

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620003

研究課題名(和文)非選択励起多周波混合パルスEPR法によるタンパク質の構造解明

研究課題名(英文)Study of protein structure using non selective multifrequency pulsed EPR

研究代表者

三野 広幸(Mino, Hiroyuki)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：70300902

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):パルスEPR法は強力なマイクロ波をパルス化して試料に照射することにより電子スピンの時間応答を観測する手法である。しかし、一般にEPR線幅は非常に広くパルス法によるスピン束の共鳴は限られており効率を下けている。そこでパルスの中に異なる周波数をもったマイクロ波を複数印加することによって広範囲の周波数範囲のスピンを共鳴させることを行った。多周波のマイクロ波を混合して測定することによりパルスEPR信号の3-5倍の強度増加に成功した。この手法をタンパク質のラジカル、金属中心に適用して高感度の測定が可能になった。

研究成果の概要(英文): Pulsed EPR is the essential tool for investigation of unpaired electron. Generally, the EPR linewidth is very broad, and it is difficult to measure spin packets in pulsed EPR. By mixing multi frequency microwaves, detectable frequency range in EPR lines was 3-5 times increased. The technique was applied to the centers in proteins. It gave high quality signal under the low radical contentraion.

研究分野: 生物物理

キーワード: EPR PELDOR 多周波共鳴

1. 研究開始当初の背景

パルス EPR 法の手法の中で生物系への応用として特に強力なものが PELDOR 法 (Pulsed Electron electron Double Resonance) である。これは 2 つの異なるマイクロ波周波数を用いた 2 重共鳴法である。ロシアの Tsvetokov らによって 1996 年提唱され、同年我々が最初に生物系に応用した。この方法では 20-80 のスピン間距離を 0.2 以下の高い精度で測定することができる。タンパク質への応用を広げること、低濃度試料でも適用可能なことが課題となっている。

2. 研究の目的

一般に EPR 信号は信号の線幅が広くパルス EPR 法ではごく一部のスピンしか励起できず非効率である。しかし複数のマイクロ波を混ぜて励起することによって励起する範囲を広げることができ信号強度が格段に増加することがわかった。この手法を拡張すれば濃度が低くこれまで測定不可能だった試料での PELDOR 測定が可能であることを意味している。また、非選択多周波励起法は PELDOR 法だけでなく多くのパルス EPR 法の測定手法にも適用可能である。パルス EPR 手法として非選択励起多周波混合を開発し、タンパク質一般に適用する汎用測定法とすることを目的として研究開発を行った。

3. 研究の方法

パルス EPR 法は強力なマイクロ波をパルス化して試料に照射することにより電子スピンの時間応答を観測する手法である。一つのパルス波によって観測できるスピンの共鳴周波数はパルスの時間の長さに反比例する(不確定性原理による)。パルス NMR 法の場合 NMR 線幅は 100 kHz 程度であるためパルスラジオ波によって周波数領域をすべてカバーしうる。このため、スピンの時間応答をフーリエ変換することにより短時間に詳細にスピンの性質を調べることができる。一方、EPR の場合マイクロ波のパルス幅としては数 ns が限界であるため観測可能なスピンは 100 MHz 程度となる。

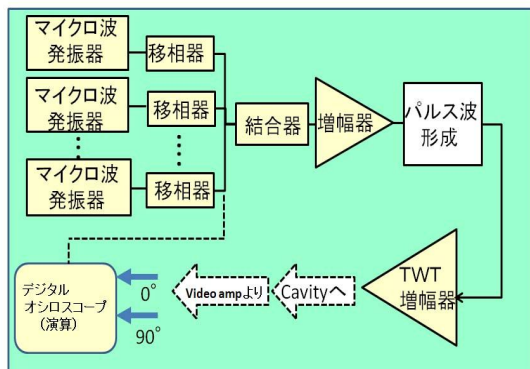
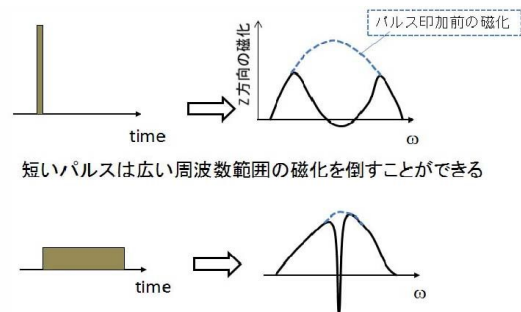


