所 山崎グループ)

#### 目的

タンパク質を用いて、バイラベル (中距離から長距離) 試料を作り、DQC-ESR 実験に供する。その試料に対して NMR を測定し、スピン標識によるタンパク質構造への影響と、標識率を評価する。

#### (1) 研究実施内容及び成果

#### 実施方法

研究対象のタンパク質は TF1-beta である。好熱菌のプロトンポンプ (細胞膜上でプロトンの濃度差を利用して ATP を合成する) の 1 つのサブユニットの名称である。単量体で構造が安定で水によく溶けるので、単一サブユニットでの構造研究が可能である。このサブユニットは、ATP、ADP の反応部位を含む。TF1-beta は 473 アミノ酸残基からなる。alpha3-beta3 の hexamer として結晶構造が得られている。長い方向で約 8 nm あり、DQC-ESR によって測定可能と期待される最長距離に匹敵する。

NMR にとってはとても大きな分子量の部類にはいるが、区分標識法と TROSY 法の組み合わせによって、主鎖の NMR 信号の帰属が得られている。Cys への mutation や spin label による全体構造への影響を NMR で monitor できるので、全体構造を乱さずに spin label を施せる部位を探すのに適した試料といえる。

構造に影響を与えずに、距離測定のために 2 つの spin label を導入する。その spin 間距離は短距離から長距離まで複数の標識体を作製することを目的とした。

まず、Cys への mutation と spin label が構造とタンパク質の溶解度や安定度に影響を与えない部位 (どのアミノ酸残基か) を決める。もともとこのタンパク質は Cys を持たないので、このまま、新たに Cys を導入することができる。1 点の Cys mutation とその Cys への spin label を行い、NMR スペクトルから全体構造が維持されているか、変化は標識部位に限定されているか、標識率は十分に高いかを測定する。

#### 実施内容

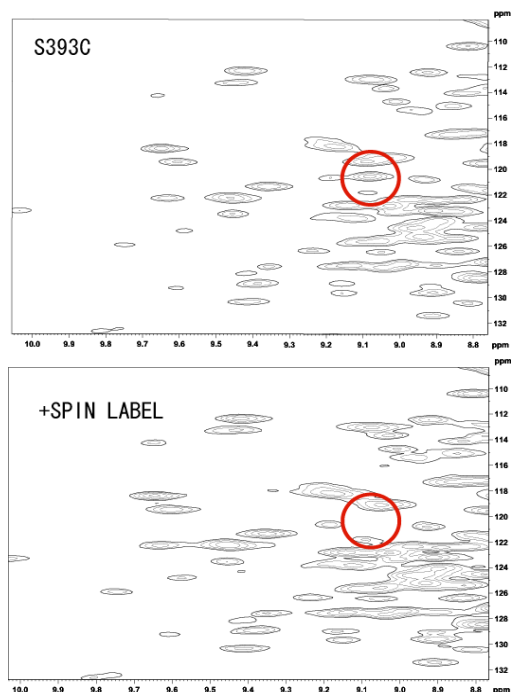
少なくとも、構造の内部への Cys mutation は当然構造を乱すので、タンパク質分子表面にあるアミノ酸残基を多数 (表 3-7-1 に示す 15 箇所) 選んだ。Cys mutation は発現ベクターへの市販のキット (Quick Change, Stratagene) を用いて行った。wild type の発現と同じように、大腸菌による大量産生 (T7 promoter、T7 polymerase による) 系を用いた。精製では、バッファーに DTT をいれ Cys を保護した。イオン交換カラム (Q) と疎水相互作用カラム (phenyl) によって精製した。



	たんぱく質の性質	MTSSL導入
S66C	良好	成功
D68C	分解	
A111C	沈殿	
R191C	やや沈殿	広範囲に変化
N196C	良好	成功
G216C	良好	成功
A282C	良好	成功
Y313C	測定時沈殿	
T314C	沈殿	
S323C	沈殿	
Q365C	良好	成功
A385C	良好	成功
S393C	良好	成功
S426C	良好	成功
E464C	良好	確認不可

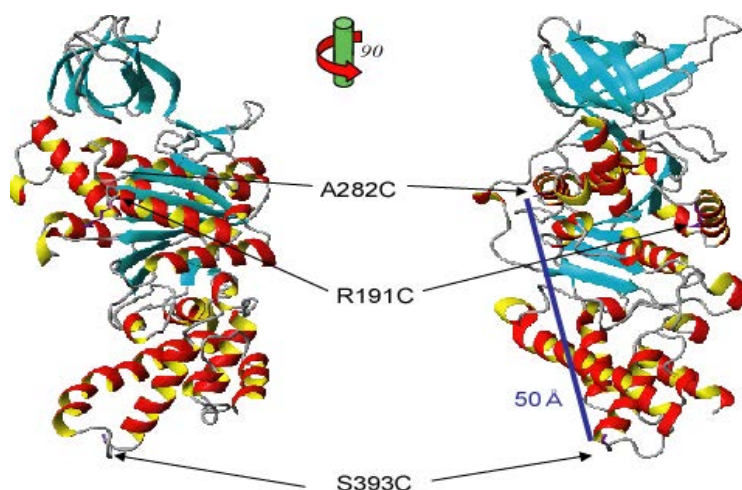
(表 3-7-1)

タンパク質は  $^{15}\text{N}$  標識を行い、NMR で  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  2D TROSY 測定を行った。15 の mutant のうち、4 つは発現時に沈殿などのため、次に進めなかった。NMR 測定時にも 1 つが沈殿した。spin label には MTSSL を使用した。反応直前に DTT を取り除き、反応後に過剰の MTSSL を取り除いた。そうして得られた試料を NMR 測定した。標識点のまわり 1 nm ほど信号が消える。S393C の例を図 3-7-1 に示す。横軸水素核、縦軸窒素核の周波数である。1 残基から 1 つのピークが得られるスペクトルである。赤丸で囲った信号が spin label によって消失している。その他は全く影響を受けていない。このことから、標識はタンパク質構造に全く影響を及ぼしていない。きれいに消失しているので 100 % 近い標識率であることが分かる。



