磁気共鳴分光特集：総説

ENDOR 法の発展とその応用

三 野 広 幸*

*名古屋大学理学研究科 名古屋市千種区不老町 (〒464-8602)

(2006年1月26日 受理)

Advancement of ENDOR Spectroscopy

Hiroyuki MINO*

*¹Division of Material Science (Physics), Graduate school of Science,
Nagoya University, Furocho, Chikusa, Nagoya, 464-8602

(Received January 26, 2006)

ENDOR spectroscopy is a powerful technique to investigate the molecular structure. Since the first discovery, a lot of experiments have been performed. In this report, recent advancements of the CW- and pulsed-ENDOR, TRIPLE, and ELDOR techniques were reviewed with our results.

Keywords: ESR, EPR, ENDOR, TRIPLE, ELDOR

1. はじめに

ESR 法は不対電子を, NMR 法は核を対象にした磁気共鳴法であり, 両者はほぼ同時期に成立している. 電子の磁気モーメントは核の磁気モーメントに比べて1000倍程度も大きく, このため ESR は NMR よりもはるかに信号強度が強く, また磁氣的相互作用の及ぶ範囲も大きい. NMR においてプロトン間の双極子相互作用の実効的な到達距離が 6–10 Å 程度なのに対し, ESR では電子間の双極子相互作用の実効的な到達距離は50–100 Å 程度である. 逆に, 近傍分子間の磁氣的相互作用しか見えないという弱さを利用して分子構造を決定する手段が2次元 NMR であるともいえる. これに対して, ESR では磁氣的相互作用が大きく, 膨大な情報量がスペクトルの中に埋没してしまいがちである. そのため必要な情報を引き出すために多くの測定技術が開発されている. 本稿の主題である ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) 法もそのひとつである.

ENDOR 法は1957年 George Feher によって初めて行われた¹⁾. その有用さは“X 線構造解析にも匹敵する手段”といわれ, 現在に至るまで極めて有用な手段の一つである^{2–5)}. いうなれば ESR の高感度と NMR の高分解能を同時に実現する手法である. その優れた能力にもかかわらず, よく普及しているとはいえず, ESR 以外の分野の研

究者に至っては手法そのものがあまり知られていない. この原因は測定設備が限られていることもあるが, 何より ENDOR の信号が複雑な緩和機構に依存するため“信号が検出できるかどうか測定してみなければわからない”という点により敬遠され, 普及を阻んだのではないだろうか. しかしここ10年間のパルス ENDOR 法の発展により状況は変わりつつある.

これまで筆者は ESR を用いた光合成系の研究に携わってきた. 光合成系は ESR 法の重要な応用のひとつであり, これからも主要な研究手段であり続けると考えられる. なかでも ENDOR 法の果たす役割は非常に大きいといえるだろう. この総説では, ENDOR の原理および CW-ENDOR とパルス ENDOR についてのそれぞれの利点を, 筆者の研究を交えながら紹介する.

2. CW-ENDOR 法

2.1 CW-ENDOR 法の原理

ENDOR の最大の利点として, 幅広い ESR 吸収スペクトルを高分解することがあげられる. 1つの不対電子近傍に超微細相互作用をもった核がある場合を考えてみる (図1). 近傍に1個の核がある場合, 超微細分裂により2本の ESR 信号に分裂する. 共鳴線の数には2個の場合4本, 3個の場合8本, 更に N 個の場合には 2^N 個となる. そのため分子内で多くの核との相互作用を含む場合, 個々の核

図1 ESR と ENDOR の共鳴線数の比較

との超微細相互作用の情報は失われ幅広な共鳴線となってしまふ。しかし ENDOR 法では 1 つの核に対して 1 対の共鳴線しか観測されないため $2N$ 個の共鳴線に分解されるのみである。更に、信号の線幅が NMR 線に準じて非常に狭くなるため分解能の高い信号を得られる。核のゼーマン周波数を ω_n 、超微細相互作用を A とすると信号のパターンは

$$\omega^{\pm} = |\omega_n \pm A/2|$$

と表される。つまり核のゼーマン分裂の大きさと超微細相互作用との大きさの比で信号のパターンは異なる。 ω_n よりも $A/2$ が小さい場合、 ω_n を中心として A の分離をもった信号のパターンとなり (図 2A) その逆の場合には $A/2$ を中心として ω_n の分離をもった信号のパターンを示す (図 2B)。

