

電子スピン共鳴法によるサブナノレベルの距離計測

Sub-nanometer distance measurements by Electron Spin Resonance

理工学研究科 物質科学部門 長嶋 宏樹

Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering

Hiroki Nagashima

Abstract

Electron spin resonance (ESR) is a powerful tool for investigating electron spin and surrounding environments. One of the applications of ESR is to measure distances between two electron spins in proteins. Recently, we applied time-resolved ESR to a model avian compass system, a photo-induced radical pair of a tryptophan residue of Bovine Serum Albumin and anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS). The time-resolved ESR signal of the radical pair is separated by a strong interaction between two radicals. The spectral simulation based on quantum physics revealed that the distance between AQDS and tryptophan is 0.53 nm. This new finding is the first step towards clarifying the structure and dynamics of the AQDS molecule in the protein.

電子スピン共鳴法(ESR)

電子スピン共鳴法(Electron Spin Resonance, **ESR**)は、分子科学の分野における強力な測定・解析手法の一つである。ESRは電子が持つ磁石としての性質、スピンを計測する手段である。スピンを持つラジカル化合物としては有機ラジカルや、鉄や銅、マンガンといった金属種が挙げられ、それぞれにおいて ESR 法を用いた研究により多くの成果が挙げられている。ラジカルの種類は膨大な化学種に比べれば非常に限られているが、一方でラジカルは化学反応に関わる重要な中間体である。スピンを持つ金属錯体、無機化合物は、磁性材料や触媒としての実用性が高く、その物性の解明と応用が期待される。太陽電池や光触媒、発光素子といった光関連デバイスの多くも、その反応過程においてスピが生じる。スピン状態(電子状態)とその近傍の構造がどうなっているのかという問題は、それら物質の物性や反応メカニズムを研究するうえで欠かせない重要な情報である。

ESR では磁場中のマイクロ波キャビティ(空洞共振器)内部にサンプルを設置する。磁場がかかると電子スピンの向きによってエネルギーが分裂(ゼーマン分裂)する。その分裂幅に等しいエネルギーを持つマイクロ波を照射すると、マイクロ波を吸収してスピンの向きが変化する。マイクロ波の吸収を見れば、スピンの存在を検出することができる。ここで、電子スピンの二つある場合を考える(図1)。電子スピン1の近傍に別の電子スピン2があると、スピ

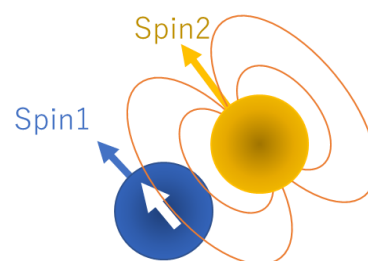


図1. 相互作用する二つのスピンのイメージ

ン2が作る磁場をスピン1は感じている。すると、共鳴磁場は、周りのスピンから受ける磁場の分だけ変化することになる。磁場の強さは距離に応じて変化するので、共鳴磁場を正確に計測できれば距離がわかる。これは ESR 法における距離計測の基本的な原理である。もし他の交換相互作用などの相互作用がある場合は複雑になる。正確に計算するためには量子論の助けも必要となるが、簡単で高速な計算プログラムも公開されている¹。スピンを本来持たないタンパク質などに安定なラジカルを結合させるスピンラベル法を用いた距離計測も盛んに行われている。

時間分解 ESR (Time resolved ESR)による初期電荷分離過程の観測

Bovine Serum Albumin (BSA)は、牛の血液中にあるタンパク質の一つで、様々な分子を結合することができる。BSA はさまざまな分子を吸着でき、² anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS)も吸着する分子の一つである。図2にそれらの構造を示した。BSA と AQDS の混合液に光を照射すると、BSA 内部のトリプトファンとの間で光誘起電荷分離反応が起こり、その反応のダイナミクスは磁場の大きさによって変化することが、当研究室のこれまでの研究で明らかにされている³。光反応における磁場効果は近年注目されている渡り鳥のコンパスメカニズムとしても注目されており、BSA-AQDS もまたその構造と動力学的解明が求められている。

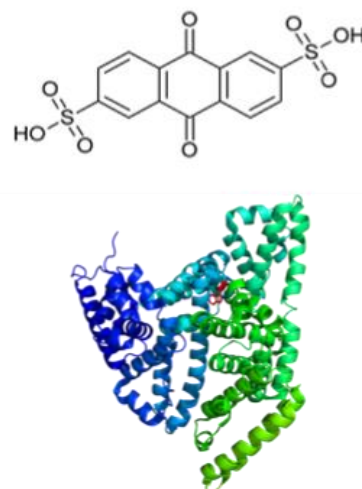


図2(上)AQDS,(下)BSAの結晶構造(PDB:4F5S)。

メカニズムの詳細な議論には、AQDS がトリプトファンに対してどのような位置にあり、どのように電荷分離反応が起きるかを明らかにする必要があった。反応の中

間状態を実際に計測する場合には時間分解 ESR 法が有用である。時間分解 ESR 法ではレーザーを照射し、光反応直後のラジカルをおよそ 100 ns の時間分解能で観測する。筆者らは、その初期構造を時間分解 ESR 法で観測することに成功した。図3(左)には時間分解 ESR スペクトルを示した。もし相互作用のほとんどない自由電子であれば、ESR 信号は点線で示した位置

