

生体電子スピニが視たい(2)

UTSUMI Hideo
内海 英雄

<静岡県立大学薬学部 422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

e-mail:utsumih@u-shizuoka.ac.jp>

1. 連載(2)のプロローグ

本連載では、「生体電子スピニを画像として視る」ために ESR Imaging と DNP-MRI を取り上げる予定である。生体 ESR Imaging は 1985 年にオハイオ州立大学の Berliner と藤井博匡先生が初めて報告したもので、その開発経緯および詳細は藤井先生が 10 年前の本誌¹⁾に解説されている。また、DNP-MRI とスピニ流も同号のトピックスで扱われ、巻頭言では山内淳先生が 10 年後への期待を述べている。SEST では生物系 ESR 研究者の参加が減少しているよう、本連載が生物 ESR 研究のお役に立てればと願っている。

ESR Imaging には生体に投与したニトロキシラジカルのシャープな 3 本線シグナルが利用されている。この 3 本線シグナルは周りの環境により様々に変化し、この変化を利用すると、例えば、薬物輸送担体などの興味深い生体内情報が得られる。そこで、本号ではニトロキシラジカルの電子スピニの動きと ESR スペクトルの変化を纏め、生体 ESR Imaging の足掛かりを提供したい。

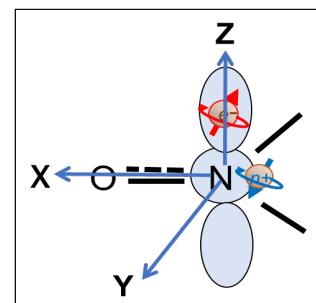
2. 電子スピニの動きと ESR スペクトルの変化

ニトロキシラジカルでは不対電子スピニが窒素核スピニ ($I=1, m_I=+1, 0, -1$) と超微細結合しているため 3 本に分裂する。前号²⁾の「3. ESR スペクトルはなぜ分裂?」では、Solomon 式を用いて電子スピニ・核スピニ超微細結合での磁気モーメント、 $\langle S_z \rangle$ と $\langle I_z \rangle$ の変化をスペクトル密度関数 w (共鳴角周波数 ω と相関時間 τ で記述) で説明した。Solomon 式は ESR の教科書では余り見掛けず、マクロ系の磁化 M_s と M_I 及び緩和時間用いた Bloch 式が汎用されている。磁化 M_s 、 M_I と磁気モーメント $\langle S_z \rangle$ 、 $\langle I_z \rangle$ の間には $M_I = N\gamma \langle I_z \rangle$ (N はスピニ数) の、緩和時間 T と遷移確率 w との間には $T = 1/w$ の関係がある。従って、マクロ系で観察される磁化と緩和時間 (Bloch 式)

は、ミクロ世界での個々のスピニ挙動 (Solomon 式) に通じる。

更に「4. 分子間スピニのダンス」では、相関時間 τ を個々の運動と関連付け、回転相関時間 τ_r 、並進相関時間 τ_t 、電子・核スピニ交換時間 τ_e 、分子交換時間 τ_h に分け、スピニのダンスに例えてスピニ遷移確率を記述した。小生にとって相関時間は馴染み難かったが、相関時間の逆数、即ち速度で考えると、相関速度は足し算となることからスピニダンスも解り易い。

ニトロキシラジカルでは不対電子は図 1 に示すように窒素原子の $2p_z$ 軌道にも存在している。



(図 1) ニトロキシラジカルの不対電子

そのため、超微細結合では等方性のフェルミ接触相互作用の他に異方性の双極子相互作用が加わり、 g 値と超微細結合に異方性が観測され、スピニハミルトニアン H は次式で表示される。

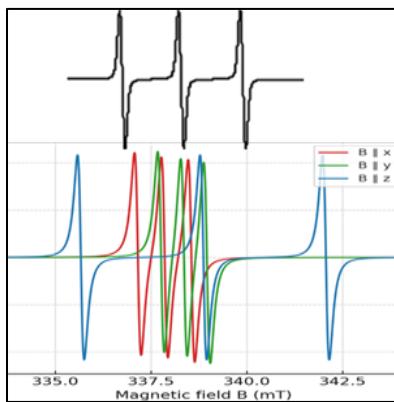
$$H = m_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g}_e \cdot \mathbf{S} + g_N m_N \mathbf{B} \mathbf{m}_I + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} \quad (1)$$

$$m_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g}_e \cdot \mathbf{S} = g_x m_B B_x S_x + g_y m_B B_y S_y + g_z m_B B_z S_z \quad (2)$$

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} = A_x S_x I_{xi} + A_y S_y I_{yi} + A_z S_z I_{zi} \quad (3)$$