原理を簡単に説明するために 1 つの不安電子 ($S=1/2$) と 1 つの核 ($I=1/2$) の 4 準位系を考えてみる (図 3)。なお図中では $\omega_n > A/2 > 0$ としている。静磁場中では、①電子のゼーマン相互作用、②核のゼーマン相互作用、③核と電子間の超微細相互作用により、4 準位にエネルギーレベルが分裂する。上からそれぞれ $|1\rangle$ 、 $|2\rangle$ 、 $|3\rangle$ 、 $|4\rangle$ と表記する。 $|1\rangle \leftrightarrow |3\rangle$ と $|2\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ が ESR 遷移、 $|1\rangle \leftrightarrow |2\rangle$ 、 $|3\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ が NMR 遷移、それ以外は禁制遷移となっている。図 4 で ENDOR の原理を説明する。はじめスピンは熱平衡状態にあり、ボルツマン分布している (図 4A)。CW-ENDOR では強いマイクロ波を照射することにより ESR の準位を飽和させる。ここでは $|1\rangle \leftrightarrow |3\rangle$ の ESR 遷移にマイクロ波を照射した場合を仮定してみる (図 4B)。強いマイクロ波の照射により、準位間 ($|1\rangle$ と $|3\rangle$) にスピンの差がなくなる。これにより ESR 遷移の飽和が起こり ESR 遷移が観測できなくなる。次にこの状態にラジオ波を照射することにより NMR 遷移を起こす。ここでは $|3\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ 間に照射するものとする (図 4C)。これにより

図2 核 1 個の場合の ENDOR 共鳴信号パターン。(A) $\omega_n < A/2$ の場合 ENDOR 信号は ω_n を中心に A の分離幅で、(B) $\omega_n > A/2$ の場合 ENDOR 信号は $A/2$ を中心に ω_n の分離幅で 1 対の信号が観測される。

図3 1 つの $I=1/2$ 核スピンと $S=1/2$ 電子スピンからなる 4 準位のエネルギー。①電子のゼーマン相互作用、②核のゼーマン相互作用、③超微細相互作用。上から $|1\rangle$ 、 $|2\rangle$ 、 $|3\rangle$ 、 $|4\rangle$ と表記すると、 $|1\rangle \leftrightarrow |3\rangle$ と $|2\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ が ESR 遷移、 $|1\rangle \leftrightarrow |2\rangle$ と $|3\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ が NMR 遷移となる。

図4 ENDOR の原理。本文参照。

準位 $|1\rangle \leftrightarrow |3\rangle$ 間の飽和がとけて ESR 遷移が回復することになる (図 4D). ESR 遷移の回復は照射するラジオ波の周波数の関数となり, $|1\rangle \leftrightarrow |2\rangle$ と $|3\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ の 1 対の信号として観測することができる.

もちろん現実の測定でスピン分布は, 図のように静止してはならず, 緩和機構が複雑に働く. この緩和機構こそが CW-ENDOR の測定を困難なものにする要因となっている. 図 3B に示すように 4 準位間に 6 種類の緩和が起こる. それぞれ電子と核のスピン緩和時間 T_e , T_n , 交差緩和の緩和時間を T_{x1} , T_{x2} とおくと, 交差緩和 T_{x1} , T_{x2} が十分長い場合の ENDOR 強度は次の式で表される.

$$E = [2(2 + T_n/T_e + T_e/T_n)]^{-1}$$

交差緩和が核緩和より速い場合 ($T_n \gg T_{x1}$, $T_{x2} > T_e$) $|1\rangle \leftrightarrow |3\rangle$ NMR 遷移を照射した場合の ENDOR 強度は

$$E = T_e/T_{x1}$$

となり, $|2\rangle \leftrightarrow |4\rangle$ NMR 遷移を照射した場合には

$$E = T_e/T_{x2}$$

となり両者の強度は異なる. そのため一般には対をなす共鳴信号の強度は異なる. このように ENDOR 信号は緩和機構に強く影響されるために, 温度やマイクロ波強度などを変えて測定条件を精査しなければ信号の測定は困難である. 逆に, 核の緩和時間は分子の運動性を反映するため, ENDOR の最適条件を与える緩和特性の違いから運動性, 粘性の違いなど周辺環境についての情報を得ることも可能である⁵⁾.

CW-ENDOR における感度向上法としては Stochastic ENDOR 法⁶⁾, transient ENDOR 法⁷⁾などが考案されている. これらの手法ではいずれも RF 磁場を短時間パルス的に印加することにより, 緩和機構の影響を抑制することで信号を検出している. 両者とも通常の CW-ENDOR 装置があれば, 簡単な改良によって測定が可能になっている. また, 後述するパルス ENDOR では, 短い時間での測定を行うことにより緩和機構の影響を無視することができる.

