B237

青色半導体レーザーの特性とヘムタンパク質の共鳴ラマン分光法への応用

○織田 賢二^{1,2}、黒岩 繁樹¹、小倉 尚志^{1,2} (¹ 東大院・総合文化、² 姫路工大院・理)

タンパク質の構造を明らかにする手法としてラマン分光法はとても有用である。特に、共鳴ラマンスペクトルは、発色団の分子振動が選択的に観測され、ヘムタンパク質などの構造決定に多大な情報を与えてきた。ヘムタンパク質は400～450 nmに吸収を有するため、Kr⁺レーザー、Ar⁺レーザー、He-Cdレーザーなどが励起光として使用されてきた。しかし、これらのレーザーは420～430 nm領域に対応してなく、高価であり、サイズが大きいのが欠点である。また、電力、冷却水などの問題もある。近年、短い波長の青色半導体レーザー素子が市販されるようになった。それらの青色半導体レーザーは、条件によってバンド幅が大きくなったり、多波長で発振したりして、ラマン分光の励起光源として使用できないことがある。

本研究では、この青色半導体レーザーをラマン分光で使用できるように条件を探索し、ヘムタンパク質の共鳴ラマンスペクトルが測定できることを目的とした。使用した素子は日亜化学のNDHV310AFBE2である。青色半導体レーザーの波長は、温度、電流値に依存し、温度、電流値を上げると長波長にシフトした。温度、電流の条件によっては複数の波長で発振したが、この2つの条件を制御することによって単色のレーザー光源となった。レーザーのバンド幅を調べるためにインデンのラマンスペクトルを測定したところ、Ar⁺レーザー、He-Cdレーザーで励起したラマンスペクトルと一致したことから、ラマン分光に使用できるレーザーのバンド幅であることが明らかとなった。28.0℃、6V、79mAの条件下で波長は、421.6 nm、レーザーパワーは、10 mWであり、ヘムの共鳴ラマンスペクトルを測定するのに十分なパワーであった。ヘムタンパク質(チトクロムc酸化酵素)を測定したところ良好に測定できた。

K.Oda, S. Kuroiwa and T.Ogura : The properties of blue diode laser and its application to resonance Raman spectra of heme proteins

B239

マッコウクジラメトミオグロビン単結晶の高磁場、多周波EPRによる研究

○宮嶋 良治^{1,2}、八代 晴彦^{1,2}、柏木 隆成^{1,2}、萩原 政幸^{1,2}、堀 洋³ (¹ 横浜市大院・総合理学、² 理研・中央研、³ 阪大・基礎工)

従来のEPR測定では、X-bandを主として2-35 GHzの低周波数の装置が長年使用されてきた。その後の高周波デバイスの開発や超伝導磁石の普及により、1990年代頃からW-band (95 GHz) でEPR測定が行われるようになった。高周波EPRでは、*g* 値の近いシグナルの分離を容易にすることができ、零磁場分裂が比較的大きい系でもシグナルの観測が可能となるメリットがある。われわれはベクトルネットワークアナライザーと超伝導磁石を用いて、16 Tまでの磁場と30から700 GHzまでの広い周波数範囲で測定を行なえるEPR装置を開発し、マッコウクジラ由来のメトミオグロビン単結晶で、主に極低温(1.5 K)での観測を行った。

この単結晶は単斜晶系、空間群 *P*2₁ に属し、二種類の異なるサイトのヘムが存在することが知られている。3×3×0.5 mm³ サイズの大きな単結晶で、*c** 軸に磁場をかけた場合のミオグロビンのEPRシグナルは、低周波数でおおよそ *g*=5.8 付近に現れたが、共鳴周波数の上昇と共に高磁場側へシフトし線幅は広がった。零磁場分裂定数 *D* をもつ *S*=5/2 のスピンハミルトニアン固有値を求め、最低エネルギーのクラマース二重項間の遷移にシグナルが対応すると考え、*D* の大きさを約 10 cm⁻¹ と見積もった。線幅のブロードニングの原因は、現在考察中である。つぎに、単結晶の *ab* 面内に磁場をかけて、185.5 および 278.3 GHz で EPR シグナルの角度変化を調べた。上に述べた2つあるヘムサイトのうち1つを、磁場がヘム面にほぼ垂直になるように配置させ、線幅の周波数依存性を調べた。磁場に対して異なる配置をするヘムをそれぞれ比較すると、磁場と垂直方向にあるヘムに由来するシグナルは、他のどの角度のシグナルよりも線幅の周波数依存性が顕著であった。詳細な解析の結果も含めて報告する予定である。