(図 3-7-1)

2 つの試料について良くない結果が得られた。結果、15 のうち 8 の位置について構造や溶解度に悪影響なく標識を行うことができた。表面にあつてほぼ安全と思つた位置への mutation でも半分ぐらいで不具合があることが分かつた。



(図 3-7-2)

このうち 3 点を選び、2 点標識を 3 つ作った。つまり、S66C+A282C、S66C+S393C、A282C+S393C の 3 つの double mutant である。同様に発現ベクトルへ 2 回目の mutation を行った。あとは同様に発現、精製を行い NMR での確認を行った。標識も 2 箇所へ同時に問題なく反応することが NMR で確認された。つまり、安全であることが確認された 2 点への同地標識は安全であることが分かった。

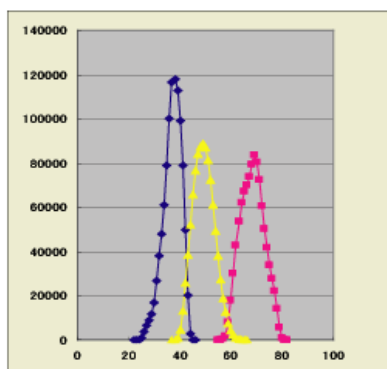
結晶構造をもとにそのスピン間距離を推定すると S66C+A282C: 3 nm、S66C+S393C: 6.8 nm、A282C+S393C: 5.1 nm であった (C-beta 間の距離)。容易と思われる 3.0 nm から、目標値ある 5.0 nm、また、限界近くと思われる 7.0 nm あたりまでの良い距離が得られた。ESR 測定条件は 50 % glycerol、0.1 mM、10  $\mu$ L である。十分な量と濃度を得ることができた。

また、スピンの 1 つしかない場合、分子間の 2 つのスピン間距離が測定される。不要な信号で、距離は長距離に分布する。濃度が高いと問題が起きる。0.1 mM 程度の濃度で分子間の信号がどのくらい重なってくるか検証するために、S393C への一点標識の試料も同様の条件で作製した。

DQC-ESR の測定は東北大学で行った。一部の測定を一緒に行った。A282C+S393C の 2 点標識試料から特徴的な DQC による振動が観測された。S393C の一点標識試料からは弱く、しかも振動しない信号が得られた。振動の周期から距離が計算されるので 0.1 mM の濃度は適当に薄いこと、またこのタンパク質は 2 量体や aggregation は起こしていないことが確認された。データとその解析解釈については、別途報告がある。

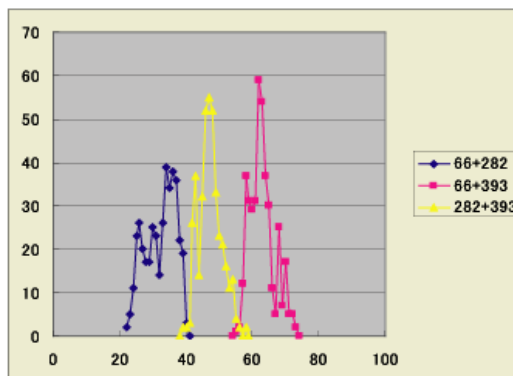
2 点標識 TF1-beta (A282C+S393C) の DQC 信号の振動は、ほぼ、4.9 nm の距離に相当する。これは、結晶構造をもとに予定していた 5.1 nm に近い。しかし、実験データは距離に分布があることを示していた。そこで、分子動力学を用いてスピン標識がどの範囲で動くことができるか計算した。タンパク質は結晶構造に固定して、導入したスピン標識の部分が自由に動けるモデルで計算すると、5.0 nm を中心に 0.5 nm の RMSD で分布する結果が得られた。energy を含めた MD 計算することで、その分布の中で好ましい構造が選ばれるが、4.8 nm を中心に 0.4 nm の RMSD という結果が得られた。これらの値は実験データと一致するように見える。実験と解析と simulation をいっそう進めることで、分布を含めた距離の決定が可能か検証されることになるだろう。

標識側鎖を自由に運動



(図 3-7-3)

水溶液中のエネルギーに基づく計算



(図 3-7-4)

## 成果

バイラベルタンパク質を作ることに成功した。TF1-beta タンパク質において、S66C、A282C、S393C の mutation と spin label は構造を乱さない良い位置であることが、分かった。標識率はほぼ 100 %であることも確かめられた。double mutant を用いることで、スピン間距離は 3.0 nm、5.1 nm、6.8 nm の 3 種類得られた。スピラベルの側鎖が自由に動くことで 1 nm ほど距離が変わる可能性があることが分かった。

## 成果の位置づけ類似研究との比較

良い位置への標識は構造への影響は NMR で見出せないくらい微小である。殆どの場合、悪い位置への mutation と spin label は溶解度を変化させているので、NMR 測定前に判断がついている。NMR で mutation と spin label の安全性を確かめた上でのバイラベルの作製の例はない。

### (2) 研究成果の今後期待される効果

測定装置は十分な性能を示しているが、標識側鎖がある程度の範囲に自由に動く。構造決定の情報としては、曖昧さがあるため利用しにくい。まず、側鎖の分布がある場合でも、タンパク質の構造変化がある時、分布をそのまま、平均距離が変化することを測定することが可能であることが期待できる。大きなタンパク質の構造変化を今まで以上に精密にとらえられることが期待できる。

構造未知のタンパク質構造決定のためには、NMR による短距離情報と組み合わせることが面白い可能性だと思われる。分布も含めて測定値が信頼できるならば、分子動力学に DQC-ESR の測定値を含めて optimize することができると期待する。