2.2 TRIPLE

ここでは簡単に TRIPLE 法についてふれる. TRIPLE は ENDOR に RF 磁場を加えて観測を行なう手法で, General TRIPLE と Special TRIPLE に大別される. General TRIPLE が ENDOR 信号の符号を同定するために行われるのに対し, Special TRIPLE は緩和機構の影響による ENDOR 信号の減少を軽減するために行われる³⁾.

a) **Special TRIPLE** Special TRIPLE は 2 つの NMR 遷移を同時に照射, 掃引する手法である. 核のゼーマン周波数 ω_n から高周波側と低周波側への掃引を同時に行なうため, ENDOR スペクトル (図 5A) の半分だけが観測さ

図5 TRIPLE スペクトルの概念図. (A) ENDOR, (B) Special TRIPLE, (C) General TRIPLE. 本文参照.

れるような形となる (図 5B). 核の緩和時間 T_n が長い場合に ENDOR 信号が十分観測されない場合に, この手法は大変有効である. また信号強度が核の個数に比例するという利点がある.

b) **General TRIPLE** General TRIPLE は ENDOR で測定された共鳴線の一つにラジオ波を印加した状態で, 別のラジオ周波数を掃引する方法である. この手法は ENDOR 信号の符号の決定に有効である. 図 5C に General TRIPLE の概念図を示す. ω_{1+} にラジオ波を印加した状態を考えると, ω_{1+} の対になっている共鳴線 ω_{1-} の強度の増加が見られる. この増加は Special TRIPLE で見られるものと同じ効果である. この時 ω_{2+} と ω_{2-} の信号強度にも変化が現れる. 図の例では ω_{2+} が増加し ω_{2-} が減少している場合を仮定しているが, これは A_1 と A_2 の符号が反対であることを意味している. もし同符号の場合 ω_{2+} が減少し ω_{2-} が増加する. 符号の同定は理論計算との比較により共鳴線を同定するのに有効となる.

2.3 測定装置

図 6 に CW-ENDOR 法のブロック図を示す. 通常の CW-ESR 測定仕様に加え, ラジオ波の発振器, パワーアンプを用意する. これらを介して試料共振器に強いラジオ波を照射する. 信号は, ラジオ波にのせた FM 変調をロックインアンプで検出するのが最も一般的である (注: AM 磁場変調を用いる場合もある). ロックインアンプ検波を用いるため, ESR 同様に, 微分形の信号が得られるのが一般的である. 試料共振器の選定は, 測定の成功を左右する最も重要な要因である. ENDOR の試料共振器は TM モード共振器にヘリックスコイルを挿入するタイプ⁸⁾と, TE モード共振器にヘルムホルツコイルを挿入する方式に大別される⁹⁾. TM モードを使った方式は, ヘリックスコイルを容易に試料に近づけることができるため, 試料に強力なラジオ波を印加することができる. このため溶液系で

図6 ENDOR 装置のブロックダイアグラム

の測定に特に有効である。その反面 Q 値が比較的悪く、感度が低くなりがちである。他方 TE モードの場合、RF 場を発生させるための幾何学的な配置が難しく、強い RF 場を得るのは難しい。しかし、 Q 値を高くとることができ、高感度の測定が可能である。低温の測定ではラジオ波は必ずしも強力である必要がないため、高感度の TE モードは低温測定に有利であるといえる。また、ENDOR 専用の共振器がなくとも手巻きのコイルで測定は十分可能である。図7にOxford社製低温測定器用試料ホルダーに装着した、手巻きのRFコイルを示す。この場合、測定はTEモード共振器で行なう。

