

Measurement of electric field gradient at the metal sites in proteins

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Yokoyama, Akihiko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00052613

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



金属タンパク質中の活性位における超微細電場測定

課題番号 16550052

平成16年度－平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年3月



研究代表者 横山明彦

(金沢大学自然科学研究科助教授)



研 究 成 果 報 告 書

金属タンパク質中の活性位における超微細電場測定

(研究課題番号 16550052)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 1 8 年 3 月

研究代表者 横 山 明 彦
金沢大学自然科学研究科助教授

はしがき

ガンマ線摂動角相関 (PAC) 法は、核磁気共鳴、核四重極共鳴、メスバウアー分光法と並んで、原子核の周りの局所的な電場・磁場を測定するために有用な手法である。その特徴は特にメスバウアー法と比較して、不安定原子核がプローブとなり個々の核からの放射される γ 線を観測するのでプローブ核の個数が少なくても良いこと、観測の時間スケールが極めて短いこと、外部磁場がなくても観測できること、固体に限らず液体や気体の測定が可能であるといった特徴を持つ。この特性を生かして錯体分子中の金属イオンに対する超微細場の測定は手法としてはこれまでも行われてきたが、特に最近では複雑な生体中の金属錯体に研究が広がってきている。

本研究では生体中の化合物について金属元素の役割を明らかにすることを目的にした研究を目指した。生体分子中の金属イオンは活性中心として重要な役割を果たし、化学的環境 (pH、酸化還元電位など) と関連したその状態の情報は非常に重要である。PAC 法では試料を溶液のまま測定 (*in situ* 測定) できるので、機能を損なうことなく、また機能が発現できる環境において測定可能である。しかし、測定手法は普及していないので、この手法を用いた実験例は世界的にもまだ少なく、測定手法を確立するための基礎的な研究の余地も多く残されている。

特に本研究では、Cd(2+)、In(3+) が置換可能な錯体について、 ^{111m}Cd や ^{117}Cd また、 ^{111}In などの PAC 測定が可能な核プローブを用いて、超微細場の測定を行い、錯体の物性との関連を探究することを目的とした。期待される成果として、生体分子における金属イオンでの超微細場の測定の確立は、PAC 法の生体物質研究への応用の幅を広げることが期待される。現在では金属イオンの生体物質中での位置などの情報が主に研究されているが、生体中の反応において金属イオンが重要な働きをしている例は多く、その超微細場の情報は反応機構の解明にも重要な役割を果たすことが期待できる。またそのような知見をもとにした新たな機能性分子の開発においても機能に密接に関係する微細場の情報は重要な指針となることが期待される。

本補助金交付期間内においては、比較的取扱いやすい金属タンパク質であるマビシアニンの野生型と変異型 (Thr15Ala-Mav) を測定試料に選び、このマビシアニン中の銅の位置に PAC プローブ親核である ^{117}Cd (半減期 2.5 h) を入れ、水溶液中の pH に対するマビシアニンの銅活性部位における超微細場測定を行った。その結果 pH6.0–8.0 の範囲では、野生型マビシアニンについて活性部位の電場勾配 V_z は $1.48\sim 2.08\times 10^{22} \text{ V}\cdot\text{m}^{-2}$ であるのに対し、変異型では $0.43 \sim 1.49\times 10^{22} \text{ V}\cdot\text{m}^{-2}$ という値になった。変異型の値はいずれも対応する pH の野生型に比較して低い値になった。また、pH 6 と 7.5 の間での電場勾配の急激な変化は同様に見られた。電場勾配の比較より、野生型と変異型の間で何らかの構造の変化があったと考えられる。

変異型は野生型の 15 位トレオニンアラニンを置換したもので酸化還元電位の変動が確認されている。さらに詳しくその変化について議論を進めるために、活性部位周りの元素と似ている様々な配位子から作ったオキシシなど 5 種類の錯体に関する電場勾配を求める同様の実験を行った。また、PAC プローブ核の依存性をみるために ^{117}Cd 以外にプローブ親核として $^{111\text{m}}\text{Cd}$, ^{111}In の測定を行った。これらのデータから、同じ化合物でもプローブ核を変えた場合では電場勾配が違っていることがわかった。これはプローブ核の元素自体が壊変過程における後遺効果の違いであると考えられる。また、測定した錯体の電場勾配値はマビシアニンの電場勾配値に比べるとほとんどは低いものであったが、キノリン-8-カルボン酸錯体はマビシアニンに近い値を与えることがわかった。これらのデータはタンパク質中の金属に対する配位の特異性を示唆している一方で、キノリン-8-カルボン酸錯体の配位構造との類似が示唆される。タンパク質の配位構造を考えるためにもこれらの配位子についてさらに詳しい検討をする必要があると考えられる。

研究組織

研究代表者 : 横山明彦 (金沢大学自然科学研究科 助教授)
研究分担者 : 中西孝 (金沢大学自然科学研究科 教授)
研究分担者 : 片岡邦重 (金沢大学自然科学研究科 助教授)
研究分担者 : 大久保嘉高 (京都大学原子炉実験所 教授)

研究経費

交付決定額 (配分額)

(金額単位 : 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2600	0	2600
平成17年度	600	0	600
総計	3200	0	3200

研究発表

(1) 学会誌等

- ・ 大久保嘉高, 横山明彦, 佐藤渉, 「物性・構造研究のためのガンマ線摂動角相関法」,
日本放射化学会編放射化学ニュース, 第 12 号, pp. 1-9, 2005 年 8 月 31 日

(2) 口頭発表

- ・ 橋本 知典, 横山 明彦, 片岡 邦重, 高田 真由子, 大久保 嘉高
「PAC 法によるマピシアニンの銅活性部位における超微細場測定」
2003 日本放射化学会年会・第 47 回放射化学討論会, 1 P18, 2003 年 10 月 1 日－3 日, 泉佐野
- ・ 横山明彦, 橋本知典, 大久保嘉高, 片岡邦重, 高田真由子
「PAC 法による生体分子中の超微細場測定」
「放射線と原子核をプローブとした物性研究の新展開」京都大学原子炉実験所専門研究会, 2003 年 11 月 25 日－27 日, 熊取
- ・ 橋本知典, 横山明彦, 片岡邦重, 高田真由子, 菊永英寿, 木下哲一, 村上幸弘, 高宮幸一, 大久保嘉高
「PAC 法による生体分子中の超微細場測定の試み」
2004 日本放射化学会年会・第 48 回放射化学討論会, 3 B01, 2004 年 10 月 27 日－29 日, 東京
- ・ 橋本知典, 横山明彦, 片岡邦重, 高田真由子, 菊永英寿, 木下哲一, 村上幸弘, 高宮幸一, 大久保嘉高
「生体分子の PAC 測定」
「放射線と原子核をプローブとした物性研究の新展開」京都大学原子炉実験所専門研究会, 2004 年 11 月 16 日－17 日, 熊取
- ・ 伊原 清, 橋本知典, 菊永英寿, 横山明彦, 佐藤 渉, 村上幸弘, 高宮幸一, 大久保嘉高, 斎藤 直

「PAC 法によるキレート錯体の超微細場測定」

2005 日本放射化学会年会・第 49 回放射化学討論会， 3 P27， 2005 年 9 月 28 日－30 日， 金沢

- ・ 横山明彦， 橋本知典， 片岡邦重， 菊永英寿， 木下哲一， 村上幸弘， 高宮幸一， 大久保嘉高， 佐藤 渉， 斎藤 直

「PAC 法によるキレート錯体と金属タンパク質の超微細場測定」

「原子核プローブ生成とそれを用いた物性研究」京都大学原子炉実験所専門研究会， 2005 年 11 月 15 日－16 日， 熊取

(3) 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

目次

第 1 章	序論	7
1-1	本研究の背景.....	7
1-2	本研究の目的.....	8
1-3	γ 線摂動角相関の原理.....	9
1-4	マビシアニンの構造と性質.....	17
第 2 章	実験	21
2-1	マビシアニンの電場勾配測定.....	21
2-1-1	試薬と主な器具.....	21
2-1-2	マビシアニンの生合成と精製.....	22
2-1-3	プローブ核の製造.....	25
2-1-4	PAC 測定.....	29
2-1-5	解析.....	33
2-2	錯体の電場勾配測定.....	35
2-2-1	試薬とプローブ核.....	35
2-2-3	測定試料の調製.....	40
2-3	電場勾配の理論計算.....	46
第 3 章	結果および考察	47
3-1	マビシアニンと金属錯体の電場勾配値の比較.....	47
3-2	電場勾配の理論計算値との比較.....	63
第 4 章	結論と今後の展望	64
第 5 章	参考文献	66
	参考資料	67

第1章 序論

1-1 本研究の背景

励起準位の原子核の中には、 γ 線を放出した後、準安定な中間準位に数 10～数 100 ns 留まった後、もう 1 本 γ 線を放出してさらにエネルギーの低い準位に移るカスケード γ 壊変をするものがある。2 つの γ 線の間には角度に関する相関関係があり、これを角相関 (Angular Correlation, AC) という。中間準位状態にある原子核に核外場が作用すると、その外場に応じて原子核が歳差運動をして角相関は変化する。これを γ - γ 摂動角相関 (Perturbed Angular Correlation, PAC) と呼ぶ。物質中の原子核に加えられる外場とは、周りの電子状態や隣接する原子核による電場、磁場 (超微細場) であり、PAC 法はメスバウアー分光法などと同様に原子核をプローブとした手法であり、その核の属する原子付近の電子状態や物質の構造を探ることができる。

PAC 法は NMR やメスバウアー分光法と同様にプローブ核周りの超微細場を測定できるが、メスバウアー分光法では試料を線源にすることは一般的ではないが、一方 PAC では必ず試料が線源となる。そのため、PAC 法では放射性核種を試料に導入する必要がある。しかし、一般的にメスバウアー分光法では試料は固体状態に限られているが、PAC 法では測定試料の状態に制限はなく液体状態でも測定ができる。

近年、タンパク質においてその構造と機能に注目されている。タンパク質の構造を解析するために使われる手法である X 線構造解析は結晶化したタンパク質の構造を測定している。しかし、機能を発現しているのが水溶液中の場合ではであり、タンパク質の溶液中での状態に関する情報が少ない。そこで本研究は、溶液中の状態についての情報を得るために生体分子の活性中心での超微細場測定を PAC 法で試みた。溶液中の活性中心について超微細場測定ができれば、生体での金属錯体分子の機能についてより深い知見が得られると期待される。

1-2 本研究の目的

本研究ではタンパク質の溶液中の状態についての情報を得るためにタンパク質の活性中心での超微細場測定を PAC 法で試み、実験手法を確立することを目指す。本研究では測定試料として、大腸菌を用いて高発現に成功し、X 線構造解析による立体構造も明らかとなっているということ、分子量が大きすぎず、タンパク質としては小さいので、扱いやすいということからマビシアニンを選んだ。マビシアニンは活性中心に銅サイトをもつブルー銅(II)タンパク質の一つである。この研究では大腸菌による生合成したマビシアニンの銅を PAC プロブ核である Cd-117 に置換し、マビシアニンの銅活性部位における超微細場測定を PAC 法で試みた。PAC プロブ核は、半減期が 2.5 時間で、溶液中で+2 価の原子価をもつ Cd-117 を選んだ。

マビシアニンの銅原子の酸化還元電位は、銅原子が酸化状態にある場合、pH に依存する。これには、マビシアニンのアミノ酸配列 15 位、トレオニンが深く関わっていることが現在指摘されている。この pH 依存性の原因を解明するために、15 位のトレオニンを他の様々なアミノ酸に置換した変異型マビシアニンが作成され、その性質について調べられている。そうして作られた変異型マビシアニンのひとつである Thr15Ala 変異型マビシアニン (15 位のトレオニンをアラニンに置き換えたもの) を用いて野生型と同様の実験を行い、野生型のマビシアニンのデータと比較して活性中心の構造や電子状態などがどのように異なるかを調べた。この変異型マビシアニンは、UV-vis スペクトルの特性吸収波長は通常のマビシアニンとほぼ同じだが、銅原子の酸化還元電位は通常のマビシアニンが 213 mV であるのに対して 283 mV と異なっており、この事実について PAC 法による検討を行った。

また、タンパク質の水溶液中の超微細場測定から得られた情報をより詳しく議論するために、配位元素が類似した錯体での超微細場測定と、錯体分子の超微細場の理論計算を行った。

1-3 γ 線振動角相関の原理

(1) γ 線角相関

励起状態の核種が壊変するとき、 γ_1 を放出後、中間準位に留まった後、 γ_2 を放出していくカスケード γ 壊変がよくみられる。(Fig. 1-1 参照) この2本の γ 線には空間的に特別な方向がない場合はどの角度にも等方的に放出されるが、 γ_1 をある方向で観測した場合、その後放出される γ_2 の放出確率は等方的ではなく γ_1 の放出方向との角度 θ の関数となる。(γ 線角相関) この現象を理解するためにまず角相関について考える。

角相関が生じる理由を考えるために、簡単なカスケード γ 壊変を考える。スピンの I_i の励起準位にある原子核のもつ角運動量を L_1 、その z 成分 M_1 の γ_1 を放出してスピン I の中間準位にしばらく留まり、さらに角運動量 L_2 、その z 成分 M_2 の γ_2 を放出してスピン I_f の準位に壊変するとする。 γ 壊変の前後で原子核と γ 線の角運動量とスピンの和は保存されるので、

$$\begin{aligned} \mathcal{P}_i &= \mathcal{P} + \mathcal{L}_1 \\ m_i &= m + M_1 \end{aligned} \quad (1-1)$$

および

$$\begin{aligned} \mathcal{P} &= \mathcal{P}_f + \mathcal{L}_2 \\ m &= m_i + M_2 \end{aligned} \quad (1-2)$$

が成立する。一方、 γ 線が放出されるとき空間分布は電磁場を球関数 $Y_L^M(\theta)$ による多重極展開をすることで求められる。つまり、 L と M がわかっているならば空間に伝播する放射分布を求めることができる。この分布は伝搬方向と z 軸のなす角 θ とすると、 $\cos \theta$ の偶数次の関数 $F_L^M(\theta)$ で表すことができる。具体的な例として $L=1$ 、 $L=2$ の時の関数を示す。

$$F_1^0(\theta) = \frac{3}{8\pi}(1 - \cos^2 \theta) \quad (1-3)$$

$$F_1^{\pm 1}(\theta) = \frac{3}{16\pi}(1 + \cos^2 \theta) \quad (1-4)$$

$$F_2^0(\theta) = \frac{15}{8\pi}(\cos^2 \theta - \cos^4 \theta) \quad (1-5)$$

$$F_2^{\pm 1}(\theta) = \frac{5}{16\pi}(1 - 3\cos^2\theta + 4\cos^4\theta) \quad (1-6)$$

$$F_2^{\pm 2}(\theta) = \frac{5}{16\pi}(1 - \cos^4\theta) \quad (1-7)$$

これを示したものが Fig. 1-2 で、このことから特徴的なことは γ 線が z 軸方向へ進行するのは $M = \pm 1$ の場合のみということである。

この 2 つのことから簡単なカスケード壊変の例としてそれぞれの準位のスピンの $I_i = 0, I = 1, I_f = 0$ の場合について考える。(1-1), (1-2) 式より $L_1 = L_2 = 1$ である。また Fig. 1-2 より分かる様に γ_1 を z 軸で観測できるのは $M_1 = \pm 1$ の場合のみである。この場合、 $m_i = 0, m_f = 0$ なので、式 (1-1), (1-2) より、 $m = \mu 1, M_2 = \mu 1$ となる。したがって、 γ_2 は全体としては等方的に放出されるが、 γ_1 を z 軸方向で観測した場合に限り γ_2 の放出確率は $F_1^{\pm 1}(\theta)$ となる。つまり、 γ_1 を観測することは中間準位の $m = \pm 1$ を選別することになる。

一般に γ 線の角相関 $W(\theta)$ は角相関係数 A_{kk} , Legendre の多項式 P_k を使って、

$$W(\theta) = \sum_{k_{\text{even}}}^{k_{\text{max}}} A_{kk} P_k(\cos\theta) \quad (1-8)$$

