

二量子遷移パルス EPR 装置とナノメートルスケールの距離測定法の開発

(東北大・多元研¹, JST・CREST², 阪市大院・理³, 京大院・人間環境⁴, 日本電子⁵)○大庭 裕範^{1,2}, 中澤 重顕³, 酒井 尚子^{2,4}, 中森 太郎^{1,2}, 山本 行男^{2,4},
風間 俊治^{2,5}, 水田 幸男^{2,5}

【序】タンパク上の2箇所をニトロキシラジカルでスピンラベルし、電子常磁性共鳴(EPR)で観測した双極子相互作用で求めたスピン間距離から構造を決定する方法は、他の手法では構造解析が困難な無配向試料などでも2~8nmの距離を測定できる点で注目されている⁽¹⁾。2量子遷移(Double Quantum Coherence: DQC)は相互作用する2スピンの固有の状態であり、これによってスピン間の相互作用のみを選択的に観測できる。このためDQCを用いた距離測定は感度、精度の点で優れているが、2つのスピンを同時に励起しなければならないため、高性能の装置が要求される。我々は日本電子と共同でニトロキシドラジカルのDQC測定に適用可能なパルスEPR装置の開発を行ってきた。本講演ではその装置開発の概要と、装置性能・測定手法の検討に適した剛直な構造のビラジカルI(図1)を用いたDQC観測の結果について報告する。

【実験】Iは文献にしたがって合成した⁽²⁾。パルスEPR装置は日本電子JES-MQ200を元に、新たにKuバンド(17.5GHz)パルスマイクロ波ブリッジおよび高速パルス発生・データ収集装置、誘電体共振器によるEPRプローブを開発し、構成した。主な性能は、最小パルス幅3ns(100ps分解能)、最大マイクロ波磁場(B_1)4mT以上(Q~50、2kW)、最小パルス間隔30ns(300ps分解能)、サンプリング速度1ns(2チャンネル同時)、最高繰り返し100kHzである。

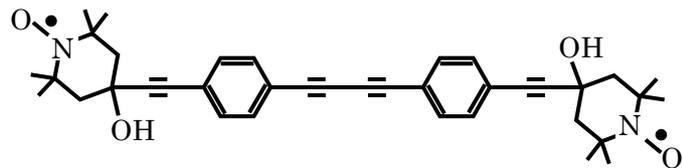
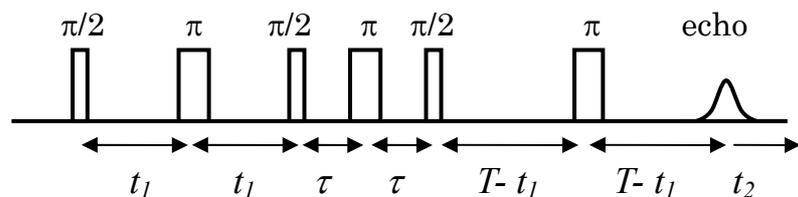


図1. ニトロキシルビラジカルIの構造

測定試料はIのtoluene / THF = 6:4(v/v)凍結溶液約10 μ lである。DQC測定は図2の6パルス列で64ステップ位相サイクルを用い、 B_1 3mT、繰り返し周期2ms、 t_2 のサンプリング1ns間隔512点で行った。また、マトリックプロトンによる核変調

図2. DQC測定6パルス列、90°、180°パルス幅それぞれ3、6ns、 $\tau = 32$ ns、 $T \sim 2.2$ μ s、 t_1 は $T/2 \sim T/2 + 1$ μ sで46ステップ測定。

効果 (Electron Spin Echo Envelope Modulation: ESEEM) を除くため、 T の値を $n\tau_H/2$ (τ_H は ESEEM周期、 $n = 0,1,2,3$) だけ変えた 4 つの測定結果を平均した。

