

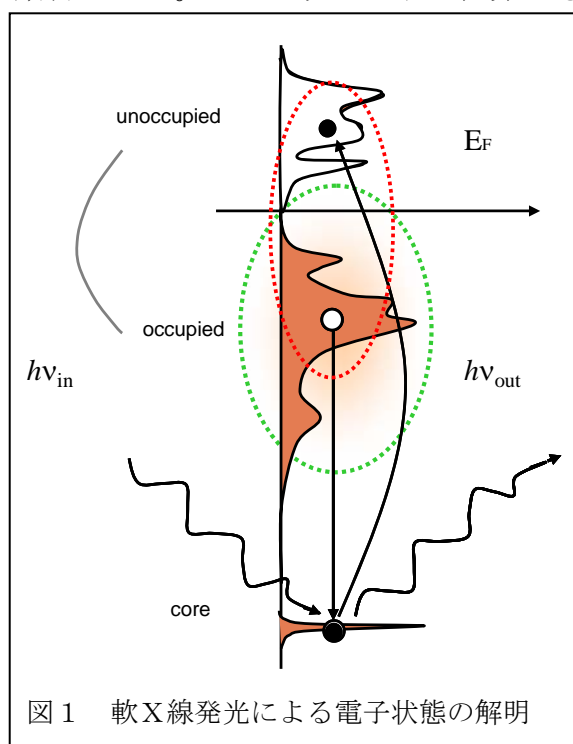
## タンパク質の電子状態の研究

辛 埴 (理研)

軟X線を物質に照射すると、内殻正孔が生じる。軟X線発光分光は、その内殻正孔を埋める過程で生じる発光を測る実験手法である。軟X線発光分光には二つの大きな特色がある。一つは多元素からなる系においても特定の元素に局在した価電子の電子状態を観測できるということ、もう一つは光子過程のみであるために表面状態に鈍感であり、チャージアップの影響もないことから、光電子分光が苦手とする水を含んだ物質でも測定できるということである。そこで本研究では軟X線発光分光のこの特色を活かして、金属タンパク質やDNA等の水を含んだ生体物質を新しい機能性を持った物質として捉え、その電子状態を研究することによって生体物質の機能性を解明し、物質科学の新しい展開を図ることを目的とする。また、金属タンパク質中の遷移金属濃度は極めて薄いため、従来、固体試料の分析に用いてきたものよりも一桁以上検出効率が高く、固体用と同程度の高エネルギー分解能を持った軟X線発光分光器を開発した。

近年のタンパク質の結晶化とその構造解析の進歩は著しく、次々に新しい重要なタンパク質の構造解析がなされつつある。そして構造解析の立場から、タンパク質の機能性解析の議論が始まっている。しかし、真の機能解析には電子状態の解明が本質的である。本研究では、光物性に基いた物質科学の精密手法として、これらの物質との相性がよい軟X線発光分光を取り入れることによって、生体物質の機能性を解明する新しい研究分野を開拓する。金属タンパク質やDNAの電子状態を知ることにより、様々な応用研究に対する基礎物性を与えることが期待される。一方で、内殻の研究では電荷移動や電子相関等の情報を得ることが期待される。このような試みは世界でも初めてである。

これまで、溶液系の電子状態を測定することは軟X線領域ではほとんど不可能であった。本研究によって、タンパク溶液試料の軟X線吸収、発光を測定する目的で開発、構築した送液システムは、純水や水溶液等、液体全般の電子状態を観測する汎用のツールとして用いることができるようになった。今後は軟X線領域において、固体以外の溶液や気体においてもこれまでできなかった電子状態の研究が進むことが期待できる。図2に送液システムの概略を示す。送液ラインは $\text{Si}_3\text{N}_4$ 薄膜を介して直接真空槽と接続している。 $\text{Si}_3\text{N}_4$ 薄膜の破損による溶液試料のビームライン上流への拡散を抑えるた



め、緊急作動ポンプ、ダイアフラム、冷却トラップ等を備えており、万一膜が破れた場合も1日以内で復旧できるようになっている。また、膜厚、開口面積、Auによる表面コーティング等の最適化を行うことによって、強酸、強アルカリを除くあらゆる試料での測定を可能にしている。