### 3. 8 距離測定用標準試料の合成 (京都大学 山本グループ)

#### 目的

新規に作成された Ku バンドパルス ESR 装置による距離測定の実効性を評価するための基準有機物質 (ラジカル間距離約 4 nm) を合成する。

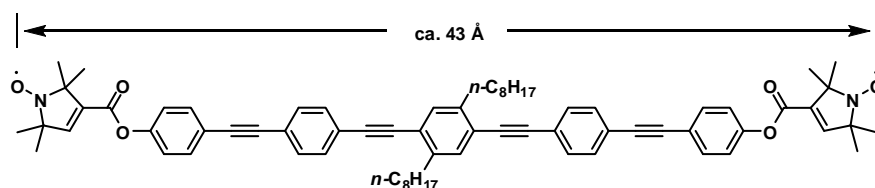
#### (1) 研究実施内容及び成果

#### 実施内容

測定装置機能評価用の固体標準試料 (ラジカル間距離約 4 nm) を作製する。

#### 成果

距離測定標準物質として既に報告されているバイラジカルは、ベンゼン環とアセチレン骨格の繰返しをリンカーとするのもで、①ピロリジンニトロキッドをエステル結合で導入すること、②リンカー伸長にアセチレンの酸化的カップリングを用いること、③長鎖アルキル基をすべてのベンゼン環に導入して化合物の溶解性を確保していること等の特徴を有している (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 7560)。この中で、②と③が合成工程をきわめて長いものになっている。そこで今回、妥当な工程数で合成可能と考えられる、下記の 4 nm バイラジカルを設計した。図 3-8-1 に示すラジカル間距離は標準的な結合長と結合角から推定したものである。



(図 3-8-1)

ジエチニルベンゼンから出発して、Sonogashira カップリングを繰り返し、リンカーを合成した。別途合成したピロリジンニトロキッド-カルボン酸とエステル合成するのが既報の手法であるが、この場合、フェノール性 OH 基の保護と脱保護が必要となる。そこで、ピロリジンニトロキッド-フェノールエステルとリンカー部の Sonogashira カップリングによる合成を考案した。同時に、合成及び測定時における試料の溶解性を確保するために、ジエチニルベンゼンにあらかじめオクチル基を導入した。以上の手法によって、標準物質の簡便かつ簡略な合成法の確立に成功した。

#### (2) 研究成果の今後期待される効果

距離測定用標準試料として必要となる、種々のリンカー長を有するバイラジカルを系統的に、かつ効率よく合成できると考える。

### 3. 9 ラベル標品の合成 (北海道教育大学 中村グループ)

#### 研究目的

- 1) DQC-ESR装置の性能評価を行う為の標準物質としてのスピラベル化合物の有機合成方法の確立を目指す。
- 2) バイラベルを含むマルチラベル化合物の合成原理を検討する。
- 3) 同位体 ( $^{14}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ ) を含む新規バイラベルの合成法を目指した。

#### 研究成果

- 1) DQC-ESR装置の性能評価を行う為の標準物質としてスピラベル化合物の有機合成方法を検討し確立した。この結果数種のバイラベルの有機化合物を得た。
- 2) これによりバイラベルのみならずマルチラベル化合物の合成原理を確立した。
- 3) 異なる同位体 ( $^{14}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ ) を含む新規バイラベルの合成法を開発した。これによってニトロオキシド基の窒素核や酸素核、重水素核の同位体可変物質の合成原理が確立できた。
- 4) 芳香族ジアミドによる一般的合成法を開発し、 $^{14}\text{NO}$ と $^{15}\text{NO}$ 担持のバイラジカル合成に成功した。またNO間距離の異なる標準分子の開発が可能となった。(文献1)
- 5) 芳香族ジアミドを基本骨格とした $^{14}\text{NO}$ と $^{15}\text{NO}$ 担持のバイラジカル合成のCW-ESR信号より、NO間距離に関する情報をスペクトル解析より得た。(文献1)

#### 【文献】

- [1] H. Kameya et. Al, Spectrochimca Acta **46**, 001-005 (2007)

#### 研究成果

- 1) DQC-ESR装置の性能評価を行う為の標準物質としてのスピラベル化合物の有機合成方法を検討し確立した。この結果数種のバイラベルの有機化合物を得た。
- 2) これによりバイラベルのみならずマルチラベル化合物の合成原理を確立した。
- 3) 異なる同位体 ( $^{14}\text{N}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ ) を含む新規バイラベルの合成法を開発した。これによってニトロオキシド基の窒素核や酸素核、重水素核の同位体可変物質の合成原理が確立できた。

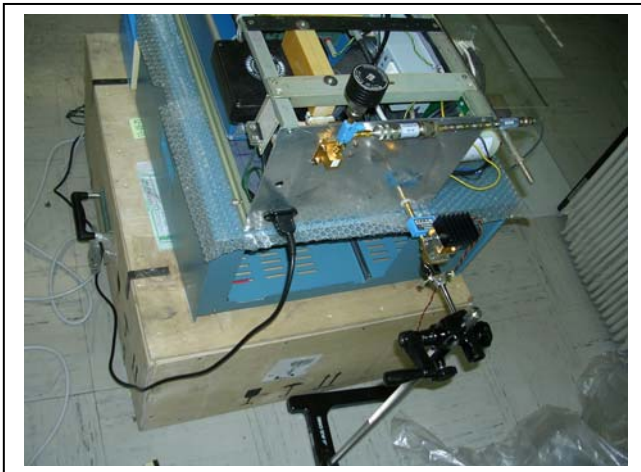
### 3. 10 Ku バンド TWTA の設計・製作(ロシア反応化学研究所 Dzubaグループ)

