

課題番号：2005B0505、利用ビームライン：BL25SU

課題名：軟 X 線自然円二色性に寄与する励起状態の広がり

### [目的]

自然円二色性 NCD は分子や結晶構造のカイラルの度合いを敏感に反映するため、タンパク質をはじめ、生体分子の立体構造情報を知ることができる重要な測定手段である。

我々のグループは 2003A 期に偏光可変アンジュレーターによって軟 X 線左右円偏光を発生させることで、アミノ酸の酸素 K 殻と窒素 K 殻領域において世界初の軟 X 線円二色性 SXNCD を検出することに成功した。

そこで生体高分子の構造情報を原子近傍の構造に特化して得ることを大目標とし、酸素や窒素の K 殻を励起した際の自然円二色性 (NCD) に寄与する電子状態が、分子上でどの程度広がっているかを確認するために、アミノ酸の中で最も大きな原子半径を持つ硫黄を含むアミノ酸 (メチオニン) の NCD スペクトル測定を行った。

### [実験]

サンプルはメチオニン(Met)、システイン(Cys)の L 体、D 体、ラセミ体(L 体と D 体が等量混ざったもの、以下 Rac-と記す)を膜厚 300 nm 程度、真空蒸着法(約 350 K)にて作成した。基板には Au を蒸着したシリコンを使用した。

NCD スペクトルの測定には、アンジュレーターの位相駆動を用い、光エネルギーとアンジュレーターギャップの同時スキャンを行った。軟 X 線吸収は全電子収量法で測定し、左右円偏光時の吸収強度の差を算出して NCD スペクトルとした。(以下、左円偏光(LCPL)の吸収：3/2、右円偏光(RCPL)の吸収：1/0 と記す。)また NCD の信号は非常に微弱であるため、検出感度をぎりぎりまで高める必要があった。そこで、フロントエンドスリットなど様々な部分を測定に最も適した状態に調整し、測定した。今回は、時間の都合で酸素 K 殻領域の L-Met, D-Met, Rac-Met のみ測定した。

Fig.1 に L-Met、Fig.2 に D-Met、Fig.3 に DL-Met の酸素 K 殻付近の XANES スペクトル(1/0)を示す。(グラフに記述してある番号は、測定番号)これら全て同条件で測定したにも関わらず、同じサンプルのスペクトルで非常にばらつきが大きい。具体的には D 体、Rac 体のスペクトルは、baseline が徐々に上にシフトしているように見えるのに対し、L 体は baseline が大きいものと小さいものに分かれてしまった。これらのことから、まだ分かっていないサンプル依存、時間依存、ビームライン依存などがあると考えられるので、原因を突き止める必要がある。

