

「物質現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 16 年度採択研究代表者

下山 雄平

(室蘭工業大学教育研究支援機構 教授)

「多量子遷移 ESR による巨大分子の構造解析」

1. 研究実施の概要

本研究は多量子遷移 ESR を開発し、これを応用した巨大分子の構造解析にねらいがある。

17 年度計画で通常のパルス測定に十分な性能を持つ Ku バンドパルス ESR 装置を開発した。装置開発は、マイクロ波ブリッジ、パルス列発生器、TWTA、標準空洞共振器、電磁石、データ取得用オシロスコープ、コンピュータシステムの設計・組み上げを行ないスピネコー信号、ついで DQC 信号の観測に成功した。18 年度は高感度、高精度で MQC 信号を得ることを目的として、パルスの帯域幅拡大、不感時間の短縮、およびサンプリング速度向上に重点を置いてこれをさらに改良した。また、距離分布導出の逆問題理論のアルゴリズムを元に、DQC 信号解析システムの開発を行った。

また、本計測法で得られる距離情報の信頼性を確認するため、ベンゼン環を3重結合でバインドした直鎖状ビラジカル合成に取り組んだ。その結果、2つの化合物(ラジカル間距離として 1.88 および 2.77nm)の合成に成功した。一方、巨大蛋白質においても実用的な距離情報の取得・検討を進める為モータータンパク質や TF1b 蛋白質への標識ラジカル導入に取り組んだ。

これまでにモータータンパク質(心筋トロポニン)において、DQC 信号から信頼性の高い距離情報(2.6nm)が得られた。多量子遷移観測に対応するパルス ESR 装置としては、米コーネル大学にて実験機が構築されている。今回のデータは同装置で得られたデータと比肩するものであるが、本装置はより実用段階に達しているものであり総合的には優位にあると考えている。

2. 研究実施内容

[研究目的] 多量子遷移 ESR の開発と本装置による巨大分子の構造解析研究

[研究方法]

1) 多量子遷移 ESR 装置開発の為にパルス ESR 機器設計とその製作

DQC 測定に必要な性能を達成するため、装置の調整改良を以下の点について行った。

- a) 広帯域励起パルスの生成：90 度パルス幅 3 ns ($B_1 = 3.0\text{mT}$) を達成するために、位相変調、整形用 2 段 PIN スイッチのタイミング調整を行った。
- b) 0.3 ns (3.34 GHz Clock)パルス時間分解能の達成：3GHz パルス発生器の制御。

- c) 最小パルス間隔 27ns の達成：パルスタイミングの調整。
- d) 最大パルス列繰り返し周波数 100 kHz の達成：高速パルス列発生器と高速 ADC を連携制御しデータ収集／積算の高速化を行った。
- e) 位相精度の検討：マイクロ波パルス及び検出器の位相精度を DQC 位相サイクルに対して検討した。

2) 本手法によるラベルしたタンパク質や高分子の構造解析研究

本装置を用いて下記の試料について室温、および 40～70K の低温における緩和時間などの基本的な EPR データ取得、および DQC 測定を行った。

室温測定： γ 線照射石英

低温測定：トロポニン 3 種 (2.6、3.5nm 2 種、阪大より)、TF1beta 2 種 (4.5、5.5 nm、理研より)

[結果]

装置改良作業を通して、以下の Ku-Band ESR 装置性能が確認できた。

- a) 最大スペクトル積算周波数 100 kHz。図 1 参照
- b) 90 度パルス幅 3 ns ($B_1 = 3.0\text{mT}$)。図 2 参照
- c) パルスの時間分解能 0.3 ns (3.34 GHz Clock)
- d) 最小パルス間隔 30 ns
- e) マイクロ波パルスパワー 2 kW
- f) 不感時間 80 ns (目標値は 30 ns)

バイラベル試料の DQC 測定

a) 室温測定

γ 線照射石英：狭帯域測定装置の調整用標準試料として DQC エコーおよび DQC 減衰測定を行い、既存の報告と一致する結果を得た。

b) 低温測定

40～70K において、3 ns90 度パルス ($B_1=3.0\text{ mT}$) を用い、トロポニン (2.6 nm) の DQC による距離測定に成功した (図 3)。測定した距離は構造から推定した 2.6nm と良く一致した。

[全体計画に対する進捗状況]

1) 装置開発

3ns の 90 度パルスによる DQC 信号の高精度化をはかるため、以下の改良を計画する。

- 3ns パルス幅設定時の、各位相チャンネル出力のパルス幅、強度の均一化。
- 周波数・結合度可変 ESR プローブの調整
低温化で周波数／結合度の調整行うため設計・試作した ESR プローブの調整。

