



Title	EPR法
Author(s)	三野, 広幸
Description	4章 分光測定 2. 分光測定法 d
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 473-481
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39181
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-066.pdf



2. 分光測定法

d. EPR 法

三野 広幸¹⁾

本稿では、はじめに EPR 法の原理を紹介し、次に、X-band 汎用 EPR 機による測定法の使用を想定し、光合成研究への応用例を紹介している。また、最近のより進んだ EPR 測定法についても簡単に紹介している。

EPR spectroscopy for photosynthesis research

Hiroyuki Mino

EPR (Electron paramagnetic resonance) is a powerful method for photosynthetic research. In this chapter, we introduce the principle of the EPR technique and some methods for spin quantization in photosynthetic organisms. Some examples of EPR signals in photosynthetic organisms and recent techniques are introduced.

EPR 法は光合成研究で定量から分子構造の解明まで広く使用される。近年ではパルス法、多周波 EPR 法などの新手法も発展している。EPR 装置といえば一般的には X-band (9 GHz) 帯の連続波 (CW)-EPR 機で、共通機器として広く大学や研究所に装備されている。いくつかの点に注意すれば汎用の分光測定器と同様に簡便に用いることができ、研究の幅をより一層広げられる。本章では、汎用機を使用した測定例を中心に EPR 法を紹介する。

2.d.1 EPR 法の原理¹⁻³⁾

EPR (電子常磁性共鳴) は電子スピンを対象とした磁気共鳴法である。ESR (電子スピン共鳴) とはほぼ同義に用いられる。主な検出対象はラジカル、遷移金属である。核スピンを対象とする NMR (核磁気共鳴) に比べると感度は格段に高いが、光学的分光法に比べるとかなりの高濃度試料が必要で、ラジカル濃度にして 20 μM 以上の濃度が必要である。測定は非破壊的に行うことができ、測定そのものによる損傷はない。精製純度の低いタンパク質などでも目的信号のみを検出できる利点はあるが、それは検出対象が限られるということでもある。

EPR の原理を理解するには基本的に以下の 3 種類のエネルギー分類を知っておけばよい。

1. 電子スピンのゼーマンエネルギー：磁場中で電子スピンの向く方向によって生じるエネルギー差である。(電子スピンを小さな磁石と考えれば理解しやすい。)

エネルギー差は磁場の大きさに比例し、その比例定数を g 因子と呼ぶ。 g 因子は有機ラジカルの場合にはほぼ 2 の値である。 g 因子は分子の形や方向によって異なるため、これを利用して分子構造を知ることができる (図 1)。

2. 核スピンのゼーマンエネルギー：磁場中で核スピンのどちらの方向を向くかによって生じるエネルギー差である。(核スピンを小さな磁石と考えれば理解しやすい。) 電子のゼーマンエネルギー同様、エネルギー差は磁場の大きさに比例し、その比例定数を核の g 因子 (g_n) と呼ぶ。核の g 因子は核の種類により異なる。このエネルギー遷移を NMR 遷移と呼ぶ。

3. 超微細相互作用：電子スピンと核スピンの相互作用である。これは電子磁石と核磁石の磁石間の相互作用と考えればよい。

以上の 1 から 3 によって磁場中で電子スピンのエネルギー準位がわかれ、分裂したエネルギー幅に等しいエネ

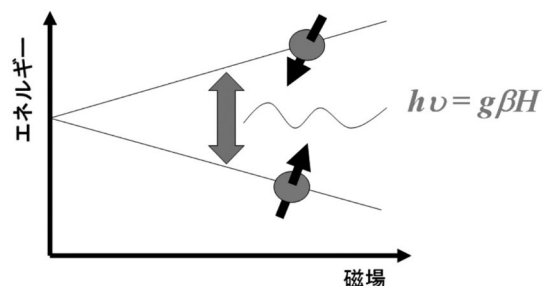


図 1：磁場中におかれた電子スピンはスピンの向きによってエネルギーに差を生じる。これをゼーマン分裂と呼ぶ。エネルギー差は磁場の強さと g 因子で決まる。エネルギー差に対応したマイクロ波をあてると共鳴吸収がおこる。

1) 名古屋大学理学研究科 (物質理学)

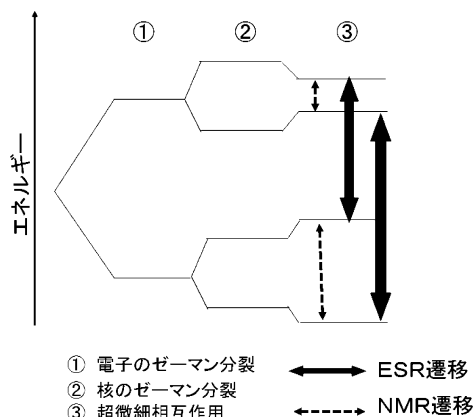


図2：1つの電子スピンと1つの核スピンの場合のエネルギー準位の模式図。ESR遷移とNMR遷移は同時にはおきない。①電子のゼーマン分裂、②核のゼーマン分裂、③超微細相互作用。

ルギーのマイクロ波を加えることにより共鳴吸収がおきる(図2)。EPR遷移とNMR遷移は同時にはおきないため、図2の場合には4準位のうちで2種類のEPR遷移が観測される。信号強度はエネルギー準位間のスピンの数によって決まる。準位を占める状態の数の差が大きければそれだけ大きな信号が得られる。各準位にいるスピンの数はボルツマン分布により決まるため温度が下がれば下の順位にいる数が増え、それだけ大きな信号が得られる(キューリーの法則)。原理的には0℃(273 K)と液体窒素温度(77 K)では信号強度は3.5倍に、液体ヘリウム温度(4.2 K)では65倍になる。このため、定量的な議論をする場合には信号強度への温度の影響を考慮しなければならない。