図 1: 装置のブロックダイアグラム。連段の発振器を結合増幅し TWT を経て試料に照射する。検出はデジタルオシロで行っている。

しかし、EPR 信号幅は 300-2,000 MHz と大変広いため、パルス法ではすべてをカバーすることはできない。これは NMR 法と EPR 法の最大の違いとなっており、EPR 法における課題である。本計画課題では、パルスの中に異なる周波数をもったマイクロ波を複数印加することによって広範囲の周波数範囲のスピンを共鳴させることにある。

本研究では、新たな装置とシステムを構成した。独立した複数のマイクロ波源から位相、強度を調整した後混合、増幅した後パルス化して試料に照射する。信号の検出は高速デジタルオシロスコープでリアルタイムに演算を行い位相の補正を行い、位相補正のプロセスは、複数の高周波部品を組み合わせることにより行う。

パルス EPR 法は強力なマイクロ波をパルス化して試料に照射することにより電子スピンの時間応答を観測する手法である。一つのパルス波によって観測できるスピンの共鳴周波数はパルスの時間の長さに反比例する。パルス NMR 法の場合 NMR 線幅は 100 kHz 程度であるためパルスラジオ波によって周波数領域をすべてカバーしうる。このため、スピンの時間応答をフーリエ変換することにより短時間に詳細にスピンの性質を調べることができる。一方、EPR の場合マイクロ波のパルス幅としては数 ns が限界であるため観測可能なスピンは 100 MHz 程度となる。本計画課題では、パルスの中に異なる周波数をもったマイクロ波を複数印加することによって広範囲の周波数範囲のスピンを共鳴させることを狙った。



短いパルスは広い周波数範囲の磁化を倒すことができる

長いパルスは狭い周波数範囲の磁化を倒すことができる

図 2: パルス長と周波数の関係

4. 研究成果

図 3 に通常の PELDOR 測定と多周波混合測定での PELDOR 測定の結果を示す。測定例は光合成タンパク質である光化学系に含まれるマンガンクラスター由来の EPR 信号に対して測定を行った。(a) は通常の PELDOR 法であり (b) は多周波混合で行った PELDOR 測定である。振動パターンと時間軸 0 ns からの降下が PELDOR の応答を示す。マンガンクラスター由来の信号は信号の線幅が 100mT 程度

あり、通常的手法では最大で 1/10 程度の励起効率であり強い信号強度を十分に得ることはできない。しかし多周波混合法を用いると信号強度の著しい増加がみられることがわかる。この例ではおよそ 80mT 間隔で 3 種類のマイクロ波周波数を混合しマンガンラスターの励起効率がおよそ 3 倍になっていることがわかる。

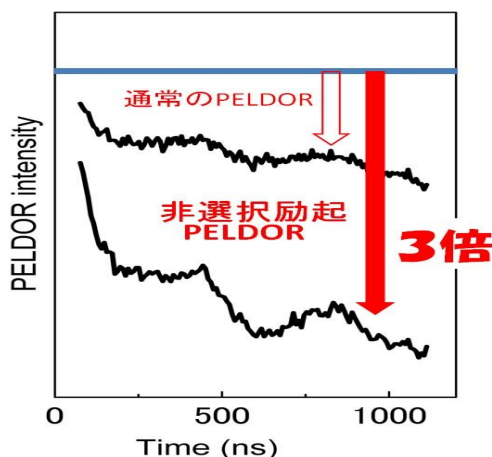


図3:通常 PELDOR 法と非選択多周波励起 PELDOR 法の信号強度の比較。

更に信号強度の効率を上げるため 5 つのマイクロ波の混合を試みた。この場合でもかなりの効率の増加は見られた。しかし最大で 4 - 4.5 倍の増加にとどまった。この場合効率化の限界となっているのはマイクロ波アンプの増幅パワーの余剰スペックである。マイクロ波の増幅率は混合周波数を用いた各宗派すすでかわらないものを使用しているマイクロ波アンプ TWT の最大電力 2 kW で限界となっている。言い換えると多周波混合ではアンプの最大電力出力まで活用することができる。

