

## 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

Study on the electronic structure of biomaterials using a high efficiency soft x-ray emission spectrometer

辛 埴 (Shin Shik)

東京大学・物性研究所・教授



### 研究の概要

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。タンパク質においては、電荷移動エネルギーを小さくすることによって、スピンや価数を容易にコントロールしていることがわかった。

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。これまで行われている構造解析の研究とは異なり、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。

### 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。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。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ため、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

- (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。

- (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(H<sub>2</sub>O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. 研究の主な成果

- (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) 金属元素が特異な反応中心となる**金属タンパク質**に対し、電子状態の立場から機能性を理

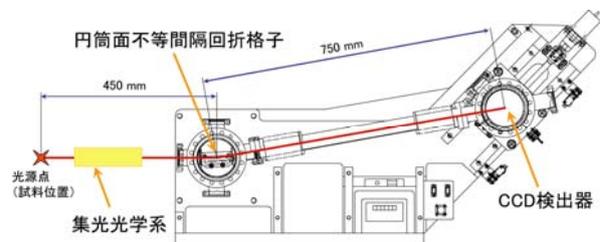


図1 発光分光器の概略図

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(dd励起)状態を比較した結果を図2に示す。これらの共鳴発光スペクトルには、FeO などの典型的な固体物質と比較すると、1) dd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、2)電荷移動サテライトが明確に見られないこと、3)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易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。

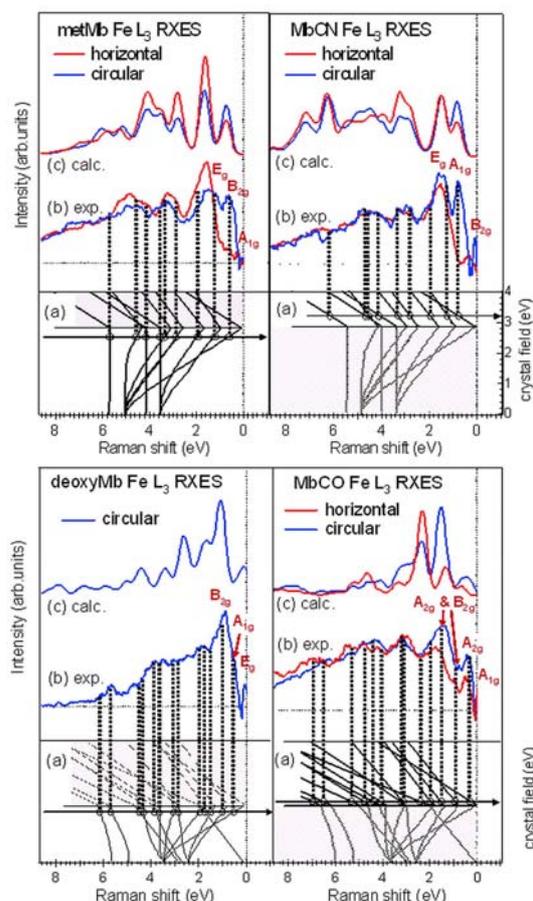


図3 ミオグロビンのFe2p軟X線共鳴発光の結果(a)田辺菅野ダイアグラム(b)実験結果(c)モデル計算結果

(3) これらのタンパク質の軟X線発光スペクトルは**クラスター計算**によって計算され、その結果、ハロディンアンダーソン状態になっていることによって、容易に金属ヘムのスピンや価数を変化させていることが明らかになった。

(4) 一方、**DNA、アミノ酸、アミノ酸鎖、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。アミノ酸鎖においてはタンパク質のホールディングの議論ができるようになった。

## 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

これまで溶液の電子状態を観測することが難しかったが、本研究により、溶液セルを作製し、世界で初めてタンパク質の電子状態を軟X線発光分光で測定することができた。一方、その結果を基に理論解析の新しい手法を促すことができた。

## 6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

- 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.Petterson, 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)