2.d.2 装置の概要⁴⁾

一般的な9 GHz帯のEPR装置の場合次のような構成をしている。(図3)

1. 外部磁場印加用のマグネット
2. マイクロ波の発振器および信号検出器(マイクロ波ブリッジ)
3. 空洞共振器

EPRの測定では試料を空洞共振器に挿入し測定を行う。空洞共振器は信号感度を決定する最も重要な部分といってもよい。空洞共振器には内部の形状により矩形型、円筒型などの違いがあり、感度、測定条件などがそれぞれ異なる。また、内部のマイクロ波の定在波のモードによってTM型、TE型などがある。汎用には矩形型または円筒型のTE型空洞共振器が使用されることが多い。TM型空洞共振器は水による誘電損失

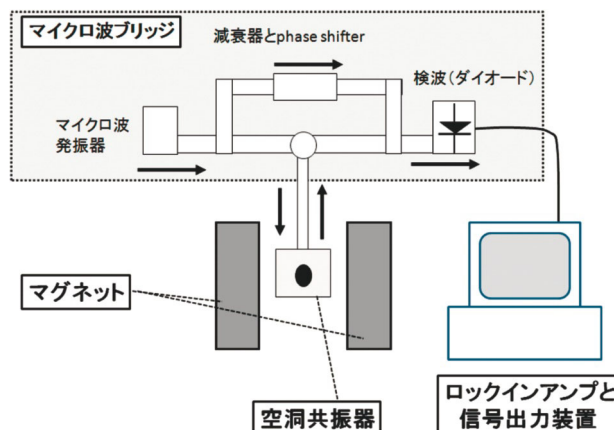


図3：EPR測定装置のブロックダイアグラム

が少ないため溶液系の測定に有利である。どのような空洞共振器を用いているのかは測定前に確認しておいたほうがよい(図4)。通常のEPR測定では変調磁場を用いるが多くの場合、変調コイルは空洞共振器内に装着されている。

4. 信号検波装置と出力装置(コンピューター、レコーダーなど)

信号の検波は通常ロックインアンプを用いて変調磁場に同調させて行う。このためEPRスペクトルは微分形で測定される。

2.d.3 測定法の一般的注意¹⁻⁵⁾

測定は以下の手順に従う、

1. マイクロ波の強度を決定する。
2. 変調磁場の大きさを決定する
3. 外部磁場の掃引範囲を決める。

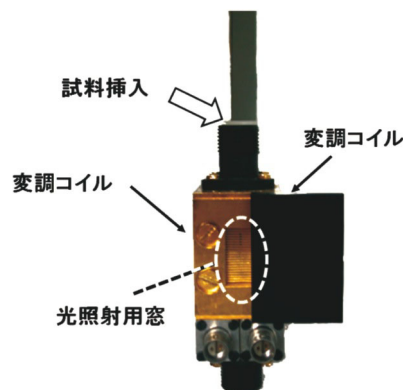


図4：Bruker社製空洞共振器 矩形型TE₁₀₂。正面のカバーをずらしたところ
試料管は共振器上部から挿入する。共振器の正面から光を照射できる。両側には測定用の補助コイルが組み込まれており、変調磁場を加えることができる。

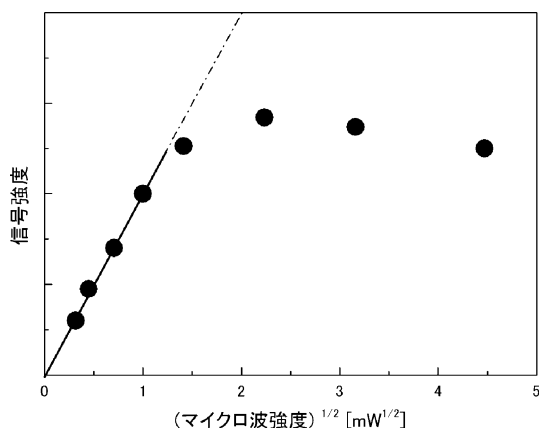


図5：マイクロ波強度と EPR 信号の強度の関係
飽和していない条件では EPR 信号強度はマイクロ波パワーの平方根に比例する。正しい線形のスペクトルを測定するには比例関係のなりたつ範囲で測定を行う。飽和の条件は試料や空洞共振器の種類によって異なる。

4. 外部磁場の掃引時間と信号検出時の時定数を決める。(詳細は各装置の取り扱い説明書を参照されたい。)

以下にそれぞれの注意すべき点を挙げる。

1. マイクロ波の強度

適正な条件では EPR 信号強度はマイクロ波のパワーの 1/2 乗に比例して大きくなる。よって強いマイクロ波の方が観測には有利である。しかし、マイクロ波が強すぎるとこの比例関係がなりたらずスペクトルのひずみを招く。このため初めて観測する信号の場合、マイクロ波パワーを変えて信号強度をグラフにプロットしておく必要がある(図5)。得られたグラフから比例関係の成り立つ範囲を読み取り適正なマイクロ波強度で観測する。マイクロ波のパワーが強くなると信号強度は飽和し、比例関係が成り立たなくなる。飽和特性は温度にも依存するので注意が必要である。低温ほど飽和しやすい。なお、特別な使い方としてグラフの飽和特性からラジカル間の距離などを読み取ることもできる。

2. 変調の大きさ

標準的な EPR の測定の場合信号検出用に外部から 100 kHz 程度の変調磁場を与える。

信号強度は変調磁場に比例して大きくなる。しかし変調磁場が大きくなるとスペクトルのひずみを招く(図6)。このため初めて観測する信号の場合、変調磁場の大きさを変えてスペクトルの形が変わらないことを確認しておく必要がある。適正な変調磁場の大きさは観測したい EPR スペクトル中のピーク分離幅の 1/3~1/4 が目安である。