2.4 CW-ENDOR 法の実際

Feherによって初めて行われたENDORは、KCl結晶中でのF中心のESRスペクトルについてのものであった¹⁾。そこでは線幅の広がり分解できなかった⁴¹K、³⁵Cl、³⁷Cl核のNMR遷移の観測に成功している。FeherはENDORによるカラーセンターの研究などにより1976年Buckley prizeを受賞した後、生体高分子への適用を積極的に行ない光合成反応中心の研究において大きな功績を残している。図8AにFeherらによる単離したChlaカチオンラジカルと光合成細菌*R. spheroides*の反応中心クロロフィルP870⁺のESRスペクトルを示す¹⁰⁾。反応中心クロロフィルは、光合成初期過程において光エネルギーを集めて電荷分離をおこす機能をもつクロロフィル分子である。図に見られるように反応中心P870⁺のESR線幅は、単離したBChla⁺分子の線幅よりもかなり狭く $1/\sqrt{2}$ 倍になっている。ESRの線幅より、BChlaと反応中心クロロフィル分子構造の違いは当初から指摘されていた。しかし、単離したBChla分子では溶媒、測定温度により線幅は大きくかわる。つまりESRの線幅は分子構造の違いだけでなく緩和過程に影響されるため、線幅だけでは分子構造までの議論はできなかった。図8Bに両分子のENDORの測定結果を示す。単離したBChla⁺では3対の主要なhyperfineが観測される。AA', BB'はBChlaの環面に結

図7 ENDOR 測定用RFコイル。Oxford社製低温測定用の試料ホルダーに装着した様子。

図8 バクテリアクロロフィルと*R. spheroides*の反応中心P870⁺ (図中ではD⁺)の(A) ESRスペクトルと(B) ENDORスペクトル。文献10より引用。

合しているメチレン基、CC'は β -プロトン由来と同定されている。一方P870⁺の方では同様に3対の超微細相互作用が観測されるものの分離幅が1/2倍になっている。このことから、P870⁺の構造が、二量体構造をなしていることが明らかになった。*R. Spheroides*の構造は1986年になって結晶構造が解かれ二量体構造をなしていることが証明された¹¹⁾。現在では光合成細菌から植物の光合成まで、反応中心クロロフィルのENDORによる研究は、幅広くなされている。光合成反応中心タンパク質と呼ばれるファミリーは基本的にはタンパク質の二量体構造からなり、反応中心クロロフィル二量体が両タンパク質を橋渡しするような配置をしている。二量体タンパク質は相同性、対称性が非常に高いにもかかわらずほとんどの場合、電子移動は片側のタンパク質上でしか行われない。構造の対称性と反

図9 (A)クロロフィル a, (B)光化学系 I 反応中心 P700 の構造と (C) ENDOR スペクトル. 本文参照.

応の非対称性は光合成系の主要研究課題であり, ENDOR は強力な研究手段となっている. Feher らの結果に見られる対称な二量体構造から発展して現在では非対称な二量体構造が見出されている. 図 9A は高等植物光化学系 I の反応中心クロロフィル P700 の構造である. P700 はクロロフィル分子 (図 9B) からなる二量体構造をなしている. クロロフィル分子の ENDOR (図 9C(a)) と比較して P700⁺ の ENDOR (図 9C(b)) の分離幅は若干狭いが, *R. Spheroides* の事例に見られるほど顕著ではない. 両者の比較から片側のクロロフィル分子上にスピン密度が 70–80 % 局在した構造が考えられている¹²⁾. 図 9C(c) に Chl a ではなく Chl d をもった反応中心 P740⁺ の ENDOR スペクトルを示す¹³⁾. このように ENDOR スペクトルの違いから分子の詳細な性質を知ることができる.

3. パルス ENDOR

3.1 パルス ENDOR とは

CW-ENDOR の最大の難点は緩和時間に強く影響を受けることである. これに対し, パルス ENDOR では核緩和や交差緩和がおきるより短い時間領域で測定するため, 緩和時間の影響を受けない. したがって, スピンエコー検出ができれば測定は可能であるといえる. またスピン分布を完全に制御できる, つまり核スピンを完全に反転させることができる. このため高い信号強度が得られることになる. (ただし, パルス法は CW 法より信号強度がそもそも低いので, その分を割り引いて考える必要がある.)

パルス ENDOR の代表的なパルス系列として, Mims によって考案されたパルス系列 (Mims-ENDOR) と Davies によって考案された系列 (Davies-ENDOR) がある (図 10)^{14–17)}. パルス ENDOR のパルス列は, ① preparation period (スピン系の分布に偏向を与える), ② population transfer period (核のスピン偏向を変える), ③ detection period (核遷移の効果を検出する), の 3 つの時間

図10 Mims ENDOR と Davies ENDOR のパルス系列.

短いパルスは広い周波数範囲の磁化を倒すことができる

長いパルスは狭い周波数範囲の磁化を倒すことができる

図11 時間領域と周波数領域でみたパルス長と hole burning の関係.