【結果と考察】 図 3 に 53K で測定した **I** の DQC エコーのピーク強度を $t' = 2t_1$ に対してプロットした。ここで t_2 のエコー信号の積分は行っていない。ラジカル間の双極子相互作用周波数を ω とすると、DQC に現れる双極子変調は $\omega t'$ の関数となるが、ほぼ周期 380 ns の明瞭な変調が観測された。図 3 を Fourier 変換 (FFT) して得られたスペクトルが図 4 である。0 MHz のピークを除くと、スペクトルは軸対称双極子相互作用の無配向スペクトル、いわゆる Pake 型となっている。±2.7 MHz のピークは無配向スペクトル強度の特異点である。また、特異点の周波数の 2 倍に相当する ±5.4 MHz はスピン間を結ぶベクトルと外部静磁場方向が一致する配向での周波数で、この信号が明瞭に観測されたことは、外部静磁場に対する可能な分子の配向のほぼ全てが観測されていることを示す。この周波数からスピン間距離として 2.69 ± 0.01 nm を得た。**I** については polystyrene 中での DEER (Double Electron-Electron Resonance) 測定からスピン間距離 2.57 ± 0.14 nm が、また、分子動力学計算による NO の O-O 間平均距離として 2.77 nm が報告されている⁽²⁾。DQC、DEER いずれの値も計算値に非常に近い。実験値がいずれも計算値よりもやや小さいのはスピンの NO 間に非局在化していることが一因である。DQC と DEER の結果の違いはマトリックスの影響が大きいと思われるが、DEER ではスペクトルの ±5.4 MHz 信号が非常に弱いことから、試料中の特定の配向をした分子しか励起できていないことによる誤差が含まれると考えられる。講演ではラジカル濃度や分子間相互作用、距離分布の影響についても述べる。

- 1) P. P. Borbat and J.H.Freed, "Biological Magnetic Resonance", vol. 19, (2000) 383.
- 2) R. E. Martin, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* (1998), **37**, 2834.

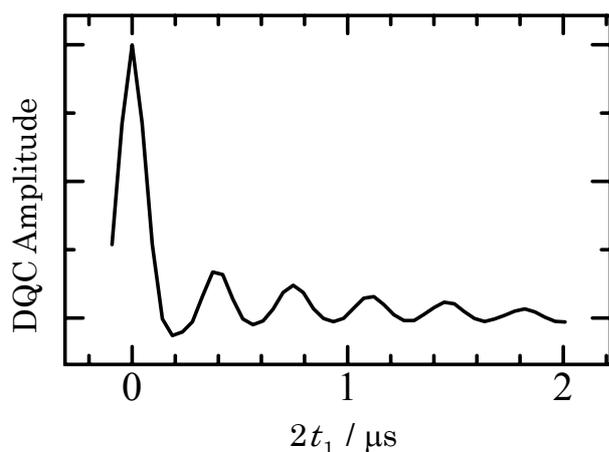


図 3. ビラジカル **I** の toluene/THF 0.12 mM 溶液の DQC 信号の双極子変調、53 K.

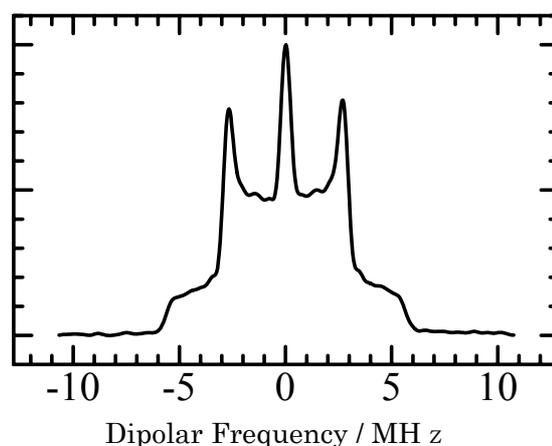


図 4. DQC 双極子変調の FFT スペクトル。前処理は apodization と zero-filling のみ。