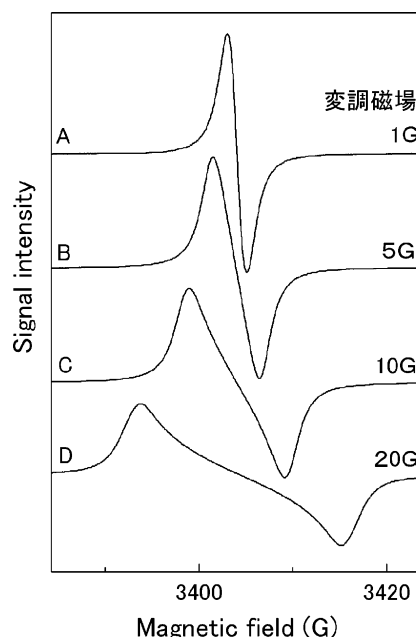


図6：変調磁場の効果

変調磁場を変えて測定した DPPH の EPR 信号。変調磁場を大きくすると信号強度は強くなるが、大きすぎると信号線形がひずみ本来の線形が崩れる。

3. 外部磁場の掃引

有機ラジカルの場合外部磁場の掃引幅は 50~200 G でよい。通常 $g=2$ 周辺に観測される。中心磁場の位置は以下の式が目安になる。

$$[\text{中心磁場(G)}] = [\text{マイクロ波周波数(GHz)}] \times 357$$

4. 掃引速度と時定数

EPR 測定では外部磁場を掃引することにより信号を得る。掃引速度が速いとスペクトルがひずむことがある。初めて信号を観測する対象の場合、掃引速度を変えて測定し、スペクトルが掃引速度によって変わらないことを確認しておく必要がある。

2.d.4 測定温度による測定法の違い

室温測定

通常 EPR 測定では外径 4 mm 内径 3 mm、あるいは外径 5 mm 内径 4 mm の専用の石英試料管を用いる。しかし、室温での測定の場合には誘電損失のため多量に水分を含む試料は測定できない。このため測定には平型試料管を用いる(図7)。平型試料管中の試料体積は数 μl である。測定を簡便に行うなら、ガラス製毛细管を用いてもよい。ガラス製毛细管の場合廉価で手軽に測定ができるが、ガラスに不純物が含まれるためバックグラウンド信号がでることに注意が必要である。ガラス製毛细管の場合

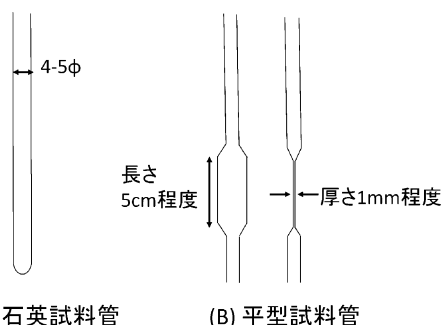


図7：EPR 試料管の形状。(A) 通常のもの。(B) 溶液測定用の平型試料管の形状。

50 μ l (外径 1.5 mm 程度) のものが使いやすい。100 μ l の毛細管でも測定は可能であるが、水分量が増えることにより信号の感度が落ちる場合がある。また空洞共振器の中の感度の実効長は 1 cm 程度であるが、スピン定量を行う場合には余裕をみて 2 cm 長程度いれておき共振器の中心位置に据える。

凍結状態での測定

試料は外径 4 mm 内径 3 mm、あるいは外径 5 mm 内径 4 mm の専用の石英試料管に入れる。

試料体積は 150 μ l 程度、濃度は 20 μ M 以上が目安である。

液体窒素温度 (77 K) での測定：

液体窒素測定には専用のデュワーが市販されている (図8)。液体窒素を継ぎ足すことなく 1 時間程度の観測ができるが、使用頻度により 3 か月から 1 年で真空度が低下するので定期的に真空を引きなおす必要がある。液体窒素の沸騰による試料管の振動を避けるため、デュワーの底にグリセロールを 1 滴たらしておくと沸石がわりになる。あるいは、液体窒素をいれた状態でデュワー内を減圧することにより沸騰はおさまる。

極低温から室温での測定：

低温での測定のために Oxford 社などから、専用の測定ユニットが市販されている。1.5–300 K での測定が可能である。77 K から室温までの制御ユニットは各 EPR メーカーで市販されている。77 K 以下の極低温の場合には専用ユニットを使う必要がある。それより高温は、ヒーターなどで液体窒素容器から発生させた低温の窒素ガスを石英製二重管中の試料に吹き付ける簡便な方法で得られる。

酸素分子の影響：

酸素分子は常磁性種であるためバックグラウンド信号となる。特に極低温の場合、固体酸素となり試料管下部に蓄積するため、より影響が大きい。真空ポンプで試料管を引いた状態でバーナーによって封じるのが最もよい方

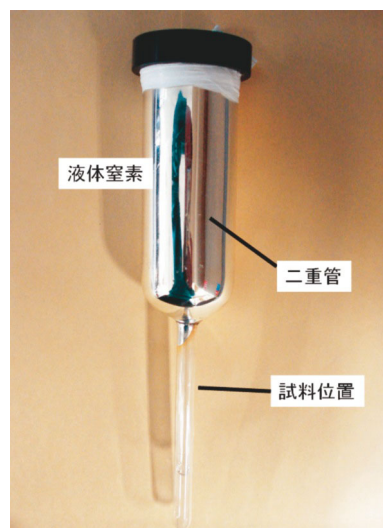


図8：液体窒素温度での EPR 測定専用デュワー。空洞共振器に挿入して使用する。

法であるが、測定前に試料管中の空気を窒素やアルゴンガスによって置換して封じてもよい。あるいはゴムのキャップを用いて封じてもよい。バーナーで試料管を封じた場合には、ひび割れなどで試料管中に液体窒素がたまりこみ、室温にあげた際に爆発することがあるので注意が必要である。

