

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目： 基盤研究 (S)
 研究期間： 2004 ~ 2008
 課題番号： 16104004
 研究課題名 (和文) 軟 X 線発光分光の開発とタンパク質、DNA 等の生体物質の電子状態の研究
 研究課題名 (英文) Study on the electronic structure of biomaterials using a high efficiency soft x-ray emission spectrometer

研究代表者
 辛 埴 (Shin Shik)
 東京大学・物性研究所・教授
 研究者番号：00162785

研究成果の概要：

高効率で、高エネルギー分解能を持った軟 X 線発光分光器及び、フロー型の溶液セルを開発する事によって、金属タンパク質や DNA 等の水を含んだ生体物質、アミノ酸、酢酸、水等の関連物質の電子状態の研究を行った。タンパク質ミオグロビンにおいては、電荷移動エネルギーが著しく小さくなっており、吸着分子の違いによって、スピンや価数が容易にコントロールされていることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	25,800,000	7,740,000	33,540,000
2005年度	24,800,000	7,440,000	32,240,000
2006年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
総計	73,100,000	21,930,000	95,030,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・物性 I

キーワード：タンパク質、DNA、軟 X 線発光スペクトル、アミノ酸、電子状態

1. 研究開始当初の背景

タンパク質などの生体物質は様々な顕著な機能性を持っていることが知られている。これまでは、構造解析の研究を中心としてこのような機能性の研究が行われてきた。一方、電荷やスピンをコントロールして、タンパク質の機能性を発揮したり、電子そのものを移動させたりしている物が多数存在している。

(1) この様なタンパク質において、真の機能性を理解するためには、その電子状態を知

ることが重要である。本研究においては、タンパク質の反応中心を成している金属の電子物性を明らかにすることによって、タンパク質の機能性を明らかにする事を狙いとした。このような電子状態の研究はこれまでほとんどなかった。

(2) 一方、光電子分光に代表される電子状態を解明する実験手段は、水溶液や水を含んだ物質に対して、これまで、ほとんど無力であった。そこで、溶液セルと軟 X 線発光分光

を進展させ、水溶液に対しても電子状態を解明する新しい実験方法を開発する必要性がある。

2. 研究の目的

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が、光電子分光が苦手とする水を含んだ物質や数万分子中の1個の金属の測定に有効である。

(1) 本研究では水溶液中の金属タンパク質や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。

(2) 一方、水溶液中の生体物質の電子状態を研究する実験方法がこれまでなかったので、溶液セルを用いた軟X線発光という新しい実験方法の開発も行った。

3. 研究の方法

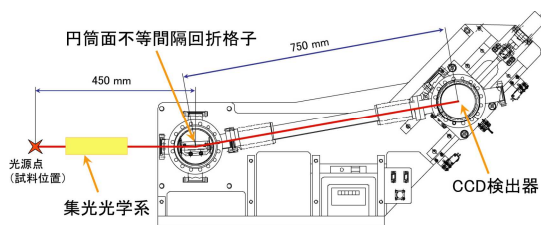


図1 発光分光器の概略図

(1) SPring-8 ビームラインの高安定、小スポットサイズを利用して、スリットレス配置を利用し、高効率・高分解能発光分光器を作製した。更に、集光鏡を作製し、高強度での測定を可能にした。表面ラフネスを解消した回折格子を作製し、CCDの位置分解能の向上させることによって高分解能を可能にした。

(2) 窒化シリコン薄膜を開発し、溶液を循環させる方式の溶液セルを開発した。その結果、生体試料の光劣化を防ぎながら、実験を行うことができるようになった。

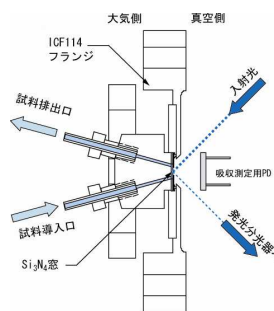


図2 溶液セルの概略図

(3) ミオグロビンタンパク質において各種ミオグロビン溶液(H₂O型、CO型、CN型、deoxy型)を作製する技術を開発し、2価高スピンと低スピン、及び3価の低スピンと高スピンの電子状態を明らかにするこ