領域からなる. パルス ENDOR 法はスピンエコー検出に基づく測定法であるため, パルス ESR 法固有の性質を理解しておく必要がある. 周波数単位での観測と時間単位での観測は, フーリエ変換の関係になっている. これは, 短い時間のマイクロ波パルスの照射により, 広範囲の周波数帯の信号を測定することを意味する (図 11). 一般的なパルス NMR の方法論では, パルスラジオ波照射によって一度に核磁化の共鳴を観測することで, 短時間での測定とスピンの制御を行っている. ところが ESR の場合には, スペクトルの多くは不均一な成分からなっているため, 多くの場合スペクトル幅が非常に広く一部分の磁化しか倒せないということになる (hole burning). パルス ESR では, 短いパルスマイクロ波で広範囲の磁化を倒す場合と, 長いパルスマイクロ波でスペクトル中に hole burning をおこす場合とを使い分けている. その性質は, Mims ENDOR と Davies ENDOR でも有効に使われている. 以下 Mims ENDOR と Davies ENDOR について説明する.

3.2 Mims ENDOR

Mims ENDOR は、最初に考案されたパルス ENDOR 系列であり、3 パルスからなるスピンエコー (stimulated echo) 検出が基本となっている。3 パルス系列では、時間間隔 τ をおいた 2 つの 90° パルスでスピン分極をおこし、3 つ目の 90° パルスによって磁化を読み出し、 τ 時間経過後のスピンエコーを検出する (図10A)。Mims ENDOR では、3 パルス系列の 2 つ目と 3 つ目のパルスの間にラジオ波パルスを印加する。ラジオ波は核スピンを 180° 反転させる条件を用いる。例として CW-ENDOR 同様、1 つの $S=1/2$ 不対電子と 1 つの $I=1/2$ 核が超微細相互作用 A によって相互作用をしているシステムを考えてみる。スピンエコー強度に現れる ENDOR の効果 V は次の式で表される^{14,15)}。

$$V = 1/4 (1 - \cos(2\pi A\tau))$$

つまり大きな超微細相互作用ほど、より大きな ENDOR 効果を得ることができる。また、信号強度が $1/\tau$ で変調を受けることを意味している。最大強度は n を整数として

$$A = \pm [1/2 + n]/\tau$$

の条件で得られる。その一方、

$$A = \pm n/\tau$$

では信号が観測できない。これを blind spot と呼ぶ。blind spot は ENDOR の効果ではなく 3 パルスエコーに付随する性質である。図12に Mims ENDOR の信号パターンの τ 依存性を示す。blind spot の存在は、信号の解釈を大変困難にする。これを解消するには異なる τ で測定を行って、2 次元スペクトルをとり、blind spot の τ 依存性をみるとよい。あるいは異なる τ のスペクトルを加算することにより blind spot の影響を除くことができる。

図13は、Mims ENDOR を用いて RF パルス長を変化させたときのスピンエコーの強度変化である。ラジオ波の周波数はゼーマン周波数付近 ($\omega = 14.5$ MHz) で固定している。図中スピンエコーの強度変化は、核スピンのラーモア歳差を示している。この図の例では $t = 8 \mu\text{s}$ で 180° の反転がおこっている。RF パルスの回転角は $\theta = \omega H_1 t$ であるためラジオ波の周波数によって回転角は変化する。そのため、周波数掃引時に一様な条件を得るためには低周波数ほど RF 磁場強度が強く、周波数があがるにつれリニアに磁場強度が弱くなるような周波数特性をもたせる必要がある。100 MHz を超える高周波での ENDOR の場合、RF パルス印加のためには強い RF 磁場は必要としない。コイルの巻き数を減らしコイルの周波数特性を下げる方が有効である。

3.3 Davies ENDOR

Davies ENDOR は Mims ENDOR 同様、3 パルスのマ

図12 Mims ENDOR における blind spot の τ 依存性。スペクトルの中心付近に現れている振動パターンが blind spot である。文献14より引用。

図13 Mims ENDOR 法での、スピンエコー強度のラジオ波パルス長依存性。振動は核のラーモア歳差を示している。

イクロ波パルスと RF パルスからなる。 180° マイクロ波パルスを印加した後 RF パルスを印加し、 90° – 180° パルスでスピンエコーを検出する (図10B)。Mims ENDOR では短いパルス幅の非選択的パルスを用いるのに対して、Davies ENDOR では広い幅の選択的パルスを用いている。つまりはじめのパルスが “hole burning” をおこし (図14-①)、引き続き RF 照射によって共鳴条件でのホールの移

図14 Davies ENDOR の原理. 本文参照.