#### 研究目的

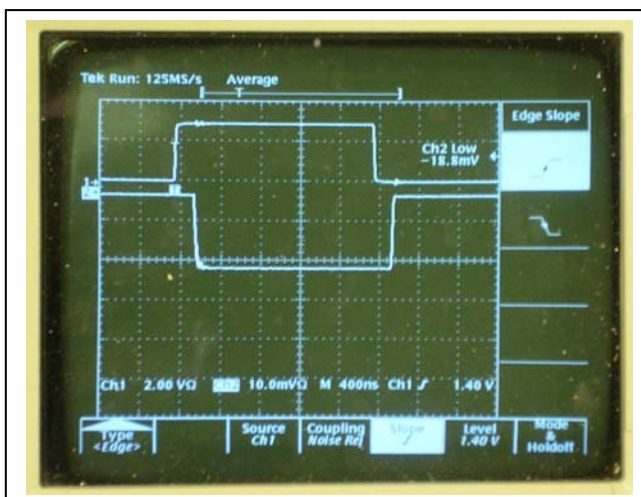
- 1) Ku バンドパルス ESR の入力波に十分な増幅を行うべく、大出力の TWTA (出力 2 kW) の新規設計を行う。この設計に基づき組上げ及び電子製作を行う。
- 2) 新規 TWTA を Ku バンドパルス ESR 装置に組み込み、動作検証を行う。

#### 研究成果

- 1) Ku バンド用 TWTA (出力 2 kW) の設計と製作を行った。
- 2) 製作された TWTA を東北大学に導入し、Ku バンドパルス ESR 装置に組み込んで動作検証を行った。
- 3) この結果、マイクロ波ユニットがカバーする 17.0~18.0 GHz の範囲で 800 W 程度のパルス出力が確認された。



製作された Ku-Band TWTA の特性テスト (於：日本電子)



TWTA への入力パルス (上段) と出力電力特性 (下段)

## § 4. 研究参加者

### ①下山グループ（研究チーム統括と ESR 理論シミュレーションの研究）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
下山雄平	室蘭工業大学 大学院工学研究科	教授	研究チーム統括と ESR 理論シミュレーションの研究	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
亀谷 宏美	室蘭工業大学	研究員	バイラベルの合成と ESR 実験	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 3 月

### ②大庭グループ（Ku バンドマイクロ波回路の最適化と解析ソフトの構築）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
大庭裕範	東北大学・多元 物質科学研究所	准教授	パルス ESR 装置の設計 および組み立て調整	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
中澤重顕	同上	博士研究員	共振器解析およびパルス ESR 測定	平成 18 年 10 月～ 平成 19 年 3 月
菅原康久	同上	修士 2 年	バイラジカル試料調整	平成 16 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
木村尚貴	同上	修士 2 年	電磁界計算	平成 16 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
中森太郎	同上	修士 1 年 ～博士 1 年	ラジカル試料調整、 ESR 測定	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 9 月
安部 淳	同上	修士 1 年	ESR 装置改良、ESR 測定	平成 19 年 4 月～ 平成 19 年 9 月

### ③小野グループ（空洞共振器の開発）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小野 光弘	山形大学 工学部	客員教授	空洞共振器の設計、実験、研究統括	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
松本 直幸	山形大学 工学部	研究補助員	数値解析、実験	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
有田 真琴	山形大学 工学部	研究補助員	数値解析、実験	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 8 月

中嶋 眞理	山形大学工学部	研究補助員	数値解析、実験	平成 18 年 9 月～ 平成 19 年 9 月
-------	---------	-------	---------	-----------------------------

④水田グループ

(パルスマイクロ波回路の開発、パルス発生器および高速 AD 変換装置を連携制御するソフトウェアの開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
水田 幸男	日本電子(株)分析機器本部	主幹研究員	装置開発	平成 17 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
藤井 金苗	日本電子データム(株) AI サービス部	専任副理事	装置開発	平成 17 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
風間 俊治	日本電子(株)分析機器本部	主幹技師	装置開発	平成 17 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
鈴木 貴之	日本電子(株)分析機器本部	主任	装置開発	平成 17 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
河原 進	日本電子(株)営業本部	副本部長	事務局	平成 17 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
釜堀 裕司	日本電子(株)分析機器本部	グループ長	事務局	平成 17 年 10 月～ 平成 19 年 9 月

⑤ 荒田グループ (バイラベルによる計測手法の開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
荒田敏昭	大阪大学	准教授	装置機能評価	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
植木正二	徳島文理大学香川薬学部	助教	装置機能評価	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 9 月
相原朋樹	大阪大学	大学院生	装置機能評価	平成 16 年 10 月～ 平成 18 年 3 月
鳴海良平	大阪大学	大学院生	装置機能評価	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
保田 哲	大阪大学	大学院生	装置機能評価	平成 16 年 10 月～ 平成 19 年 9 月
植田啓介	大阪大学	大学院生	装置機能評価	平成 15 年 10 月～ 平成 19 年 9 月



石井健太郎	大阪大学	大学院生	装置機能評価	平成19年4月～ 平成19年4月
藪内 都		派遣	装置機能評価	平成18年10月～ 平成19年3月
桑原直之	大阪大学	CREST 研究員	装置機能評価	平成19年4月～ 平成19年8月

⑥山崎グループ（1. タンパク質試料の調製 2. NMR-ESR 統合的構造解析法）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山崎 俊夫	理化学研究所 横浜研究所・ゲノム科学総合研究センター	チームリーダー	タンパク質 TF1-beta の作製とNMRによる評価	平成16年10月～ 平成19年9月
畑中 稔	同上	研究員	同上	平成16年10月～ 平成19年3月

⑦山本グループ（距離測定用標準試料の合成）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山本 行男	京都大学大学院人間環境学研究科	教授	装置機能評価	平成18年12月～ 平成19年9月
酒井 尚子	京都大学大学院人間環境学研究科	技術職員	装置機能評価	平成18年12月～ 平成19年9月