とができた。ミオグロビン以外のタンパク質やDNA、アミノ酸等の関連物質の試料作成技術の開発を行いながら、その電子状態を測定した。

(4) 実験成果を解析する理論の開発を行った。

4. 研究成果

(1) 窒化シリコンの薄膜を開発し、フロー式の溶液セルを作製し、試料の劣化を防ぎながら軟X線分光の実験を行うことができた。更に、高効率・高分解能の軟X線発光分光器を作製することができた。

(2) 金属元素が異なる反応中心となる金属タンパク質に対し、電子状態の立場から機能性を理解するため、特定の金属元素のみの電子状態の情報が得られる軟X線共鳴発光分光を用いて、素性がよくわかっているミオグロビンの鉄中心の分析を行った。Fe2p内殻に共鳴励起させて取得したミオグロビンの軟X線共鳴発光分光測定により、鉄に対する吸着分子が異なる系に対するFe3d電子励起(d-d励起)状態を比較した結果を図3に示す。これらの共鳴発光スペクトルには、Fe0など

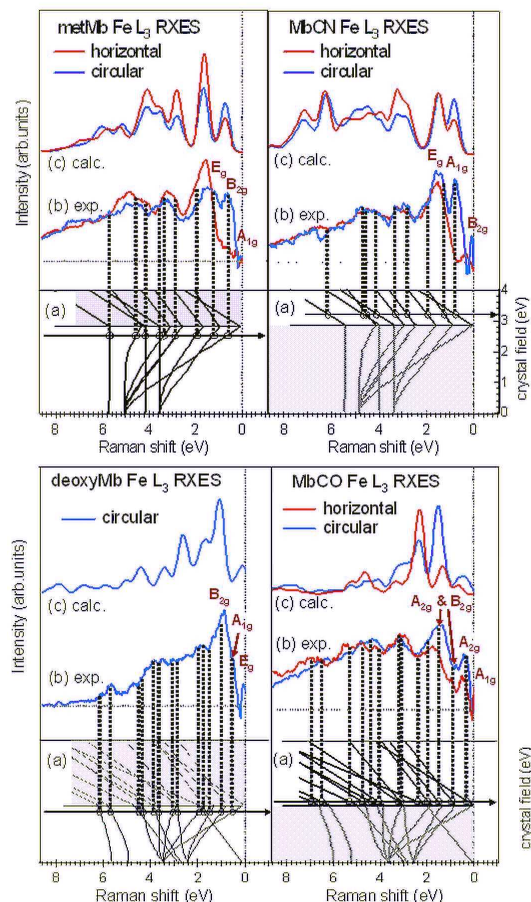


図3 ミオグロビンのFe2p軟X線共鳴発光の結果 (a) 田辺菅野ダイヤグラム (b) 実験結果 (c) モデル計算結果

の典型的な固体物質と比較すると、

d d 励起が非常に弾性散乱ピークに近いところから始まること、

電荷移動サテライトが明確に見られないこと、

弾性散乱のごく近傍で強い偏光依存性があること

などの際だった特徴が見られる。分子の種類によってヘム鉄の価数、スピン状態が異なることが知られているにもかかわらず、ヘム鉄の 3d 電子準位はほとんど変化していないことも際だっている。これは、5 つの窒素原子に取り囲まれたヘム鉄がスピン転移の起こりやすい結晶場ポテンシャルを感じていること、また隣接原子との強い電子軌道の混成によってヘム鉄の 3d 電子状態が広がり、価数の変化を鉄に結合した配位子の部分が担うためであると考えられる。ミオグロビンにおけるヘム鉄のこの特徴は、酸素吸着に伴うヘム鉄の電子状態変化が極めて小さいことを示しており、可逆的な分子の吸脱着反応を可能にする電子的メカニズムと考えられる。