と表される。この時の γ_1 を観測してから角度 θ で γ_2 を計数ときの時間 t の関数として得られる時間スペクトルは、

$$N(\theta, t) = e^{-t/\tau_N} W(\theta) \quad (1-9)$$

となる。ここでの τ_N は中間準位の寿命である。

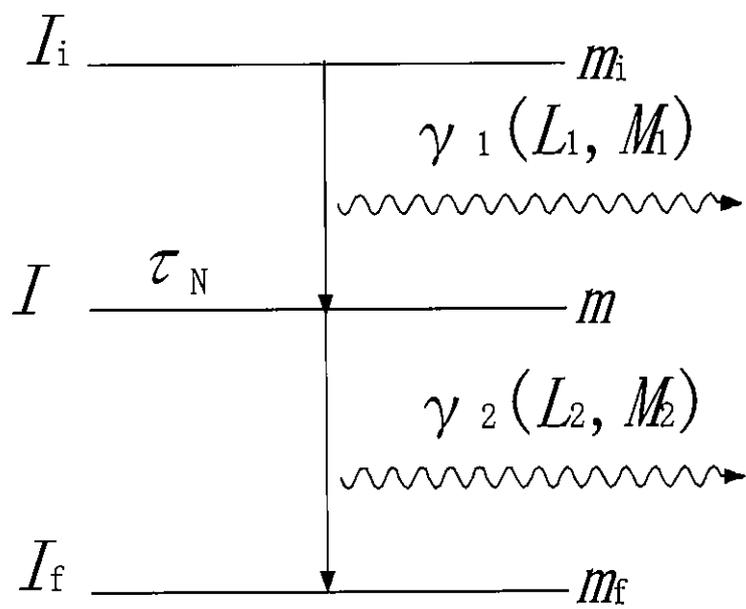


Fig. 1-1 Cascade decay of γ -rays

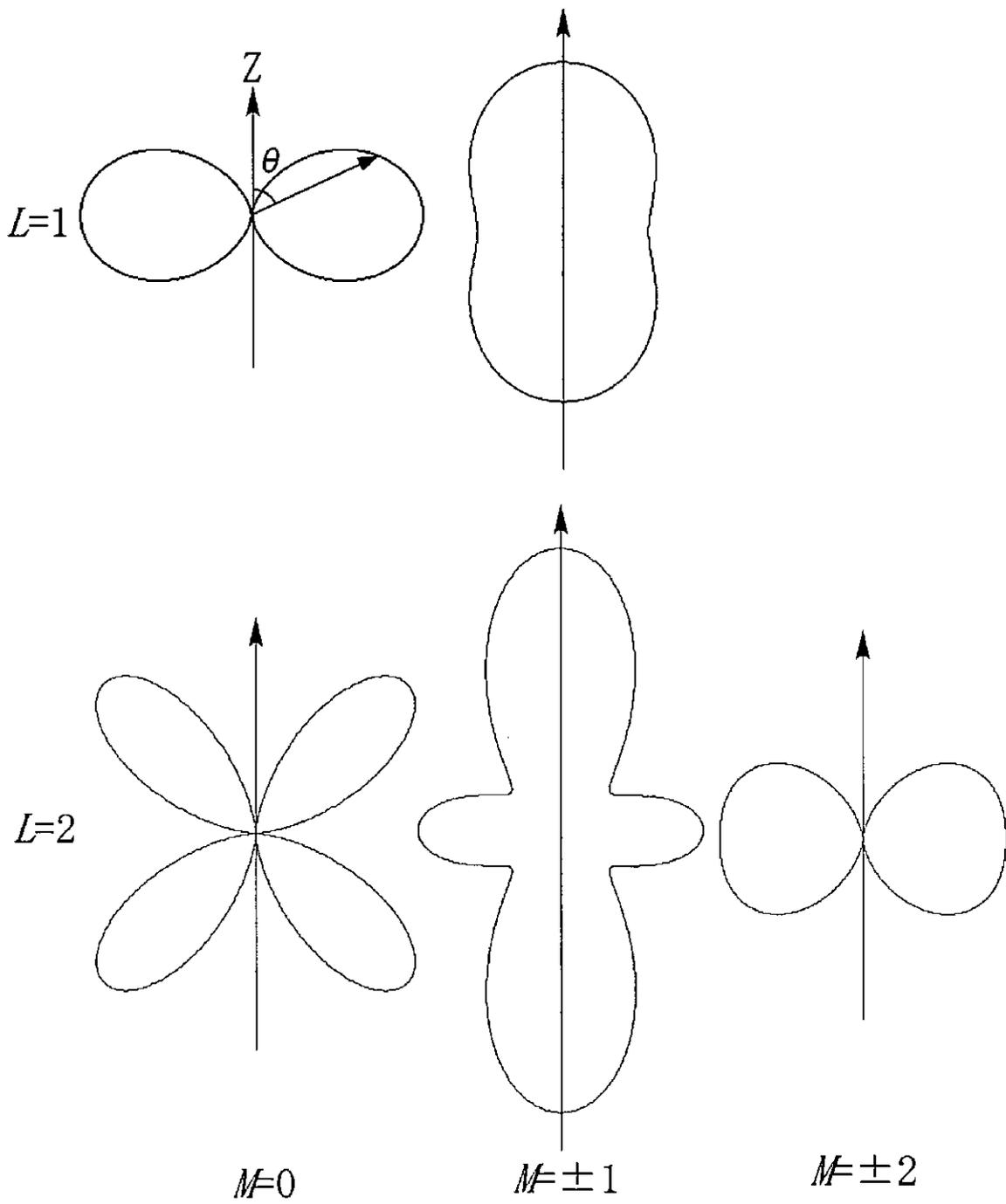


Fig. 1-2 Angular correlation of γ -rays

(2) γ 線摂動角相関

つぎに、外場がある場合を考える。原子核は外場のなかに存在すると歳差運動を起こす。中間準位の原子核も γ_2 の放出時まで、つまり中間準位に留まっている間に歳差運動をおこし、 γ_2 の放出確率が時間変化する。したがって、この変化した放出確率を原子核が中間準位に留まる時間の関数として表すことができる。この外場によって生まれた変化を摂動と見なし、変化した角相関を摂動角相関と呼ぶ。

簡単な例として、試料および検出器を含む面に垂直な磁場がある場合を考える。中間準位の核は磁場の周りに Larmor 周波数 ω_L で歳差運動をする。(Fig. 1-3) これは、角相関 $W(\theta)$ が ω_L で回転したものとなる。したがって、時間スペクトルは、

$$N(\theta, t) = e^{-t/\tau_N} W(\theta - \omega_L t) \quad (1-10)$$

で表される。

実際には、摂動角相関の測定の場合、外部磁場を印加しないで行われるため、核に及ぼす摂動の主軸の向きもランダムであり、試料全体としては等方的であり、この場合、摂動角相関 $W(\theta, t)$ は時間微分摂動係数 $G_{kk}(t)$ を用いて、

$$W(\theta, t) = \sum_{k_{\text{even}}}^{k_{\text{max}}} A_{kk} G_{kk} P_k(\cos \theta) \quad (1-11)$$

で表される。摂動に関する全ての情報は $G_{kk}(t)$ に含まれる。摂動として考えられるのは主に磁場と電場勾配があり、以下にそれぞれの場合の摂動を考える。

摂動が磁場の場合の G_{kk} は $k=4$ 以上の項は非常に小さいので $k=2$ まで考えればよい。磁場に関しては、中間準位の核スピンの $1/2$ 以上のときに周りの磁場と相互作用する。そのときの式は

$$\begin{aligned} G_{22}(t) &= \sum_m \begin{pmatrix} I & I & 2 \\ m & -m & 0 \end{pmatrix}^2 + 2 \sum_m \begin{pmatrix} I & I & 2 \\ m-1 & -m & 1 \end{pmatrix}^2 \cos(\omega_L t) + 2 \sum_m \begin{pmatrix} I & I & 2 \\ m-2 & -m & 2 \end{pmatrix}^2 \cos(2\omega_L t) \\ &= \frac{1}{5} [1 + 2 \cos(\omega_L t) + 2 \cos(2\omega_L t)] \end{aligned} \quad (1-12)$$

として、表される。

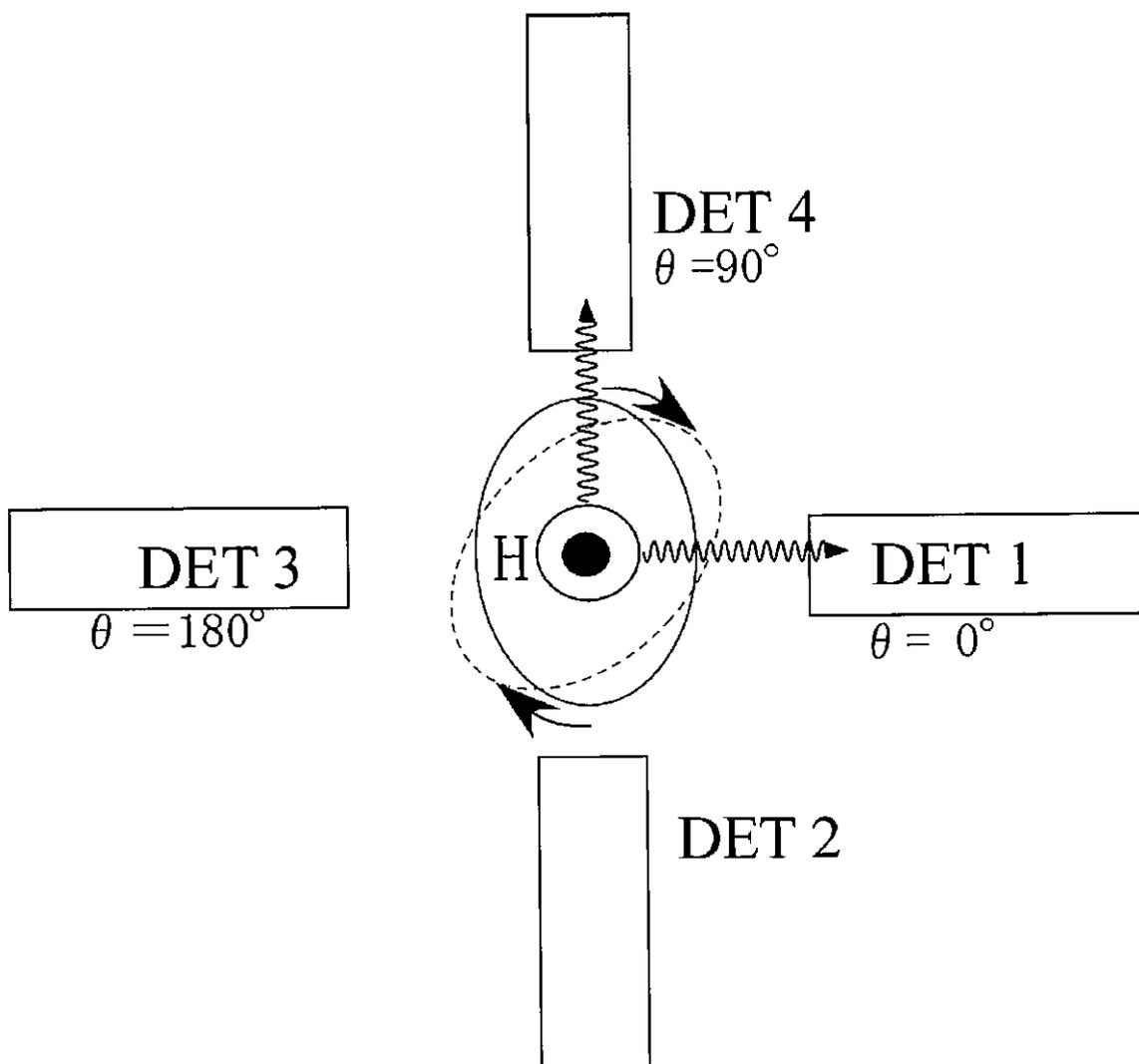


Fig. 1-3 Nuclear precession movement

次に、電場勾配の場合を考える。中間準位の核スピンの 1 以上になると原子核が電気四重極モーメントをもつ。この電気四重極モーメントと電場勾配が相互作用し、角相関に摂動を生じさせる。習慣として電場勾配は $|V_{xx}| \leq |V_{yy}| \leq |V_{zz}|$ が満たされるように x, y, z 軸を選ぶ。電場勾配は電気四重極モーメント ω_Q と非対称パラメータ η の 2 つの量で示される。それらは、

$$\omega_Q = -\frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)\eta} \quad (1-13)$$

$$\eta = \frac{V_{zz} - V_{yy}}{V_{zz}} \quad (1-14)$$

と定義される。

そして、 $G_{22}(t)$ は

$$G_{22}(t) = \sum_m \begin{pmatrix} I & I & 2 \\ m & -m & 0 \end{pmatrix}^2 + \sum_{m' \neq m} \begin{pmatrix} I & I & 2 \\ m' & -m & p \end{pmatrix} \times \cos[3(m^2 - m'^2)\omega_Q t]$$

$$= \frac{1}{5} + \sum_{n \geq 1} S_n \cos(n\omega_0 t) \quad (1-15)$$

$$\omega_0 = 3\omega_Q \quad (I \text{ が整数の場合})$$

$$\omega_0 = 6\omega_Q \quad (I \text{ が半整数の場合})$$

である。なお、摂動角相関に関する詳しい文献は[1], [2], [3]などがある。

(3) PAC プローブ核種について

PAC 測定ではメスバウアー分光法と同様、使える核種が限られており、測定する系にあった核種を選ばなくてはならない。その条件として考えられるのは、

- 1) 試料に核種を導入する必要があるので親核はある程度の長さの半減期が必要である。
- 2) 核種の角相関の異方性 A_{22} がある程度大きい方が測定に有利である。
- 3) 中間準位の寿命が短すぎず、長すぎないことが必要である。中間準位の寿命は、時間微分型 PAC では測定器の時間分解能の限界から寿命は数 ns 以上で、偶然同時計測の問題から数 μ s 以下。
- 4) 注目するカスケード以外の γ 壊変で、中間準位が成立したり壊変したりする割合が少ないことである。

また、プローブ核の条件ではないが、PAC 測定ではたびたび測定に適した放射エネルギーが問題となる。強すぎる放射能を用いると偶然同時計測の問題から S/N 比が悪くなってしまう。そのため PAC 測定ではむやみに線源を強くしてはならない。

1-4 マビシアニンの構造と性質

生体分子として本研究ではマビシアニンを用いた。(Fig. 1-4) マビシアニンはズッキーニに含まれるタンパク質であり、109 残基のアミノ酸からなる、分子量 11,747 Da の低分子量ブルー銅タンパク質である[4], [5]。生体での役割は植物の非光合成組織に存在する cupredoxin である。これらの光合成に関与しない cupredoxin はその生体内での生理学的役割は未だ解明されていないが、生体防御に関与していると考えられている。マビシアニンは活性中心に銅(II)サイトを持ち、type I 銅のシアニン類に類別されているブルー銅タンパクの 1 つである。マビシアニンの全体構造は X 線構造解析によって測定され、3 つの短い α ヘリックスと、7 つの β ストランド、柔軟性に富んだループ領域から成り、ステラシアニンと類似した構造をとっている。(Fig. 1-5, Fig. 1-6) Type I 銅部位は、エクアトリアル面内に His44 の N 原子、His90 の N 原子、Cys85 の S 原子が配位し、軸位に Gln95 側鎖の O 原子が配位した歪んだ四面体構造をとる。

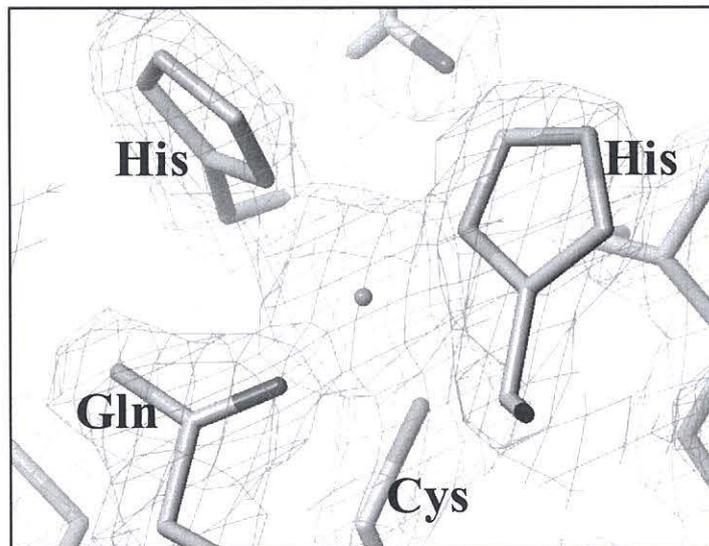
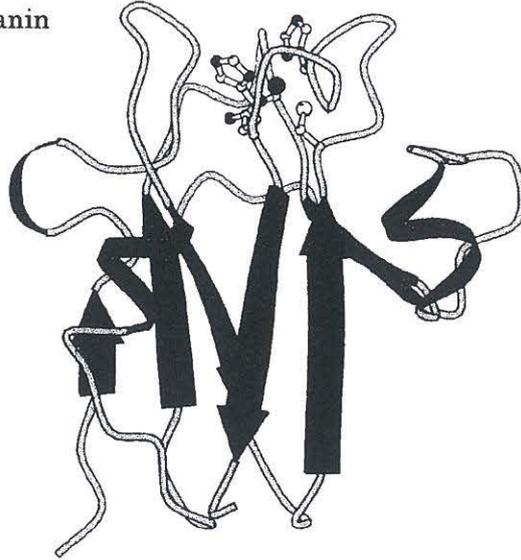


Fig. 1-4 The conformation of Mavicyanin (upper) and the map of copper binding structure (bottom)

a) Mavicyanin



b) Stellacyanin

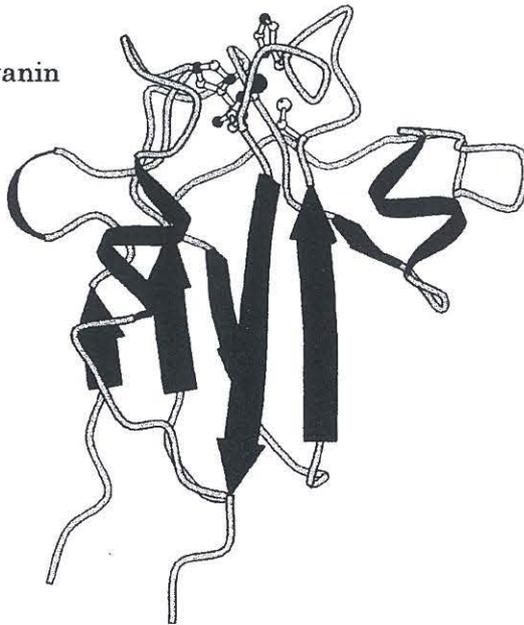


Fig. 1-5 Structures of mavicyanin and stellacyanin

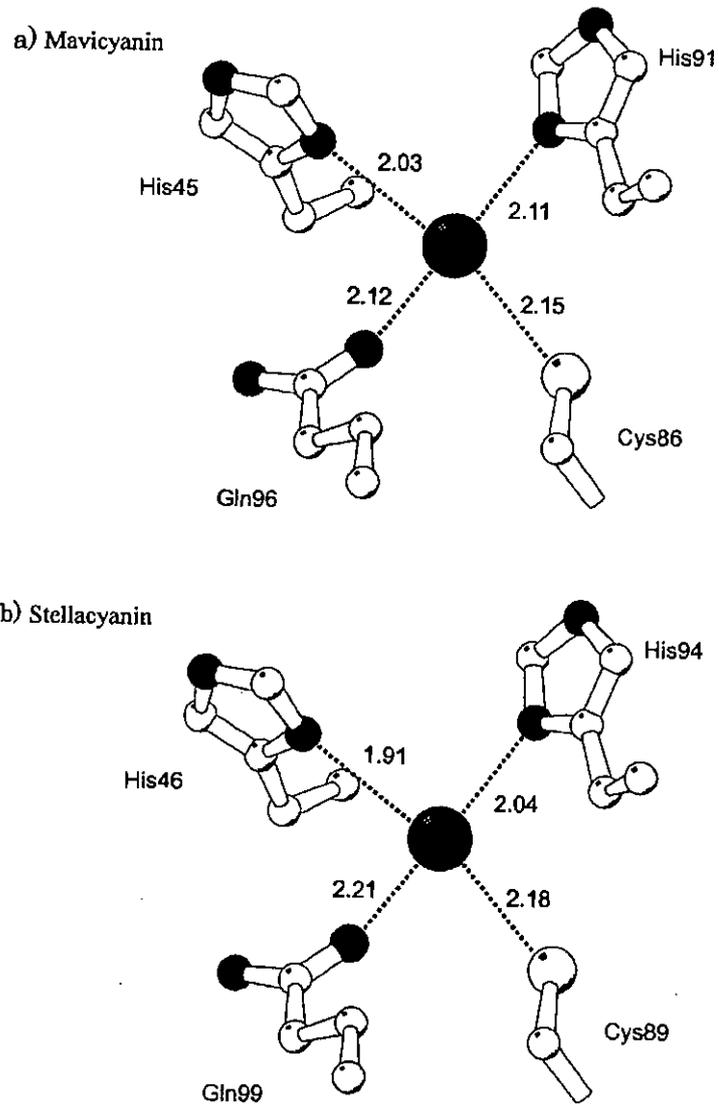


Fig. 1-6 Structures of the copper sites of mavicyanin and stellacyanin

第2章 実験

2-1 マビシアニンの電場勾配測定

2-1-1 試薬と主な器具

(1) 試薬

下記の特級試薬をそのまま、もしくは希釈、混合して用いた。

酸	: 36 % 塩酸
アルカリ	: 水酸化ナトリウム
緩衝溶液	: HEPES, MES, Tris-HCl, TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
その他の試薬	: スクロース, LB 培地 (Yeast extract, Tryptone, NaCl), 塩化リゾチーム, Benzonase, Triton X-100
使用した菌株	: <i>E.coli</i> BL21, <i>E.coli</i> Rosetta
分子サイズ排除カラム	: sephadex G-25 (Amersham Bioscience 社製)

