

生体試料の XAFS

足立 伸一, 谷田 肇, 城 宜嗣 (理化学研究所生体物理化学研究室*)

生体内には多くの種類の金属原子が存在し、蛋白質・核酸・糖など生体物質の構造維持、酸化還元反応、酸塩基触媒、配位子結合などの活性中心として働き、これらを通して多くの重要な生理作用に関わっている。例えば、金属原子を活性中心とする酸化還元酵素では、その触媒反応サイクルにおいて、金属原子の酸化数の変化、配位構造の変化を伴う。また、金属原子と配位原子との結合距離や角度の微妙な相違が、金属原子の生理活性の相違を決定している例もある。そこで、これら金属原子の働きを分子レベルで明らかにする為には、金属の配位環境あるいは電子状態を詳細に明らかにする必要がある。XAFS 法はこの目的に最も適する物理化学的手法として注目されている。

1. 生体試料の XAFS 測定

XAFS 法は、金属原子による X 線の吸収過程、およびそれに伴う光電子の放出と金属周辺の配位原子による散乱過程を観測する分光法であり、生物科学のみならず、酸化物超伝導物質や化学触媒などの材料科学の分野にも広く応用されている手法である。しかし、XAFS 測定において、生体試料が材料試料と比べて決定的に異なる点は、試料濃度が非常に希薄な点である。一般に、生体試料はその溶液をどんなに濃縮することができても、その濃度はせいぜい数ミリモル (millimole) 程度である。これは、生化学者・生物学者が聞けばびっくりする高濃度であるが、XAFS 測定の観点からは極めて希薄である。このために、生体試料の XAFS 測定には、吸収法を用いる事ができず、より感度の高い測定が可能な蛍光法を用いる事が一般的である。蛍光法は、金属原子が X 線のエネルギーを吸収後に、二次的な過程として放出する蛍光 X 線の強度を検出する方法であり、試料が希薄かつ厚みを持っている場合には、吸収法と近似的に同じ結果が得られる。それでも、2 mM の濃度の試料で、良好な S/N 比のデータを得る為には、半日の積算が必要である。

我々はここ数年来、高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光研究施設において、いくつかの金属蛋白質の XAFS を蛍光法で測定し、活性中心の微細構造解析を行ってきた。その成果の中から 2 つをここで紹介し、さらに今春より稼動を開始した理研の SPring-8 生体用

XAFS ラインについても簡単に触れる。

2. 一酸化窒素還元酵素

一酸化窒素還元酵素 (NOR) は、脱窒過程で生じる一酸化窒素 (NO) を、細胞にとって無毒な亜酸化窒素 (N_2O) に変換する酵素である。この酵素は活性中心に鉄と平面配位子であるポルフィリンとの錯体 (ヘム) を含んでおり、その鉄原子上で一酸化窒素還元反応が行われる。我々は、脱窒カビの NOR の結晶構造を解く事に成功したが、驚くべき事にその基本的な構造は (分子全体の構造も鉄周辺の構造も)、同じヘム酵素である一原子酸素添加酵素 (MO) と非常に似ていた。そこで、これら反応性の異なる 2 つのヘム酵素について、XAFS 法を用いて鉄の配位構造を比較した。その結果、三価の鉄に NO が結合した状態 (Fe^{3+} -NO 型酵素) において、Fe-NO の結合距離が NOR では 1.67 \AA 、MO では 1.77 \AA である事が明らかとなった。すなわち、Fe-NO 結合は NOR の方が MO よりも強くなっていた。一方、振動スペクトル解析の結果、N-O 結合は NOR の方が MO よりも強い事が分かっている。以上の結果は、NOR の方が MO よりも、NO から Fe へ電子供与が多い為に NO 分子上の電子密度が下がっている事を示している。 Fe^{3+} -NO 型酵素は NO 還元反応の最初の状態であり、この状態が電子供与体 NADH からの電子を受け取る事から触媒反応は始まる。XAFS 解析の結果は、この NOR の性質 (NO が NADH から電子を受け取り易くなっている) と矛盾なく、その反応機構を確立する上で、大きな手助けとなった。

3. 酸素センサー蛋白質

豆科の植物の根に共生する根粒菌は、空気中の窒素の固定をすることで有名である。窒素固定に係わる酵素ニトロゲナーゼは、空気中の酸素に対して不安定であり、その発現は酸素濃度に依存して調節されている。酸素センサー蛋白質 FixL は、根粒菌中の酸素濃度を感知する蛋白質である。FixL も上記 NOR 同様に、鉄-ポルフィリン錯体を活性中心に含むが、この鉄は触媒部位ではなく、酸素の結合部位となっている。すなわち、酸素濃度が高い環境では、酸素分子は鉄に結合し、低くなると鉄から解離する。