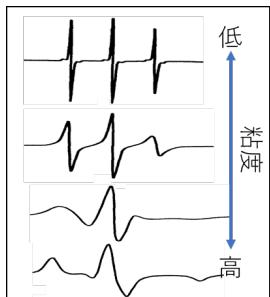
X, Y, Z 軸を図 1 のようにとると、式(2)(3)のテンソルは $g_x=2.009$ 、 $g_y=2.006$ 、 $g_z=2.003$ 、 $A_x=0.7$ mT、 $A_y=0.6$ mT、 $A_z=3.2$ mT 程度となり、外部磁場を X, Y, Z 方向で観測すると、図 2 の緑、橙、青の 3 本信号が観測される。しかし、溶液中ではラジカル分子の速いブラウン運動により回転相関速度が速くなり異方性テンソルが平均化され、

$g_{hf} = (g_x + g_y + g_z)/3$ 、 $A_{hf} = (A_x + A_y + A_z)/3$ の位置に 3 本線が観測される(図 2 上、黒線)。



(図 2) ESR スペクトルの異方性
X;赤、Y;緑、Z;青(ChatGPT 作成)

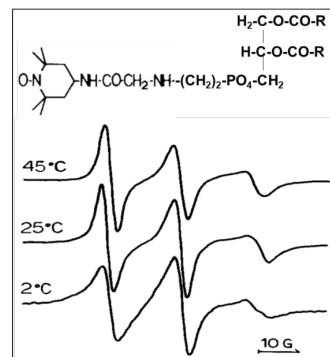
この異方性は溶液の粘度が増し分子の回転相関速度が遅くなると平均化されにくくなり、図 3 のように高磁場側 ($m_I = -1$) シグナルが、更に粘度が増すと低磁場側 ($m_I = +1$) シグナルも広幅化し、回転運動が止まると中央 ($m_I = 0$) シグナルに明瞭な g 値異方性が観測される。



(図 3) 粘度による ESR スペクトルの変化

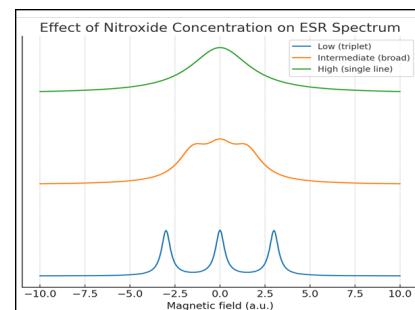
一方、軸回転運動すると、軸以外のテンソルが平均化され、回転軸に平行 (//) な成分と垂直 (⊥) な成分になる。図 4 はその一例でリン脂質の極性基をニトロキシリジカルで標識したジパルミトイルレシチン(DPPC)を合成し、DPPC リポソームに挿入して温度を変えて測定した ESR スペクトルである。³⁾ 45°C では低磁場側 ($m_I = +1$) の信号が最も高く図 2 の緑と青が平均化した様子が分かり、標識リン脂質が $N = O$ 結合を軸 (//; X, ⊥; Y, Z) として速い軸回転をしていると結論される。2°C のゲル状態では中央 ($m_I = 0$) の信号が最も高く図 3 の 2 番目のスペクトルに近い

ことから軸回転運動は抑制され遅いブラウン運動していることが示唆される。



(図 4) ニトロキシリジカルの軸回転異方性スペクトル

ラジカル濃度が増すと超微細結合に加えて電子スピンと電子スピンの交換相互作用を生じる。電子スピン交換速度 v_{ex} と超微細分裂周波数 ω_{hfc} を用いると遷移確率は $w_s \propto v_{ex}/(\nu_{ex}^2 + \omega_{hfc}^2)$ となり遷移確率は v_{ex} に依存する。希薄溶液では交換速度が遅く、 $v_{ex} \ll \omega_{hfc}$ となり 3 本線が見えるが、濃度が上がるにつれて 3 本線の線幅が広がり、 $v_{ex} \approx \omega_{hfc}$ で 3 本線が崩れ、 $v_{ex} \gg \omega_{hfc}$ となると 1 本線シグナルに変化し、横緩和の遷移確率もほぼ同様に記述され線幅はシャープになる。

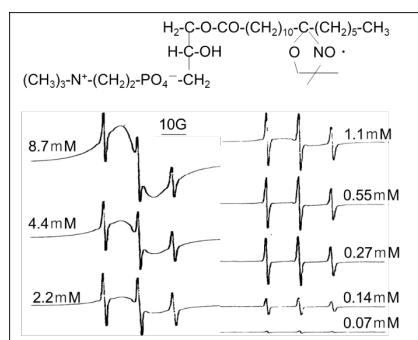


(図 5) スピン交換による ESR スペクトル変化
(ChatGPT 作成)