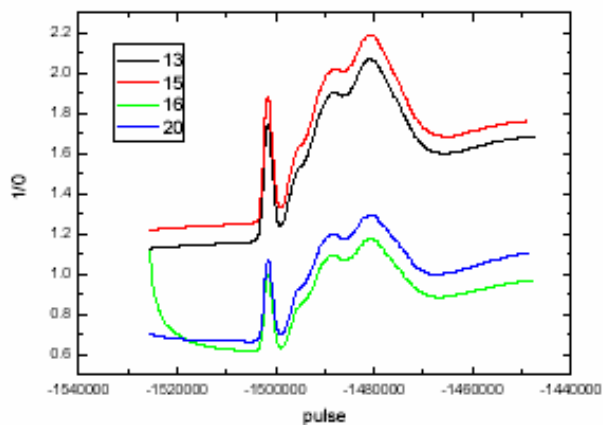


Fig.1 : L-Met / XANES

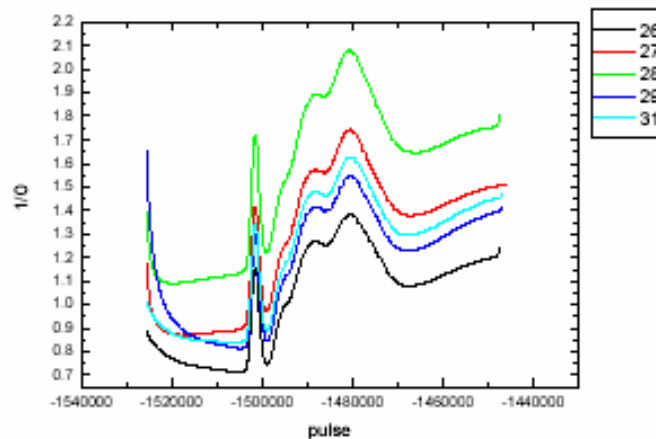


Fig.2 : D-Met / XANES

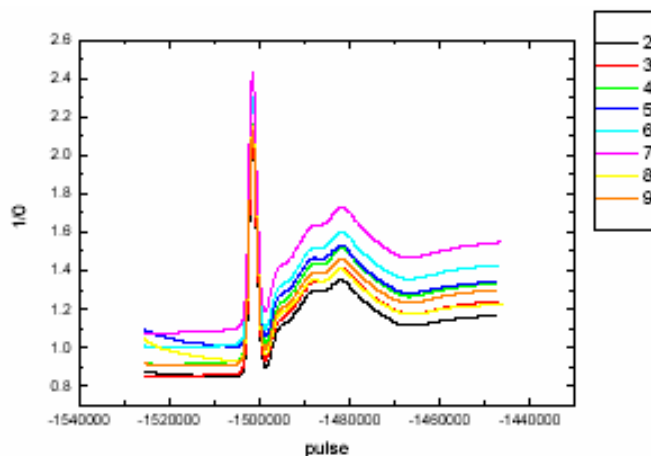


Fig.3 : Rac-Met / XANES

[考察]

SXNCD スペクトルを計算するために、まず Fig.1-3 のスペクトルを、それぞれ 525 eV - 530 eV(ピークが立ち上がるエネルギーの前)の部分が 0 となるように平行移動させ、それらの平均を取った。そのスペクトル(L 体、D 体、Rac 体)を Fig.4 に示す。左円偏光の吸収(3/2)も同様にした。

Rac-Met は 532 eV 付近のピークが L 体、D 体よりもかなり大きくなった。これは、Rac-Met が L 体や D 体と異なる結晶構造をしている可能性を示す。よって、今回の解析には L 体と D 体のみを用いた。

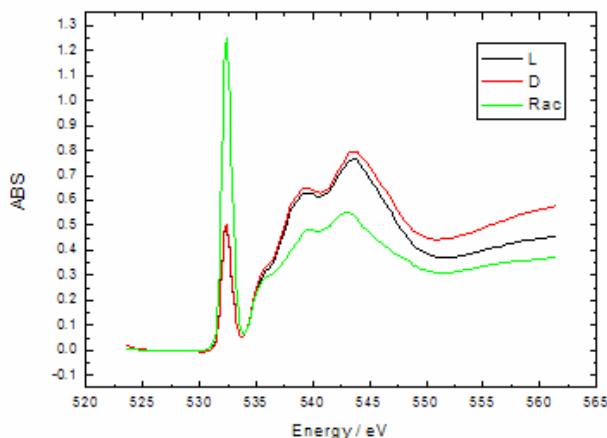


Fig4. XANES of Met O K-edge

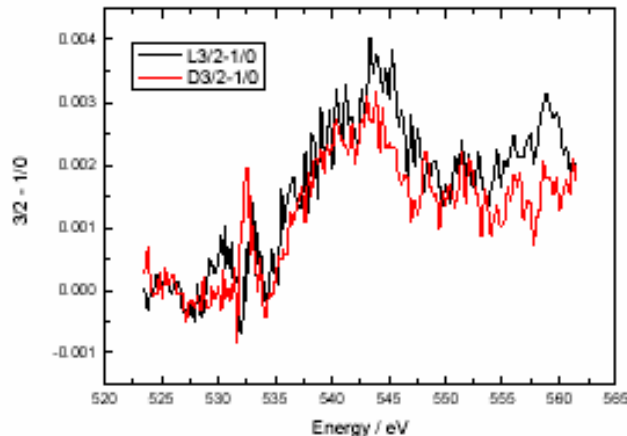


Fig5 : L 体(黒線)、D 体(赤線)の CD

CD の定義式は、

$$\Delta\mu = \mu(\text{LCPL}) - \mu(\text{RCPL}) \dots \textcircled{1}$$

で、式①のように計算したのがFig5である。グラフをみてわかるようにL体、D体のスペクトルでCDらしき差は見られるものの、吸収に似た形のノイズ(baseline)がのっている。

このノイズを減らすために、次のような解析を行った。それぞれの吸収スペクトルを  $X(a)$  ( $X$ : L体 or D体、 $a$ : 3/2 or 1/0)、真のCDを  $CD(X)$ 、ノイズを  $\alpha$  とすると、

$$X(a) = X_{\text{LCPL}} + \alpha_{\text{LCPL}}(X) \dots \textcircled{2}$$

とかけるので、

$$X(3/2) - X(1/0) = CD(X) + (\alpha_{\text{LCPL}}(X) + \alpha_{\text{RCPL}}(X)) \dots \textcircled{3}$$