* 理化学研究所生体物理化学研究室 〒679-5143 兵庫県佐用郡三日月町三原323-3

TEL 07915-8-2817 FAX 07915-8-2818

e-mail 足立伸一 sadachi@spring8.or.jp 谷田 肇 tanida@spring8.or.jp 城 宜嗣 yshiro@postman.riken.go.jp

この酸素の結合解離の情報、FixLの他の部位にある触媒部位(キナーゼ部位)に伝達され、他の蛋白質のリン酸化をとおしてニトロゲナーゼ遺伝子の発現調節を行っている。

酸素の結合解離によって鉄周辺にどんな構造変化がおこるのか? それがどのようにキナーゼ部位に伝わるのか? それを知らば酸素センサー蛋白質としての、分子内情報伝達の機構を分子レベルで理解できる。そこで、XAFS法を用いてFixLの酸素結合型と非結合型の鉄の配位構造を解析した。

酸素結合型では、鉄はポルフィリン面内に位置し、その面に対して酸素分子と反対の位置に結合している内部配位子(ヒスチジン残基のイミダゾール窒素原子)との結合距離は2.07 Åであった。鉄より酸素分子が解離すると(酸素非結合型)、鉄はヒスチジンの方向に引っ張られ、ポルフィリン面内から約0.56 Å飛び出し、鉄-イミダゾール窒素原子の距離も2.12 Åに伸びた。すなわち、酸素分子の鉄からの解離により、内部配位子であるイミダゾール基はポルフィリン面に対して約0.6 Å移動する事が明らかとなった。このイミダゾール基の動きが、FixLのキナーゼ部位活性化と直接関係あるかどうか、現在検討中であるが、ヘモグロビンのR-T転位におけるTrigger機構を思わせる構造変化である事は事実である。

我々は、これ以外にも一酸化窒素センサー蛋白質(sGC)や一酸化炭素センサー蛋白質(CooA)のXAFS測定も完了しており、現在解析中である。ちなみに、我々はEXAFS解析プログラムとして、S. S. Hasnain教授の好意によりDaresbury研究所(英)より供与されたEXCURV92を用いている。

4. SPring-8の生体試料用XAFSライン

理化学研究所では、SPring-8に生体試料を対象としたXAFS測定用のビームラインBL44B2を建設した。このラインは単色X線および白色X線回折測定と併用される予定である。平成10年7月現在、イオンチャンバーを検出器として使った、吸収XAFS測定のテストは終了しており、夏休み明けの9月末には蛍光測定用のSSD検出器が設置されテスト測定が開始される予定である。

BL44B2の光学系は、第1スリットの下流に二結晶分光器があり、その下流にベントシリンダー型ミラーを置く配置になっている。二結晶分光器の第一結晶は直接水冷式のフィンクーリング結晶、第二結晶は間接水冷式であり、

Si(111)反射を使用している。ミラー調整装置はベント機構をもつ1m長ミラーシステムである。ミラー本体の材質はSiであり、1000×90×50 mm³の母材を用いてサジタル方向に曲率半径61.13 mmのシリンダー形状に加工されている。ミラー表面はPtコートであり、本体の側面を間接水冷している。XAFS実験時には高調波除去のために0~5.5 mradの間に設置され、試料への入射は、はね上げ方向の斜入射となる。第一スリットの開口が10 mm(H)×1 mm(V)(角度発散0.38 mrad(H)×0.038 mrad(V))でミラーをベントさせた時の、実験ハッチ内のミラー集光位置での集光サイズは、0.25 mm(H)×0.18 mm(V)(FWHM)であった。

XAFS実験ハッチ内には、上下の移動と傾斜機構を持つ定盤(シグマ光機製)が設置され、その上に光学レールを固定して、4象限スリット、イオンチャンバー、SSD検出器、クライオスタット等が設置される。測定は吸収法・蛍光法の両方法が可能である。蛍光法用の検出器はEG&G Ortec社製の19素子型SSD検出器を用い、検出回路系としてXIA社のDXP(4ch)ボードを採用している。クライオスタットは、10 Kから室温までの温度コントロールが可能である。測定系の制御はすべて、PCベースのLabVIEW(Ver4.0)で開発したソフトウェアを使用している。

以上のように設置した装置を用いて、吸収法によるテスト測定を行った結果、我々が主な測定対象としている6~25 keVにK吸収端を持つ試料(Mn~Pd)について良好なスペクトルが得られる事を確認している。ただし、測定エネルギー領域によっては、エネルギースキャン中の入射ビーム強度の安定性に若干の問題があり、スキャン中にロッキングカーブのチューニングを断続的に行うことにより対処している。

5. 最後に

生体XAFSは試料条件(濃度、容量、金属原子の種類と数)さえ適合すれば、金属を含む生体分子の金属周辺の構造を精密に簡便に解析できる手法であり、世界の多くの研究グループがこの手法を用いて生体高分子の構造生物学研究を行っている。しかし、我が国にはこの分野に未だ数えるほどのグループしかおらず、SPring-8の稼動を契機に、今後さらに多くの研究グループの参画を期待している。