⑧ 中村グループ（ラベル標品の合成）

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
中村 秀夫	教育学部函館校	助教授	装置機能評価	平成16年10月～ 平成18年3月
鵜飼 光子	教育学部函館校	教授	装置機能評価	平成16年10月～ 平成18年3月
的場 昭代	教育学部函館校	M1	装置機能評価	平成17年4月～ 平成18年3月
亀谷 宏美	教育学部函館校	非常勤	装置機能評価	平成16年10月～ 平成18年3月

⑨Dzubaグループ (KuバンドTWTAの設計・製作)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
S. Dzuba	反応化学研究所	所長	TWTA設計・製作	平成17年4月～平成18年3月
Y. Grishin	反応化学研究所	教授	TWTA設計・製作	平成17年4月～平成18年3月
E.Kalneus	反応化学研究所	技師	TWTA設計・製作	平成17年4月～平成18年3月
M.Bizin	反応化学研究所	技師	TWTA設計・製作	平成17年4月～平成18年3月
V.Koshelenko	反応化学研究所	技師	TWTA設計・製作	平成17年4月～平成18年3月
M.Romachenko	反応化学研究所	事務員	TWTA設計・製作	平成17年4月～平成18年3月

§5. 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Prof.Yuri Grishin Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Russia	パルス ESR の技術指導	日本電子、東北大	平成19年1月13日～2月8日

## § 6. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0件、国際誌 12件)

1. New Method of Tie Line Determination by Spin-Label ESR, Y-W. Chiang, J. Zhao, J. Wu, Y. Shimoyama, J. H. Freed and G. W. Feigensohn, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1668**, 99-105 (2005).
2. Conformational Change in Full-length Mouse Prion: A Site-Directed Spin Labeling Study, O. Inanami, S. Hashida, Y. Shimoyama and M. Kuwabara, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **335**, 785-792 (2005).
3. Direct evidence of complete charge separation in the excited triplet state of 1,2-(N-arylaziridino)-[60] fullerene by means of time resolved electron paramagnetic resonance, Seigo Yamauchi, Yohei Iwassaki, Y. Ohba, Bahlul Z. S. Awen, Akihiko Ouchi, *Chem. Phys. Lett.*, **411**, 203-206 (2005).
4. Novel Excited Quintet State in Porphyrin: Bis (quinoline-TEMPO) yttrium-tetraphenyl- porphyrine Complex, Luca Maretti, Saiful S. M. Islam, Yasunori Ohba, Takashi Kajiwara, and Seigo Yamauchi, *Inorg. Chem.*, **44**, 9125-9127 (2005)
5. Synthesis of C2-chiral bifunctionalised spin labels and their application to troponin C, S. Chatani, M. Nakamura, H. Akahane, N. Kohyama, M. Taki, T. Arata and Y. Yamamoto, *Chem. Commun.*, **14**, 1880-1882 (2005)
6. Identification of pH-sensitive Regions in Mouse Prion by the Cyctein-scanning Spin-labeling ESR Technique, Y. Watanabe, O. Inanami, M. Horiuchi, W. Hiraoka Y. Shimoyama, F. Inagaki and M. Kuwabara, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**, 111-119 (2006).
7. A New Series of Radical-Triplet Pair System: Modulation of Radical-Triplet Interaction by a Counter Ion, L. Maretti, S. M. Islam, T. Kajiwara, R. Miyamoto, Y. Ohba, and S. Yamauchi, *Mol. Phys.*, **104**, 1619-1626 (2006)
8. Calcium-dependent movement of troponin I between troponin C and actin as revealed by spin-labeling ESR, T. Aihara, S. Ueki, M. Nakamura, and T. Arata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 462-458 (2006).
9. Synthesis of a New Water Soluble 2,2-Bifunctionalized Spin Label and Its Application to Troponin C, Tasuku Hirayama, Masayasu Taki, Motoyoshi Nakamura, Toshiaki Arata and Yukio Yamamoto, *Chem. Lett.* **35**, 834-835 (2006)
10. ESR and ENDOR Studies of the Distal Site Coordination of Shark Heart Myoglobin, Y. Ohba, S. Yanagiya, N. Ohshima, A. Matsuoka, K. Shikama, and S. Yamauchi, *Applied Magn. Reson.*, **31**, 527-541 (2007).
11. A New Pulse Width Reduction Technique for Pulsed Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Y. Ohba, S. Nakazawa, S. Kazama and Y. Mizuta, *J. Magn. Reson.*, **191**, 1-6 (2008).
12. Development of a control system for pulsed-electron spin resonance spectrometers, Y. Mizuta, S. Kazama, Y. Ohba, N. Sakai, Y. Yamamoto, and Y. Shimoyama, *Rev. Sci. Instrum.*, **79**, 044705-1-8(2008).

(2)その他の著作物

1. 荒田敏昭、部位特異的スピンラベル ESR-機能中の巨大タンパク質構造解析-、*分光研究* 55巻5号、308-319 ページ (2006)
2. T. Arata, T. Aihara, K. Ueda, M. Nakamura and S. Ueki, Calcium structural transition of troponin in the complexes, on the thin filament, and in muscle fibres, as studied by site-directed spin-labelling ESR, *Adv. Exp. Med. Biol.* **592**, 125-135 (2007)
3. 荒田敏昭、*生命科学のための機器分析)実験ハンドブック(実験医学別冊)*
4. 荒田敏昭、*ESR(電子スピン共鳴)ータンパク質構造解析ー(羊土社)*, 168-176 頁 (2007)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 5 件、国際会議 2 件)