2.d.5 EPR 法を用いた分子数の定量法

スピン $S=1/2$ をもつ分子の EPR 信号は同じスピン数なら信号の線形によらず積分強度は一定となる。通常の有機ラジカルはスピン $S=1/2$ である。これを利用してタンパク量を定量できる。(EPR で観測される信号はスピン $S=1/2$ だけではない点に注意が必要である。たとえば三重項の場合スピン $S=1$ 、 Mn^{2+} の場合スピン $S=5/2$ である。)

光化学系 II のスピン定量^{6,7)}

[実験方法]

光化学系 II のチロシン D' は安定なラジカル状態で存在する。このためチロシン D' を定量することによって光化学系 II の反応中心数を定量することができる (図9)。

定量にはチラコイド膜または、精製した光化学系 II 粒子を用いる。細胞のままでも不純物からのラジカル信号がなければ計測は可能である。ここでは精製した BBY 粒子からの場合を例に示す。測定は凍結状態で行う。

1. 標準試料を用意する。スピンラベル試薬である TEMPO を水に溶かし適当な濃度に調整しておく。ス

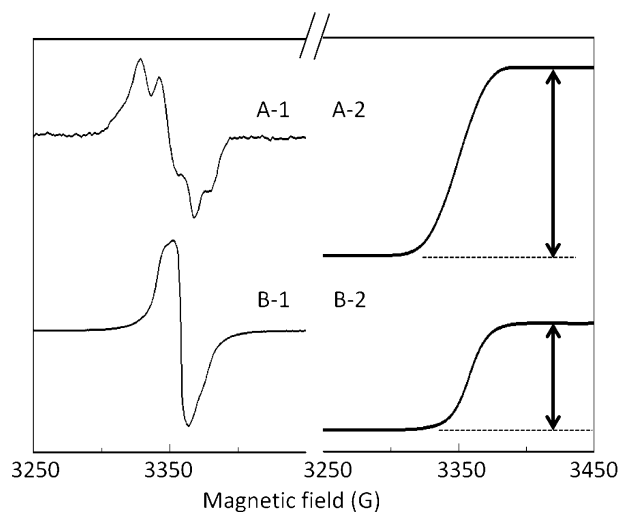


図9：(A-1) 光化学系II由来のクロロシン D[•] ラジカルの EPR 信号 (B-1) TEMPO 水溶液の EPR 信号。測定は凍結状態でを行った。定量のためには比較試料も同じ測定条件で測定するのが望ましい。(A-2, B-2)クロロシン D[•] ラジカル, TEMPO ラジカルの EPR 信号をそれぞれ二重積分したもの。二重積分の強度比からスピンを定量する。

ピンラベル試薬は劣化する場合があるので注意して保存しておく。

2. BBY 粒子を 4-6 mgChl/ml の濃度に調整し、クロロフィル濃度を定量しておく。
3. 試料を EPR 試料管に移す。試料長は 1 cm 以下 (100 μ l 程度) にしておく
4. 0 °C で試料に 10 秒～1 分間光照射を行う。

この操作により還元されていたクロロシン D も酸化され、すべてのクロロシン D が酸化型になる。

5. 光照射後数秒程度おいてから暗状態で液体窒素中に移し凍結する。
6. 77-100 K 程度の温度でクロロシン D[•] の信号を測定する。

測定条件の目安は、マイクロ波強度：0.05 mW 変調磁場 4 G 磁場掃引幅 200 G 掃引時間 30 秒

7. 得られたスペクトルを二重積分し、積分強度を得る。積分操作のためにはベースラインをあらかじめ引いておく必要がある。

ベースラインはクロロシン D[•] 信号の存在していない両端の位置から 1 次,あるいは 2, 3 次程度でのフィッティングを行う。1 回目の積分後にもベースラインはひずむため、再度ベースラインを引き算してから積分する。

8. TEMPO ラジカルを標準試料として全く同じ条件で測定する。
9. TEMP ラジカルで得られたスペクトルを二重積分

し、積分強度を得る。

10. チロシン D[•] と TEMPO ラジカルで得られた積分値を比較しその比からチロシン D[•] のスピンを求める。(図 9)

この方法によりクロロフィル定量から求められたクロロフィルの分子量とチロシン D[•] との比は 210-230 になる。

注意：EPR の測定条件が異なる信号の積分値を比較するには変調、マイクロ波強度、横軸のデータポイント数、温度、磁場掃引幅を考慮する必要がある。特にデータポイントが異なる場合二重積分後の値はデータポイント比の二乗に比例することに注意が必要である。煩雑な計算を避けるため、標準試料はすべて同じ条件で測定するのが望ましい。

光化学系 I の定量^{6,7)}

光化学系 I の量は反応中心クロロフィル P 700⁺ を定量することによって得られる。

測定法は光化学系 II のクロロシン D[•] に準ずる。

P 700⁺ は光化学系 I 粒子に 10 mM のフェリシアン化カリウムを加えることにより得るか、低温下で光照射することにより得る。反応中心すべてに十分光照射されていることに注意が必要である。光合成バクテリアの反応中心の定量もこれに準ずる。

PSI/PSII 比の算出⁷⁾

クロロシン D[•] と P 700⁺ のラジカル量比から PSI/PSII 比を求めることができる。PSI/PSII 比のみの算出の場合、TEMPO などの標準試料は必要としない。(図 10)

1. チロシン D[•] 信号を測定する。(光化学系 II の測定法参照)
2. 同じ試料を低温下で (200 K 以上で) 十分光照射し P 700⁺ をつくる。