動をおこす (図14-②). 90° – 180° パルスでのスピネコーによってとらえたホールの変化分が ENDOR の効果となる (図14-③). 定性的には, preparation パルスによりつくられた hole に相当する周波数範囲においては信号強度が弱くなることになる. Mims ENDOR の場合と同様, 大きな hyperfine coupling ほど ENDOR 効果は大きくなる.

Mims ENDOR と Davies ENDOR を比較した場合, 信号の感度では Mims ENDOR の方が高いが, blind spot のない Davies ENDOR の方がはるかに解釈が容易である. ただし hyperfine が小さい窒素核, 重水素核などでは τ を小さくとれば, blind spot の問題に悩まされることはないため効果的である.

3.4 パルス ENDOR の応用例

ここでは, 筆者がこれまで行ってきた光化学系IIのチロシンラジカルの研究を中心にパルス ENDOR の適用例を挙げる. 光化学系IIは光合成に関わるタンパク質のうちで水を分解し酸素を発生する機能をもったタンパク質で, 他の光合成反応中心タンパク質同様 C_2 対称な構造をもっている. 最新の報告では X 線による結晶構造解析において, 公称 $3.0 \text{ \AA}$ の分解能での構造情報が得られている¹⁸⁾. 反応中心クロロフィル P680 と酸素発生系マンガングラスターとの間に位置するのがチロシン分子であり, 電子移動の中間体として働くチロシン Z と, 安定ラジカルとして存在し役割の不明なチロシン D の2つが存在する. チロシン D はタンパク質中で発見された最初のアミノ酸ラジカルである. 1989年に ESEEM の結果から中性ラジカルと同定されている¹⁹⁾. 図15にチロシン D の ESR スペクトルを示す. チロシン分子の ESR 信号は2つの等価な $3,5$ - α プロトン (7 ガウス) と1つの β プロトン (10 ガウス) からなる, ほぼ $1:3:3:1$ の信号強度で説明されている. 図16にチロシン D とチロシン Z の Davies ENDOR スペクトルを示す. 図中 a ピークは $3,5$ - α プロトン由来で, これよりスピン密度が 0.26 と見積もることができる.

図15 (A)チロシンの分子構造と, (B)光化学系II中のチロシンラジカル ESR スペクトル. 点線は積分形を示す. 棒スペクトルは, ESR の強度パターンを示す. 2つの等価な α プロトンと1つの β プロトンによるほぼ $1:3:3:1$ の強度パターンで説明される.

図16 光化学系II中の2つのラジカル. (A)チロシン D, (B, C)チロシン Z の Davies ENDOR スペクトル. 本文参照.

またラベル b, c は β メチレンプロトン由来である. チロシン D とチロシン Z (High pH) との間には違いが見られるがこれは β プロトンの上反角の違いによるものとわかった. チロシン D で p_z 軌道方向に対して 47° , チロシン Z で 43° と見積もることができる. また, チロシン Z は低い pH ではスピン分布が変わり, $3,5$ - α プロトン上のスピン密度は 0.26 から 0.22 まで低下することがわかった (図16C)²⁰⁾.

前項での説明に従えば, パルス ENDOR では超微細相互作用が大きいほど信号強度が大きく, 逆に小さな超微細相互作用では信号強度は小さいはずである. しかしながら図16において明らかのように, 実際の測定ではマトリクス領域付近でのパルス ENDOR 信号はくっきりと観測されている. これはマトリクスプロトンが数多く存在する場合, 核スピンの電子スピン位置につくる局所磁場のアンサンブル平均によっておこる効果として説明される²¹⁾.

図17に溶液を重水に置換した場合のチロシン D, Z の ^2H の Mims ENDOR での測定結果を示す. 超微細相互作

図17 光化学系II中の2つのラジカル。(A)チロシンZ, (B)チロシンDのMims ENDOR スペクトル。重水置換溶液中で測定された。点線は、チロシンD スペクトルのsimulationを示す(双極子相互作用570 MHz, 四極子相互作用200 MHz, $I=1/2$, $S=1/2$)。

用が小さいため τ を小さくすることにより blind spot の影響を避けることができる。ここで観測しているのは重水素に交換されたプロトンであり、チロシン分子の水素結合が存在していることを意味している。図17BはチロシンDでのENDORスペクトルである。重水素核は $I=1$ であるため、この信号は磁気的雙極子相互作用と、電気四極子相互作用によって説明できる。これに対してチロシンZでは幅の広いスペクトルだけが観測されている。これはチロシンZが安定な水素結合をもたないからだと考えられる^{20,22)}。