1. Calcium structural transition of troponin in the complexes, on the thin filament, and in muscle fibres as studied by site-directed spin-labelling ESR, T. Arata, International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, 2006. Oct., Okazaki.
2. 電子スピんで探るタンパク質の構造と物性、荒田敏昭 ESR フォーラム研究会、2006 年 6 月、京都大学
3. 部位特異的スピンラベル ESR 法 -機能中の巨大複合体解析-、荒田敏昭、大阪大学蛋白研究所セミナー、2006 年 7 月、大阪大学
4. Switch action of troponinI on the Ca<sup>2+</sup> regulated thin filament as revealed by Spin labeling distance measurement using PELDOR, T. Aihara, M. Nakamura, S. Ueki, M. Miki, and T. Arata Alpach Workshop on Motor Proteins 2007, 2007. Mar., Austria.
5. An ESR Study of Prion (BSE) Protein, Y. Shimoyama Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2007 (JSED2007) 2007. Mar., Muroran.
6. Synthesis and Electron Spin Resonance Spectroscopy of Biradical Molecule Containing <sup>14</sup>N-O and <sup>15</sup>N-O Moieties, H. Nakamura, H. Kameya, M. Ukai, A. Matoba, Y. Shimoyama, 10 th International Workshop on Electron Magnetic Resonance of Disordered Systems, 2007. Jun., Bulgaria.
7. パルス ESR の高性能化 - 高時間分解・高速サンプリングシステムの開発、水田幸男、風間俊治、大庭裕範、下山雄平 ESR フォーラム研究会、2007 年 6 月、けいはんなプラザ

②口頭発表 (国内会議 15 件、国際会議 2 件)

1. ビラジカル Nitro-oxide の合成と ESR、的場暁代、亀谷宏美、荒田一志、下山雄平、中村秀夫 日本化学会北海道支部 2005 年夏季研究発表会、2005 年 7 月、函館
2. プリオン  $\alpha$ -ヘリックスおよび  $\beta$ -シート領域の pH 依存性構造変化の Site-Direct Spin Labelling (SDSL) 法による解析 渡邊康子・稲波修・飯塚大輔・下山雄平・中村秀夫・桑原幹典、第 44 回電子スピンサイエンス学会年会、2005 年 10 月、仙台
3. プリオン H95-H110 領域の新たな Cu(II) 結合構造 - Site-Direct Spin Labelling (SDSL) 法を用いた双極子 - 双極子相互作用による距離情報解析- 稲波修・橋田修吉・渡邊康子・平岡和歌子・下山雄平・中村秀夫・稲垣冬彦・桑原幹典、第 44 回電子スピンサイエンス学会年会、2005 年 10 月、仙台
4. ラジカル 2 付加フラレン構造異性体の分離とラジカル間の分子内相互作用 菅原康久、大庭裕範、山内清語 第 85 回日本化学会春季年会、横浜
5. パルス磁場勾配 ESR 装置の開発 木村尚貴、大庭裕範、山内清語 第 85 回日本化学会春季年会、横浜
6. 数値計算法によるパルス ESR 用誘電体共振器の設計、大庭裕範、山内清語 化学系 7 学協会連合東北地方大会、2005 年 9 月、仙台
7. Dynamics and orientation of troponin C studied by ESR using a bifunctional spin label. M. Nakamura, S. Chatani, Y. Yamamoto, T. Arata 第 78 回日本生化学会大会、2005 年 10 月、神戸
8. パルス ESR 用誘電体共振器の設計と試作、大庭裕範、山内清語 第 44 回電子スピンサイエンス学会、2005 年 10 月、仙台
9. 平面型ニトロキシドラジカル 4 核クラスターの磁氣的相互作用と有効スピンハミルトニアン、大庭裕範、Luca Maretti、山内清語 第 44 回電子スピンサイエンス学会、2005

年 10 月、仙台

10. パルス ESR 測定装置用カプラの数値的電磁場解析による最適化、中澤重顕、大庭裕範、山内清語 日本化学会第 86 春季年会、2006 年 3 月、千葉
11. Optimization of the Coupler and Dielectric Resonator for Ku-band Pulsed ESR Spectroscopy by Numerical Analysis of Electromagnetic Field, S. Nakazawa, S. Yamauchi, Y. Ohba Sendai-Berlin- Novosibirsk Joint Seminar on Advanced ESR, 2006.Aug, Russia
12. Ku バンドパルス ESR の試作 I、大庭裕範、中澤重顕、風間 俊治、水田幸男 第 45 回電子スピンスイエンズ学会、2006 年 11 月、京都
13. Ku バンドパルス ESR の開発 II、中澤重顕、大庭裕範、風間 俊治、水田幸男 第 45 回電子スピンスイエンズ学会、2006 年 11 月、京都
14. X バンドスロットアレイ共振器(SAR)の開発、小野 光弘 第 45 回電子スピンスイエンズ学会、2006 年 11 月、京都
15. Ku バンドパルス ESR の開発と量子遷移による距離測定、中澤重顕・荒田敏昭・植木正二・風間俊治・水田幸男・大庭裕範 日本化学会第 87 春季年会、2007 年 3 月、大阪
16. 二量子遷移パルス ESR 装置とナノメートルスケールの距離測定法の開発、大庭裕範、中澤重顕、酒井尚子、中森太郎、山本行男、水田幸男 第一回分子科学討論会、2007 年 9 月、仙台
17. Development of High-Speed Data Acquisition System for Multi-Quantum Coherent Pulsed-ESR Spectrometer at Ku-Band, Y. Mizuta, S. Kazama, Y. Ohba, Y. Shimoyama Joint Conference of the International Symposium on Electron Spin Science and the 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Electron Spin Science and Technology, 2007.Nov, Shizuoka

③ポスター発表 (国内会議 19 件、国際会議 4 件)