(2) 装置

- ・ 上皿電子分析天秤
(株) 島津製作所, AEU-210 型, 秤量 200 g, 感度 0.1 mg
- ・ BaF₂ シンチレータ
(株) 応用光研工業, 直径 1.5 inch, 厚さ 1 inch
- ・ ペルチェ素子
(株) オーム電機, OCE-F15P-D12
- ・ pH メータ
(株) 東亜 DKK, HM21P
- ・ スターラー
(株) IKA, RET ベーシック C

2-1-2 マビシアニンの生合成と精製

(1) 培養

形質転換後の菌をプレートに植菌し、37 °Cで一晩培養した。培養後、単一のコロニーを4 mlのLB培地に植菌し、37°Cで8時間振とう培養した（前培養）。200 mlの滅菌したLB培地に前培養を植えつぎ37°Cで4時間振とう培養後（本培養）、フィルター滅菌した1 M IPTG 溶液を100 μ l（終濃度0.5 mM）加えて再び37°Cで8時間振とう培養し誘導発現を行った。培養終了後、冷却遠心機で集菌しTEに懸濁して超音波破碎した。次いで沈殿を1 Mスクロース溶液に懸濁し、破碎されずに残った菌体を溶菌し、DNAを除去するために塩化リゾチームとBenzonaseを加えて30分~1時間37°Cの温度一定で放置した。冷却遠心後、再度沈殿を1 M ショ糖溶液に懸濁して遠心し細胞破碎残渣を分離した。さらにTriton X-100 溶液200mlに懸濁し、4°Cで温度一定にし放置することで封入体と共に沈殿した細胞破碎残渣を抽出除去した。冷却遠心し上清を除いて封入体を完全に単離した。

(2) 封入体の可溶化と脱銅

2% TritonX-100, 10 mM EDTA に懸濁したものを冷却遠心し、上澄みを捨て沈殿に8 M 尿素を加えて溶かした。これを4 °Cで2~3時間放置した。放置後、これを透析膜に入れ、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に終濃度4 M 尿素を加えたbufferに4~5時間、4 °Cで透析した。透析後、透析膜を20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に終濃度2 M 尿素を加えたbufferに移し、4 °Cで4~5時間透析した。同じように尿素濃度を1 M、次いで尿素無しの溶液で透析を行い、順次4 °Cで4~5時間透析した。1 mMのCuCl₂, 20 mMのTris-HCl (pH 7.5) の溶液に一晩透析し、銅を取り込ませた。透析後、冷却遠心し、沈殿を取り除き上澄みを透析膜に入れ、0.1 M KCN, 1 mM EDTA, 0.1 M Tris-HClが入った溶液に入れ一晩透析を行い、Cuを除去した。この後、0.1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.3) 溶液に透析してKCNを除去した。除去後、280 nmの紫外吸光を測定し、マビシアニンの量を決定した。これで得られた脱銅のマビシアニンを用いてKURRI (京都大学原子炉実験所)にてPAC測定を行った。また全体のスキームをFig. 2-1, Fig. 2-2に示す。なお、マビシアニン変異体の場合は銅を添加せず同様の合成を行った。

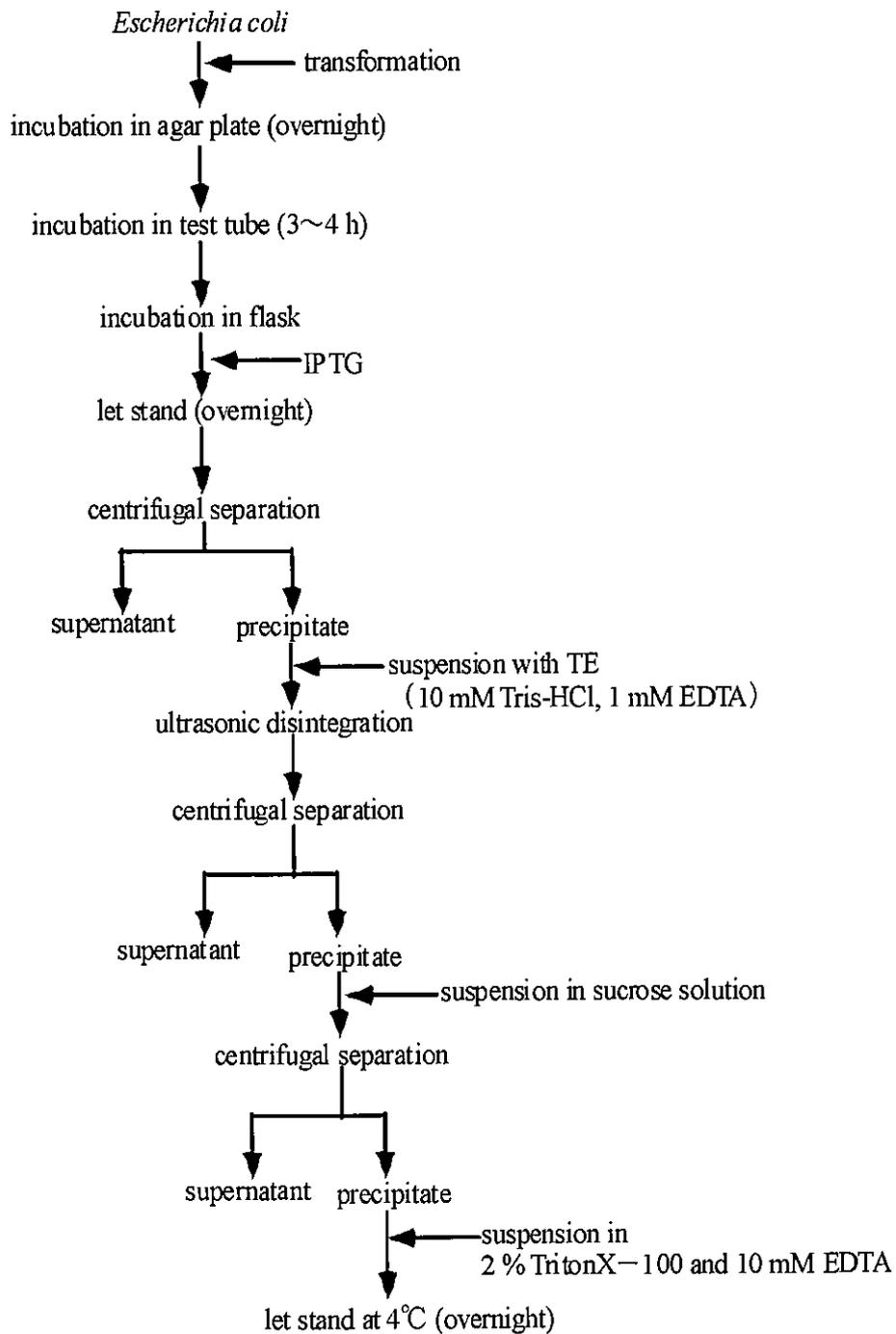


Fig. 2-1 Procedure of Biosynthesis for Mavicyanin (Part I)

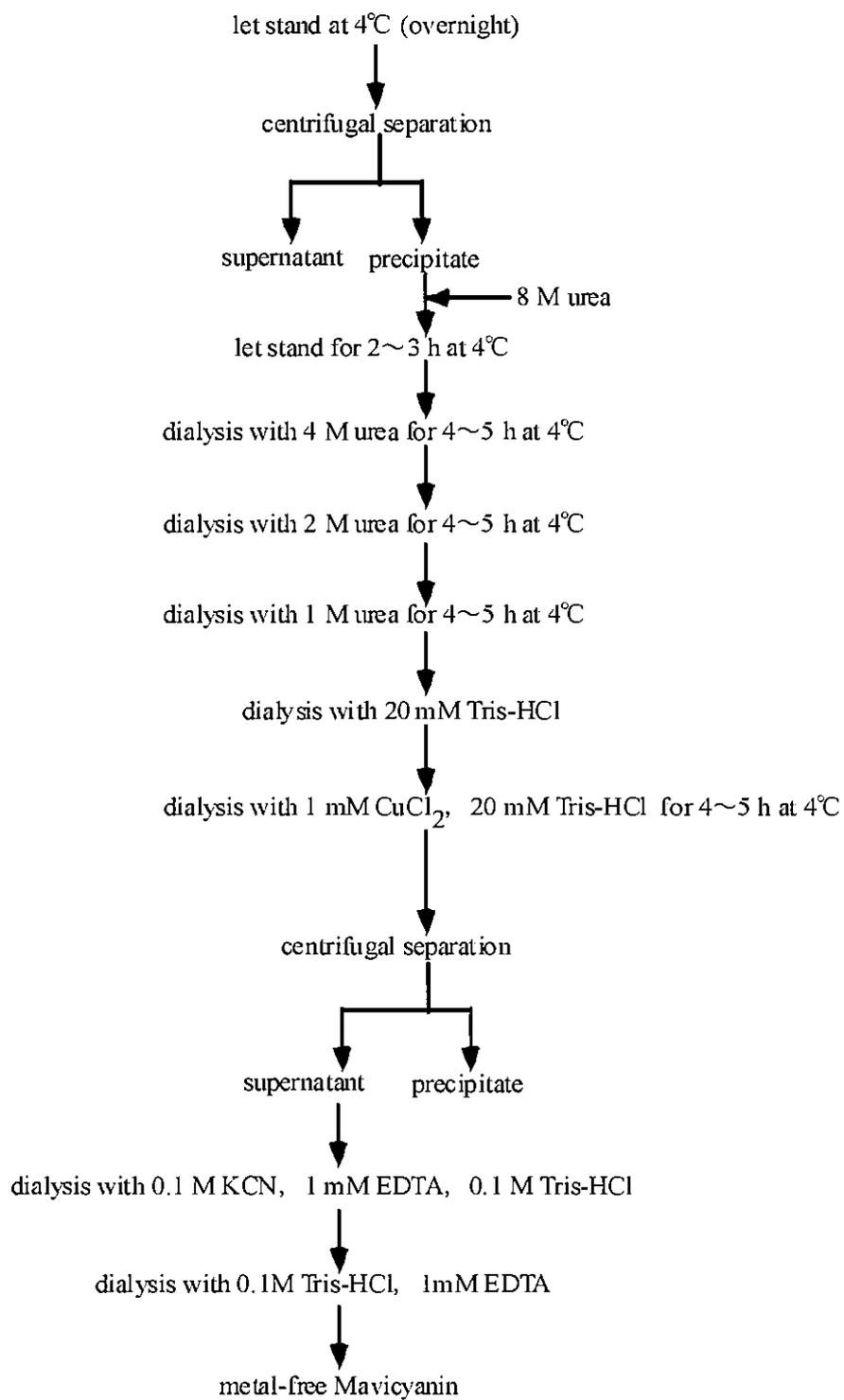


Fig. 2-2 Procedure of Biosynthesis for Mavicyanin (Part II)

2-1-3 プローブ核の製造

今回使用した PAC 核種は ^{117}Cd (半減期 2.49 時間) で, この壊変様式を Fig. 2-3 に示す。 ^{117}Cd は β^- 壊変をし, ^{117}In の様々な励起準位にそれぞれの確率で遷移する。これらの励起準位のうち, 89.7 keV と 344.5 keV の γ 線カスケードの相関を利用した。この核種について相関に関わる中間準位の寿命は 77.3 ns, 核スピンは $3/2^+$, 電気四重極モーメントは $(-)$ 0.59 barn である [6]。

^{117}Cd は同位体 ^{116}Cd の存在度が 96.5 % に濃縮してある CdO 粉末 (約 2 mg) を京都大学原子炉実験所の 5 MW 出力の原子炉中に圧気輸送管 No. 1 または No. 2 を使って送入し, 熱中性子照射 (中性子束 $1.93 \times 10^{13} \sim 2.75 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を 60 分間行い, $^{116}\text{Cd} (n, \gamma) ^{117}\text{Cd}$ 反応により ^{117}Cd を含む CdO を製造した。そのときに生成した放射能は 2.1~3.0 MBq である。BaF₂ シンチレーション検出器と Ge 検出器で測定した照射後の CdO のエネルギースペクトルを Fig. 2-4 と Fig. 2-5 にそれぞれ示す。

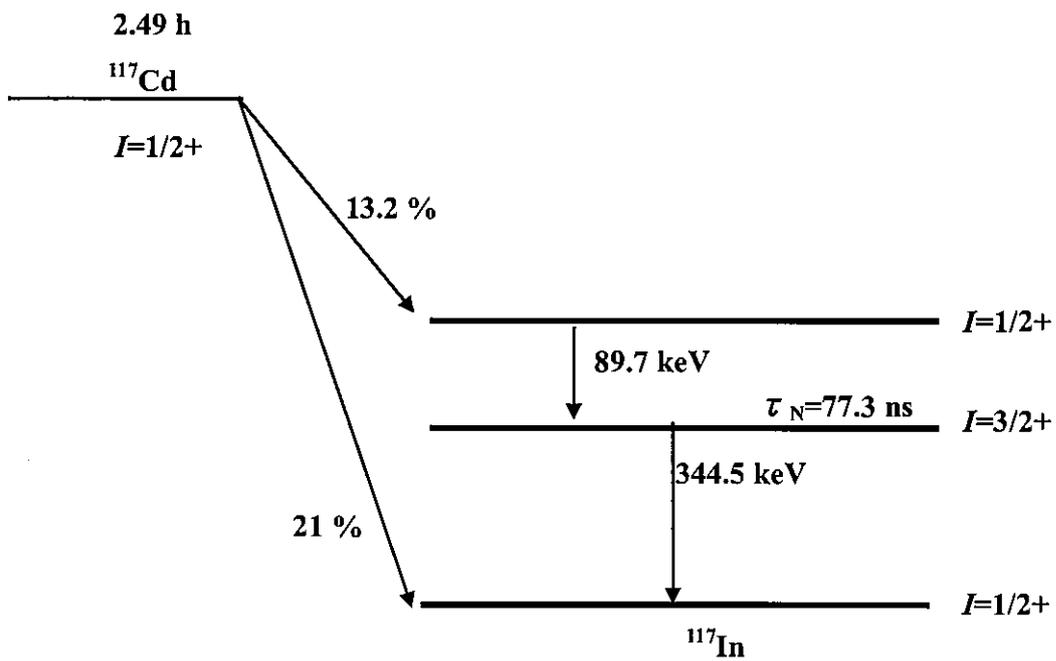


Fig. 2-3 Simplified decay scheme of ^{117}Cd

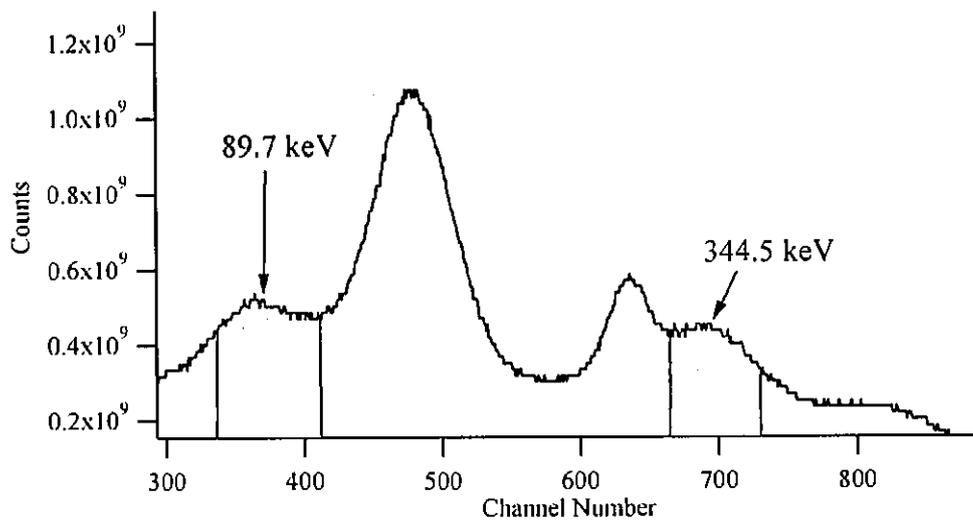


Fig. 2-4 Energy Spectrum for Cd-117

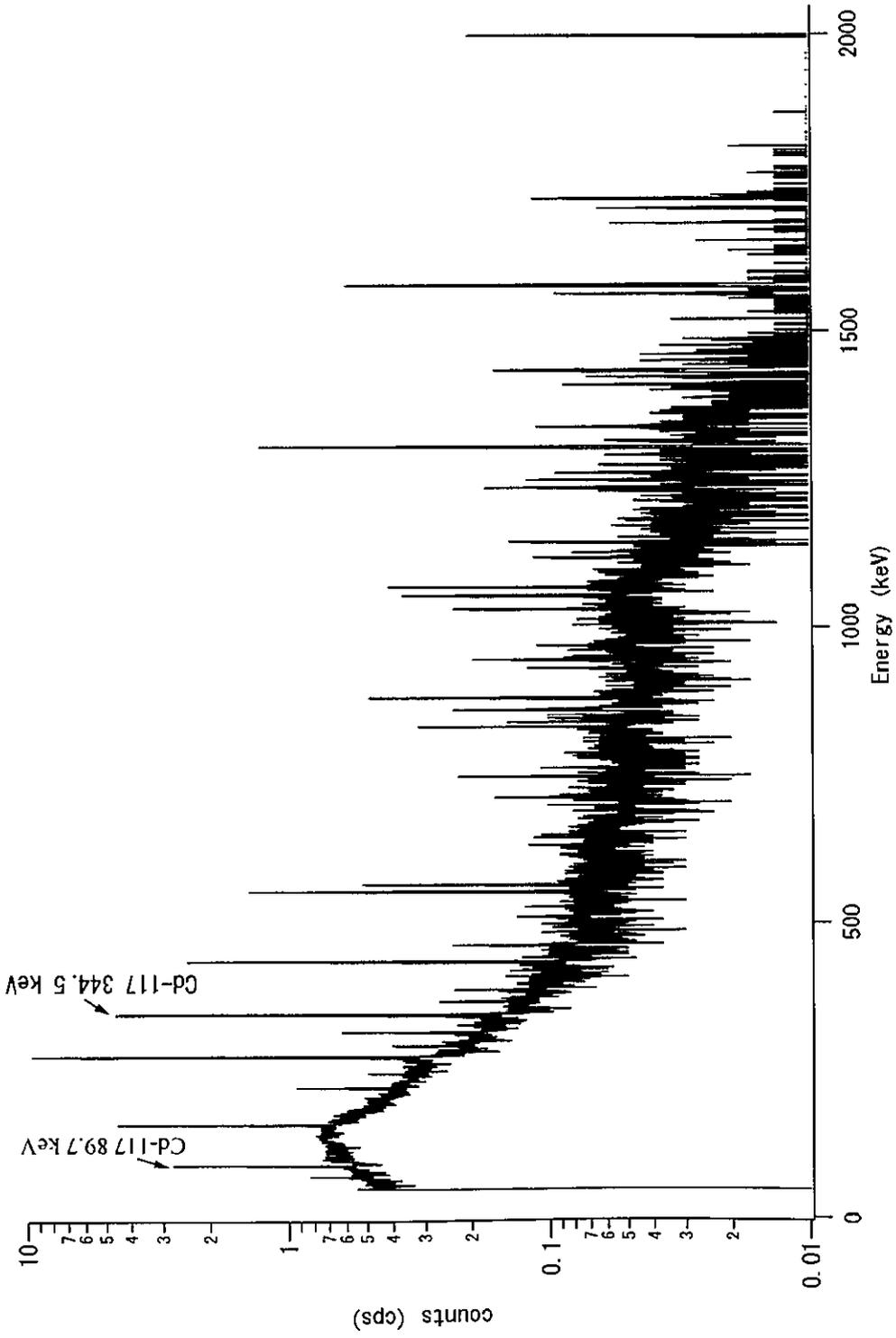


Fig. 2-5 Energy Spectrum for Cd-117

2-1-4 PAC 測定

(1) 測定装置

2 本のカスケード γ 線の角度分布を調べるため、4 つの検出器を 90 度と 180 度方向に設置し、時間微分型摂動角相関測定法で計測した。検出器には時間分解能に優れた BaF_2 シンチレータを使用した。 BaF_2 シンチレータに直結した光電子増倍管から、主に時間分解能が優れているがエネルギー分解能が劣っている信号（速い信号, timing pulse）と、時間分解能が劣っているがエネルギー分解能に優れている信号（遅い信号, energy pulse）を取り出す。速い信号は時間に関する情報を、遅い信号はエネルギーに関する情報を与える。