このようにENDOR法では分子および、その周辺環境を詳細に調べることができる。そこから得られる情報は分子の機能と密接に関連をもっており、強力な解析手段となっている。

3.5 パルス ENDOR-induced ESR の実際

ENDOR-induced ESR (EIE) は、ENDOR の共鳴周波数にラジオ波を固定しながら磁場掃引して ESR スペクトルを得る手法である。これにより、ENDOR 信号がどのような ESR 信号に帰属しているのかを知ることができる。図18Aに、光化学系II中に観測される split signal と呼ばれる信号の、パルス ESR の磁場掃引スペクトルを示す²³⁾。この信号は酸素発生機能に関係すると考えられているが、生化学処理法を変えることにより図18Aの trace a のような線形を示す場合と trace b のような線形を示す

図18 光化学系II中に見られる2種類の電子供与体由来の (A)パルス ESR および (B) Davies ENDOR 信号。 (C)スペクトル a について行ったパルス ENDOR-induced ESR スペクトル。

場合があり、磁性種の由来が不明であった。図18Bに、両者の ENDOR スペクトルを示す。trace a', trace b' はそれぞれ図18Aの trace a, b に対応した ENDOR スペクトルである。両者が非常によく似た線形を持っていることがわかる。図18Cに、trace a'の矢印位置での ENDOR ピークを用いたパルス ENDOR-induced ESR を示す。得られたスペクトルは trace b の信号線形を反映するものであり、これにより trace a が2種類の信号が重畳したものであり、ENDOR 信号の起源も trace b 由来のものであることがわかった。このように、ENDOR-induced ESR を用いると重なった ESR 信号を分離することが可能である。

4. ELDOR-detected NMR 法

Davies ENDOR の自然な拡張として、ELDOR を用いた ENDOR 共鳴線の観測が考えられる^{15,24,25)}。かつて CW ESR においても ELDOR 法はよく研究がなされていた。しかしスペクトルの線幅はあくまでも ESR 線幅であり、ENDOR のように分解能が向上するという事はなかった。また ESR 測定では一般的に高い Q 値を要求するために、周波数の自由度は小さい。このため ELDOR を行うためには、ELDOR 専用の共振器で2種類のマイクロ波周波数の差は固定で行われていた。したがって、ELDOR の用途は緩和時間測定など限定的なものであった。一方パルス ESR では、ringing を抑制する必要性から試料共振器の Q 値はそもそも低く、異なったマイクロ波を導入することが比較的容易になっている。更にパルス長を変えた選択的励起により、観測するスペクトル範囲を制御することができる。つまりパルス ESR 法の発展に伴って、ELDOR の応用範囲は飛躍的に広がったといえる。

図19に、著者の使った ELDOR-detected NMR の系列を示す。はじめに、外部からのマイクロ波パルスを加す

図19 Davies ENDOR と ELDOR-detected NMR のパルス系列の比較。

図20 光化学系Ⅱ中のクロシン D の Davies ENDOR と ELDOR-detected NMR の比較. 点線は simulation スペクトル。

る。ここでは、パルス幅を長くとりスペクトル内に鋭いホールをつくる。次に、 90° – 180° の Hahn の系列によってエコーを観測する。外部マイクロ波の周波数を掃引することにより、2種のマイクロ波周波数差の関数としてエコー強度の測定を行えばよい。図20に、クロシン D において測定した ELDOR スペクトルを示す。信号分解能に関しては、ENDOR スペクトルよりも線幅がおよそ1.3倍広く分解能は低いものの、ほぼ同等のスペクトルが得られることがわかる。また図21に、PS II タンパク質に外部から結合させた Mn^{2+} の ELDOR スペクトルを示す。ELDOR は、挿入図中の Mn^{2+} ESR スペクトルの矢印の位置で測定した。スペクトルから明らかなように、この手法では非常に広い周波数範囲での測定が可能であることがわかった。ENDOR の測定には RF 発信機、高出力アンプ、専用共振器などを用意する必要があるが、ELDOR の測定には外部マイクロ波発振器があればよいだけなので、ENDOR よりも簡便に測定ができるといえる。

図21 光化学系Ⅱに結合した Mn^{2+} の ELDOR-detected NMR. Inset はパルス ESR による磁場掃引スペクトル。

5. おわりに

ENDOR 法は優れた測定手法であり、これまで多くの研究がなされてきた。最近のパルス ESR の発展は目覚ましく、それに付随して、パルス ENDOR 法についてもさまざまな測定手法が日進月歩で開発されている。

