

軟 X 線共鳴発光分光で見たミオグロビンヘムの Fe3d 電子状態

(理研 SPring-8¹, 広大理², 阪大極限セ³, 東邦大医⁴, 理研⁵, 東大物性研⁶) 原田 慈久¹, 徳島 高¹, 田口 宗孝¹, 堀川 裕加², 城 宜嗣¹, 萩原 政幸³, 平谷 篤也², 大胡 恵樹⁴, 橋爪 大輔⁵, 辛 埴^{1,6}

【序】 ミオグロビン (Mb) は筋肉中で酸素貯蔵を行っており、ヘムを反応中心として内包している蛋白質である。酸素のような基質を結合する点において、ヘムを取り囲むアミノ酸残基による立体障害の効果や分極場の影響が複雑に絡み合いながら、最終的にはヘム鉄原子の 3d 電子状態が基質結合を支配している。しかし鉄の 3d 電子状態間の吸収 (dd 遷移) は、ポルフィリンの π 電子に由来する可視域の巨大な吸収バンドに埋もれて、これまで直接観測することが困難であった。ヘムの機能が主に立体構造の観点から議論されているのは構造で全てが説明できるからではなく、電子状態の全体像を捉える術がなかったからであると考えられる。そこで我々はこの鉄の dd 遷移を選択的に、しかも許容遷移として観測できる軟 X 線発光分光法に着目し、生理的環境に近い溶液状態を同時に実現する蛋白質の送液システムを開発して、各種基質を配位したミオグロビン溶液の内殻励起発光スペクトルを取得することに成功した。また、ヘムの参照物質として側鎖を様々に修飾した鉄ポルフィリン錯体の測定も行い、ミオグロビンヘムの特徴について調べた。

【実験装置】 実験は、高輝度放射光実験施設 SPring-8 BL17SU において行った。ミオグロビン溶液試料は大気圧下に保持し、真空を仕切る 150nm 厚の Si₃N₄ 薄膜を介して軟 X 線照射、及び発光検出を行った。また、コンタミネーションの防止、条件の制御、照射によるラジカルの蓄積防止等の観点から、送液システムを構築してミオグロビン溶液が常に入れ替えられるようにした。図 1 に送液システムを示す。試料は容積 2ml のバイアルからチュービングポンプによってタイゴン及びテフロンチューブ内に吸い出され、軟 X 線照射部の石英ガラス製の溶液セルを通して、再びバイアルに戻る。測定中の試料温度は 2 ± 0.5 °C に制御した。発光の測定には独自に開発した斜入射平面結像型分光器¹を用いた。

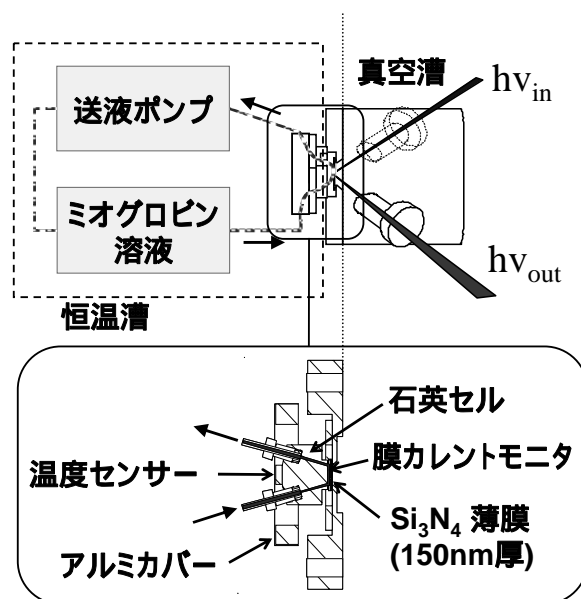


図 1 . 蛋白質送液システム

【試料】 ミオグロビン試料はウマ心筋由来 (Mb、シグマ) で、オキシ型が混入しているため、鉄 3 価状態であるメトアクオミオグロビン (metMb) の作成には 100 mM フェリシアン化カリウム / 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 8.4) で 4 時間、暗所で 48 時間反応させて完全に酸化させ、フェリシアン化カリウムや小分子量の夾雑物は同バッファーにより除去した。シアノメトミオグロビン (MbCN) は metMb に 20 mM シアン化カリウムを入れることによって作成した。また、metMb を窒素雰囲気下で 10 mM ジチオナイトによってデオキシ状態 (deoxyMb)