- マイクロ波信号の漏洩と回り込みの解決
不感時間の短縮と TWTA の発振抑制のためマイクロ波信号の漏洩と回り込みを回避する。このため、マイクロ波回路構成の見直し、コネクタ類の選別、シールドの強化を実施する。
 - 強度変調による広帯域化
強度変調方式により観測帯域を拡大。TWTA 出力を導波管にて共振器に投入する。
 - SAR 共振器の開発
同軸結合式、および導波管結合式 SAR 共振器を完成させる。
- 2) ソフトウェア開発
昨年度実施した DQC 信号の解析原理を踏まえ、信号解析ソフトウェアの開発し、双極子変調信号から標識スピン間の距離や分布情報を高精度で求める。
- 3) 試料調整
- 標準試料
昨年度成功した 2.7nm 試料合成の知見を生かし直鎖状安定ビラジカル (5nm) の合成に取り組む。
 - タンパク試料
トロポニンビラジカル (5.7nm、7.5nm) のビラジカル合成を実施し、TF1b タンパクにおいては 4.5nm、5.1nm の距離をもつビラジカルを適時合成し、NMR データ (TROSY) との相関を調べながら測定する。
- 4) 実測定
試料濃度や緩和時間の制約があるため、標準試料においては 5nm、タンパク試料においては 4.5nm のビラジカルにて DQC 測定を実施し、距離および分布データの取得を行う。

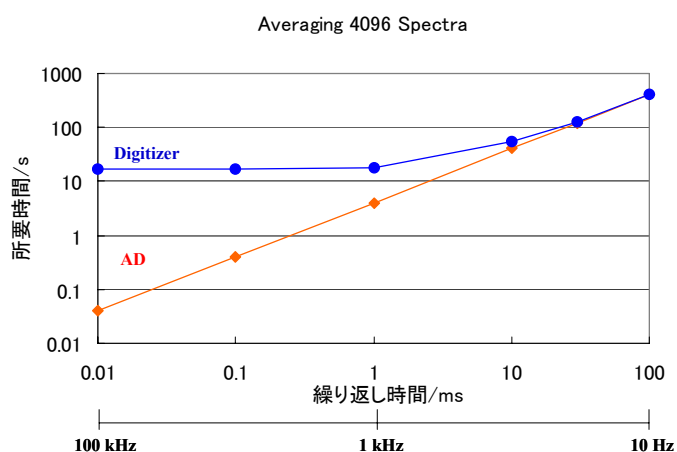


図1. 繰り返し周波数を変化させた場合の、デジタイザおよびADCによるデータサンプリング時間の比較。4096回の積算所要時間にて比較を行った。

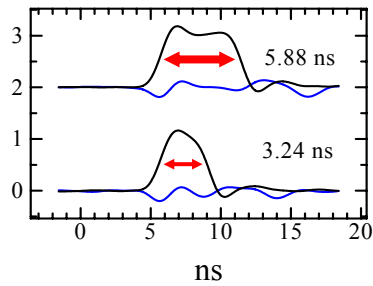


図2. Mixer検出によるマイクロ波パルス信号。上はPINスイッチ1個による最小幅パルス(5.88ns)。下はPINスイッチ直列接続により短縮したパルス(3.24 ns)。