フェリシアンナイドを 10 mM になるように加えてもよい。

200 K 以下で光照射すると、光化学系 II 由来の Chl_z⁺ が同時に酸化蓄積されるので、注意する。

3. P 700⁺ とクロロシン D[•] の重なった信号から予め測定しておいたクロロシン D[•] の信号を引き算し P 700⁺ のみの信号を得る。
4. チロシン D[•], P 700⁺ それぞれの信号を二重積分し得られた値から PSI/PSII 比を得る。

Mn²⁺ イオンの含有量の定量⁸⁾

植物の葉を直接 EPR で測定した場合 Mn²⁺ の信号が観測されることがある。これは液胞に含まれている Mn²⁺ と考えられる。酸素発生系マンガングラスター由

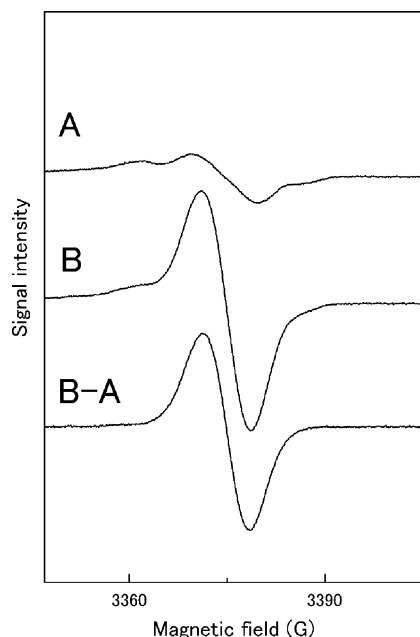


図 10：クロロプラスト標品での測定例。A：光化学系II由来のチロシン D[•] の信号。B：200 K 照射下での信号。B-A：引き算により得られた P 700⁺ の信号。測定は凍結状態で行った。

来のマングンの EPR 信号は室温では観測されない。しかし酸素発生系を酸により破壊すると酸素発生系のマンガンは Mn^{2+} イオンとして溶出する。これを利用して Mn^{2+} 量 (光化学系 II の量) を求めることができる。以下はチラコイドまたは BBY タイプ PSII 標品での測定例である。(図 11)

1. 試料を 1 ml のチューブに移し体積の 1/10 量の硝酸を加える。この操作により光化学系 II に含有されるマンガンクラスターが壊れ Mn^{2+} となり溶液中に溶出する。
2. $18,000 \times g$ 5 分程度で遠心分離する。
3. 上澄みを $25 \mu\text{l}$ の毛細管中に吸引し、真空グリースなどで毛細管の両端をふさぐ。
サンプル量は十分長くとり (2~3 cm)。
4. EPR 測定用試料管中 (内径 3 mm 外径 4 mm, あるいは内径 4 mm 外径 5 mm のもの) この毛細管をいれ、空洞共振器の中央におき測定を行う。
EPR の測定条件例：室温, 変調 20 G, マイクロ波パワー 1 mW, 磁場掃引幅 1000 G, Mn^{2+} 由来の 6 本の EPR 信号線が観測できる。
5. 濃度既知の MnCl_2 水溶液を同じ $25 \mu\text{l}$ 毛細管に同量とる。
6. 試料と同じ条件で MnCl_2 水溶液を測定する。
7. 試料中の Mn^{2+} の信号強度と MnCl_2 水溶液中の

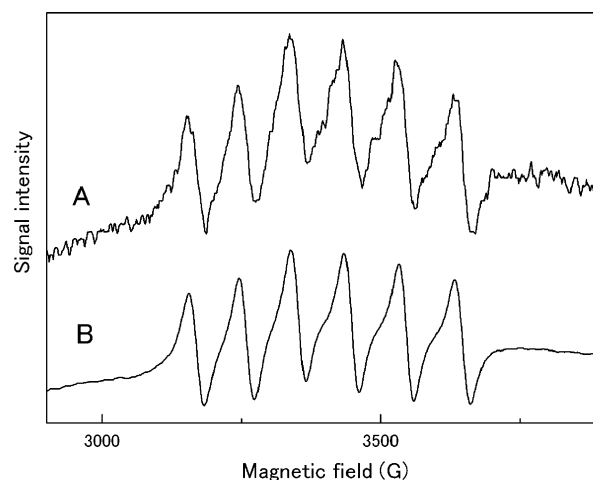


図 11：(A)：クロロプラストから抽出した Mn^{2+} イオンの EPR 信号 (B)： MnCl_2 水溶液中の Mn^{2+} イオンの EPR 信号。強度比から Mn^{2+} を定量する。

Mn^{2+} の信号強度を比較する。

8. 信号強度比から Mn^{2+} のスピン量を求める。

活性な酸素発生系を光化学系 II あたり 4 個の Mn^{2+} が析出する。

(注：必ずしも遠心分離の必要はないが、これを行わない場合測定中に固体成分が毛細管の下部へ沈降し、感度や周波数などの測定条件が変わる場合がある)

in vivo での葉の EPR 測定

植物の葉を直接測定する場合、葉を適当な大きさに切断して石英 EPR 試料管に挿入すればよい。多くの場合 Mn^{2+} や由来不明のフリーラジカルが観測されるが、若い葉や植物種によっては Mn^{2+} が観測されずチロシン D[•] のみ信号が観測できる場合がある。また、空洞共振器内への照射によって P 700⁺ を観測することもできる。シアノバクテリアの場合、細胞のままでは不純物由来の EPR 信号が大きく大抵の場合観測は困難であるが、条件や種によっては不純物ラジカル由来の EPR 信号が全くでない試料もある。