(3) ヘム蛋白質中 Fe イオンの Fe3d の電子状態についてクラスターモデルによる理論解析を行なった。この理論解析の特徴は、これまでの強相関電子系の研究で培ってきた解析手法を駆使し、凝縮系物理の観点から発光スペクトルに見られる素励起の詳細とその機構を調べたことにある。図3から明らかのように、理論計算は実験スペクトルの構造・偏光依存性などを概ね良く再現している。この解析からヘム蛋白中 Fe イオンの電荷移動エネルギーは非常に小さく、特に三価の Fe の場合には負の となる事が明らかとなった。そしてこの小さな電荷移動エネルギーが、ミオグロビン特有のスペクトル構造 (d d 励起が弾性散乱ピークに近いこと、電荷移動サテライトが明確に見えないこと) を与えることを明らかにした。この小さな 或いは負の がヘム蛋白中で Fe イオンが二価や三価の状態を容易に取れる原因となっていると考えられる。この状況は、半導体中の遷移金属不純物が多重電荷状態を取れること (ハルデン・アンダーソン状態) と酷似している。また、実験で観測されている強い偏光依存性について群論に基づいた偏光依存性の解析も行ない、弾性散乱ピーク近傍の各ピークの対称性を明らかにした。

(4) 一般的によく知られているように、タンパク質は、温度、圧力、pH 等がある範囲の値から外れると、折りたたまれたフォールディング状態から、ほどけた状態になってしまう。このような現象には、タンパク質の側鎖

の電離や水素結合が大きくかかわっていると考えられている。軟 X 線発光分光法では、カルボキシル基 (COOH) を持つアミノ酸は、C=O の酸素の選択的励起を利用して水溶液中の電子状態を観測できる。図4に示したのはチオール基を含んだアミノ酸システインの軟 X 線発光スペクトルの pH 依存性である。pH2 付近でカルボキシル基の電離が起きるため、pH2 を挟んで塩基性側と酸性側では顕著な電子状態の変化が観測されている。カルボキシル基以外の官能基の電離によるスペクトルの変化を詳細に比較すると、アミノ基の電離による変化はほとんど観測されないのに対して、チオール基の電離による電子状態の変化ははっきりと観測される。軟 X 線発光で観測されているのは励起した原子の近傍の局所的な電子状態であるため、基本的には離れた部位にある官能基の変化の影響は受けにくいと考えられるので、システインでは分子の安定構造が変化したために発光スペクトルが変化したと考えられる。一方、このような分子の構造の変化による発光スペクトルは、より大きな高分子でも観測される。ポリリシンは、水中ではランダムコイル、水-メタノール混合溶媒中ではヘリックス構造をとることがわかっているが、発光スペクトルも明確な違いを見せている。

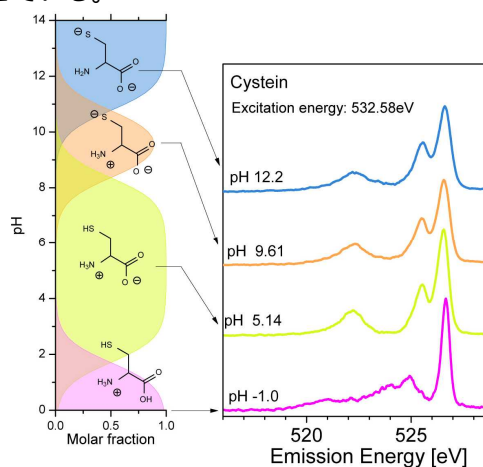


図4 システイン水溶液の発光スペクトルの pH 依存性

(5) 一方、DNA、酢酸、水などの酸素内殻発光を測定することによって電子状態を測定し、LDA 計算などで解析を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計27件)