に還元し、deoxyMb に高純度の一酸化炭素を吹き付けることによってカルボモノキシ型 Mb (MbCO)に変換した。全ての試料はセントリプレップ YM-10 によって約 10 mM まで濃縮して測定に用いた。最後に、紫外-可視分光光度計(日立)で試料の定量や基質の結合状態をチェックした。参照物質として、市販のヘミン(hemin, Fluka) 500mg を 0.3M NH₄OH (pH=11.7) 6ml に溶かし 1N HCl をヘミンの沈殿ができない程度に滴下して中和したもの、及びヘム面に歪みを導入した鉄ポルフィリン錯体(Fe(TPP)Cl; planar, Fe(TⁿPrP)Cl; ruffle)の粉末試料をクロロホルム(脱水)に溶かして試料プレート上に滴下乾燥させたものを用いた。

【実験結果と考察】 図2に各種ミオグロビン及びヘミンのFeL₃共鳴発光スペクトルを示す。横軸はラマンシフトで表示している。共鳴発光で観測されているものはほぼ全てdd励起または配位子からFe原子への電荷移動(CT)励起である。励起エネルギーは各試料共通で、L₃吸収端のピークより約 1.5eV 上に合わせている。これによって、高シフトエネルギー側の強度の相対的な減衰が抑えられ、dd励起の構造を数多く捉えることができる。1スペクトルの取得時間はおよそ10時間、エネルギー分解能はおよそ E/ E~1000 である。なお、低エネルギーdd励起をはっきりさせるため、バッファー液の弾性散乱を参照スペクトルとして弾性散乱を差っ引いてある。形式価数、スピン状態の異なる試料ではdd励起のエネルギー、強度が微妙に異なっているが、いずれも弾性散乱から1~1.5eV程度シフトしたところに鋭いピークを持っている。これは通常の酸化物では見られないピークで、一方遊離ヘムであるヘミンで現れることから、ヘム錯体に共通して基底状態に近接した励起状態があることを示している。3価 high spin に対する磁化率²やEPR³の測定で、Fe 3d電子の第一励起状態が基底状態から 6000cm⁻¹(~0.75eV)程度まで近接していることが示唆されており、これらとコンシステントな結果と言える。FeL₃共鳴発光では、EPRでとらえられない2価 low spin の電子状態も明瞭に捉えている。また deoxyMb とヘミンでは、5eV以上のピークが消失している。これは基質が配位していないこと、及びFe原子がヘム面からオフセットしているために、ヘム及び基質からのCT励起成分が弱まっていることを反映しているものと考えられる。

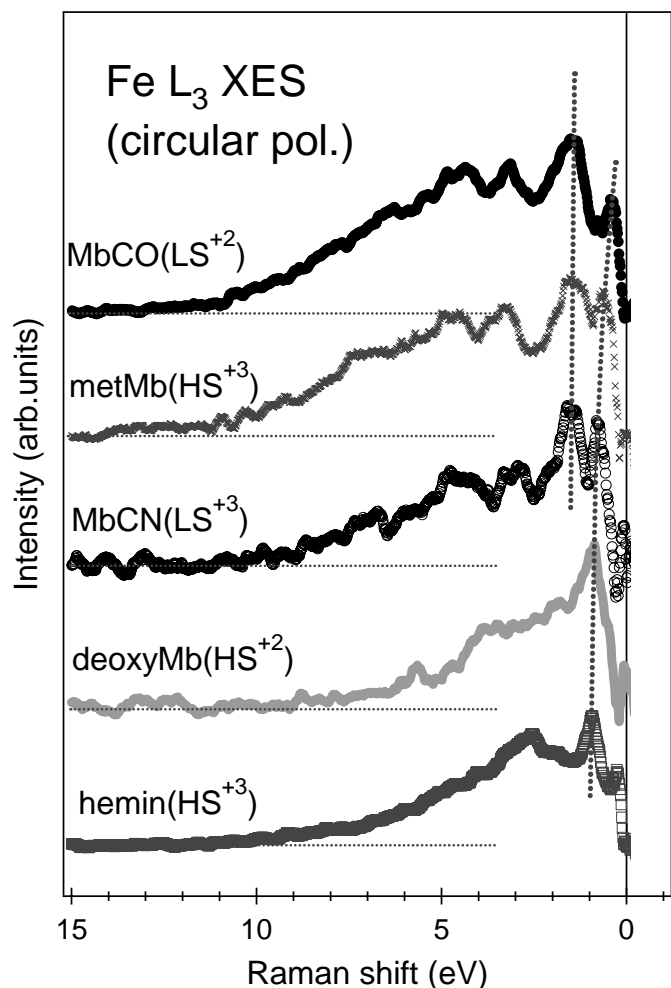


図2. 各種ミオグロビン及び hemin の Fe L₃ 共鳴発光スペクトル(ラマンシフト表示)

¹ T. Tokushima et al., Rev. Sci. Instrum. 77, 063107 (2006)

² T. Iizuka et al., Biochim. Biophys. Acta 167, 441 (1968)

³ Y. Miyajima et al., J. Phys. Soc. Jpn. 73, 280 (2004)