1. Determination of Tie Lines in Binodal Phase of Ternary Lipid Vesicle Membranes by Spin-label ESR and Stochastic Simulation Approach, Y. Shimoyama, Yun-Wei Chiang, Mitsuko Ukai, Hideo Nakamura 第 44 回電子スピンスイエンズ学会、2005 年 10 月、仙台
2. 分子内に 14N-Oxide と 15N-Oxide を官能基に持つビラジカル化合物の合成と ESR 特性、中村秀夫、亀谷宏美、的場暁代、鶴飼光子、下山雄平 第 44 回電子スピンスイエンズ学会、2005 年 10 月、仙台
3. Synthesis and Electron Spin Resonance Characterization of Biradical Molecules Containing 14N-O and 15N-O Moieties, H. Nakamura and Y. Shimoyama Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Nitroxide Radicals; Synthesis, Properties and Implications of Nitroxides. 2005.Sep., Russia
4. Effect of DEPC on the conformation of sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase as studied by ESR, R. R. Narumi, T. Yamamoto, S. Ueki, T. Arata 第 78 回日本生化学会大会、2005 年 10 月、神戸
5. ESR measurement of tropomyosin molecule on the thin filament by site-directed spin label scanning, K. Ueda, T. Aihara, S. Ueki, C. Kimura, M. Miki, T. Arata 第 78 回日本生化学会大会、2005 年 10 月、神戸
6. スピンラベル ESR によるヒト心筋トロポニン C 構造変化の研究、植木正二、中村志芳、荒田敏昭 第 43 回日本生物物理学会年会、2005 年 11 月、札幌
7. Conformational states of tropomyosin molecule on muscle thin filament. K. Ueda, T. Aihara, S. Ueki, C. Kimura, M. Miki, T. Arata 第 79 回日本生化学会年会、2006 年 6 月、京都
8. Switch action of troponin I on the Ca<sup>2+</sup> regulated thin filament as revealed by spin labeling distance measurement using PELDOR, T. Aihara, M. Nakamura, S. Ueki, M. Miki, and T. Arata 第 79 回日本生化学会年会、2006 年 6 月、京都
9. ATP binding to the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump ATPase is interfered by DEPC modification, R. Narumi, S. Ueki, and T. Yamamoto 第 79 回日本生化学会年会、2006 年 6 月、京都

10. Switch action of troponinI on the Ca<sup>2+</sup> regulated thin filament as revealed by Spin labeling distance measurement using PELDOR, T. Aihara, M. Nakamura, S. Ueki, M. Miki, and T. Arata 第44回日本生物物理学会年会 (5th EABS & 44th BSJ), 2006年11月、沖縄
11. Conformational states of tropomyosin molecule on muscle thin filament., K. Ueda, T. Aihara, S. Ueki, C. Kimura, M. Miki, T. Arata 第44回日本生物物理学会年会(5th EABS & 44th BSJ)、2006年11月、沖縄
12. Analysis of conformational changes of functional loop L11 of kinesin using fluorescence ESR and ESR, M. Yamada, T. Arata, K. Kondo, H. Maeda, and M. Maruta 第44回日本生物物理学会年会 (5th EABS & 44th BSJ)、2006年11月、沖縄
13. Conformational Dynamics of Loop L11 in Kinesin Measured by Site-Directed Spin Labeling Electron Paramagnetic Resonance, M. Yamada, K. Kondo, H. Maeda, S. Maruta, and T. Arata, 56th Fujihara Seminar “The Molecular Motor Conference 2007” 2007.Aug, Tomakomai
14. Conformational Dynamics of Unique Elements of Motor Protein Kinesin as Detected by Distance Measurement using Spin-labeling ESR, Handai Nano Symposium 2007, A. D. Yamada, K. Sugata, S. Yasuda, L. Song, H. Maeda, M. Nakamura, S. Ueki, P. G. Fajer, S. Maruta, and T. Arata, 2007.Sep., Osaka
15. Dynamics and orientation of troponin C studied by ESR using a bifunctional spin label. Gordon Research Conference on Muscle: Contractile ESR proteins, T. Arata, M. Nakamura, S. Chatani, Y. Yamamoto, 2006.Jul, USA
16. ESR measurement of tropomyosin molecule on the thin filament by site-directed spin label scanning, K. Ueda, T. Aihara, S. Ueki, C. Kimura, M. Miki, T. Arata International Symposium Celebrating 40th Anniversary of Troponin Discovery, 2006.Oct., Okazaki.
17. Loop-11 dynamics of kinesin measured by electron paramagnetic resonance, M. Yamada, K. Kondo, H. Maeda, M. Maruta, and T. Arata The 2006 Biophysical Discussions on Molecular Motors, Montrey, 2006.Oct., USA
18. Analysis of conformational changes of functional loop L11 of kinesin using fluorescence and ESR, M. D. Yamada, T. Arata, K. Kondo, H. Maeda, and M. Maruta, Biophysical Society 51st Annual Meeting, 2007.Mar, USA.
19. ESR Analysis of pH-induced Change in PrP<sup>c</sup> of the Site-directed Spin Labeling (SDSL) Method, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2007 (JSED2007) Y. Otoshima, Y. Watanabe, H. Tamayama, O. Inanami, Y. Shimoyama 2007.Mar., Muroran.
20. An ESR study of Thin Films of Poly-3-hexyl-thiophene for Environmental Studies, K. Sugiyama, T. Kojima, H. Fukuda, Y. Shimoyama, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2007 (JSED2007) 2007.Mar., Muroran.
21. An ESR Study of Salt Bridge Formation of Prion by Site-directed Spin-labeling Method, H. Tamayama, Y. Watanabe, Y. Otoshima, O. Inanami, Y. Shimoyama, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2007 (JSED2007) 2007.Mar., Muroran.
22. Electromagnetic Field Analysis of ESR Resonator Cavity for Environmental Studies, M. Nakamura, T. Ohkubo, H. Kawaguchi, Y. Shimoyama, Joint Seminar on Environmental Science and Disaster Mitigation Research 2007 (JSED2007) 2007.Mar., Muroran.
23. Development of Multi-Quantum Coherent (MQC) Pulsed-ESR Spectrometer at Ku-Band, Y. Mizuta, S. Kazama, Y. Ohba, Y. Shimoyama Joint Conference of the International Symposium on Electron Spin Science and the 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Electron Spin Science and Technology, 2007.Nov., Shizuoka.