Fig. 2-6 に本研究の測定に用いた PAC 測定用の fast-slow 同時計数回路図を示す。 γ_1 が検出器 1 (Det 1) または 2 (Det 2) に入るとそれらからの速い信号が、 γ_2 が検出器 3 (Det 3) または 4 (Det 4) に入るとそれらから速い信号が発信される。それぞれの信号はまず S/N 比を最適化するために Timing Filter Amplifier (TAF, Ortec 454) に通され、次に Constant-Fraction Discriminator (CFD, Ortec 473, 463) に通し検出器 1 または 2 からの速い信号を start 信号、検出器 3 または 4 からの速い信号を stop 信号として Time-to-Amplitude Converter (TAC, Ortec 567) に通し γ_1 と γ_2 の放出された時間差をパルス波高に変換し、時間情報を得る。一方、 γ_1 または γ_2 が入った全ての検出器から出た遅い信号は増幅されたあと、Single-Channel Analyzer (SCA, Ortec 551, 590A もしくは Canberra 2037A) でエネルギー選別され、Coincidence Matrix (Coin. Matrix, Osaka denpa 2410) で 2 つの検出器からの遅い信号を同時計測し、入ってきた信号の組み合わせを認識する。この信号がゲートパルスとして Linear Gate (LINEAR GATE, Ortec 426) に入力されて、同時に TAC から送信されている時間情報の信号を通過させる。これが analog-digital converter (ADC, Laboratory Equipment 2201A) で変換されて、各チャンネルの計数值として memory (memory, Laboratory Equipment MCA-48F) にためられる。 γ_1 と γ_2 を計測する際の組み合わせは、(1-3), (1-4), (2-3), (2-4) という組み合わせの他に遅延回路 (Delay, Ortec 427A) を用いることで γ_1 を stop 信号、 γ_2 を start 信号とできるので組み合わせは上記以外に (3-1), (4-1), (3-2), (4-2) といった組み合わせにより計 8 通りの時間スペクトルが得られる。

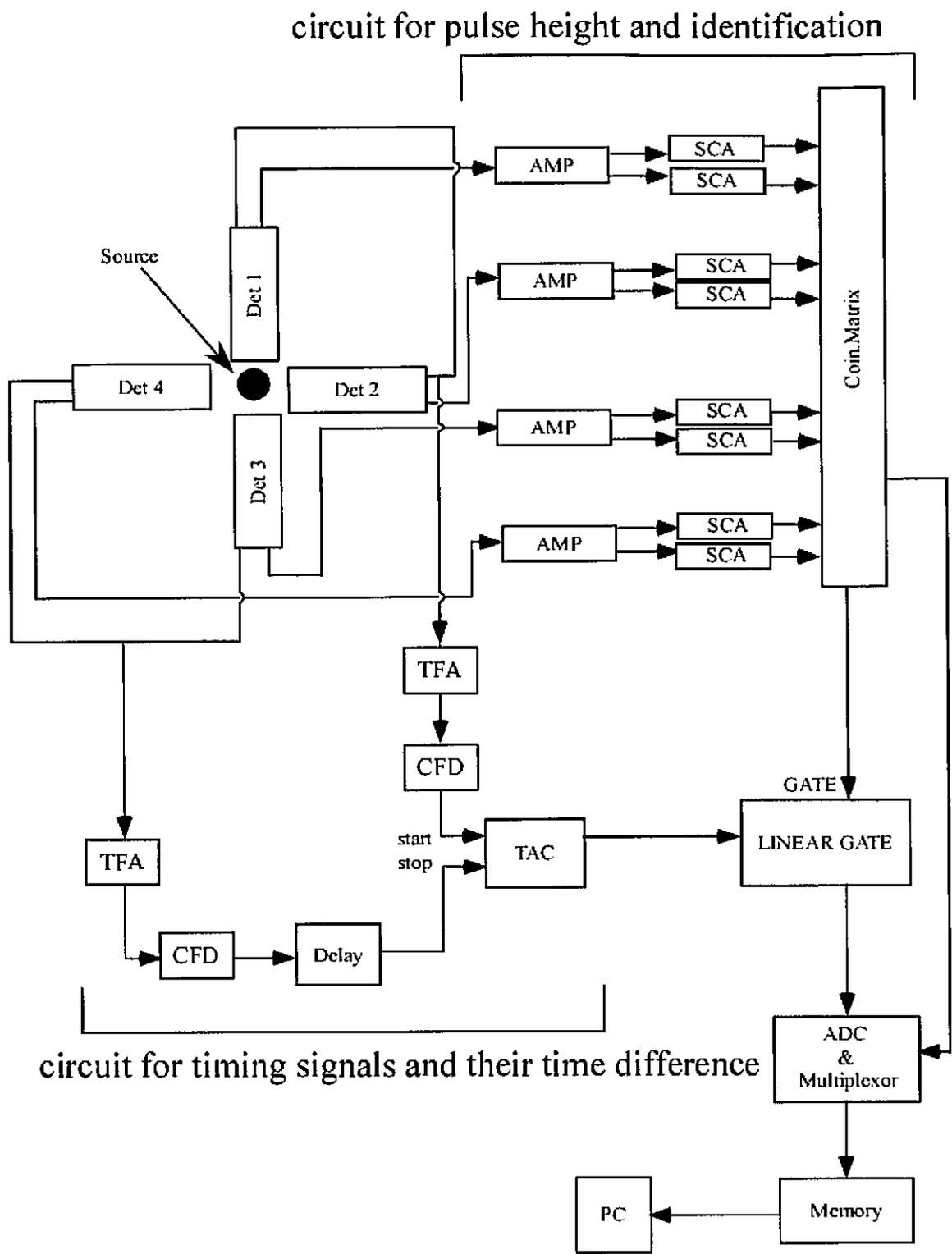


Fig. 2-6 Diagram of electronic circuit for PAC measurement

(2) 試料調製

試料調整のスキームを Fig. 2-7 に示す。中性子照射直後の CdO (粉末, 約 2 mg) を 3 N 塩酸で溶解した後, ホットプレートで蒸発乾固を行い, 化学形を CdCl₂ にした。ここに活性部位の銅を予め抜いておいたマビシアニン水溶液を加えて混合し, スターラーで攪拌しながら 1 時間放置してマビシアニンに放射性 Cd を取り込ませた。MES, HEPES 緩衝剤を用いて目的の pH に調整した Sephadex G-25 カラム (ゲルろ過クロマトグラフィー, 分子ふるい) を利用して測定妨害となるタンパク質にとり込まれなかった余分な放射性 Cd を除いた。そのときの試料の放射エネルギーを窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管で測定した。その量は 6 cm 離れたところで約 1 kcpm であった。その後, 試料溶液は粘性を高めてタンパク質の拡散運動を抑えるためにスクロースを加え, これを測定試料とした。測定試料は, それぞれの BaF₂ シンチレーション検出器と試料の距離が 3 cm になるように中心に設置し, タンパク質の変質を防ぐためにペルチェ素子で冷やしながら (約 -5 °C ~ -4 °C) 測定を行った。なお, 測定は親核種の半減期と妨害放射能の成長のために 2~3 時間程度しか継続できない。そこで, 同じ条件下での PAC 測定を数回繰り返して行い, データを足し合わせて統計の改善を図っている。

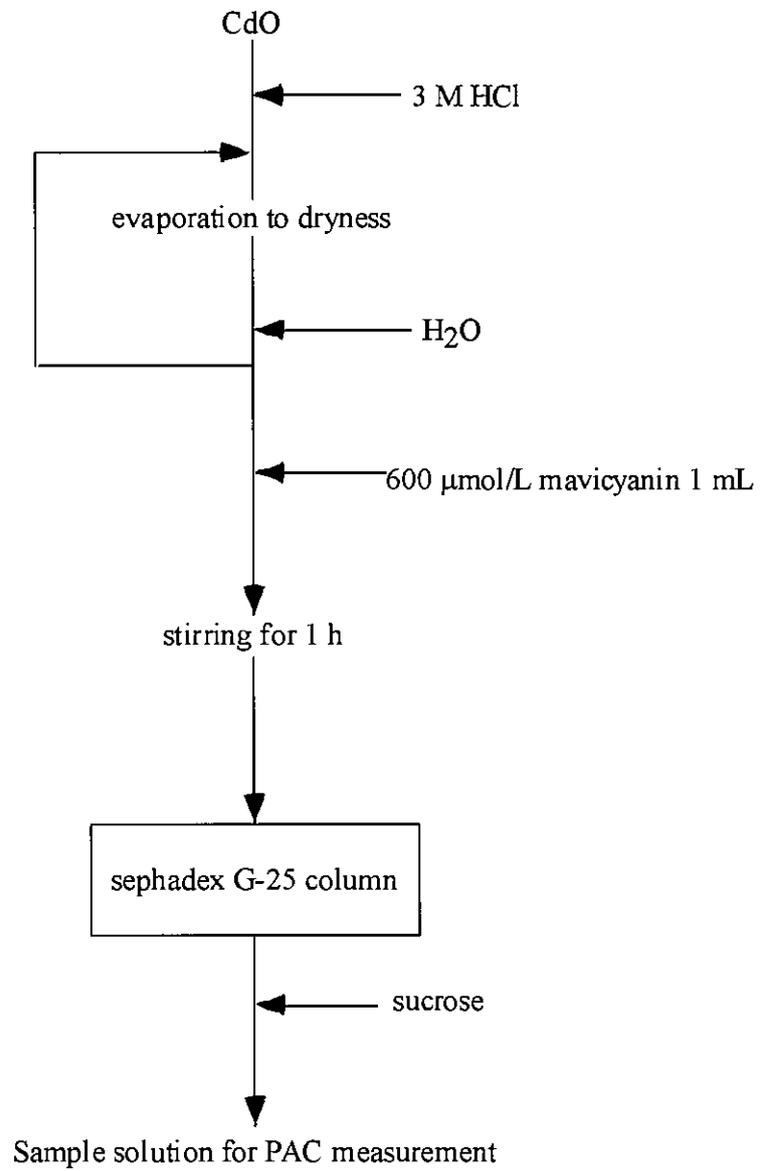


Fig. 2-7 Sample preparation

2-1-5 解析

1-3 節で摂動角相関の原理を述べたが、(1-11) 式摂動角相関について $k=2$ ま
で展開した式は以下のようなになる、

$$W(\theta, t) = 1 + A_{22}G_{22}(t)P_2(\cos\theta) \quad (2-1)$$

実際の測定では各検出器の組み合わせは 90° , 180° 方向で測定しているので、 90° ,
 180° について (2-1) 式を解くと、

$$W(90, t) = 1 + A_{22}G_{22}(t) \times \frac{3\cos^2(90) - 1}{2} \quad (2-2)$$

$$W(180, t) = 1 + A_{22}G_{22}(t) \times \frac{3\cos^2(180) - 1}{2} \quad (2-3)$$

となる。また、PAC 測定での各検出器の時間スペクトルは

$$N(\theta, t) = e^{-t/\tau_n} W(\theta, t) \quad (2-4)$$

となる。具体的には測定は 180° 方向に (1-3), (2-4), (3-1), (4-2) の 4 通り
と、 90° 方向に (1-4), (2-3), (4-1), (3-2), の 4 通りの組み合わせになり、以
下の式に従い 90° 方向, 180° 方向の幾何平均をとった。

$$N(180, t) = \{N_{1-3}(180, t)N_{2-4}(180, t)N_{3-1}(180, t)N_{4-2}(180, t)\}^{1/4} \quad (2-5)$$

$$N(90, t) = \{N_{1-4}(90, t)N_{2-3}(90, t)N_{4-1}(90, t)N_{3-2}(90, t)\}^{1/4} \quad (2-6)$$

また、(2-2), (2-3), (2-4) 式より、

$$\frac{2[N(180^\circ, t) - N(90^\circ, t)]}{N(180^\circ, t) + 2N(90^\circ, t)} = A_{22}G_{22}(t) \quad (2-7)$$

となる。

今回の実験では摂動には磁場と電場勾配があるが、マビシアニンは強磁性体ではないので電場勾配による摂動だけを考えた。ここで Cd-117 に関して電場勾配のみを考えた場合の $A_{22}G_{22}(t)$ は以下のようになる、

$$A_{22}G_{22}(t) = \frac{A_{22}}{5} \left[1 + 4 \cos \left\{ 6\omega_Q \left(1 + \frac{\eta^2}{3} \right)^{\frac{1}{2}} t \right\} \right] \quad (2-9)$$

ここで Cd-117 の場合、 $A_{22} = -0.36$ となる [7]。得られた PAC スペクトルに (2-9) 式を最小 2 乗法でフィティングすることで、 ω_Q を求めることができる。また、電場勾配に軸対称がある場合には $\eta = 0$ となる。求めた ω_Q は、以下の式で電場勾配に変換できる、

$$\omega_Q = -\frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)\hbar} \quad (2-10)$$

これにより ω_Q から V_{zz} を求めた。解析には Igor (Ver. 4.05, WaveMetrics 社) による計算プログラムを用いた。

2-2 錯体の電場勾配測定

2-2-1 試薬とプローブ核

(1) 試薬

下記の特級試薬をそのまま、もしくは希釈、混合して用いた。

酸	: 36 % 塩酸
アルカリ	: 水酸化ナトリウム
有機溶媒	: エタノール, 四塩化炭素, クロロホルム
その他の試薬	: 塩化インジウム, ジチゾン, オキシソ, ベンゾイルフェニルヒドロキシルアミン (BPHA), ジエチルジチオカルバミン酸 (DDC), キナルジン酸, キノリン-8-カルボン酸, クペロン

(2) プローブ核の製造

PAC プローブ核については、2-1-3 節で述べた ^{117}Cd の他に $^{111\text{m}}\text{Cd}$ と ^{111}In を用いて測定を行ったものがある。 $^{111\text{m}}\text{Cd}$ は、 ^{117}Cd とは違い β^- 壊変をしないため、壊変後の原子核の後遺効果を気にする必要がないという利点が存在するが、親核の半減期が ^{117}Cd の半減期に比べ短いという不利な点もある。簡略化した壊変様式を Fig. 2-8 に示す。 $^{111\text{m}}\text{Cd}$ について相関に関わる中間準位の寿命は 122.7 ns, 核スピンは 5/2+, 電気四重極モーメントは (+) 0.77 barn であり, 151 keV と 245 keV の γ 線カスケードの相関を測定している。また, この核種の角相関係数は $A_{22} = +0.18$ である。 $^{111\text{m}}\text{Cd}$ は同位体 ^{110}Cd の存在度が 96.0 % に濃縮してある CdO (約 3 mg) を京都大学原子炉実験所の 5 MW 出力の原子炉中で圧気輸送管 No. 1 または No. 2 を使って, 熱中性子照射 (中性子束 $1.93 \times 10^{13} \sim 2.75 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を 60 分間行い, $^{110}\text{Cd} (n, \gamma) ^{111\text{m}}\text{Cd}$ 反応により $^{111\text{m}}\text{Cd}$ を含む CdO を製造した。そのときに生成した放射能は 9.5 ~ 13.5 MBq である。

^{111}In に関しては, 日本メジフィジックス社より 74 MBq (1.0 mL) の塩化インジウム製剤を購入し, これを実験に用いた。 ^{111}In の壊変様式を Fig. 2-9 に示す。 ^{111}In は β^+ 壊変したあと, 171 keV と 245 keV の γ 線を放出し, そのカスケード測定している。このカスケードに関わる中間は $^{111\text{m}}\text{Cd}$ の場合と同じ準位で, 寿命 122.7 ns, 核スピンス 5/2+, 電気四重極モーメントは (+) 0.77 barn であり, 角相関係数

は $A_{22} = -0.18$ である。Ge 検出器で測定した ^{111}In のエネルギースペクトルを Fig. 2-10 に示す。

$^{111\text{m}}\text{Cd}$, ^{111}In について $A_{22}G_{22}(t)$ は摂動が電場勾配だけによるものと考えた場合は以下の式のようになる,

$$A_{22}G_{22}(t) = A_{22} \{S_0 + S_1 \cos(6\omega_Q C_1 t) + S_2 \cos(6\omega_Q C_2 t) + S_3 \cos(6\omega_Q C_3 t)\} \quad (2-9)$$

ここで S_n , C_n は非対称パラメータ η によってあたえられ, $\eta = 0$ の場合,

$$A_{22}G_{22}(t) = \frac{A_{22}}{35} \{7 + 13 \cos(6\omega_Q t) + 10 \cos(12\omega_Q t) + 5 \cos(18\omega_Q t)\} \quad (2-10)$$