3. 脂質分子の動きと ESR スペクトル変化

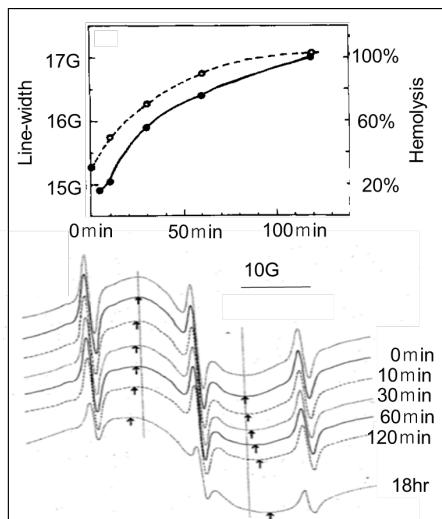
これらの ESR スペクトル変化を利用した方法がスピンラベル法で、McConnel、Ohnishi(大西俊一京都大学名誉教授)らによって開発された。⁴⁻⁶⁾ 大西先生は帰国後スピン標識リン脂質を合成し、脂質の膜内外移動(フリップフロップ)が脂質で異なること、フォスファチジルセリンは膜内層に局在することを見出した。^{7,8)}

筆者もスピニラベル法に興味を持ち 1974 年から研究を始めた。当時、リゾリン脂質は細胞溶解や膜融合作用があり、その作用機序として、①遊離体、②ミセルが膜に侵入すると考えられていた。⁹⁾ そこで、新たにリゾレシチンにスピニラベルした化合物 (SL-lysoPC、図 6) を合成し ESR 測定すると、シャープな 3 本線は濃度に応じて増加し 1.1 mM 以上で一定となり、続いてブロードな 1 本線が濃度依存的に現れた。このスペクトル変化は臨海ミセル形成濃度 (CMC) に一致し、ブロードな信号はミセル内でのスピニスピン交換に由来することが示された。¹⁰⁾



(図 6) SL-lysoPC と ESR スペクトル

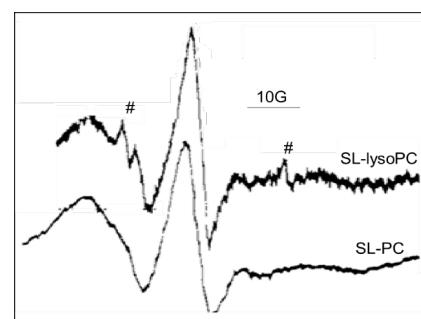
この SL-lysoPC 溶液 (6.7 mM) を赤血球 (1×10^9 細胞/mL) と 37°C で混和すると図 7 上の実線で示すように徐々に溶血する様子が観測された。一方、ESR 測定結果 (図 7 下) は予期しない変化を示した。ミセルシグナルが広幅化し、その線幅 (図 7 上; 点線、下; 矢印) は溶血量と似た変



(図 7) SL-lysoPC の溶血活性と
混和液の ESR スペクトル

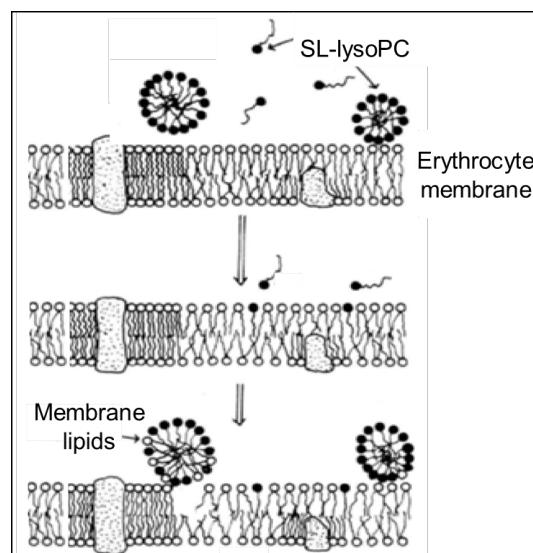
化を示した。この広幅化は赤血球膜脂質がミセルに混和したためと考え、赤血球膜から抽出した脂質をミセルに混和すると脂質量に応じてミセルシグナルは広幅化し、10% の脂質で線幅は 1.525 mT から 1.635 mT へと増大した。¹¹⁾

一方、リゾレシチンの赤血球膜侵入の有無を確認するために低用量 (CMC 以下) の SL-lysoPC ($51 \mu\text{M}$) を赤血球 (5×10^9 細胞/mL) と混和すると図 8 のスペクトルが観測されたが、赤血球膜侵入シグナルは SL-lysoPC 濃度 $100 \mu\text{M}$ で頭打ちとなり、リゾレシチンの活性は膜侵入によるものでないことが結論付けられた。