2.d.6 EPR 法による光合成反応中心の信号

マンガンクラスターの EPR 信号⁹⁻¹⁴⁾

酸素発生系由来の EPR 信号は極低温でのみ測定できる。これまでに S_0 , S_1 , S_2 , S_3 状態の EPR 信号が観測されているが、通常観測できるのは S_0 , S_2 状態のみである (図 12)。特に S_2 状態に由来する S_2 マルチライン信号は、その発見以来 EPR 法における酸素発生系の構造研究や、 S 状態のモニターに使われてきた。 S_2 状態は 200 K での照射で生成される。通常 $g=2$ を中心に 80-90 G

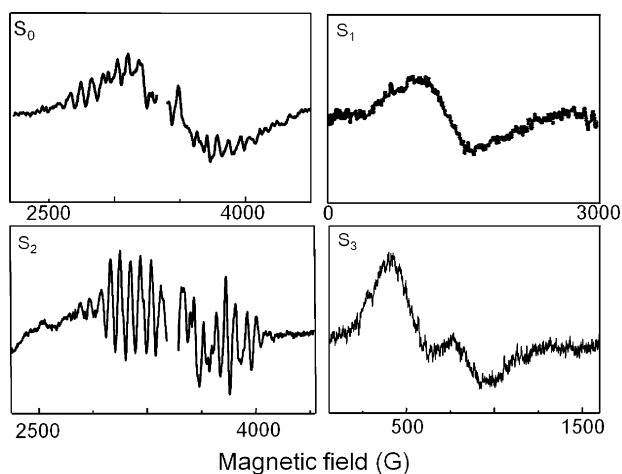


図 12：酸素発生系マンガンクラスターの信号
S₂ 信号が最も広く研究には用いられている。S₁, S₃ 信号は bimodal 空洞共振器によって測定。

間隔で 18-20 本からなる EPR 信号が観測される。この S₂ マルチライン信号と同時に $g=4$ 付近にも S₂ 状態由来の信号が観測される。アルコール類の添加で $g=4$ 信号は消失する。140 K での照射で大きな $g=4$ 信号が観測されるが、200 K に温度を上げてアニールすると S₂ マルチライン信号と強度を交換して $g=4$ 信号は小さくなる。S₂ マルチライン信号は Ca²⁺ 除去や NH₄ イオンの添加により線の本数が増える。Cl⁻ イオンを除去すると S₂ マルチラインは観測されず $g=4$ 信号のみが観測される。

BBY タイプの光化学系 II での観測では、試料濃度は 10 mgChl/ml (タンパク質濃度で 50 μ M 程度)、変調は 20 G、マイクロ波強度は 0.2 mW が目安となる。10 K 以上では観測できない。

FeQ_A⁻ 信号

光化学系 II の電子受容体 Q_A⁻ は、近傍の非ヘム鉄との

相互作用により幅の広い信号として観測される。また、この信号は鉄との相互作用のために有機ラジカルに比べて飽和しにくい (図 5)。そのため強いマイクロ波パワー (100 mW 程度) にして他の磁性種の EPR 信号を飽和させる条件下で測定すると観測しやすい。Fe を Zn などに置換すると Q_A⁻ のみの一般的な有機ラジカル信号を観測できる。紅色バクテリアでも同様である。

クロロフィル信号⁶⁾

クロロフィル由来の信号としては、光化学系 II の反応中心 P 680⁺, Chl₂ 光化学系 I の反応中心 P 700⁺, バクテリアの反応中心 P 840⁺ などがある。P 680⁺ 以外は 10 mM 程度のフェリシアナイド添加,あるいは凍結状態での光照射により安定なラジカルとして観測できる。正しい信号線形を得るためには小さな変調磁場 (2-3 G) での測定を行う。P 680⁺ はすぐに還元されてしまうので時間分解 EPR 法によってのみ観測できる。

トリプレット信号の測定¹⁵⁾

電子受容体が還元された状態の光合成反応中心を光照射すると、反応中心クロロフィルのトリプレットが形成され、EPR で観測できる。II 型反応中心では電子受容体キノンの二重還元,あるいは除去によって観測できる。光化学系 II 反応中心タンパク質を 4.2 K で連続光照射して出来た ³P 680 の EPR 信号を図 13(A) に示す。

2.d.7 時間分解 EPR

磁場を固定して EPR 信号強度の時間変化を測定すればラジカル信号の生成消滅をモニターできる。レーザー照射と同期して測定をはじめればよい。ただし、時間分解能は変調磁場の周波数で制限される。(100 kHz 変調では 10 μ s 程度より早い時間変化は測れない)。より高速での時間分解測定では、変調磁場をかけずデジタルオ

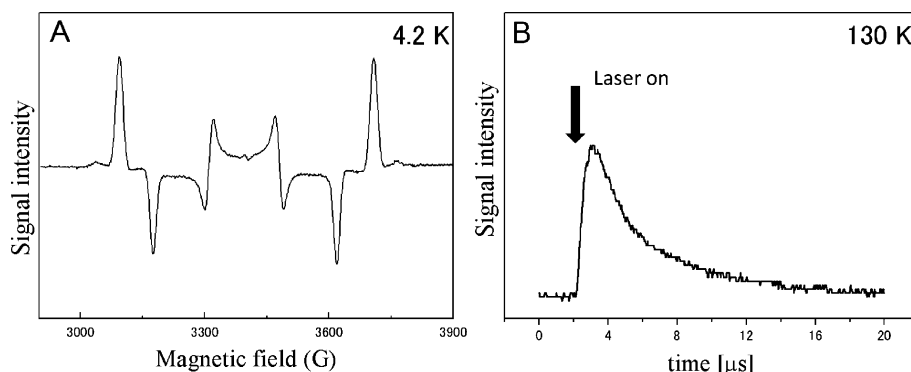


図 13：³P 680 の EPR スペクトル (左) 4.2 K 定常光照射下での磁場掃引スペクトル (右) 130 K でのレーザー同期による ³P 680 の時間分解 EPR スペクトル。右の場合変調磁場は用いていない。