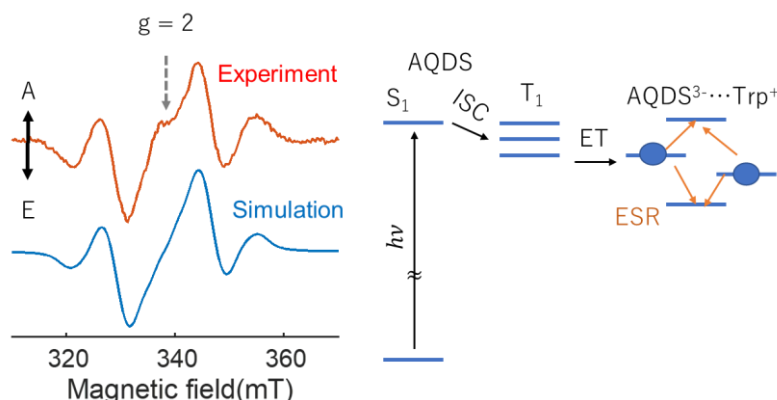


図3(左)光照射から1 μs後に得られた時間分解 ESR スペクトルと量子力学に基づいたシミュレーション結果。(右)光反応ダイアグラム。AQDSの三重項生成後に電荷分離反応で生じるラジカルペアを形成する。ESR計測では、ラジカルペアの信号を観測している。

($g = 2$)に表れるが、実験からは ± 20 mT もの範囲に広がり分裂した信号が表れている。このスペクトルは電荷分離反応によって生じたラジカル対がかなり近距離に存在し、非常に強い磁場を互いのスピンの感じる磁場が非常に強いために単一の時間分解 ESR スペクトルから構造解析できるという幸運なケースであった。しかし、実験のスペクトルの $g = 2$ の矢印で示した付近にも別の信号が重なっており、シミュレーションからは全く再現できていない。これは、遠距離にまで離れた別のラジカルペアに由来するためである。このような 1 本の幅の広いスペクトルに隠れた分裂を解析するのは通常の ESR 法だけでは難しい。測定精度を上げる方法としては、マイクロ波とは異なる電磁波を照射する二重共鳴法やパルス ESR 法が挙げられる。パルス ESR 法では、パルスマイクロ波のタイミングや波形を変えることによって、微弱な磁場の大きさをナノ秒スケールのスピンドイナミクスに変換して観測を可能にする。長距離電荷分離状態のラジカル対の距離計測には、ESEEM 法と呼ばれるパルス系列がよく用いられる。パルス電子-電子二重共鳴法(DEER)⁶を用いれば、最大で 10 nm も離れたスピン間の距離を計測することが可能で、複合体を形成するタンパク質などの構造解明が盛んに行われている。これらのパルス ESR を用いたプロジェクトも現在も進行中である。BSA-AQDS システムへのパルス ESR の応用により、タンパク質中で磁場効果を示すラジカル対の反応ダイナミクスの理解、さらに、渡り鳥のコンパスの機構にも関連する反応ダイナミクスの基礎原理の解明が期待される。

上記の ESR スペクトルは、スピン同士の感じる磁場が非常に強いために単一の時間分解 ESR スペクトルから構造解析できるという幸運なケースであった。しかし、実験のスペクトルの $g = 2$ の矢印で示した付近にも別の信号が重なっており、シミュレーションからは全く再現できていない。これは、遠距離にまで離れた別のラジカルペアに由来するためである。このような 1 本の幅の広いスペクトルに隠れた分裂を解析するのは通常の ESR 法だけでは難しい。測定精度を上げる方法としては、マイクロ波とは異なる電磁波を照射する二重共鳴法やパルス ESR 法が挙げられる。パルス ESR 法では、パルスマイクロ波のタイミングや波形を変えることによって、微弱な磁場の大きさをナノ秒スケールのスピンドイナミクスに変換して観測を可能にする。長距離電荷分離状態のラジカル対の距離計測には、ESEEM 法と呼ばれるパルス系列がよく用いられる。パルス電子-電子二重共鳴法(DEER)⁶を用いれば、最大で 10 nm も離れたスピン間の距離を計測することが可能で、複合体を形成するタンパク質などの構造解明が盛んに行われている。これらのパルス ESR を用いたプロジェクトも現在も進行中である。BSA-AQDS システムへのパルス ESR の応用により、タンパク質中で磁場効果を示すラジカル対の反応ダイナミクスの理解、さらに、渡り鳥のコンパスの機構にも関連する反応ダイナミクスの基礎原理の解明が期待される。

謝辞

本研究は、埼玉大学科学分析支援センターに設置されているパルス電子スピン共鳴装置を用いて行われました。また本実験とシミュレーションは埼玉大学大学院理工学研究科、新井柊平氏と行ったものです。また研究の過程において、多くの議論をしていただいた Lewis M Antill 博士と前田公憲准教授に感謝いたします。

参考文献

- (1) Stoll, S., Schweiger, A., *J. Magn. Reson.*, **2006**, 178 (1), 42-55.
- (2) Bujacz, A., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **2012**, 68 (10), 1278-89.
- (3) 岩田奈々. タンパク質の光化学反応におけるラジカル対ダイナミクスと磁場効果. 埼玉大学理工学研究科修士論文(未公刊), 2020.
- (4) Kobori, Y.; Fuki, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133 (42), 16770-3.
- (5) Fuki, M.; Murai, H.; Tachikawa, T.; Kobori, Y., *J. Phys. Chem. B*, **2016**, 120 (19), 4365-72.
- (6) Jeschke, G., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2012**, 63, 419-46.