次に多周波での励起に加え多周波での信号検出の例を示す。図 4 a, b はそれぞれ異なる周波数での共鳴信号である。周波数が異なるため異なった磁場での共鳴となっている。図 4 c は 2 つの信号での同時検出の結果を示す。同時に 2 つのマイクロ波で信号の検出が行われていることを示す。これによって多周波での広い磁場範囲で信号を励起することを示している。

このシステムを、光合成タンパク質光化学系、青色センサータンパク質 photozipper に実際に適用し測定を行ったところ、従来より高い感度での信号を得ることができ、実際の応用が可能であることはわかった。J 中來訪との比較結果は論文準備中である。

最近になって任意波形発生器 (AWG) を用いたパルス整形手法が開発され世界的に応用がはじまっている。現在すでに商業ベースでの製品化も行われている。AWG 法は今後の主流となりえる優れた手法ではある。しか

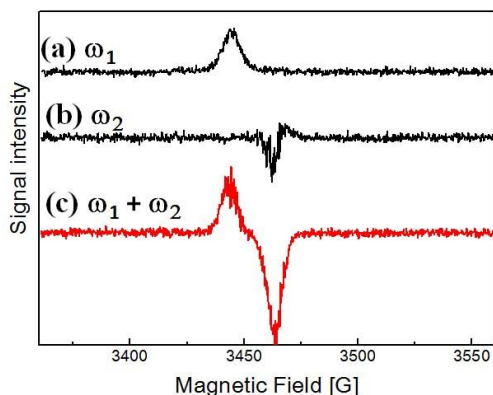


図 4 . 二周波混合による coal 試料のスピネコー測定。測定周波数 (a) ω_1 (b) ω_2 (c) $\omega_1 + \omega_2$ に位相補正したもの

し、短いパルスで広帯域での励起という点での限界がある。多周波のマイクロ波を混合する手法は短いパルスを用いた広範囲での EPR 信号の測定という目的では大きな利点がある。今後の発展として AWG のシステムを相補的にもちいることによって最も効率の良い測定をすることが可能になると考えられる。

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 7 件)

1.Nagashima,H., Kishimoto, H., Mutoh, R., Terashima, N., Oh-oka,H., Kurisu, G and Mino, H.,"Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy Studies of Iron-Sulfur Cluster in Rieske Protein from Green Sulfur Bacterium Chlorobaculum tepidum" J. Phys.Chem. B, (2017) ,121, 2543-2553

2.Hasegawa,M., Nagashima, H., Minobe, R., Tachikawa,T., Mino,H. and Kobori,Y., "Regulated Electron Tunneling of Photoinduced Primary Charge- Separated State in the Photosystem II Reaction Center" J. Phys.Chem. Lett., (2017) 8, 1179-1184.

3.Nagashima,H. and Mino, H. "Location of Methanol on the S_2 State Mn Cluster in Photosystem II Studied by Proton Matrix Electron Nuclear Double Resonance" J. Phys.Chem. Lett., (2017) 8, 621-625

4.Nagashima,H., Nakajima, Y., Shen, J-R. and Mino, H. " Proton matrix ENDOR studies on Ca^{2+} -depleted and Sr^{2+} -substituted Mn cluster in photosystem II" J. Biol. Chem., (2015) 290, 28166-28174

5.Asada, M and Mino, H. "Location of the High-Affinity Mn²⁺ Site in Photosystem II Detected by PELDOR" J. Phys. Chem. B. (2015) 119 (32), 10139-10144

6.Nagashima,H., Nakajima, Y., Shen, J-R. and Mino, H. " Proton matrix ENDOR studies on Ca²⁺-depleted and Sr²⁺-substituted Mn cluster in photosystem II" J. Biol. Chem., (2015) 290, 28166-28174

7.Asada, M and Mino, H. "Location of the High-Affinity Mn²⁺ Site in Photosystem II Detected by PELDOR" J. Phys. Chem. B. (2015) 119 (32), 10139-10144