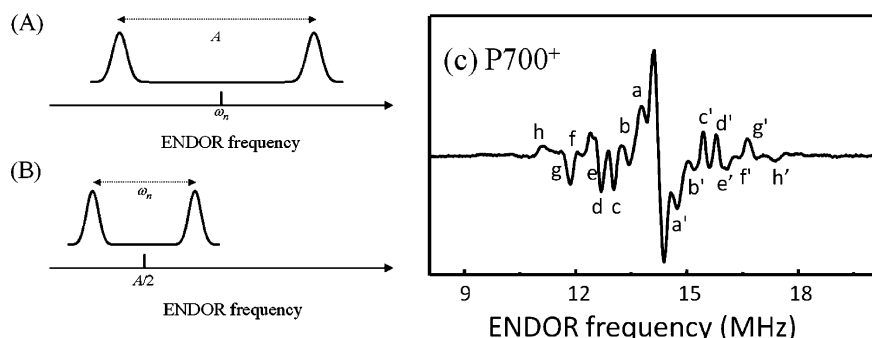


図 14: (A, B) ENDOR の信号パターン (A) 核ゼーマン ω_n が超微細相互作用 A の $1/2$ より大きい場合 (B) 核ゼーマン ω_n が超微細相互作用 A の $1/2$ より小さい場合 (C) 光化学系 I 反応中心クロロフィル $P700^+$ の ENDOR 信号. 信号パターン (A) に対応して, 左右対称な信号となる.

シロスコープなどに直接信号を出す. この場合, 信号は微分形ではなく積分形(吸収形)で検出される. 図 13(B) に 3P680 の時間分解 EPR を示す.

2.d.8 パルス EPR 法による光合成反応中心の信号測定

パルス EPR 法や多周波 EPR 法が光合成反応中心タンパク質の研究では盛んにすすめられている. これらの手法は分子構造の解析や, ラジカル間の距離測定に威力を発揮する. ここでは ENDOR, ESEEM, 多周波数 EPR について簡単に紹介しておく.

ENDOR 法と ESEEM 法

ENDOR (電子核二重共鳴) 法はマイクロ波による EPR 遷移とラジオ波による NMR 遷移を同時におこすことによって超微細相互作用 (図 2) を検出する方法である. EPR の強度で NMR の分解能を実現することができ, 分子上の電子スピン密度, プロトン位置などについての情報が得られる. ENDOR の信号パターンには次の 2 通りがある.

(A) 核ゼーマン相互作用が超微細相互作用の $1/2$ より小さな場合 (図 14(A)). 有機ラジカルにおいてプロトンの信号を ENDOR で観測する場合 (A) のパターンになる. 図 14(C) は光化学系 I の反応中心クロロフィル $P700^+$ のプロトン ENDOR 信号である. プロトンの共鳴周波数 (14-15 MHz) を中心に左右対称な 1 対の信号となる. 分離幅の大きさが超微細相互作用の大きさになる. これに対して (B) 核ゼーマン相互作用が超微細相互作用の $1/2$ よりより大きな場合には図 14(B) のようなパターンになる. 超微細相互作用の $1/2$ の周波数を中心に核ゼーマン相互作用の大きさで 1 対の信号が観測できる. マンガン核のように核のゼーマン相互作用が小さな核に対する ENDOR 信号はこのパターンになる.

ENDOR 法は観測条件が厳しく, 信号を観測できるかどうかは実際に測定してみないと予想できないという難点が普及を妨げてきた. しかし, 最新のパルス ENDOR 法を使えばスピンエコー信号が検出されれば原理的には観測可能で, 状況は大きく改善されている.

ESEEM (電子スピンエコー変調) 法はパルス ESR 法の手法の一つである. 図 15(A) に 2 パルスでの ESEEM の例を示す. 時間間隔 τ でマイクロ波パルスを磁場中をかけると τ 時間後にスピンエコー信号が観測される. 時間間隔 τ を変化させると超微細相互作用によってスピンエコー信号の強度が変調を受ける. 図 15(B) に光化学系 I 反応中心 $P700^+$ の 2 パルス ESEEM 信号を示す.

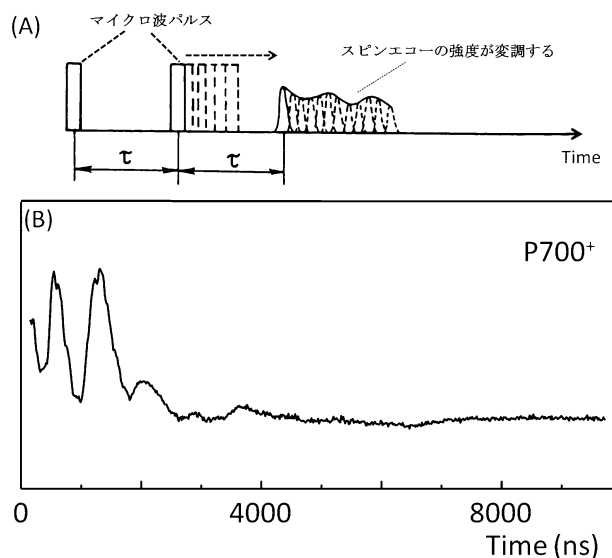


図 15: (A) 2 パルス ESEEM の測定法. 2 つのマイクロ波パルスを時間間隔 τ でかけると, τ 時間後にスピンエコー信号が観測される. τ を変えると, 超微細相互作用に由来する変調効果がスピンエコー強度に現れる. (B) 2 パルス法により測定した $P700^+$ の ESEEM スペクトル. 図中の振動パターンはクロロフィルの Mg に配位している窒素核の NMR に由来する. 解析の際には時間変化スペクトルをフーリエ変換する.

