

## 軟 X 線発光分光によるミオグロビン溶液の電子状態観測

(理研/SPring-8\*, 東大物性研\*\*)

原田 慈久\*, 徳島 高\*, 宮嶋 良治\*, 田口 宗孝\*, 辛 埴\* \*\*

## 【序】

ミオグロビンは主に筋肉中で酸素貯蔵の役割を果たす蛋白質として知られ、様々な基質を結合するヘムを反応中心として持っている。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、ミオグロビンに特有の基質選択性がある。一方で、ヘムの中央に位置する鉄の3d電子状態が、基質との結合特性を支配している。鉄はポルフィリン環に埋め込まれることによって特定の分子に対する結合効率が桁違いに高まり、さらにヘムが蛋白質に取り囲まれることで酸素の結合性が高まる。そこで、鉄の3d電子状態を直接観測すれば、基質との結合がどの軌道を介して行われるかなどの情報が得られ、ミオグロビンの機能解明だけでなく、基質特異性を持つモデル物質の設計にもフィードバックすることができる。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。

そこで今回、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てミオグロビンの実験を行った。特に、より生理的環境に近い条件で実験を行うため、バッファーに溶けたミオグロビン溶液を測定できるシステムを開発した。本講演では、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し、配位子場理論を用いて解析した結果について報告する。

## 【実験装置】

実験は、放射光実験施設 SPring-8 BL17SU において行った。本研究に先駆けて、溶液試料のための高効率・高分解能発光分光システムを開発した<sup>1</sup>。溶液試料は大気圧中に保持し、真空を仕切る150nm厚のSi<sub>3</sub>N<sub>4</sub>薄膜を介して試料への軟X線照射、及び発光検出を行った。吸収は膜カレントモニタまたは真空中におかれたフォトダイオードによる総発光収量により測定した。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過して、再びバイアルに戻る。測定中の試料温度は2 ± 0.5 に制御した。

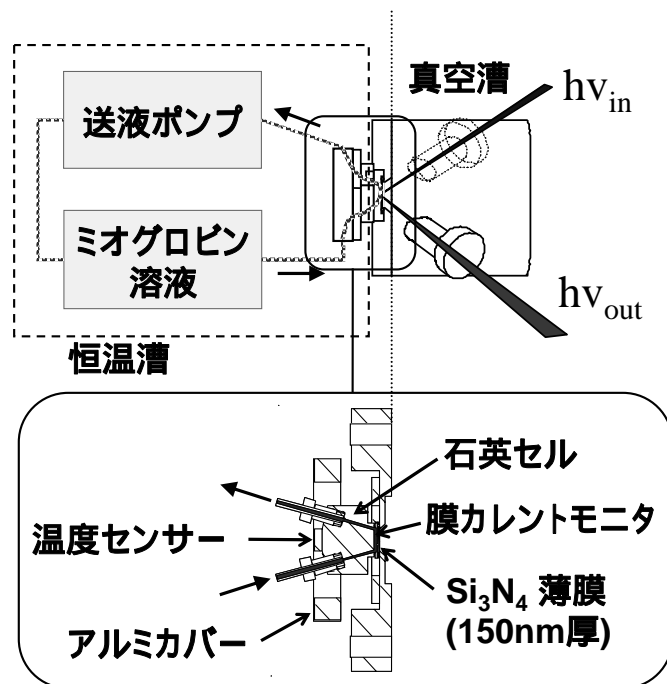


図1. 送液システム概念図

## 【試料作成】

試料はウマ心筋ミオグロビン (Mb、シグマ) で、精製度が十分のためそのまま用いた。試薬は全て特級試薬を用いている (Wako)。ミオグロビンには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ミオグロビン (ヘムに水が配位したミオグロビン、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た。反応後、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る十分な透析によって除去した。metMb は窒素雰囲気下のグローブボックスで、10 mM ジチオナイトによってデオキシ状態 (deoxyMb) に還元して試料とした。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。全ての試料はセントリプレップ YM-10 によって 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。

## 【実験結果と考察】

図2に各種ミオグロビンの Fe2p 吸収及び共鳴発光スペクトルを示す。励起エネルギーは各試料共通で、 $L_3$  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吸収がおよそ1時間、発光がおよそ10時間、エネルギー分解能は吸収がおよそ  $E/E \sim 3000$ 、発光がおよそ  $E/E \sim 1000$  である。共鳴発光で観測されているものはほとんど dd励起である。elastic と書かれた位置からのシフト量が dd励起エネルギーに相当する。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

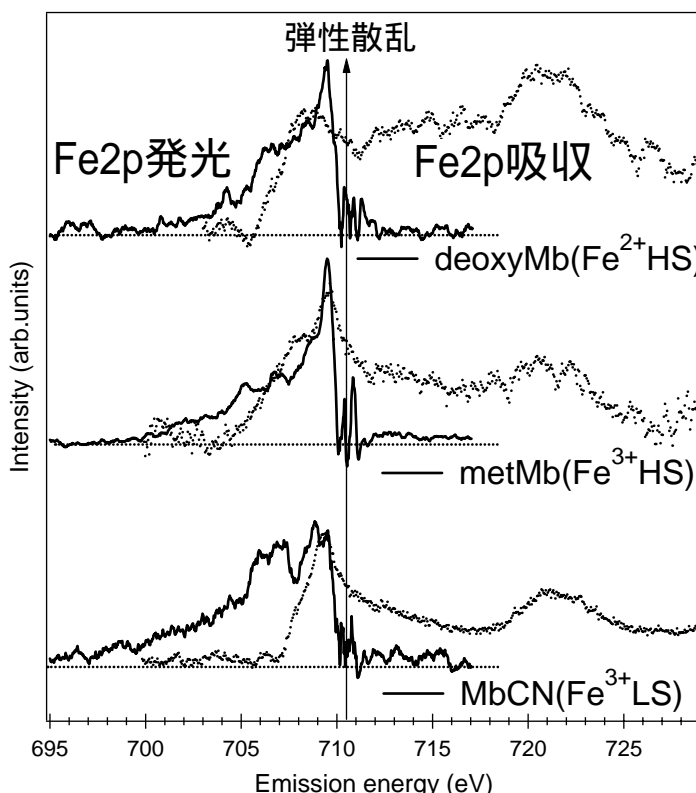


図2. deoxyMb, metMb, MbCN の Fe2p 吸収及び  $L_3$  共鳴発光スペクトル

のエネルギー、強度が顕著に異なっているが、いずれも弾性散乱から 1.5eV 程度シフトしたところに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、ミオグロビン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。磁化率<sup>2</sup>や EPR<sup>3</sup>の測定で、Fe 3d 電子の第一励起状態が基底状態に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。講演では、配位子場理論を用いた内殻発光スペクトルの計算との比較により、ミオグロビンの特徴が、ヘムの特徴でどこまで説明できるかを議論する。

<sup>1</sup> 徳島高、原田慈久、宮嶋良治、辛埴、分子構造総合討論会 2005、3P191.

<sup>2</sup> T. Iizuka et al., Biochim. Biophys. Acta 167, 441 (1968)

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