となる。

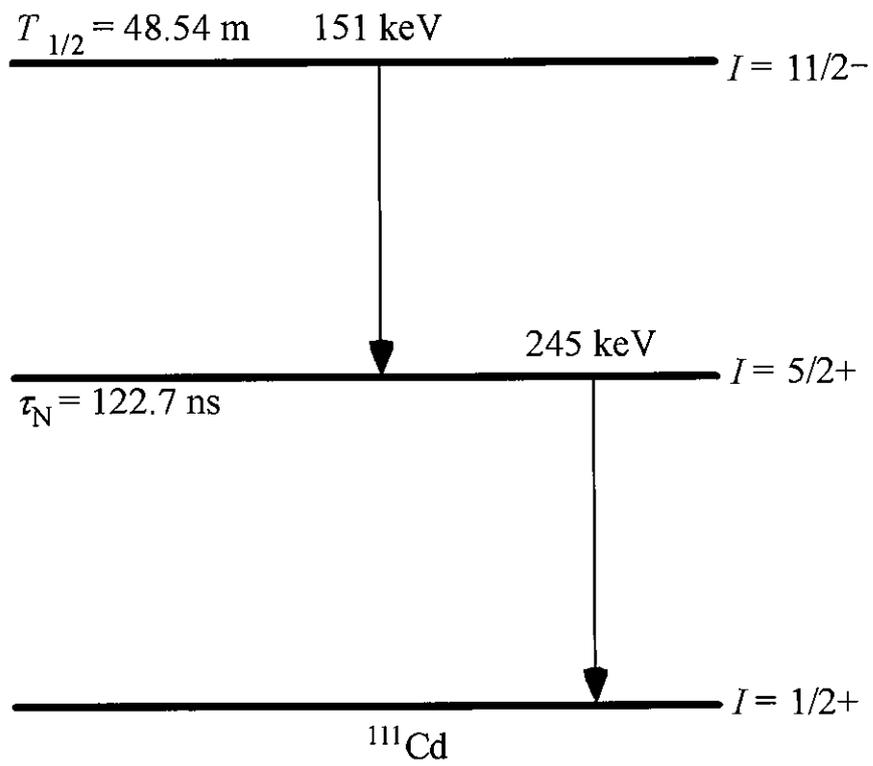


Fig. 2-8 Simplified decay scheme of ^{111m}Cd

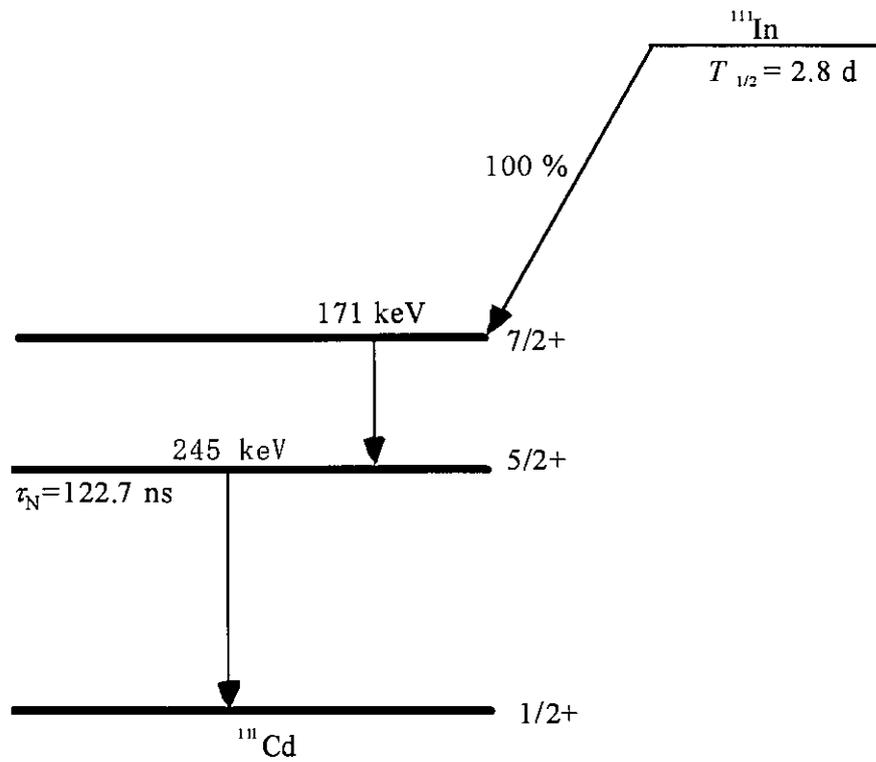


Fig. 2-9 Simplified decay scheme of ^{111}In

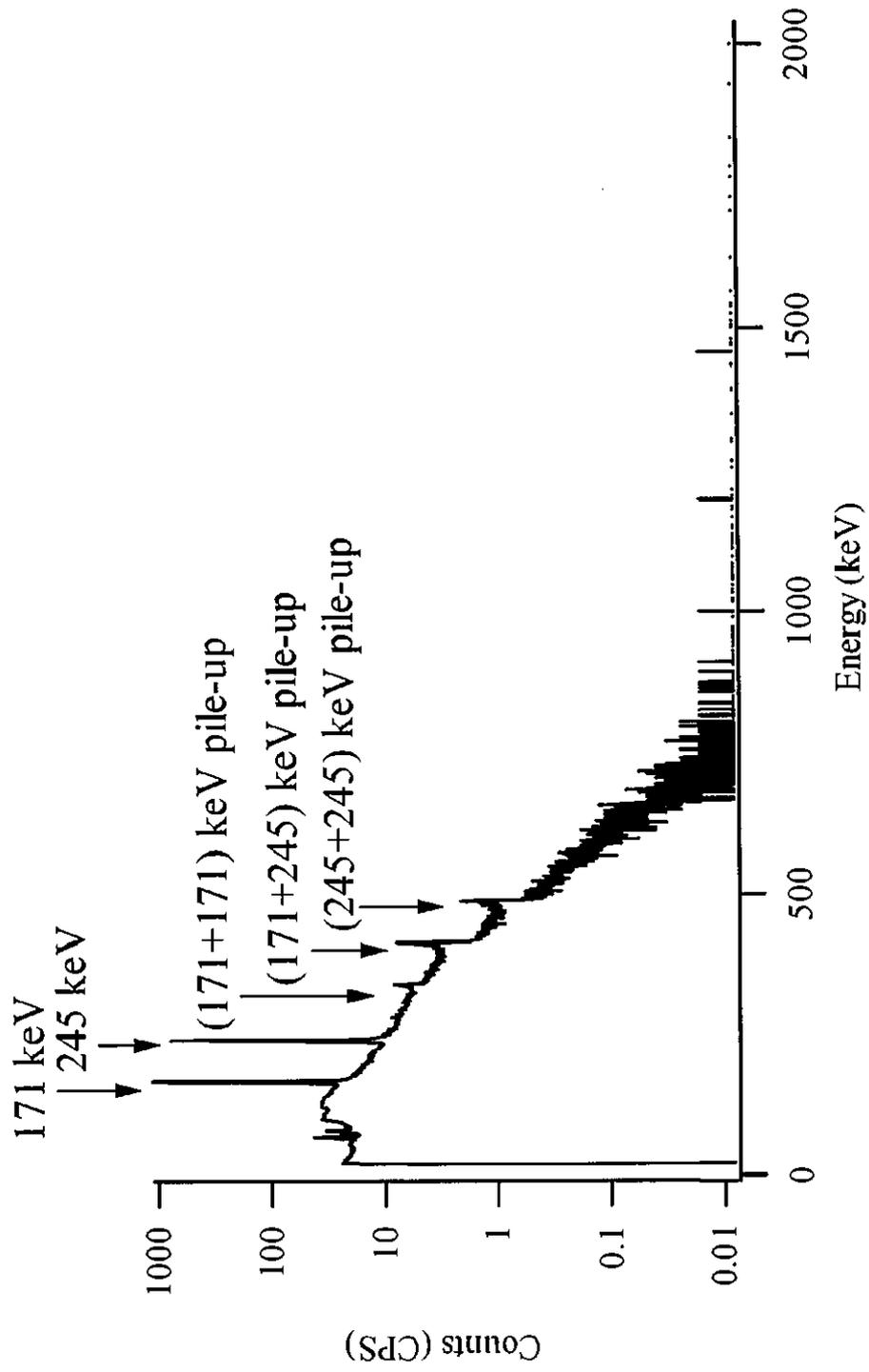


Fig. 2-10 Energy Spectrum for In-111

2-2-3 測定試料の調製

マビシアニンの電場勾配と比較検討するために用いた配位子は、マビシアニンと配位する元素が似ていることから、金属の抽出や定量分析に度々用いられているジチゾン、オキシシン、ベンゾイルフェニルヒドロキシルアミン (BPHA) ジエチルジチオカルバミン酸 (DDC)、キナルジン酸、キノリン-8-カルボン酸、クペロンを用いた。それらの配位したときの Cd (II) 錯体構造を Fig. 2-11, Fig. 2-12, Fig. 2-13 に示す。測定に用いた PAC 測定回路は 2-1-4 節の回路と同じものを用いた。

(1) ジチゾン錯体の調製

照射直後の CdO 粉末 (Cd-111m または Cd-117) を 3 N 塩酸で溶解した後、ホットプレートで蒸発乾固を行い、化学形を CdCl₂ にした。これに蒸留水 5 mL を加え遠沈管に移し、ジチゾン (四塩化炭素, 0.99 mmol/L) を 5 mL 加え、激しく 5 分間振り、有機相を分取した。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射エネルギーを測定し、約 2.5 kcpm 程度になるように試料の全量を調整した。その後、試料溶液はペルチェ素子の上に置き PAC 測定を行った。

(2) オキシシン錯体の調製

①照射直後の CdO 粉末 (Cd-111m または Cd-117) を 6 N 塩酸を溶解後、ホットプレート上で蒸発乾固を行った。その後、オキシシン (エタノール, 0.08 g/mL) を 5 mL 加えた。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射エネルギーを測定し、約 2.5 kcpm 程度になるように試料の全量を調整し、室温で PAC 測定を行った。

②購入した ¹¹¹InCl₃ を 0.1 mL 分取し、オキシシン溶液 (エタノール, 0.2 mM) を 10mL 加えた後、1 mM InCl₃ を 3 mL 加え沈殿を生成させた。これを分取して、測定試料とした。試料の放射エネルギーは広口 GM 計数管に密着させたところで約 25 kcpm であった。

(3) BPHA 錯体の調製

照射直後の CdO 粉末 (Cd-111m または Cd-117) を 3 N 塩酸で溶解した後、ホットプレートで蒸発乾固を行い、化学形を CdCl₂ にした。これに蒸留水 5 mL を加え遠沈管に移し、BPHA (クロロホルム, 50 μmol/L) を 5 mL 加え、激しく 5 分

間振り,有機相を分取した。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射エネルギーを測定し, 約 2.5 kcpm 程度になるように試料の全量を調整した。その後, 試料溶液はペルチェ素子の上に置き PAC 測定を行った。

(4) DDC 錯体の調製

①照射直後の CdO 粉末 (Cd-117) を 3 N 塩酸を溶解後, ホットプレート上で蒸発乾固を行った。そこに蒸留水 1 mL とジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム水溶液 (77.7 $\mu\text{mol/L}$) を 4 mL 加え, 沈殿を生成させた。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射エネルギーを測定し, 約 2.5 kcpm 程度になるように試料の全量を調整し, 室温で PAC 測定を行った。

②購入した $^{111}\text{InCl}_3$ を 0.1 mL 分取し, DDC 溶液 (エタノール, 0.2 mM) を 10 mL 加え沈殿を生成させた。これを分取して測定試料とした。試料の放射エネルギーは広口 GM 計数管に密着させたところで約 25 kcpm であった。

(5) キナルジン酸錯体の調製

照射直後の CdO 粉末 (Cd-117) を 3N 塩酸 0.8 ml で溶解したあと、ホットプレートで蒸発乾固を行い、再び 3N 塩酸 0.2 ml で溶解して蒸発乾固を行い、化学形を CdCl_2 にした。これを蒸留水 1 ml で溶かし、キナルジン酸水溶液 (0.018 mol/l) を 4 ml 加えた後、0.1 M NaOH 水溶液を滴下し pH をおよそ 4~5 に調節し沈殿を生じさせた。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射エネルギーを測定し、溶液から約 2500 cpm となる量をバイアル瓶にとって測定試料とし、室温で PAC 測定を行った。

(6) キノリン-8-カルボン酸錯体の調製

照射直後の CdO 粉末 (Cd-117 または Cd-111m) を (1) と同様に処理して化学形を CdCl_2 にした。それに蒸留水 1 ml とキノリン-8-カルボン酸水溶液 (0.015 mol/l) を 4 ml 加えた後、0.1 M NaOH 水溶液を滴下して溶液をほぼ中性にした。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射エネルギーを測定し、Cd-117 の試料は約 2500 cpm、Cd-111m の試料は約 1500 cpm となる量の溶液をとり、室温で PAC 測定を行った。

(7) クペロン錯体の調整

照射直後の CdO 粉末 (Cd-117 または Cd-111m) を上記と同様に処理して化学

形を CdCl_2 としたものに蒸留水を 1 ml 加えて溶かし、クペロン水溶液 (0.018 mol/l) を 4 ml 加えた。その後 0.1 M NaOH 水溶液で溶液の pH を 7.4 に調節した。窓にアルミキャップがついた細口 GM 計数管を 6 cm 離れたところで試料の放射能を測定し、Cd-117 の試料は約 2500 cpm、Cd-111m の試料は約 1500 cpm となる量の溶液をとり、その後室温で PAC 測定を行った。

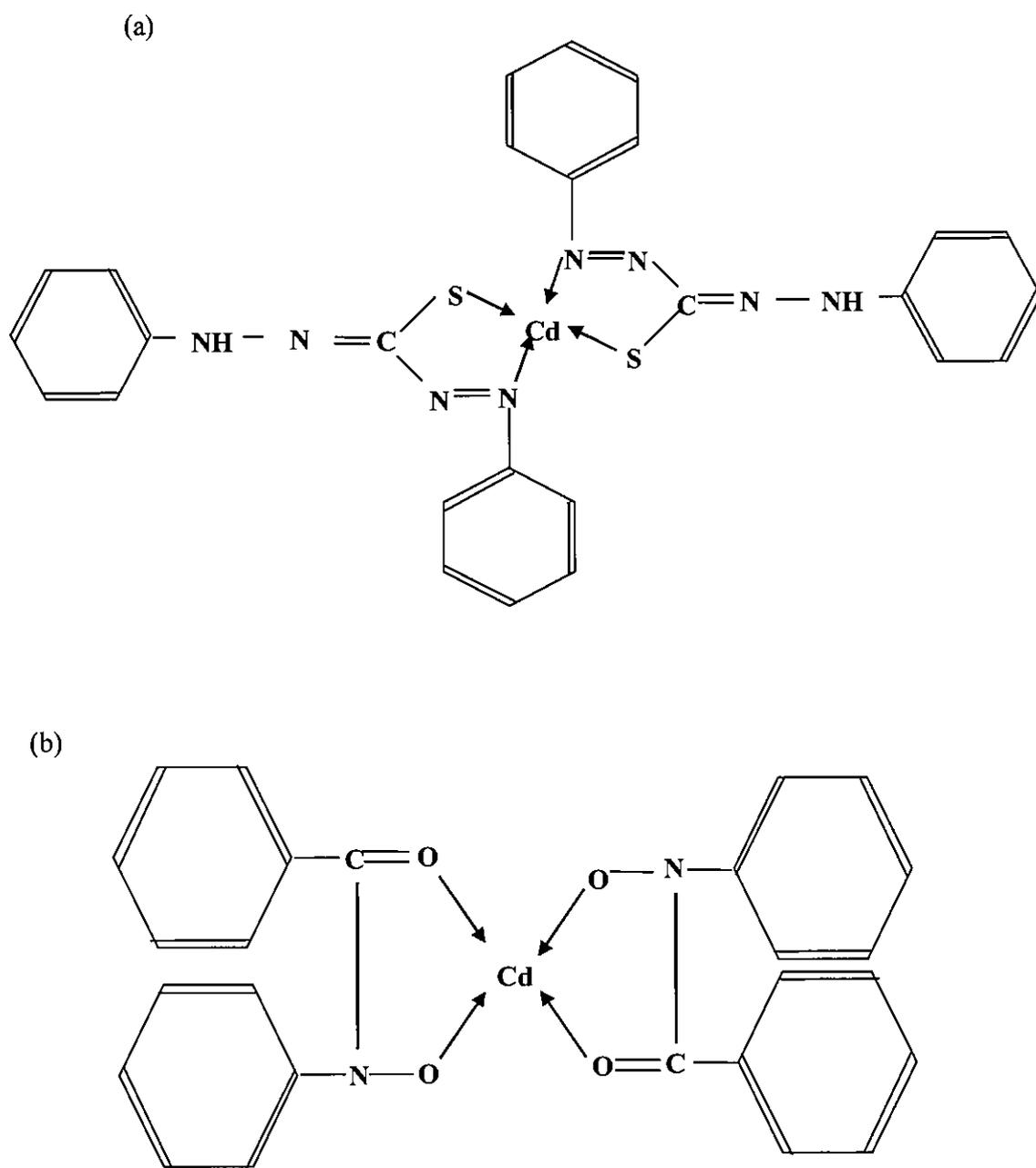


Fig. 2-11 Structures for Cd complexes with BPHA (a) and dithizone (b)

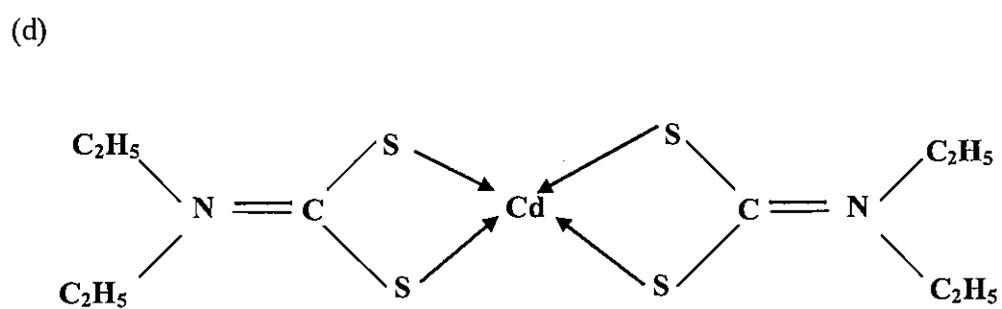
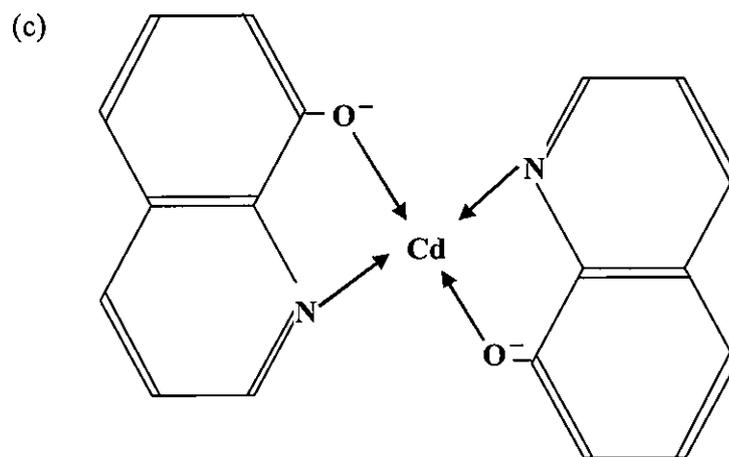
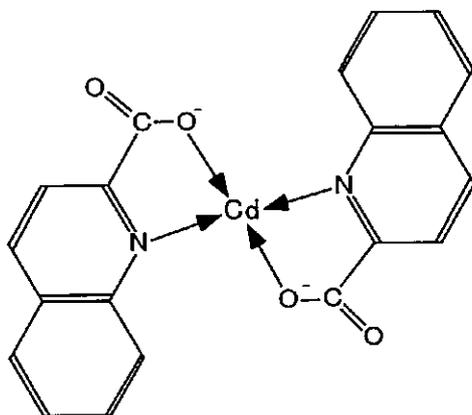
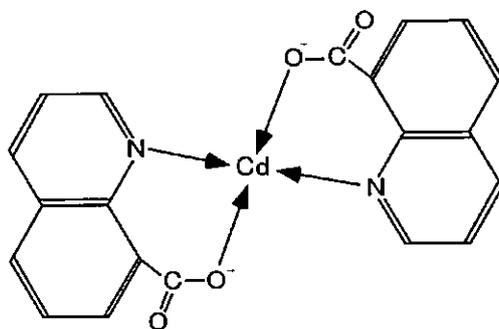