(4) 特許出願

① 国内出願(1件)

1. 小野光弘、“空洞共振器、及びそれを用いた電子スピン共鳴測定装置”、2006-206795 (2006)



## § 7. 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 19 年 11 月 6 日	SEST2007 学会 CREST ミニシンポジウム	静岡	60 名	CREST 開発成果の報告



## § 8. 結び

タンパク質や巨大分子、分子複合体が注目を集める中で、その構造解析のために、ナノメートルでの距離測定法の必要性が高まっている。電子スピンはこの距離におけるプローブとして最適である。その理由は、2–3 nm 以上の距離にある電子スピン間の相互作用はほぼ双極子相互作用のみと考えてよく、しかも点双極子近似が良く成り立ち、相互作用と距離の関係にあいまいさが殆どないことにある。パルス ESR による DQC 法はこの双極子相互作用を他の相互作用から分離して選択的に観測できる唯一の方法であり、この点で本質的に他の手法よりも優れている。本研究計画によって開発された DQC 法は、欠落するナノ構造、即ち 2–10 nm の距離情報と構造解析に決定的な解決法をもたらした。

本研究計画では DQC 観測に必要な、広帯域の励起ができるマイクロ波システムと複雑な位相操作を伴うパルス列による高速積算ができるパルス・信号処理システムを構築して、現在の水準では最高性能の Ku バンド (17.5 GHz) パルス ESR 装置を開発した。これによってスピラベルされたタンパク質および合成バイラジカルで高感度の DQC 観測を実現し、実際に 2–6 nm の距離測定に成功した。この実績からいって、タンパク質について 2–6 nm、また構造の揺らぎの小さい合成高分子などでは 2–8 nm の距離が観測可能である。さらに、 $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  同位体置換を駆使することによって、より長い距離をより高感度で測定することも可能である。

開発した Ku バンドパルス ESR 装置では 2 kW、2 ns の短パルスを実現し、8mT 以上の励起帯域を用いることは、不完全な励起に起因する歪みのない双極子スペクトルを得ることができる点で重要である。これまで双極子スペクトルの線形は殆ど考慮されていなかったが、今装置によって、正しい線形を観測できることで距離分布の解析の精密化が期待できる。開発した 2 次元法は、DQC に含まれる最大限の構造情報を引き出す可能性を示した。また、広い励起帯域は本研究で用いたニトロキシドラジカルに限らず、重原子を含まない多くのラジカルについての DQC 測定を可能にする。構造生物学の難問である膜タンパク質の構造解析やアモルファス新素材の解析に DQC 法による研究は今後期待される重要な手段の一つである。

本研究で開発した 0.3 ns の分解能の高速パルス・信号処理システムは、Ku バンド以上の周波数を持つパルス ESR に直ちに適用でき、性能を飛躍的に向上することができる。いずれの周波数においても、従来の機器より一桁以上高い効率で信号を積算できることから、理論的に可能な最大の感度を実現することができる。低周波数ではスピン格子緩和時間が短くなることから特に積算効率の改善が有用になると期待できる。また高周波 ESR では、本来持っている高い時間分解能を生かすことができる。また、16 チャンネルの任意のパルスパターンを生成できることから、DQC に限らず他の測定法への対応もできる。特により複雑な位相操作が要求される 2 量子以上の coherence 観測への応用は、3 スピン以上の相関を直接観測する実験手法として興味を持たれる。

本研究ではデバイス性能を重視して、マイクロ波周波数として Ku バンドを選択したが、高周波化の利点とスペクトル異方性の兼ね合いから、最も DQC 測定に適しているのは Q バンド (35 GHz) である。市販の Q バンドマイクロ波素子の性能は Ku バンドよりもかなり劣り、特にナノ秒のパルスの生成に困難が予想された。本研究では将来の Q バンド装置の開発を視野に入れて、ナノ秒のパルス生成技術を開発した。また、前述したように、開発したパルス・信号処理システムはそのまま Q バンドに応用可能である。より高感度で、距離精度が高く、2 次元スペクトルにおいてより高い分解能が期待できる Q バンド装置の開発が、次の目標として期待される。さらに多量子遷移への拡張を考えると、coherence 次数の増大において急激に複雑化する位相サイクルを簡略化するために、パルス磁場勾配を導入することの有用性は大きい。現在、ナノ秒のパルス磁場の生成は世界の各研究グループにおいても成功を見ていないが、今後のイメージングや分子や電子の拡散運動の研究への可能性もあり期待される実験技術である。

本研究計画で開発されたパルスシーケンス技術は量子技術の有力技術で、DQC を主なパル

スシーケンスとして用いたが、ゼロ量子遷移による禁制遷移の純化による遷移金属イオン集団の量子磁性の研究が期待される。新しいパルスシーケンスを開発できれば自然科学上の難問解決につながる。しかし、我国のマイクロ波技術の諸外国からの遅れから見れば、研究時間と研究費用に何倍もの負担が必要である。本研究成果が我国の量子技術発展の一里塚となればと念願する。

3年間にわたり推進してきた「多量子遷移 ESR による巨大分子の構造解析」に関して研究チームの先生方や国内外の研究者の方々と様々なディスカッションの機会を得たことは一研究者として貴重な財産となった。研究総括の東北大学名誉教授田中通義先生及びアドバイザー諸先生方に感謝の意を表したい。なかでも京都大学名誉教授の山内淳先生にはプロジェクトの推進に終始有益なご助言をいただいた。最後に J S T スタッフの方々に感謝の意を表す次第である。



**Kuバンドパルスマイクロ波ユニット(左)とTWTA(右)**