新規の斜入射平面結像型の軟X線発光分光器を設計・製作した。この分光器は、入射スリットを無くすことにより高検出効率を実現しながらSPring-8BL17SUの微小スポット光を最大限利用して高エネルギー分解能をも達成することが出来る。この分光器を用いた固体試料及び純水でのテスト実験において、約1600 (E/ΔE)のエネルギー分解能を達成した。これは現時点で軟X線領域における世界最高の分解能である。この分解能はスポットサイズを更に小さくすることと、検知器の位置分解能を改善することにより分解能を5000近くまで上げることが可能である。この分光器を用いて、次節のような生体物質からの微弱信号を観測することができた。一方、CCD検知器における検出効率の改善を行い、集光鏡等の工夫を行うと更に強度が1桁程度上がることが予想され、次年度では引き続き発光分光器の改善を行う予定である

Fe3d電子状態は吸着分子により図3のような変化が予想されている。このFe3d電子状態を直接観測することが本研究の目的である。ヘム核にCO分子が吸着した場合(MbCO)と水分子が吸着した場合(metMb)で、10mM程度に精製、濃縮したミオグロビン溶液を用いてFe2p励起内殻吸収と軟X線発光スペクトルを測定した。吸収スペクトルにおいては、得られた結果から、観測される吸収スペクトルを理論計算により、解析中である。

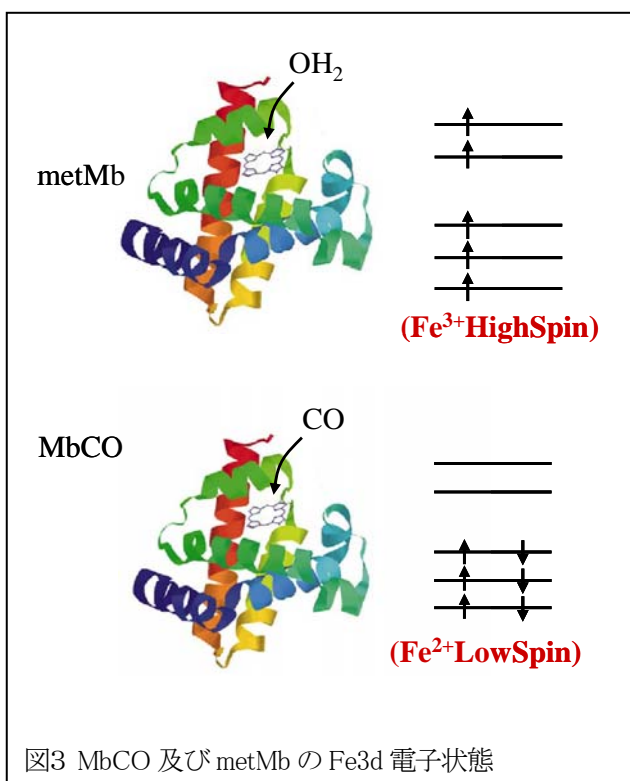
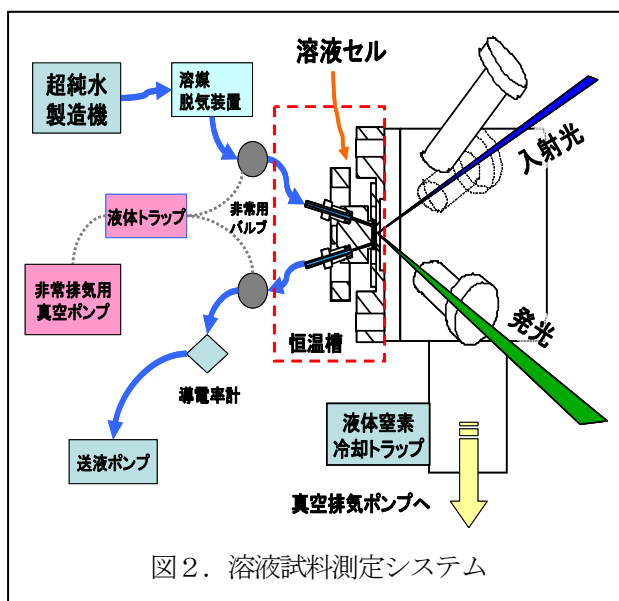


図3 MbCO 及び metMb の Fe3d 電子状態

一方、Fe2p 内殻発光は元素選択性に優れるため、分子量 16500 の中に鉄 1 原子しか含まれないほど微量にもかかわらず、測定可能である。図 4 に測定した発光スペクトルの比較を示す。1 スペクトルの測定に半日～1 日かかっているが、送液によって照射ダメージの影響は完全に排除している。タンパクの軟 X 線発光を測定し、d-d 遷移を議論できたのは世界で始めてである。