Fig. 2-12 Structures for Cd complexes with oxine (c) and diethyldithiocarbamic acid (d)

(e)



(f)



(g)

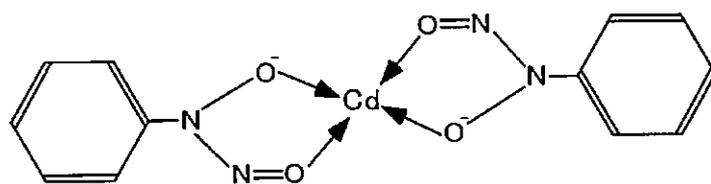


Fig. 2-13 Structures for Cd complexes with quinaldinic acid (e), 8-quinolinecarboxylic acid (f), and cupferron (g)

2-3 電場勾配の理論計算

電場勾配を理論計算するために、本研究では Gaussian03 (Gaussian 社) プログラムを用いた。また、その計算プログラムを CPU 2.53 GHz (Intel 社製, Pentium4), Memory 735 MB の PC 上で起動させた。

特に明記がない場合は、基底関数について Cd の場合は Kellö と Sadlej による基底関数[8]を、その他の元素については 6-31G (d) 基底関数を用いた[9]。計算した構造については Hartree-Fock で構造最適化を行った。また、電場勾配を密度汎関数理論 B3LYP 法を用いて計算した。

第3章 結果および考察

3-1 マビシアニンと金属錯体の電場勾配値の比較

(1) マビシアニンの PAC スペクトル

時間微分型 PAC 測定で得られた時間差スペクトルの 1 例を Fig. 3-1 に示す。このスペクトルは 2-1-5 節で述べたように 8 つからなるそれぞれの検出器の組み合わせに対応する時間スペクトルを 1 つのスペクトルとして表したものである。左から 4 つの減衰曲線が、残り 4 つの減衰曲線と時間軸が逆になっているのは γ_1 と γ_2 の時間差について start と stop を逆にしてデータを取得しているからである。詳しく言えば、 90° 角相関が 1, 4, 5, 8 であり、 180° 角相関が 2, 3, 6, 7 である。2-1-5 節の (2-5), (2-6) 式を用いて $N(90^\circ, t)$, $N(180^\circ, t)$ を算出し、(2-7) 式より $A_{22}G_{22}(t)$ を求めた。

野生型マビシアニン溶液中の pH を変えて得られた $A_{22}G_{22}(t)$ の TDPAC スペクトルを Fig. 3-2, Fig. 3-3, Fig. 3-4 にそれぞれ示す。また、Burg により考えられた最大エントロピー法に基づいて作られた日野によるフーリエ変換プログラムを用いて変換したそれぞれのスペクトルも示す[10], [11]。このフーリエ変換スペクトルから分かることは、pH 6 以外のスペクトルから特徴的な 1 成分があることが分かる。このことを受けて 1 成分の ω_Q をパラメータとして (2-8) 式を使って $A_{22}G_{22}(t)$ 時間スペクトルに最小 2 乗法でフィッティングを行い、その計算結果を実線で示す。ここで、実線で示した曲線が減衰してみえるのは ω_Q に分布があるためであり、フィッティングでは 5% のガウス分布を持たせている。このフィッティングより ω_Q を得る。ただし、 ^{117}Cd の場合には非対称パラメータ η と電気四重極周波数 ω_Q は同時に求めることができないので、 η はマビシアニンとステラシアニンの構造が似ていることから、E. Danielsen によって測定されたステラシアニンの非対称パラメータ $\eta = 0.45$ を暫定的に用いて電気四重極周波数 ω_Q を求めた。[12] また、マビシアニンにおける各 pH, ω_Q , 2-1-5 節の (2-9) 式を用いて求めた電場勾配 V_{zz} を Table 3-1 に示す。pH を変えて得られたスペクトルから電場勾配を求めると $1.48 \sim 2.08 \times 10^{22} \text{ V} \cdot \text{m}^{-2}$ という値になった。Danielsen et al. によって、マビシアニンと構造が似ているステラシアニンについて測定された ω_0 の値は $300.9 \text{ Mrad} \cdot \text{s}^{-1}$ (プローブ核 ; Cd-111m) であり、 V_{zz} に換算すると

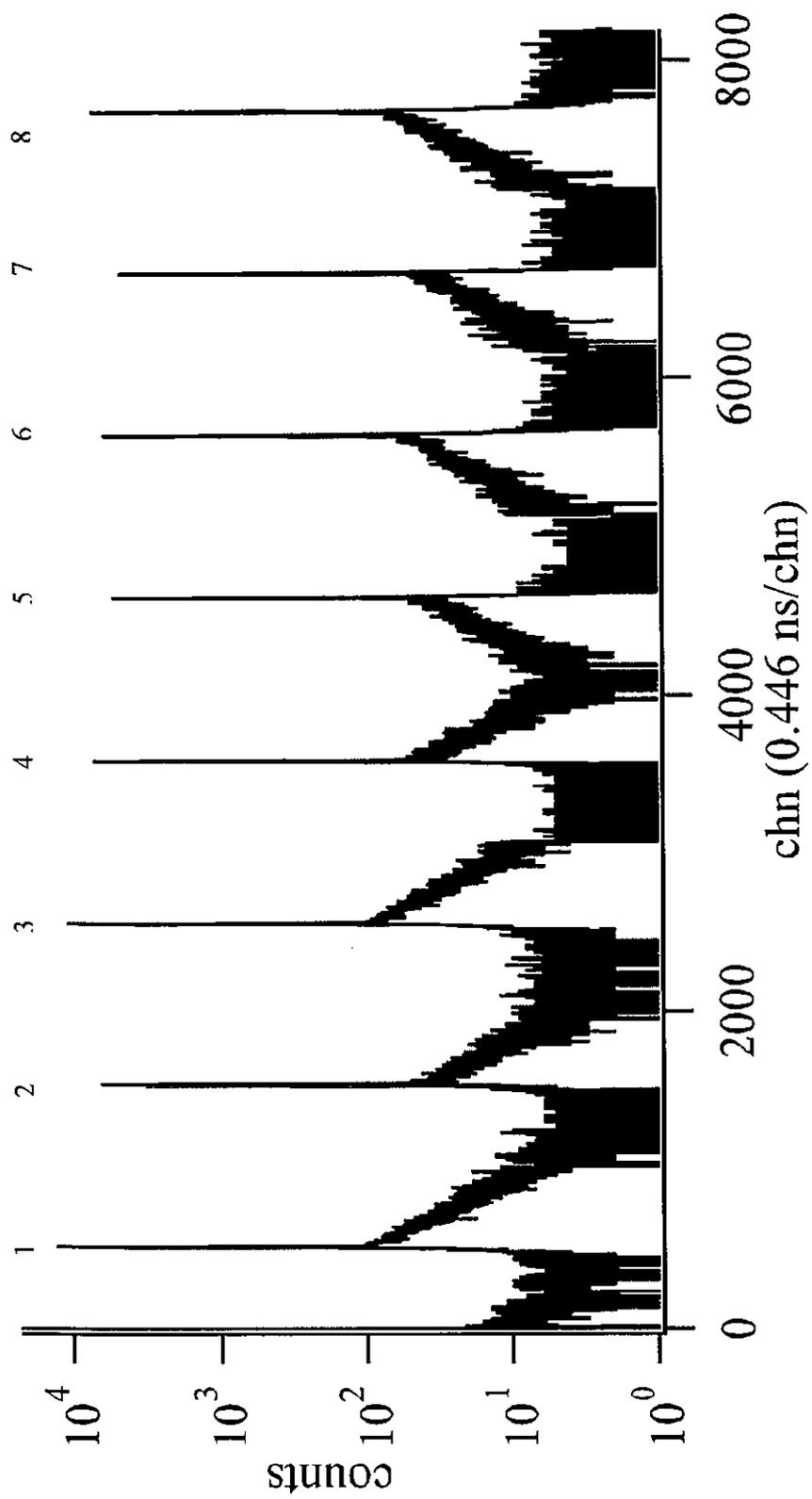


Fig. 3-1 PAC spectrum for mavecyanin substituted with ^{117}Cd

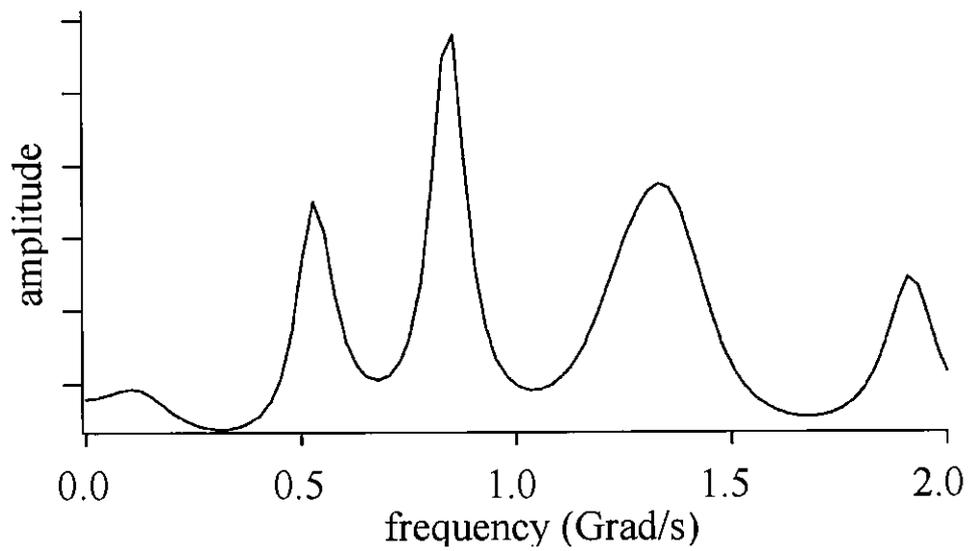
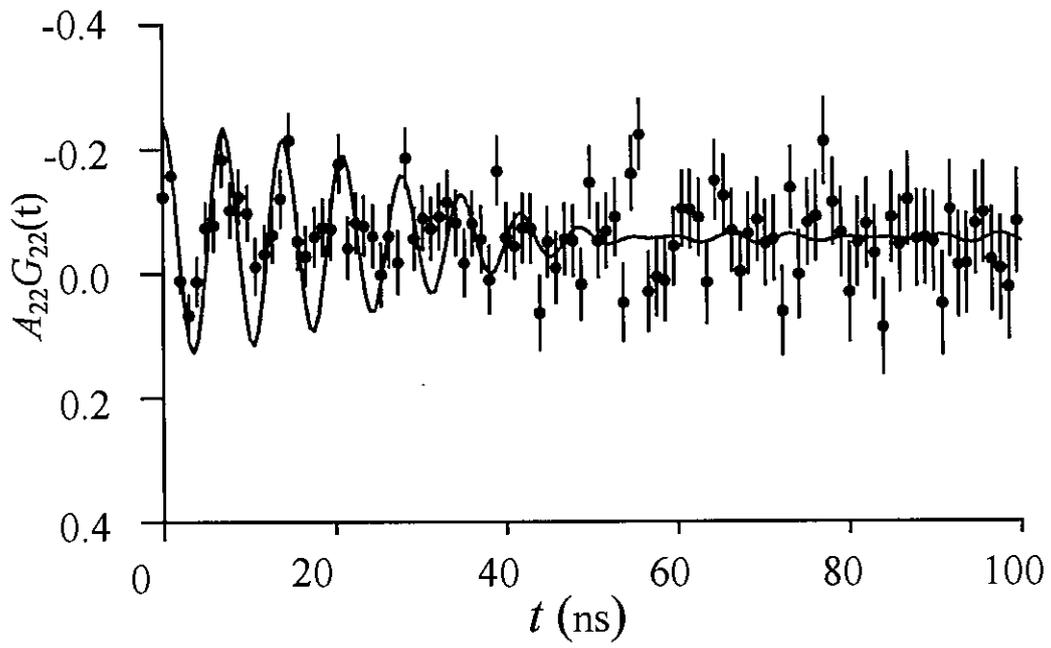


Fig. 3-2 TDPAC spectrum for wild-type mavicyanin (pH 8), (upper) and the Fourier transformed spectrum (bottom)

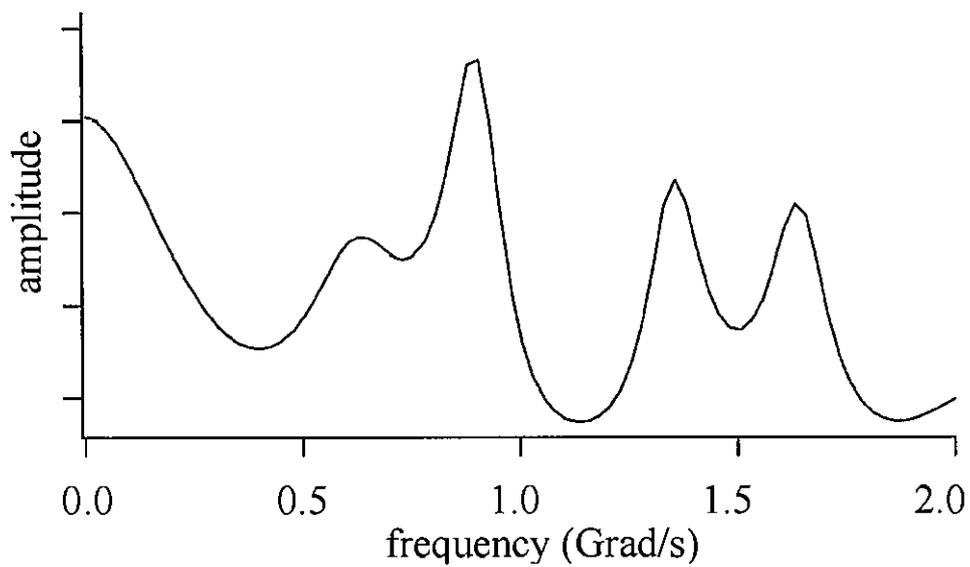
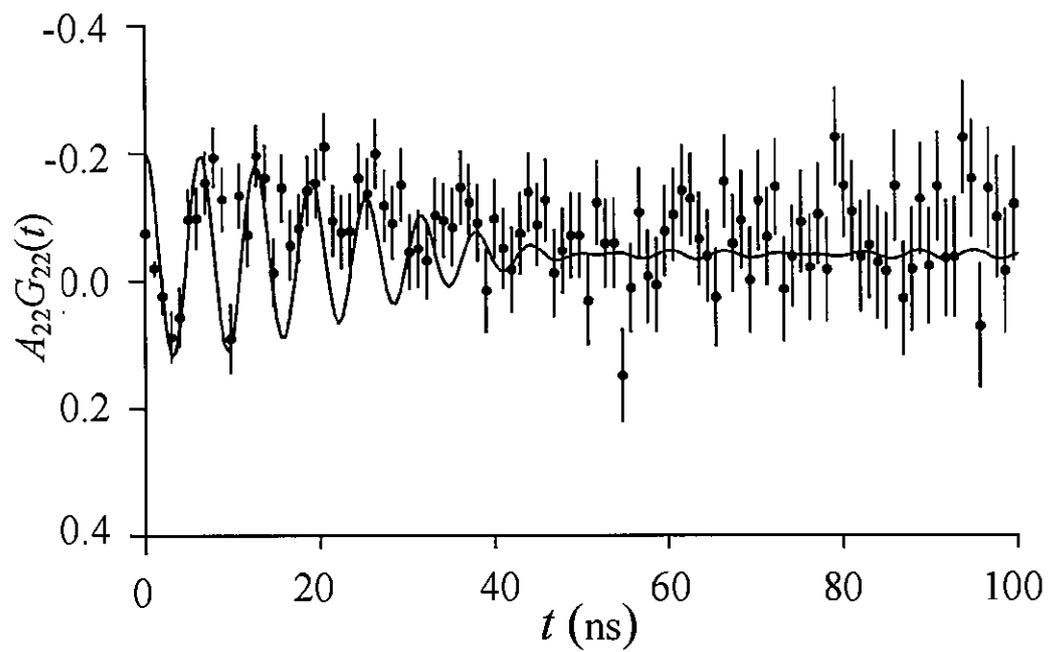


Fig. 3-3 TDPAC spectrum for wild-type mavicyanin (pH7.5), (upper) and the Fourier transformed spectrum (bottom)