本稿の中で事例として示したように、筆者はこれまで光合成タンパク質を中心に ESR の研究をすすめてきた。Feher の例に見られるように、光合成系は ESR の分野で非常に強力な研究手段となっており、ESR 法のモデル系としての役割も果たしてきた。これはタンパク質と ESR 法の相性のよさにはかならない。タンパク質をラジカルや錯体などを溶かした仮想的な“溶媒”とみなした場合、電子スピン、核スピンの緩和時間は ESR 測定には非常に適した時間スケールとなっている。タンパク質科学の構造や機能、反応など様々な面において、今後 ESR 法の果たす役割は大きいものと考えている。

謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は、河盛阿佐子博士（関学大）、小野高明博士（理研）、伊藤繁博士（名大）との共同研究である。この場をお借りして共同研究者の方々に、感謝申し上げます。

参考文献

- 1) G. Feher: Phys. Rev. **105**, 1122 (1957).
- 2) 伊達宗行：電子スピン共鳴（培風館、東京、1978）p. 119.
- 3) H. Kurreck, B. Kiste, and W. Lubitz: *Electron Nuclear Double Resonance Spectroscopy of Radicals in Solution* (VCH, New York, 1988) p. 7.
- 4) C. P. スリクター：磁気共鳴の原理（シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、1998）p. 223.
- 5) 桑田敬治、伊藤公一：電子スピン共鳴入門（南江堂、京都、

- 1980) p. 201.
- 6) W. Bruggenmann and J. R. Niklas: J. Mag. Res. A **108**, 25 (1994).
- 7) C. W. Hoganson and G. T. Babcock: J. Mag. Res. A **112**, 220 (1995).
- 8) K. Möbius and R. Biehl: *Multiple Electron Resonance Spectroscopy*, eds. M. M. Dorio and J. H. Freed (Plenum, New York, 1979) p. 475.
- 9) D. S. Leniart: *Multiple Electron Resonance Spectroscopy*, eds. M. M. Dorio and J. H. Freed (Plenum, New York, 1979) p. 5.
- 10) G. Feher, A. J. Hoff, R. A. Isaacson, and L. C. Ackerson: Ann. New York Acad. Sci. **244**, 239 (1975).
- 11) J. Deisenhofer, O. Epp, L. Miki, R. Huber, and H. Michel: Nature **318**, 618 (1986).
- 12) A. N. Webber and W. Lubitz: Biochim. Biophys. Acta **1507**, 61 (2001).
- 13) H. Mino, A. Kawamori, D. Aoyama, T. Tomo, M. Iwaki, and S. Itoh: Chem Phys. Lett. **411**, 262 (2005).
- 14) A. Grupp and M. Mehring: *Modern Pulsed and Continuous-Wave Electron Spin Resonance* (John Wiley & Sons, New York, 1990) p. 195.
- 15) A. Schweiger and G. Jeschke: *Principle of Pulse Electron Paramagnetic Resonance* (Oxford, New York, 2001) p. 359.
- 16) W. B. Mims: Proc. R. Soc. London **283**, 452 (1965).
- 17) E. R. Davies: Phys. Lett. A **47A**, 1 (1974).
- 18) B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, and J. Biesiadka: Nature **438**, 1040 (2005).
- 19) R. G. Evelo, A. J. Hoff, S. A. Dikanov, and A. M. Tyryshkin: Chem. Phys. Lett. **161**, 479 (1989).
- 20) H. Mino, A. V. Astashkin, and A. Kawamori: Spectrochim. Acta. A **53**, 1465 (1997).
- 21) A. V. Astashkin and A. Kawamori: J. Mag. Reson. **135**, 406 (1998).
- 22) D. A. Force, D. W. Randall, R. D. Britt, X. Tang, and B. A. Diner: J. Am. Chem. Soc. **117**, 12643 (1995).
- 23) A. V. Astashkin, H. Mino, A. Kawamori, and T. Ono: Chem. Phys. Lett. **272**, 506 (1997).
- 24) P. Schosseler, T. Wacker, and A. Schweiger: Chem. Phys. Lett. **224**, 319 (1994).
- 25) H. Mino and T. Ono: App. Magn. Reson. **23**, 571 (2003).

PROFILE

三野広幸 名古屋大学 理学研究科 助手

〔略歴〕 1990年関西学院大学理学部卒業, 1995年同大学大学院理学研究科博士課程修了, 1996年理化学研究所協力研究員, 基礎科学研究員, 1999年理化学研究所フロンティア研究員, 2001年より現職。〔専門〕 磁気共鳴, 生物物理