変調は主にクロロフィルのマグネシウムに配位している窒素核に由来している。時間変化のスペクトルはフーリエ変換によって周波数軸になおして解析を行う。ENDOR がプロトンなど g_n 因子が比較的大きな核の測定に有利なのに対して、ESEEM は窒素核、重水素など g_n 因子が比較的小さな核に対して有効である。

多周波数 EPR

一般に EPR の測定には 9 GHz 帯が使われる。しかし、周波数を変えて EPR を測定することにより多くの情報を得ることができる。ゼーマンエネルギーは磁場の大きさに比例して大きくなるため (図 1, 2) 高周波の ESR では g 因子の異方性、つまり分子構造の方向による違いにより信号を分解することができる。逆に、低周波の ESR では g 因子の異方性が小さくなるが、相対的に超微細相互作用 (図 2) が大きくなるため電子と核との相互作用をみるのに適している。図 16 に多周波数 ESR 法によるチロシン D $\cdot$ の信号を示す。周波数の低い S-band では g 因子の異方性の影響が小さくなり中心から左右対称なスペクトルが得られている。一方周波数の高い W-band では g 因子の異方性によりスペクトルが分裂している。これらの手法により分子構造の詳細を知ることができる。

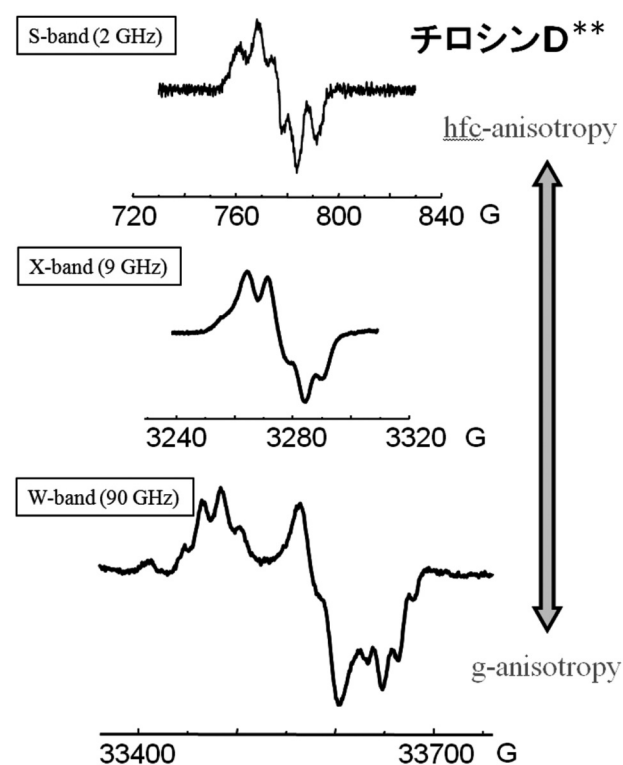


図 16 :

2.d.9 おわりに

本稿では主に汎用の共通機器として測定可能と思われる方法を中心に例をあげた。本稿ではふれなかったが、他にもスピンラベル法、スピントラップ法なども盛んに使用されている。これらの測定に関しての注意点は本稿で紹介したもの準じて頂きたい。本稿の最後にはより進んだ測定法の例をいくつかあげた。特に、パルス EPR 法、時間分解 EPR は幅広く研究がおこなわれており、光合成系は最も成功している EPR の応用対象のひとつとして数えられている。興味をもたれた方は参考文献¹⁶⁻¹⁸⁾を一読されたい。

参考文献

- 1) 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, 1998.
- 2) A. Carrington & A. D. McLachlan「化学者のための磁気共鳴」培風館, 1970.
- 3) 桑田敬治, 伊藤公一「電子スピン共鳴入門」南江堂, 1980
- 4) アルガー「電子スピン共鳴」吉岡書店, 1968.
- 5) 大矢博昭, 山内淳「電子スピン共鳴」講談社, 1989.
- 6) A. F. Miller & G. W. Brudvig Biochim. Biophys. Acta (1991), P.1056.
- 7) S. Itoh, H. Mino, K. Itoh, T. Shigenaga, T. Uzumaki & M. Iwaki, Biochemistry (2007), **46**, P.12473
- 8) T. Ono & H. Mino Biochemistry (1999), **38**, P.8778
- 9) 河盛阿佐子, 「電子と生命」, 共立, 2000, P.70
- 10) J. Messinger, J. H. A. Nugent & M. C. W. Evans Biochemistry (1997), **37**, P.11055
- 11) T. Yamauchi, H. Mino, T. Matsukawa, A. Kawamori & T. Ono (1997) **36**, P.7520
- 12) G. C. Dismules & Y. Siderer Proc. Natl. Acad. Sci. (1981), **78**, P.274
- 13) T. Matsukawa, H. Mino, D. Yoneda & A. Kawamori (1999), **38**, P.4072
- 14) V. K. Yachandra, K. Sauer, and M. P. Klein, Chem Rev **96** (1996) P.2927.
- 15) F. J. E. Vanmiegheem, K. Satoh & A. W. Rutherford, Biochim. Biophys. Acta (1991), **1058**, P.379.
- 16) H. Kurreck, B. Kirste & W. Lubitz, Electron Nuclear Double resonance spectroscopy of radicals in solution, 1988, VCH.
- 17) A. Schweiger & G. Jeschke, Principles of pulsed electron paramagnetic resonance (2001) Oxford.
- 18) J. Ametz & A. J. Hoff, eds., Biophysical techniques in photosynthesis, 1996, Chaper 14-18, Kluwer.