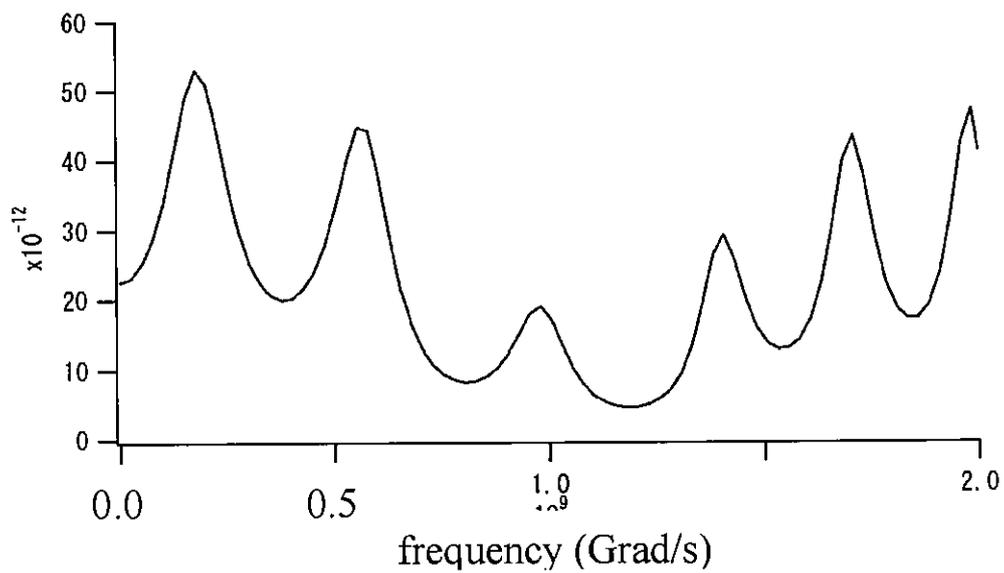
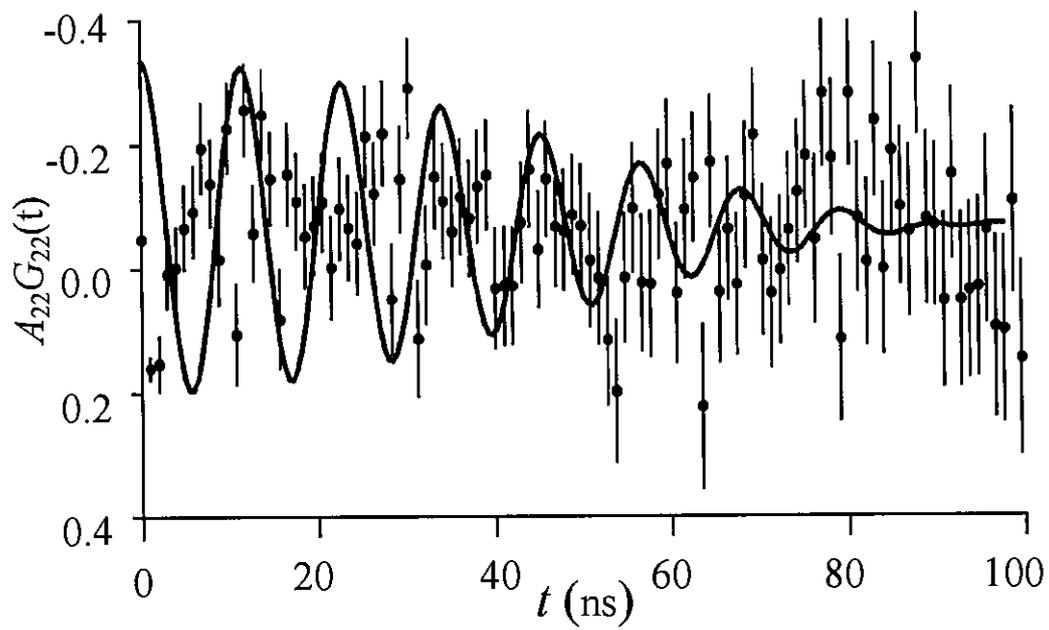
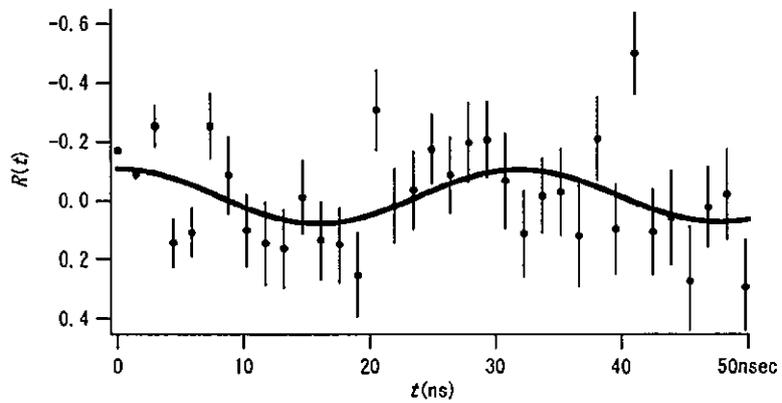
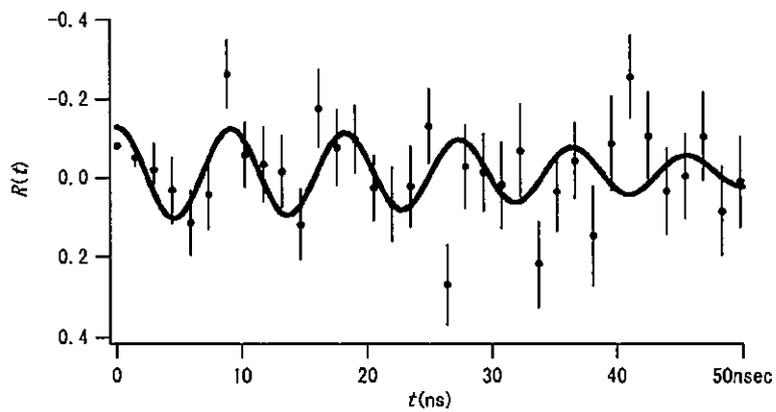


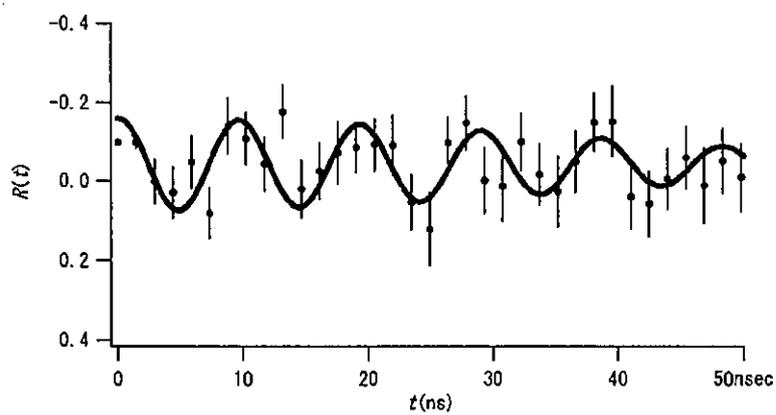
Fig. 3-4 TDPAC spectrum for wild-type mavicyanin (pH 6), (upper) and the Fourier transformed spectrum (bottom)



Thr15Ala-Mav (pH6.0, Cd-117)



Thr15Ala-Mav (pH7.5, Cd-117)



Thr15Ala-Mav (pH8.0, Cd-117)

Fig. 3-5 TDPAC spectra for mutant mavicyanin.

Table 3-1. EFG of mavycyanin and stellacyanin

sample	Electric Quadrupole Frequency $/\text{Mrad}\cdot\text{s}^{-1}$	Electric Field Gradient $/10^{22}\text{ V}\cdot\text{m}^{-2}$
mavycyanin (pH 6)	111	1.48
mavycyanin (pH 7.5)	156	2.08
mavycyanin (pH 8)	142	1.90
stellacyanin		1.71 [12]

$1.71 \times 10^{22} \text{ V} \cdot \text{m}^{-2}$ となり、今回の実験値は近い値となった。このことから本研究で観測した電場勾配はマビシアニンの金属活性位のものであると考えられる。また、pH 6 と 7.5 の間で電場勾配に関して大きな変化が見られた。この電場勾配の変化について、何らかの構造の変化があったと考えられる。

Thr15Ala 変異型マビシアニンの PAC スペクトルに対するフィッティングの結果を図 3-5 に、得られた PAC パラメータを表 3-2 にそれぞれ示す。その結果を同じ pH の野生型の電場勾配値と比較してみると、3 つ全ての pH において、変異型マビシアニンの値が野生型のマビシアニンの値を下回っていることがわかる。PAC 法では、プローブ核に対して周りの原子の距離が近ければ近いほど、得られる電場勾配値は大きくなる。よって、マビシアニンの 15 位のトレオニンがアラニンに置き換わったことにより、銅サイトへ配位している原子が平均的に銅原子から遠のいたことが予測される。ただし、このことは UV-vis スペクトル測定の結果に反映されていない。また、今回の解析にはステラシアニンの非対称パラメータ $\eta = 0.45$ を暫定的に用いた。そのため、配位の角度も変化している可能性もある。しかし、非対称パラメータがそのとり得る範囲 ($0 \leq \eta \leq 1$) を動いても、電場勾配 V_{zz} は 10 パーセント程度しか変動しない。よって、今回の結果は配位原子の、銅部位に対する角度の変化よりも距離の変化を反映しているものと考えられる。UV-vis スペクトル測定では S(Cys)-Cu(II) の電荷移動遷移を測定しているのだが、今回の変異型と野生型とでは UV-vis スペクトルの特性吸収波長はほぼ同じである。よって、変化しているのは S(Cys) 原子以外の配位原子と銅原子の間の距離である可能性が高いと思われる。

(2) 錯体の電場勾配

測定したジチゾン、オキシシン、BPHA、DDC、キナルジン酸錯体、キノリン-8-カルボン酸錯体、クペロンの PAC スペクトルを Fig. 3-6, Fig. 3-7, Fig. 3-8, Fig. 3-9, Fig. 3-10, Fig. 3-11 に示す。また、これらのスペクトルから求めた ω_Q と V_{zz} の値についても Table 3-2 に示す。また、PAC プローブ核に Cd-117 を用いた場合 η を決定することができないので、Cd-111m または In-111 で決定したものをを用いてフィッティングを行った。ジチゾン、オキシシン、BPHA に関しては良いフィッティングが得られたが、DDC のスペクトルに関してはプローブ核を

In-111 にした場合ではあまりよいフィッティングは得られていない。

錯体の電場勾配について、全体の結果から同じ化合物でもプローブ核を変えた場合ではプローブ核が感じている電場勾配が違っているということがわかる。これは中間準位の元素の違いか (Cd-117 の場合はインジウム, In-111, Cd-111m の場合はカドミウム), または壊変による原子核の後遺効果の可能性も考えられる。特に、同じ錯体で Cd-117 をプローブ核として測定した場合、他のプローブ核と比べて同じか、またはより大きい値を示している。一般にインジウムは+3 価をカドミウムは+2 価をとりやすい。壊変後の電子の再配列は数 ns で行われるといわれているので、In-117 の寿命が 77.3 ns あることから、In-117 は再配列を行って、+3 価になることで大きい値を示している可能性がある。

また、測定した錯体の電場勾配値はマビシアニンの電場勾配値に比べるとほとんどは低いものであった。この差はタンパク質中の金属に対する配位の特異性を反映しているのではないかと考えられる。一般に PAC 測定で求められる電場勾配はプローブ核周りについてトータルの電場勾配値を与え、それはプローブ核と周りの原子との距離に依存し、電場勾配値が大きければ大きいほどそのプローブ核に対して周りの距離が近いということを示す。しかし、それは全体的に近づいているのかまたは、ある特定の原子だけが他の配位原子と比べて近くなっているのかは分からない。そこで、理論計算を行うことでどのような場合に電場勾配が大きくなるのかを計算する必要がある。

キナルジン酸錯体とキノリン-8-カルボン酸錯体の、 ^{117}Cd を用いた場合の電場勾配を比較すると、2つの値に間に大きな差があることがわかる。この2つは構造異性体であり、今回の結果は立体障害などによる配位構造の差を表しているのではないかと考える。

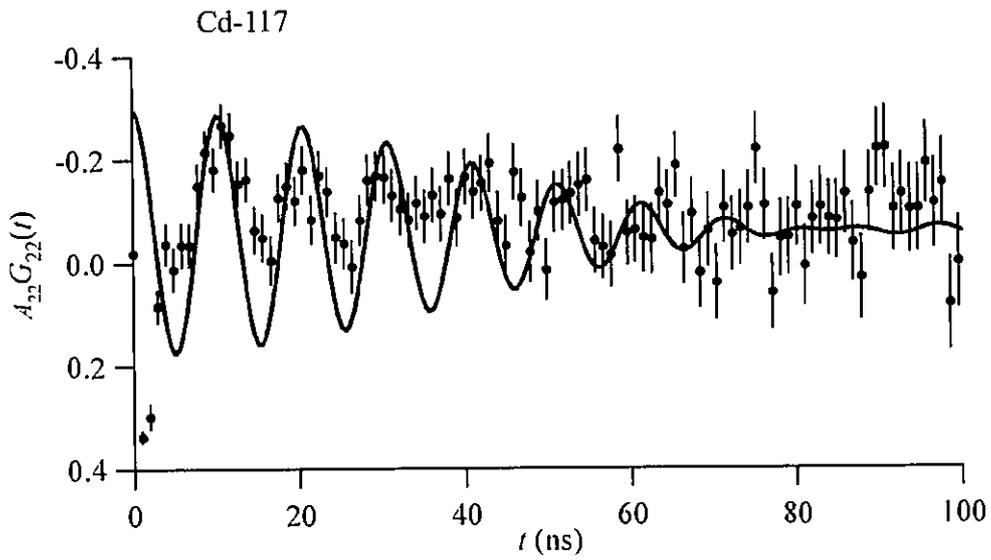
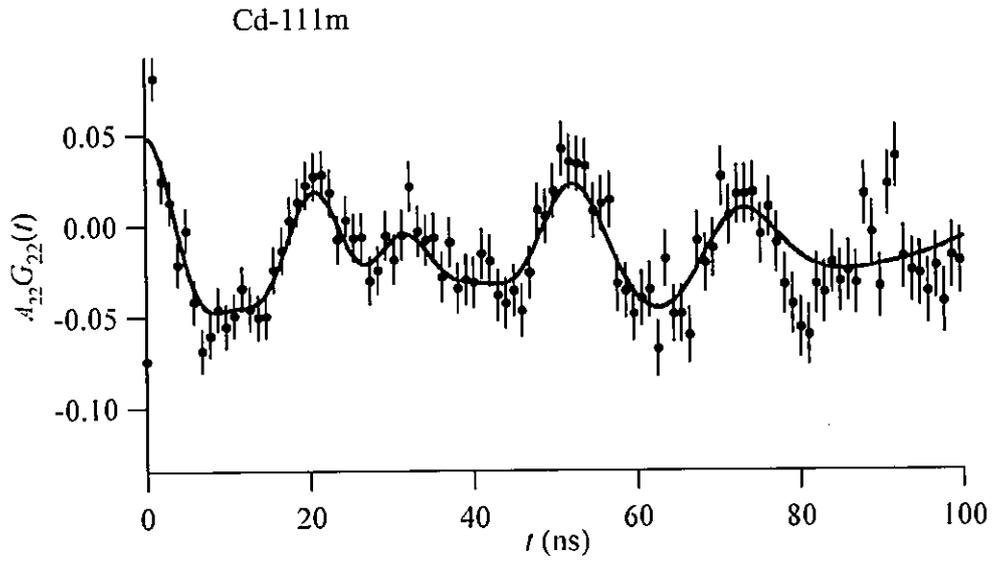