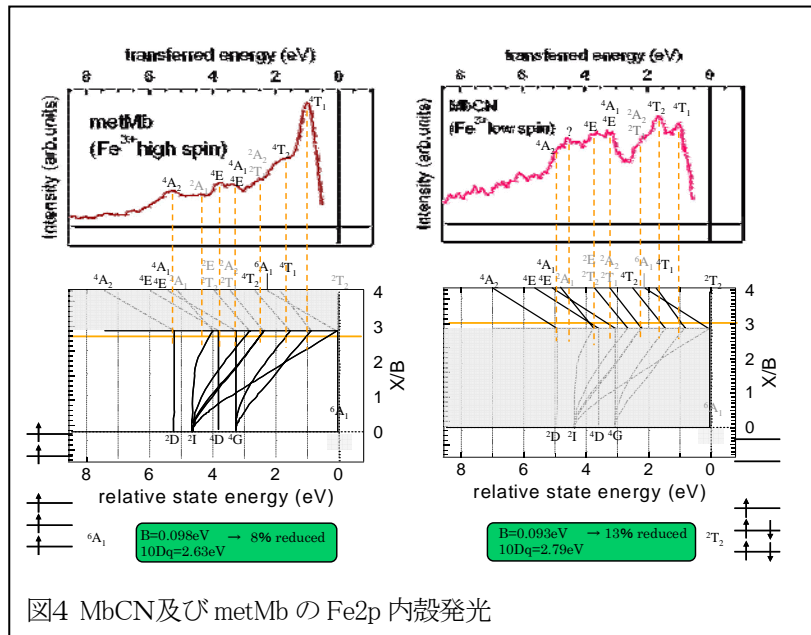


図4 MbCN及び metMb の Fe2p 内殻発光

たのは世界で始めてである。スペクトルにおいても、MbCO と metMb の違いは低ラマンシフトエネルギー側で大きく、高ラマンシフトエネルギー側では小さい。3d 多重項の違いは Tanabe-Sugano のダイアグラムで説明することができる。高ラマンシフトエネルギー側で変化が小さいのは、3d 電子相関が弱い事とアミノ酸と 3d 電子の混成がきわめて大きい事を示している。混成の大きさはタンパク質中の電子の移動と深い関係がある。現在は、その解析のために理論家に共同研究を依頼し、図 5 のような原子配置のモデルを用いて計算中である。

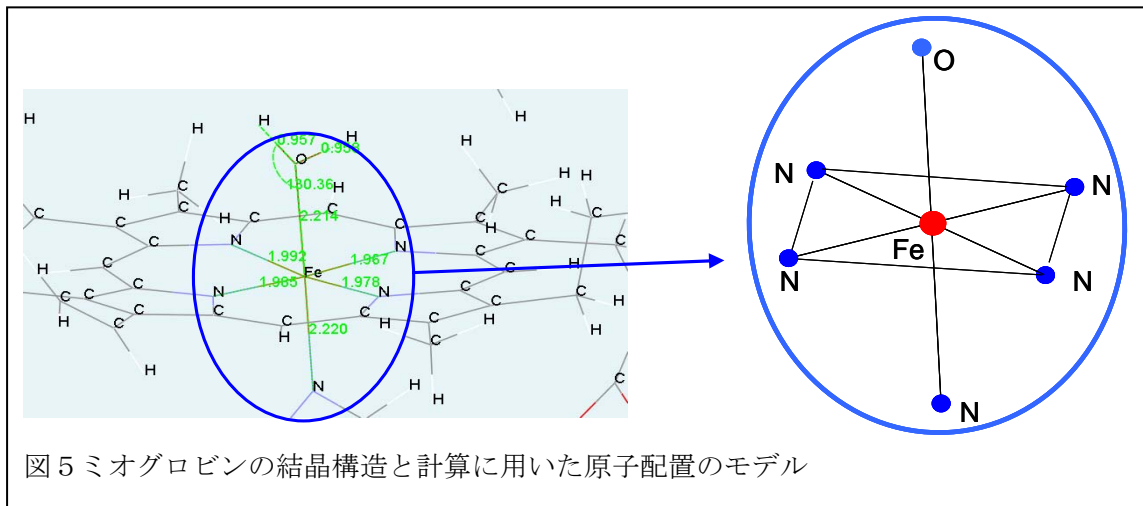


図 5 ミオグロビンの結晶構造と計算に用いた原子配置のモデル