ここで真のCDとノイズのオーダーは

$$O(CD(X)) < O(\alpha_{\text{LCPL}}(X) + \alpha_{\text{RCPL}}(X)) \dots \textcircled{4}$$

つまり、ノイズの方が大きいと考えられるので、 $X(3/2) - X(1/0)$ の隣接平均を取ったものはノイズを反映し、それを式③から引いたものが真のCDと考えられる。そのグラフをFig6に示す。

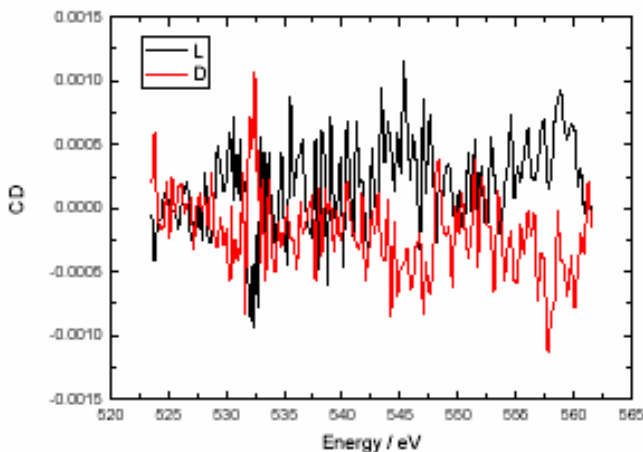


Fig6 :  
ノイズを差し引いた CD

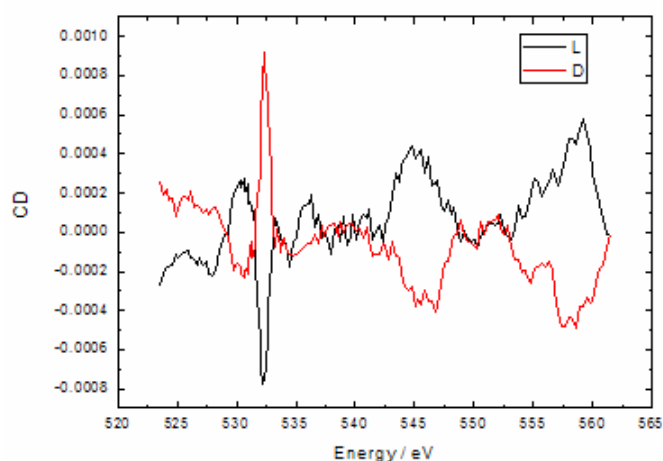


Fig7. NCD of Met O K-edge

Fig.6 のグラフにスムージングをかけたものを Fig.7 に示す. 532, 545, 557 eV 付近に符号が逆で強度がほぼ等しいピークが確認された. 557 eV 付近のピークの帰属は理論計算を待つ必要があるものの, 532, 545 eV 付近のピークはそれぞれ, カルボキシル酸素の  $1s \rightarrow \pi^*$ ,  $1s \rightarrow \sigma^*$  遷移に帰属すると考えられる. 市販の円二色分散計を用いて測定した紫外領域の CD スペクトルでも符号が逆で強度が等しいピークが確認されたことから, 真の CD スペクトルを測定できた可能性が高いと結論した.

#### [結論及び今後の課題]

今回は解析によって CD を計算したが, 全て同条件で測定したにも関わらず, 同じサンプルの吸収スペクトルで非常にばらつきが大きいということは CD を測定するには問題である. まだ分かっていないサンプル依存, 時間依存, ビームライン依存などがあると考えられるので, 測定精度を上げるためにも原因を突き止める必要がある. もしくは, ばらつきの小さくなるような測定方法を探す必要がある. このことは, 我々の NCD 測定だけでなく, 磁気二色性(MCD)を測定されている方達のためにも, 測定精度を上げる上で重要だと考えている.

また NCD スペクトルに関しては, NCD に寄与する励起状態が硫黄まで広がっているとすれば,  $\alpha$ -炭素から硫黄までの結合距離がメチオニンよりも短いため, システインの NCD 強度は今回の結果よりも大きくなると考えられる. これを確かめるためにシステインの酸素 K 殻領域の NCD スペクトルを測定する必要があり, これは今後の課題である.