Y. Miyajima, H. Yashiro, T. Kashiwagi, M. Hagiwara, H. Hori : High field and multi-frequency EPR in single crystals of sperm whale met-myoglobin

B238

ヤツメウナギのヘモグロビン、ミオグロビンの構造と機能

○今井 清博¹、堀 洋²、矢沢 洋一³、大河内 正一¹ (¹ 法政大・工・物質化学、² 阪大院・基礎工学・システム人間系、³ 北海道教育大・教育)

単量体ヘモグロビン (Hb) と四量体 Hb をつなぐ位置にある円口類 Hb およびミオグロビン (Mb) の構造と機能の関係を明らかにする目的で、国内で捕獲されたヤツメウナギから、イオン交換樹脂カラムで分離した二つの Hb 成分 (Hb I, Hb II) および Mb を調製し、それらの酸素結合特性、電子常磁性共鳴吸収 (EPR)、フーリエ変換近赤外線吸収 (FT-IR) などの解析を行って以下の結果を得た。Hb II の酸素親和性は Hb I に比べてわずかに高い。Bohr 効果は Hb I には存在するが Hb II には存在しない。ATP の効果は両成分にみられない。両成分ともに、蛋白濃度が高くなると、酸素親和性が低下し、協同作用が現れる。その程度は Hb I の方が顕著である。Mb の酸素親和性は Hb のそれと同等で、弱い Bohr 効果を示すが、ATP の効果は見られない。酸化型 Hb の EPR では、*g* = 6 付近のシグナルが軸対称性のものと異方性のものの2つの高スピン種が存在し、pH の増大と共に前者が減少し、後者が増大する。pH9 では低スピン型に移行することから、遠位配位子は水分子と思われる。還元型 NO 誘導体の EPR は、His を近位配位子とする六配位型の特徴を示し、pH6 では *g* 異方性が増大する。EPR スペクトルの蛋白濃度依存性はみられない。還元型 CO 誘導体の FT-IR スペクトルに、1968cm⁻¹ (major band) , 1928cm⁻¹ (minor band) の特徴的な吸収帯がみられ、前者はさらに2つの吸収帯に分解できる。CO 結合状態には少なくとも3種類のコンフォーマーがある。以上の結果を、従来の先人の結果と比較し、分子進化的観点からの検討を行う。

K. Imai, H. Hori, Y. Yazawa and S. Okouchi : Structure and function of lamprey hemoglobins and myoglobin

B240

放射光核共鳴非弾性散乱によるミオグロビン鉄の運動スペクトルの温度依存性

○原見 太幹¹、宮崎 源太郎²、瀬戸 誠³、三井 隆也¹、北尾 真司³、小林 康浩³ (¹ 原研 放射光科学研究センター、² 大阪大学 基礎工学部、³ 京大 原子炉実験所)

放射光を光源とする核共鳴非弾性散乱を利用して、ミオグロビンの鉄原子の運動スペクトルを測定したので報告する。従来原子、分子の運動を記述するのに Debye-Waller 因子や平均二乗変位が用いられているが、核共鳴非弾性散乱は着目する原子のエネルギースペクトルを測定することができ、スペクトルを解析することによって変位に寄与している運動を議論することができる。蛋白質のような生体高分子は構造を変えながら運動することによって機能を果たすことができるが、熱平衡的な構造解析は盛んに行われているが、熱平衡の構造からの変位の研究は今後の課題と思われる。ミオグロビンのアミノ酸残基や鉄原子の Debye-Waller 因子、平均二乗変位は回折実験やメスバウア実験で報告されており、200 K 付近を境に低温側では状態が凍結されているが高温側ではコンフォメーションサップ状態間の遷移が活発になり、Debye-Waller 因子が急激に減少つまり平均二乗変位が急激に大きくなることが報告されている。この Debye-Waller 因子が急激に減少つまり平均二乗変位が急激に大きくなることをより詳しく調べるため、核共鳴非弾性散乱を行った。今回は、ミオグロビン溶液を試料とし、SPRING-8 核共鳴散乱ビームライン BL11XU で実験を行い、シリコンモノクロメータ (2.5meV バンド幅) を使用した。測定エネルギー範囲は± 60meV である。

T.Harami,G.Miyazaki,M.Seto,T.Mitsui,S.Kitao and Y.Kobayashi : Dynamical spectra of iron in myoglobin by synchrotron radiation nuclear resonant inelastic scattering