Ligand Energy Controls the Heme Fe

Valence in Aqueous Myoglobins
Y.Harada, M.Taguchi, Y.Miyajima, T,
Tokushima, Y.Horikawa, A.Chainani,
Y.Shiro, Y.Senba, H. Ohashi, H.
Fukuyama and S. Shin
J. Phys. Soc. Jpn. **78**, 44802-44806(2009)
Selective observation of the two
oxygen atoms at different sites in the
carboxyl group (-COOH) of liquid
acetic acid
T.Tokushima, Y.Horikawa, Y.Harada,
O.Takahashi, A.Hiraya, S.Shin
Phys. Chem.Chem.Phys, **11**, 1679-1682
(2009)
High resolution x-ray emission
spectroscopy of liquid water: the
observation of two structural motifs
T.Tokushima, Y.Harada, O.Takahashi,
Y.Senba, H.Ohashi, LGM.Pettersson,
A.Nilsson, S.Shin
Chem. Phys. Lett., **460**, 387-400(2008)
ミオグロビンのFe3d電子状態
原田慈久、田口宗孝、辛埴
固体物理, **43**, -11, 711-720 (2008)
Electronic structure of DNA
nucleobases and their dinucleotides
explored by soft x-ray spectroscopy
Y.Harada, T.Takeuchi, H.Kino,
A.Fukushima, K.Takakura, K.Hieda, A
Nakao, S.Shin, H.Fukuyama
J.Phys.Chem. A **110**, 13227-13231
(2006)
High performance slit-less
spectrometer for soft x-ray emission
spectroscopy
T.Tokushima, Y.Harada, H.Ohashi,
Y.Senba, S.Shin
Rev.Sci.Inst., **77**,
063107-063111,(2006)

[学会発表](計57件)

Electronic state of glycine in aqueous
solution observed by soft x-ray
emission spectroscopy
Y.Horikawa, T.Tokushima, Y.Harada,
Y.Hitaka, Y.Utsumi, A.Hiraya, S.Shin,
15th International Conference on
Vacuum Ultraviolet Radiation
Physics(VUV XV)Berlin, Germany,
2007.07.29-08.03
High resolution soft x-ray emission
spectra of liquid water
T.Tokushima, Y.Harada, O.Takahashi,

Y.Miyajima, H.Ohashi, T.Senba,
M.Odelius, L.G.M.Pettersson, Nilsson,
S.Shin,
15th International Conference on
Vacuum Ultraviolet Radiation
Physics(VUV XV), Berlin, Germany,
2007.07.29-08.03
pH dependence of the electronic
structure of glycine observed by soft
x-ray absorption and emission
spectroscopy"
Y.Horikawa, T.Tokushima, Y.Harada,
A.Hiraya, S.Shin
Joint Conf Joint Conference of
JMLG/EMLG Meeting 2007 and 30th
Symposium on Solution Chemistry of
Japan, Fukuoka, 2007.11.21-25
Heme Fe 3d states in myoglobin
solutions explored by soft x-ray
emission spectroscopy
Y.Harada, Y.Miyajima, S.Shin,
T.Tokushima, M.Taguchi, H.Ohashi,
Y.Senba, M.Oura, T.Takeuchi, Y.Shiro,
M.Hagiwara
15th International Conference on
Vacuum Ultraviolet Radiation
Physics(VUV XV),Berlin, Germany,
2007.07.29-08.03
Electronic structure of heme iron in
aqueous myoglobins observed by
resonant soft x-ray emission
spectroscopy
Y.Harada, T.Tokushima, Y.Miyajima,
M.Taguchi, H.Ohashi, Y.Senba,
Y.Horikawa, Y.Hitaka, M.Oura,
T.Tomoyuki, Y.Shiro, M.Hagiwara,
A.Hiraya, Y.Utsumi, S.Shin
6th International Conference on
Inelastic X-ray Scattering(IXS2007),
Awaji, Japan, 2007.05.07-11
Soft X-ray RIXS
S.Shin
6th International Conference on
Inelastic X-ray Scattering(IXS2007),
Awaji, Japan, 2007.05.07-11
High resolution soft X-ray emission
spectroscopy of transition metal
compounds and proteins
S.Shin
International Workshop on Soft X-ray
Raman Spectroscopy and Related
Phenomena, Okazaki, Japan,
2006.08.17-19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛 埴

東京大学・物性研究所・教授

研究者番号：00162785

(2) 研究分担者

横谷 尚睦

東京大学・物性研究所・助手

研究者番号：90311646

高田 恭孝

理化学研究所・専任研究員

研究者番号：90261122

小林 啓介

高輝度光科学研究センター - 放射光研究所・主

席研究員

研究者番号：50372149

原田 慈久

東京大学・工学部応用化学科・特任講師

研究者番号：70333317

石坂 香子

東京大学・物性研究所・助教

研究者番号：20376651