Fig. 3-6 PAC spectra for dithizone

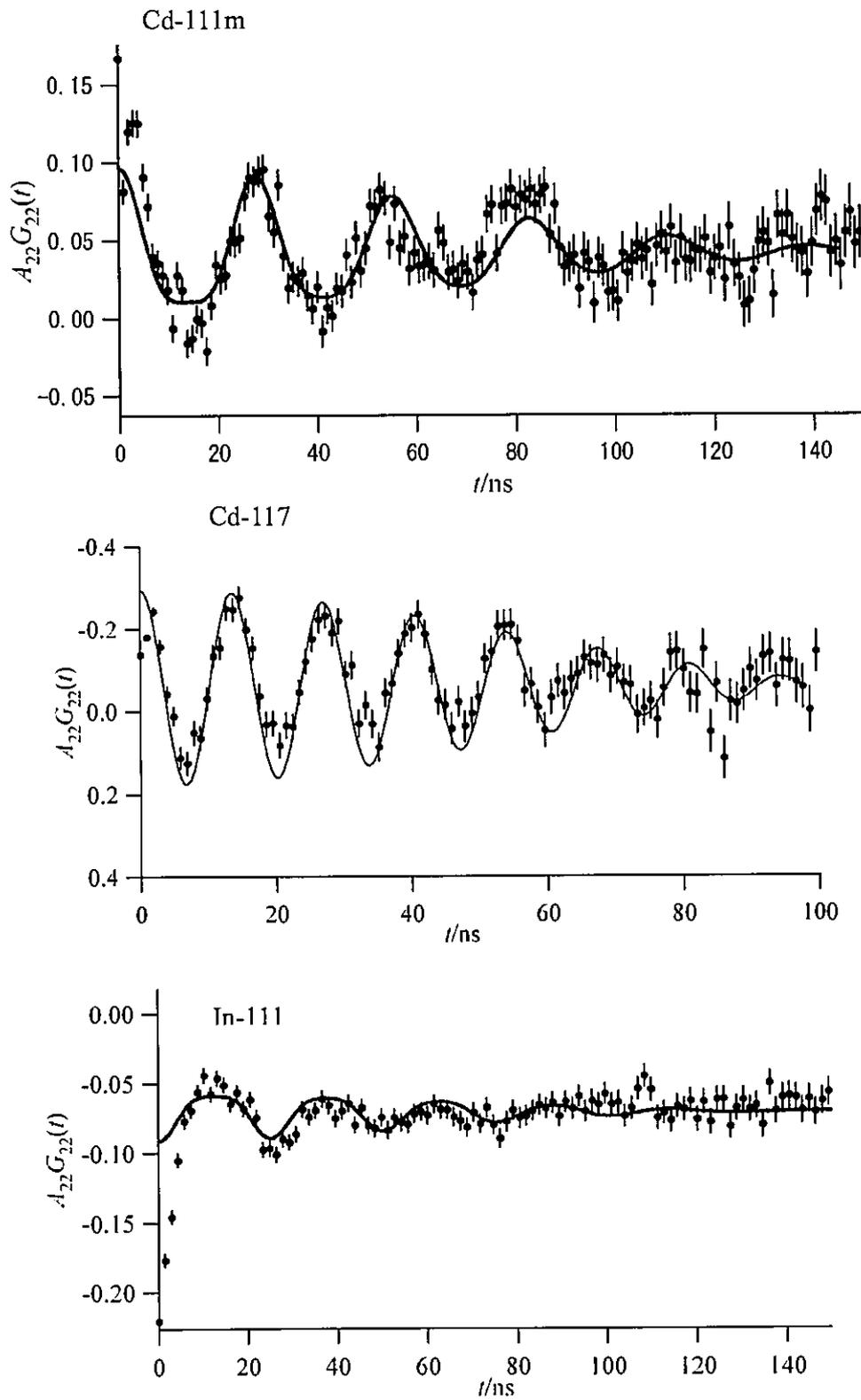


Fig. 3-7 PAC spectra for oxine

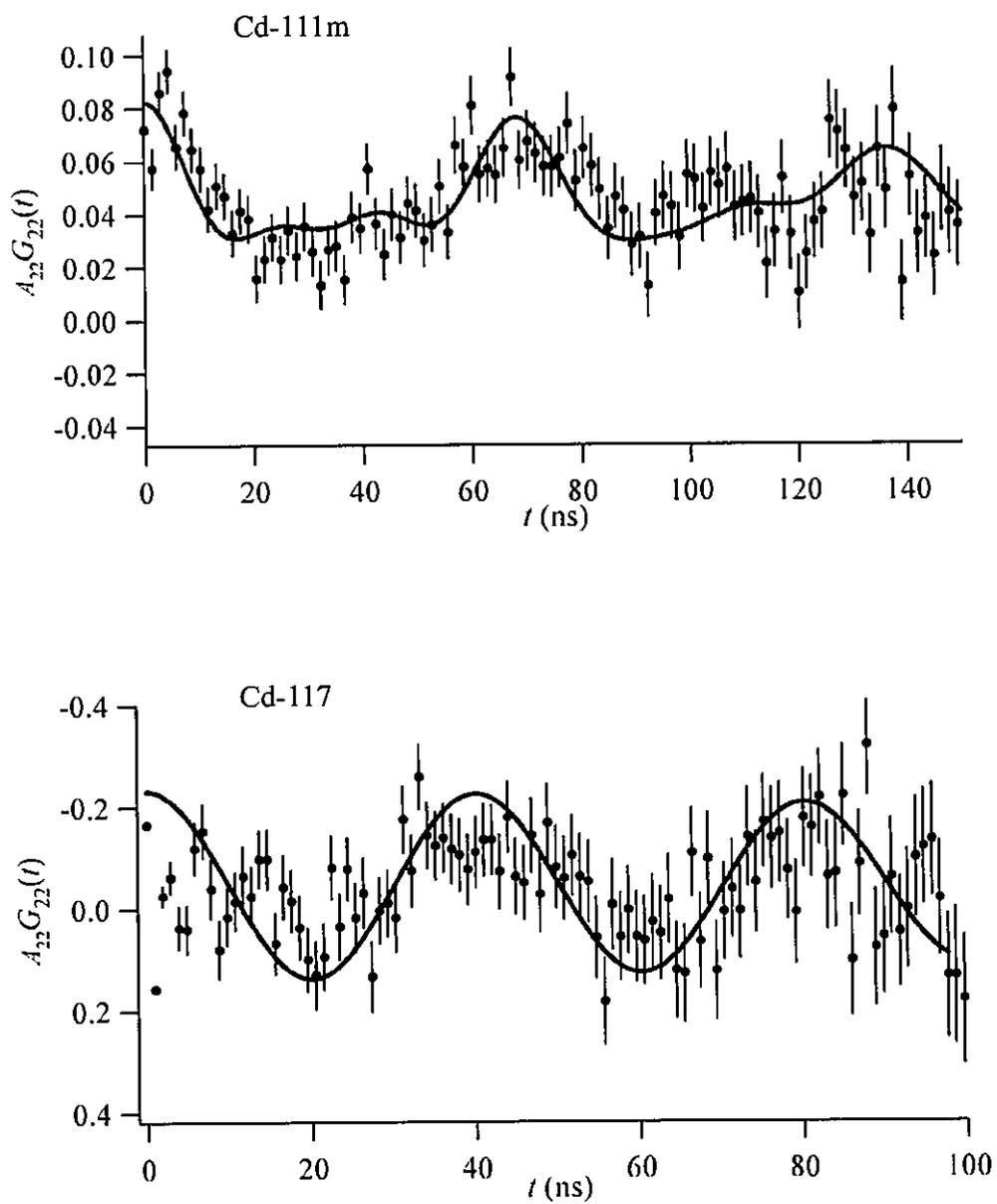


Fig. 3-8 PAC spectra for BPHA

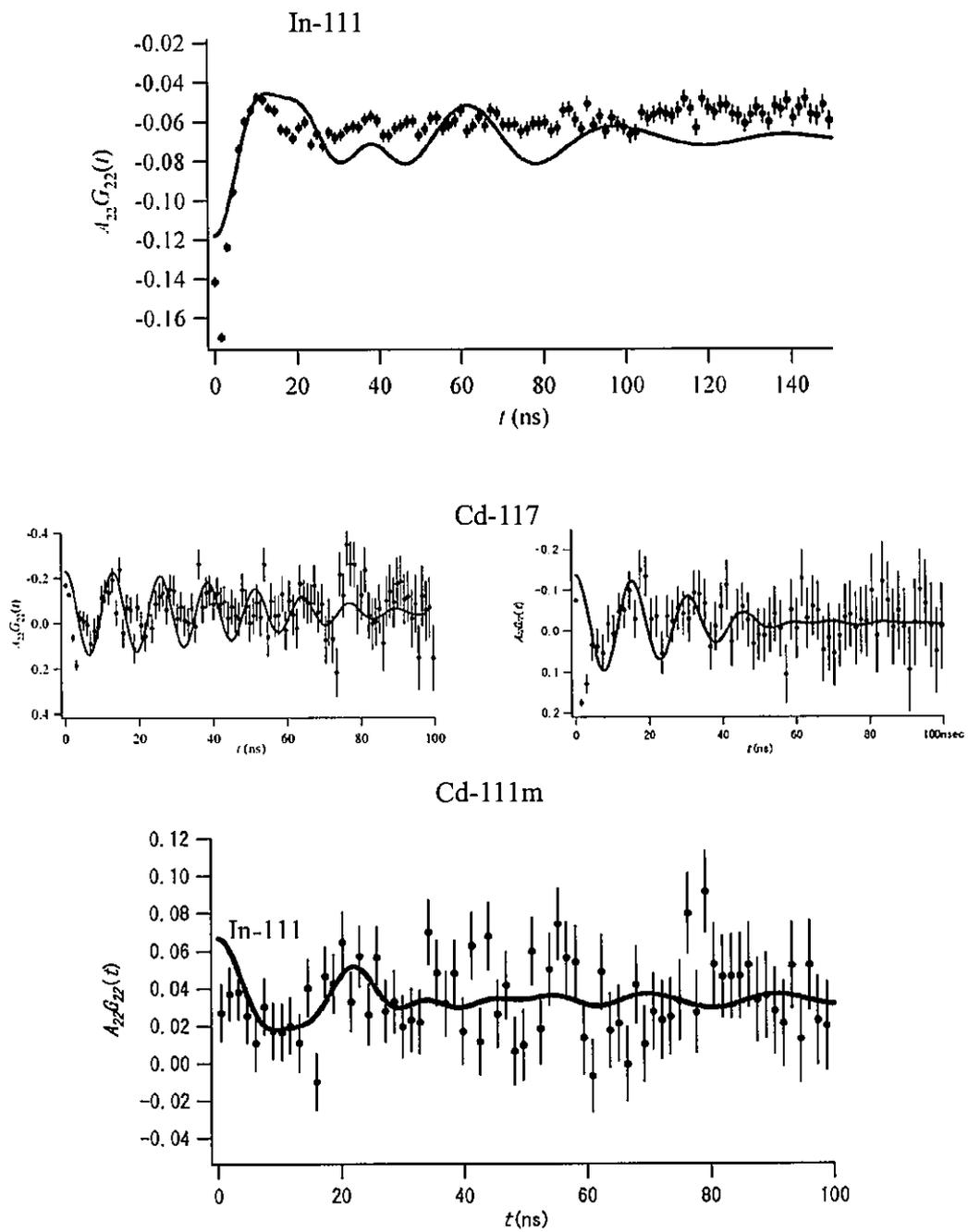
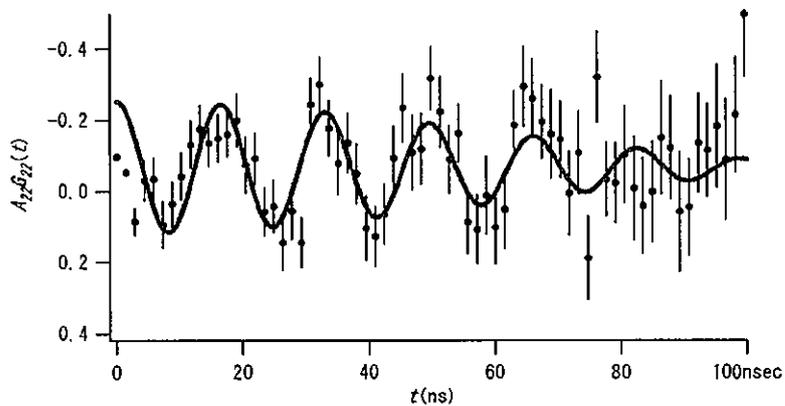
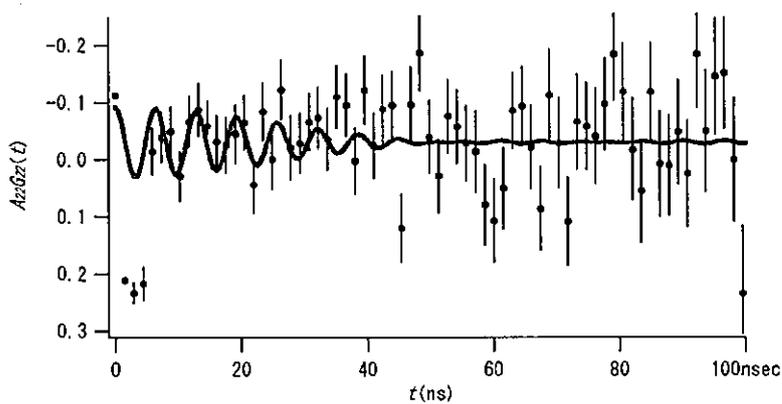


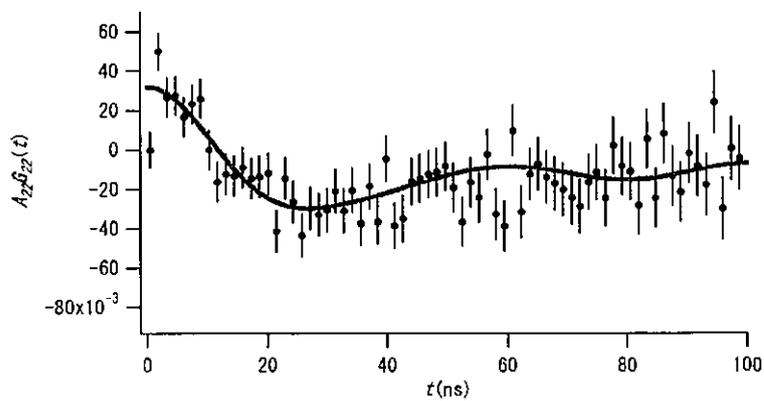
Fig. 3-9 PAC spectra for DDC



quinaldinic acid (Cd-117)

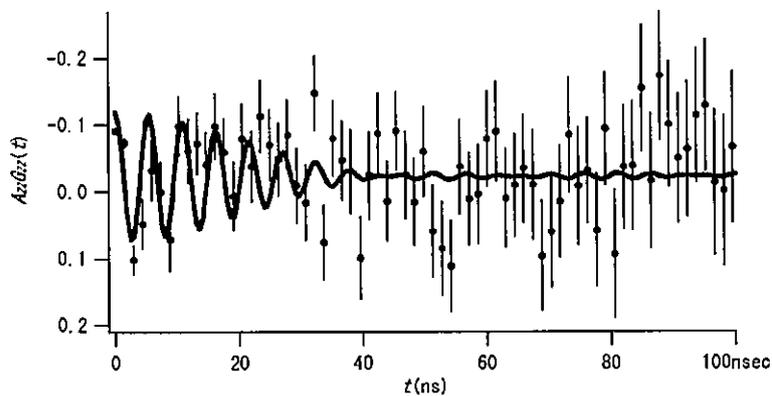


8-quinolinecarboxylic acid (Cd-117)

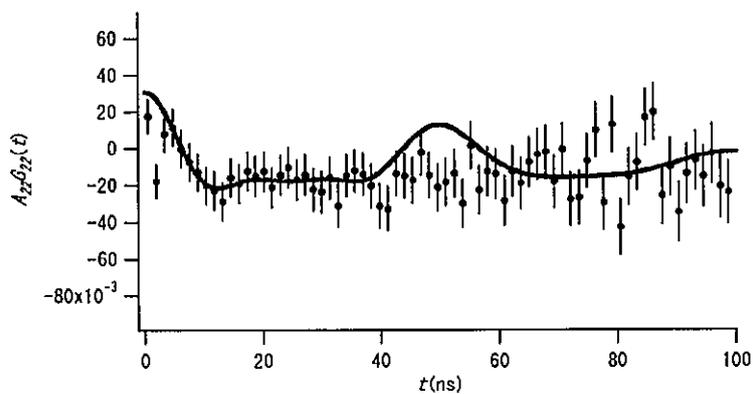


8-quinolinecarboxylic acid (Cd-111m)

Fig. 3-10 PAC spectra for metal complexes.



cupferron (Cd-117)



cupferron (Cd-111m)

Fig. 3-11 PAC spectra for metal complexes.

Table 3-2 EFG in mavicyanin and complexes

Sample	donor atoms of ligand	probe	ω_Q /Mrad·s ⁻¹	η	EFG 10 ²² V·m ⁻²
Wild-type mavicyanin (pH 6)	N, N, O, S	¹¹⁷ Cd	111	0.45	1.48
Wild-type mavicyanin (pH 7.5)		¹¹⁷ Cd	156	0.45	2.08
Wild-type mavicyanin (pH 8)		¹¹⁷ Cd	142	0.45	1.90
Thr15Ala-Mav (pH6)	N, N, O, S	¹¹⁷ Cd	31.8	0.45	0.43
Thr15Ala-Mav (pH7.5)		¹¹⁷ Cd	111	0.45	1.49
Thr15Ala-Mav (pH8)		¹¹⁷ Cd	105	0.45	1.40
dithizone	N, N, S, S	^{111m} Cd	31.1	0.6	1.06
		¹¹⁷ Cd	97.2	0.6	1.30
oxine	N, N, O, O	¹¹¹ In	24.3	0.9	0.83
		^{111m} Cd	24.6	0.9	0.84
		¹¹⁷ Cd	68.7	0.9	0.92
BPHA	O, O, O, O	^{111m} Cd	9.7	0.6	0.33
		¹¹⁷ Cd	24.5	0.6	0.33
DDC	S, S, S, S	¹¹¹ In	21.1	0.5	0.72
		¹¹⁷ Cd	78.3	0.5	1.05
oxine (theoretical value)					2.0
キナルジン酸	N, N, O, O	¹¹⁷ Cd	58.4	0.72	0.78
キノリン-8-カルボン酸	N, N, O, O	¹¹⁷ Cd	154	0.3	2.06
		^{111m} Cd	9.05	0.3	0.31
DDC	S, S, S, S	¹¹⁷ Cd	63.2	0.7	0.85
		^{111m} Cd	27.5	0.7	0.94
クペロン	O, O, O, O	¹¹⁷ Cd	194	0	2.60
		^{111m} Cd	21.7	0	0.74

3-2 電場勾配の理論計算値との比較

電場勾配の算出に関して、手始めに錯体分子モデルとして PAC スペクトルが明確だったオキシシンを選んだ。Cd にオキシシンを配位させた状態で電場勾配を算出した結果を Table 3-2 に示す。その計算の結果、実測値よりも 1.5 倍ほど大きい値となった。この大きな開きは、おそらく計算で最適化された原子間距離や配位角度が実際の結晶構造とずれていることが主な原因と考えられる。しかし、それはプローブ核とその周りの原子との幾何学構造が変化すれば、電場勾配もそれに伴い大きく変化するということである。この強い相関は PAC 法の感度の良さを示すものであり、構造変化に伴い電場勾配が大きく変化する PAC 法の有望性を示唆している。

第4章 結論と今後の展望

本研究により、マビシアニンの電場勾配を測定することができた。しかし、プローブ核に Cd-117 を用いた場合の値ではまだ金属と配位原子がどのように変化しているのかは不明である。よって非対称パラメータを測定できるプローブ核（具体的には In-111, Cd-111m）に変えることで構造変化の様子を測定する必要がある。また、Cd-117 の場合では壊変の前後での原子核の後遺効果の影響も考えられるのでプローブ核を変えて測定することは必要である。

マビシアニンと配位元素が似た錯体の電場勾配値はマビシアニンの電場勾配値に比べるとほとんどはかなり低いものであった。この差はタンパク質中の金属に対する配位の特異性を反映しているのではないかと考えられる。同じ錯体でプローブ核を Cd-117 にした場合と他のプローブ核にした場合とを比べると電場勾配値が大きく与えられる。これは Cd-117 の場合の中間準位元素が In であるためと考えられる。

また、オキシニンについて行った理論計算については、実測値よりも 1.5 倍ほど大きい値となった。この大きな開きは計算で最適化された原子間距離や配位角度が実験事実からずれていることを示しているが、また一方ではプローブ核の周りの原子との幾何学構造と電場勾配との強い相関を示すと考えられる。今後、Cd に対してどの場合に配位しているときに電場勾配が高くなるのかを計算していく必要がある。

今回、マビシアニンの配位原子 (S, N, O) のうちのいずれかを 1 種類、あるいは 2 種類を配位原子として持つ配位子を参考試料として用いたが、配位原子の種類、組み合わせがよりマビシアニンに近い配位子があるならば、それを利用することにより銅タンパク質の銅原子に対する配位の特異性をさらに明らかにできる可能性がある。

また、マビシアニンに取り込む PAC プロブ親核に ^{117}Cd を選択したが、半減期の長い PAC 核種 (例えば ^{111}Ag : 半減期 7.5 日) を利用することができれば、より統計の良いデータが得られる可能性がある。非対称パラメータによる影響を検討するという点でも、PAC 核種を変えて測定を行うことは重要である。

また、Thr15Ala 変異型マビシアニンについての結果は、UV-vis スペクトル測

定の結果に反映されていないものであった。しかし、もしこれが、UV-vis 測定では検出できない何らかの状態の違いを示しているのであれば、金属タンパク質への PAC 法の応用性の拡大が見込めるのではないかと考えられる。

第 5 章 参考文献

- [1] 浅井吉藏, RADIOISOTOPES 42, 25 (1993)
- [2] H. Fraunfelder and R. M. Steffen, “ α -, β -, γ -Ray Spectroscopy” vol. 2, 997 (1964)
- [3] R. Bauer, Q. Rev. Biophys. 18, 1 (1985)
- [4] Kunishige Kataoka, Masami Nakai, Kazuya Yamaguchi and Shinnichiro Suzuki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 250, 409 (1998)
- [5] Yong Xie, Tsuyoshi Inoue, Yoichi Miyamoto, Hiroyoshi Matsumura, Kunishige Kataoka, Kazuya Yamaguchi, Masaki Nojini, Shinnichiro Suzuki and Yasushi Kai, J. Biochem. 137, 455 (2005)
- [6] R. B. Firestone, in Table of Isotopes, 8th ed., edited by V. S. Shirley (Wiley, New York, 1996), Vol. I.
- [7] H. H. Rinneberg, At. Energy Rev. 17, 477 (1979).
- [8] V. Kellö and A. J. Sadlej, Theor. Chim. Acta 91, 353 (1995)
- [9] J. Antony, B. Hansen, L. Hemmingsen, and R. Bauer, J. Phys. Chem. A 104, 6047 (2000)
- [10] M. Hino, “Spectral Analysis”, Asakura, Tokyo, p. 210 (1977).
- [11] J. P. Burg, 37th Annual International Meet. Soc. of Explor. Geophys., Oklahoma City (1967).
- [12] Eva Danielsen, Rogert Bauer, Lars Hemmingsen, Marie-Louise Andersen, Morten J. Bjerrum, Tilman Butz, Wolfgang Tröger, Gerard W. Canters, Carla W. G. Hoitink, Göran Karlsson, Örjan Hansson, and Albrecht Messerschmidt, J. Biol. Chem. 270, 573 (1995).