(図 8) SL-lysoPC ($51 \mu\text{M}$) と赤血球 (5×10^9 細胞/mL) 混和液の ESR スペクトル

これら結果を纏めると、リゾレシチンの膜作用機序は図 9 となる。¹¹⁾ リゾレシチン (●で 1 本足) は溶液中で単分子 (3 本線シグナル) と凝集体ミセル (広幅 1 本線シグナル) で存在する。このリゾレシチンは赤血球膜 (○で 2 本足) に侵入する



(図 9) リゾレシチンの膜作用機序

が侵入量に限界があり溶血には至らない。一方、ミセルシグナルは広幅化し、5~10%程度の赤血球膜脂質をミセルに取り込むと赤血球膜に構造異常を生じ低分子イオンの透過性が亢進し溶血に至る。ミセルによる赤血球膜脂質取込みや溶血は25°C以下では観察されず赤血球膜の流動性が関与することが示唆された。また、リポソームでの実験からは相分離状態の膜脂質が取り込まれ易いことが示され、図9に示すように相分離している膜脂質を取り込み、その結果生じた膜構造変化が溶血に必要と結論された。

この作用機序は当時の学説の想定外で、この提案に対して発表後には多くの批判があった。ESRスペクトルの解釈に間違いはないと思うが、筆者は博士論文提出後に所属研究室も変わりこの研究も中断した。本稿執筆を機に、リゾ脂質研究の最前線を調べたところ、リゾホスファチジン酸の受容体が1996年に同定され¹²⁾、リゾ脂質と疾患との関わりが明らかとなりホットな研究領域になっているようだ。一方、リゾレシチンは不飽和脂肪酸を含まないことから安定な乳化剤として利用され、更に健康食品としてネット販売されており、驚きと懸念を抱いた。

4. 本篇のまとめ

熊田先生からのSEST通信「Kobe Seminar on Quantum Biology and Technology」(主催:小堀先生(神戸大))の案内が届き、早速、量子生物学研究を探索すると興味ある論文に出会った。¹³⁻¹⁵⁾これらの論文は電子スピンの分子内、分子間の流れと生物活性の関りを示したもので、DNP-MRIにも通じると感じた。電子スピンは量子生物学以外でも、量子コンピュータや材料科学など広い分野に亘り、電子スピン研究が最先端研究分野で活躍する様子を目の当たりにした。

プロローグでも記したように、次号では生体ESRとESR Imagingを取り上げる。生体ESR Imagingを材料科学などスピンサイエンスへも応用したい思いから、本号で扱った分子運動によるESRスペクトル変化を活用した生体ESR Imagingの実施例を紹介する予定である。本連載で「生体スピンの量子科学が視たい」、それ

も「画像で視たい」と願っている。

参考文献

- 1) 藤井博匡, 電子スピンサイエンス **13** (Autumn) (2015) 112-115.
- 2) 内海英雄, 電子スピンサイエンス **23** (Spring) (2025) 46-49.
- 3) Takeshita K., Utsumi H., Hamada A., *Biophys. J.* **52** (1987) 187-197.
- 4) Ohnishi S., McConnell H.M., *J. Am. Chem. Soc.* **87** (1965) 2293.
- 5) Stone T.J., Buckman T., McConnell H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **54** (1965) 1010.
- 6) 大西俊一, 化学と生物 **14**(2) (1976) 108-116
- 7) Maeda T., Asano A., Okada Y., Ohnishi S., *J. Virol.* **21** (1977) 232-241.
- 8) Sato S.B., Ohnishi S., *Eur. J. Biochem.* **130** (1983) 19-25.
- 9) 井上圭三, 油化学 **26** (1977) 588-596.
- 10) Utsumi H., Inoue K., Nojima S., Kwan T., *Chem Phys. Lipids* **18** (1977) 203-211.
- 11) Utsumi H., Inoue K., Nojima S., Kwan T., *Biochemistry*, **17** (1978) 1990-1996.
- 12) Hecht J.H., Weiner J.A., Post S.R., Chun J., *J. Cell Biol.* **135** (1996) 1071-1083.
- 13) Cao J., Cogdell R.J., Coker D.F., Duan H., Hauer J., Kleinekathöfer U., Jansen T.L.C., Mančal T., Miller R.J.D., Ogilvie J.P., Prokhorenko V.I., Renger T., Tan H., Tempelaar R., Thorwart M., Thyrhaug E., Westenhoff S., Zigmantas D., *Science Advances* **6** (2020) eaaz4888.
- 14) Higashi K., Okamoto T., Iwaya N., Sakuda E., Kay C W M., Ikoma T., Higashi M., Kobori Y., *Angew. Chem. Int. Ed.* **64** (2025) e202503846.
- 15) Richer G., Weber S., Roemisch W., Bacher A., Fischer M., Eisenreich W., *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 17245-17252.