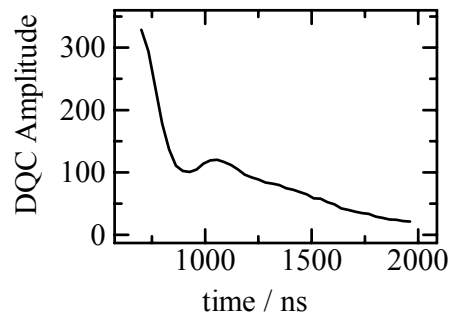


図3. トロポニン2重ラベルタンパク水溶液のDQC、70 K。変調の解析より、スピン間距離2.65 nmを得た。

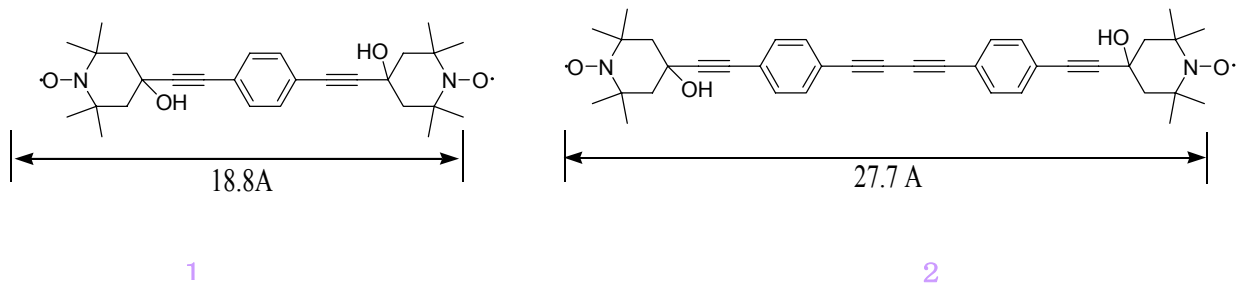


図3. 直鎖状ビラジカルの構造

3. 研究実施体制

(1)「下山」グループ

- ①研究分担グループ長:下山 雄平(室蘭工業大学 教授)
- ②研究項目
 - ・チーム全体の研究総括と機能評価

(2)「大庭」グループ

- ①研究分担グループ長:大庭 裕範(東北大学 助教授)
- ②研究項目
 - ・Ku バンドマイクロ波回路の最適化と解析ソフトの構築

(3)「小野」グループ

- ①研究分担グループ長:小野 光弘(山形大学工学部 客員教授)

②研究項目

- ・共振器および結合器の設計・開発

(4)「水田」グループ

①研究分担グループ長:水田 幸男(日本電子 副主幹研究員)

②研究項目

- ・高速AD変換装置の開発と、パルス発生器やAD変換装置を連携制御するソフトウェアの開発

(5)「荒田」グループ

①研究分担グループ長:荒田敏昭(大阪大学 助教授)

②研究項目

- ・バイラベルによる計測手段と計測手法

(6)「山崎」グループ

①研究分担グループ長:山崎 俊夫(理化学研究所横浜研究所 チームリーダー)

②研究項目

- ・タンパク質試料の調製、NMR-ESR 統合的構造解析法

(7)「山本」グループ

①研究分担グループ長:山本 行男(京都大学 教授)

②研究項目

- ・多量子遷移ESR計測のための標識化合物の合成

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- ESR Detection of Wheat Flour before and after Irradiation, Y. Shimoyama, *Spectrochimica Acta Part A*, **63** (2006), 888-890.
- An ESR Protocol Based on Relaxation Phenomena of Irradiated Japanese Pepper, Y. Shimoyama, *Spectrochimica Acta Part A*, **63** (2006) 879-882.
- An Electron Spin Resonance Study of g-ray Irradiated Ginseng, Y. Shimoyama, *Spectrochimica Acta Part A*, **63** (2006) 883-887.
- Advanced Protocol of Detection for Irradiated Food by Electron Spin Resonance Spectroscopy, Y. Shimoyama and H. Nakamura, *Radiation Physics and Chemistry*, **73**, 177-180 (2006).
- An ESR Study of Free Radicals in Irradiated Cereals, H. Kameya, H. Nakamura, Y.

Shimoyama, *Radiation Physics and Chemistry*, **73**, 177-180 (2006).

- Identification of pH-sensitive Regions in Mouse Prion by the Cyctein-scanning Spin-labeling ESR Technique, Y. Watanabe, O. Inanami, M. Horiuchi, W. Hiraoka Y. Shimoyama, F. Inagaki and M. Kuwabara, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338** (2006) 111-119.
- A New Series of Radical-Triplet Pair System: Modulation of Radical-Triplet Interaction by a Counter Ion, Luca Maretti, Saiful. M. Islam, Takashi. Kajiwara, Ryo Miyamoto, Yasunori Ohba, and Seigo Yamauchi, *Mol. Phys.* , 104, 1619-1626 (2006)
- EPR and ENDOR Studies of the Distal Site Coordination of Shark Heart Myoglobin, Yasunori Ohba, Satoru Yanagiya, Noriyasu Ohshima, Arika Matsuoka, Keiji Shikama, and Seigo Yamauchi, *Applied Magn. Reson.*, in press.
- Tasuku Hirayama , Masayasu Taki, Motoyoshi Nakamura, Toshiaki Arata and Yukio Yamamoto , Synthesis of a New Water Soluble 2,2-Bifunctionalized Spin Label and Its Application to Troponin C, *Chem. Lett.* 35: 834-835 (2006)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:3 件 (CREST 研究期間累積件数:4 件)