

(様式第5号)

タンパク質の XAFS 測定

XAFS measurements of proteins

山口敏男、加藤祐子、吉田亨次
Toshio Yamaguchi, Yuko Kato, Koji Yoshida

福岡大学理学部
Faculty of Science, Fukuoka University

- ※1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

BL11に設置されたXAFS分光器にて金属イオン濃度5 mMのタンパク質溶液のM₁ KおよびM₂ K吸収端X線吸収測定を蛍光法により室温で行った。M₁-タンパク質中のM₁²⁺のXANES形状は6配位の水和M₁²⁺の形状に似ているが、ピーク位置はわずかに高エネルギー側にシフトした。一方、M₂-タンパク質のXANES形状は水和M₂²⁺の形状とほぼ同じであった。測定後の試料溶液中のタンパク質の量の変化があったので、タンパク質の一部はX線照射により壊れた可能性がある。

(English)

M₁ K- and M₂ K-edge X-ray absorption measurements were made in fluorescent mode at ambient temperature at BL11 on aqueous 5 mM M₁- and M₂-protein solutions to determine the local structure around the metal ions and reveal the underlying mechanism of the change in protein character. The XANES feature of M₁-protein is similar to that of the hexa aqua M₁²⁺, but the peak slightly shifted to the higher-energy side. The XANES feature of M₂-protein is very similar to that of the aqua M₂²⁺. After the XAFS measurements, the amount of proteins was increased, suggesting that the protein might be partially broken by X-ray irradiation.

2. 背景と目的

本実験課題の目的はXAFS測定実験により、XANESとEXAFS解析からProtein-Metal complexの金属イオン周りの結合状態や配位数などを解明することにある。本実験では金属イオン周りの局所構造を決定して、金属イオンがタンパク質のどの位置で結合するかなどを解明することが本実験の特色である。さらに、タンパク質においてはpHによる分光学的変化は顕著であることをつきとめているので、なぜ金属イオンと配位するとpHにより著しく変化するのかを解明する。

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

測定試料は、M₁ K吸収端ではタンパク質-M₁ ([M₁²⁺]=5 mM) pH=5, 8と溶媒(水 + NaCl 100 mM + Tris* 10 mM)を、M₂ K吸収端 (4.04 keV) では、タンパク質-M₂ ([M₂²⁺]=5 mM) pH= 8, 12と溶媒(水 + NaCl 100 mM + Tris* 10 mM) (*Tris = トリスヒドロキシメチルアミノメタン(緩衝剤))。

標準試料として、Cu 箔 エネルギー基準物質（透過法測定）、 M_1 硝酸塩水溶液($[M_1^{2+}] = 5 \text{ mM}$)、 M_2 硝酸水溶液($[M_2^{2+}] = 5 \text{ mM}$) 5 mM である。

測定範囲 $M_1 K$ 吸収端 (XANES と EXAFS)、 $M_2 K$ 吸収端 (XANES と EXAFS)

(データ取得に必要な測定装置・測定方法、レイアウト等)

(注：600～800 字程度)

測定装置は BL11 XAFS 分光器と Lytle 検出器、または SDD 検出器を用いた。測定は蛍光法で室温で行った。溶液試料はポリエチレン袋に封入した。測定時間は溶液試料は 30 分、タンパク質試料は 10 分×6 回とした。

4. 実験結果と考察

5 mM M_1 -タンパク質水溶液 (17090901-17091107) および 5 mM $M_1(\text{NO}_3)_2$ 水溶液(17090601) $M_1 K$ 吸収端スペクトルを比較した結果、 M_1 -タンパク質水溶液の吸収スペクトルは M_1 硝酸塩水溶液の形状に似ているが、吸収ピークは高エネルギー側へシフトした。 $M_1(\text{NO}_3)_2$ 水溶液中では M_1^{2+} に 6 個の水分子が結合した正八面体構造をとることが報告されている。類似タンパク質の結晶構造では、金属イオンは 5 配位構造であることが明らかになっている。本結果から、 M_1 -タンパク質のクロモファア部の M_1 イオンは 4 配位構造を取らないことは明らかになったが、5 配位構造と 6 配位構造を識別するためには、XANES スペクトルを DV-X α 分子軌道計算により解析することが必要になる。

5 mM M_2 -タンパク質水溶液 (merge 3、4 回スキャン合成) および 5 mM $M_2(\text{NO}_3)_2$ 水溶液(merge, 4 回スキャン合成)の $M_2 K$ 吸収端スペクトルを比較した。 M_2 硝酸塩水溶液中では M_2^{2+} に 6～7 個の水分子が結合した構造をとることが報告されている。両スペクトルは非常によく似た形状を示しており、 M_2 -タンパク質中の M_2^{2+} の配位数は 6～7 と考えられる。詳細な配位構造は DV-X α 計算により決定する。 M_1 イオンと M_2 イオンがタンパク質に結合した時の分光学的スペクトルの違いがそれぞれの配位構造の違いを反映していると考えられる。

XAFS 測定前後に、 M_1 -タンパク質および M_2 -タンパク質水溶液のタンパク質の量を Bradford 法で測定したところ、タンパク質の量はかなり増加していた。この結果から、各タンパク質は X 線照射により部分的に壊れているのではないかと考えられる。

5. 今後の課題

今回の実験から、室温では M -タンパク質水溶液に X 線を照射すると、タンパク質は部分的に壊れることが明らかになった。放射線損傷対策として、 M -タンパク質水溶液に不凍剤を加えてできるだけ低温で測定するか、 M -タンパク質水溶液を液体窒素温度まで冷却しガラス状態で測定する。

6. 参考文献

なし

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

なし

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を 2～3)

タンパク質、局所構造、XAFS

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2017年度実施課題は2019年度末が期限となります)。長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

② 研究成果公報の原稿提出

(提出時期：2020年3月)