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1.三野 広幸, 小関 康平,長嶋 宏樹,久富 修,Radical formation and proton pathway in Photozipper protein,日本植物生理学会年会 鹿児島大学 2017年3月16-18日
2. 三野 広幸, 小関 康平,長嶋 宏樹,久富 修,機能性タンパク質 Photozipper の反応機構,分子研研究会-生体や物質機能の起源にせまる先端的電子スピン計測-, 分子科学研究所, 2016年12月7-8日
- 3.小関 康平,長嶋 宏樹,久富 修, 三野 広幸,機能性タンパク質 Photozipper の反応過程の解析,第54回電子スピンサイエンス学会年会, 大阪市立大学, 2016年11月10-12日
- 4.佃野弘幸,武藤梨沙,栗栖源嗣, 大岡宏造, 三野 広幸, Initial formation of the radical pair in reaction center complex of Heliobacterium modesticaldum detected by transient EPR, 第53回生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016年11月25-27日
- 5.寺島尚貴, 長嶋宏樹, 岸本拓, 武藤梨沙, 大岡宏造, 栗栖源嗣, 三野 広幸, 時間分解 EPR によるヘリオバクテリア反応中心での初期ラジカル対生成, 第54回電子スピンサイエンス学会年会, 大阪市立大学, 2016年11月10-12日
- 6.Hiroyuki Mino,Local structure of photosystem II revealed by pulsed ELDOR,Molecular Photoscience Research Center International Workshop Novel Magnetic Resonance Techniques in Millimeter and Terahertz Waves and their Applications to Bioscience" (MR-THz2016), Kobe university November 8-9, 2016
- 7.浅田瑞枝, 西村大志, 佐藤文彦, 伊福健太郎, 三野 広幸, 光化学系 II 表在性サブユニット PsbP 結合位置の解析, 電子スピンサイエンス

学会年会、新潟コンベンションセンター、2015年11月2-4日

8.長嶋宏樹, 三野 広幸, プロトン ENDOR によるアンモニア分子の Mn クラスタへの結合サイトの同定, 第54回電子スピンサイエンス学会年会, 新潟コンベンションセンター, 2015年11月2-4日

9.酒井貴弘, 長嶋宏樹, 松下仁美, 三野 広幸, Ca²⁺除去したマンガンクラスターの高酸化状態スピン構造, 第54回電子スピンサイエンス学会年会, 新潟コンベンションセンター, 2015年11月2-4日

10.浅田瑞枝, 三野 広幸, PELDOR study on the high-affinity Mn(II) site of photoactivation of photosystem II, 日本生物物理学会年会, 金沢大学, 2015年9月13-15日

11.酒井 貴弘, 長嶋 宏樹, 松下 仁美, 古川 貢, 三野 広幸, Influence of Ca²⁺ on spin structure of Mn cluster in high oxidation state, 第53回生物物理学会年会, 金沢大学, 2015年9月13-15日

12.長嶋宏樹, 中島芳樹, 沈建仁, 三野 広幸, ENDOR studies on biochemical modification on calcium site of the Mn cluster in photosystem II, 第53回生物物理学会年会, 金沢大学, 2015年9月13-15日

13.Mizue Asada and Hiroyuki Mino, Position of the Mn(II) binding site at the initial step of photoactivation of photosystem II studied by PELDOR, IGER International Symposium Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems, Nagoya, August 31-September 2, 2015

14.Hiroki Nagashima, Yoshiki Nakajima, Jian-Ren Shen and Hiroyuki Mino, CW-ENDOR studies on protons surrounding S₂ state oxygen-evolving complex in photosystem II, The 4th IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular System, Nagoya, August 31 - September 2, 2015

15.酒井 貴弘, 長嶋 宏樹, 松下 仁美, 古川 貢, 三野 広幸, 高酸化状態におけるマンガンクラスターのスピン構造と Ca²⁺の役割,第19回 ESR フォーラム, 東京工業大学,2015年7月24日

16.浅田瑞枝, 三野 広幸, パルス ELDOR 法を用いた光化学系 II Mn クラスタの光活性化における Mn²⁺親和サイトの位置決定, 第19回 ESR フォーラム, 東京工業大学,2015年7月24日

17. Hiroki Nagashima, and Hiroyuki Mino,

"ENDOR Studies on the Hydrogen-Bonding Network Surrounding Mn Cluster", 理研シンポジウム: 生体金属科学 2015 年 6 月 16-17 日

〔図書〕(計 1 件)

光合成のエネルギー変換と物質変換
(EPR の項目) 化学同人 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三野 広幸 (Mino Hiroyuki)

所属研究機関

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号: 70300902