

## 分子動力学シミュレーションと Poisson-Boltzmann 方程式の

### 組み合わせによる液液界面近傍のイオン輸送現象の解析

(東北大学大学院理学研究科) 吉川信明, 森田明弘

### A Study of Ion Transport through Liquid-Liquid Interface by using Molecular Dynamics Simulations combined with Poisson-Boltzmann Equation

(Tohoku Univ. Graduate School of Science)

Nobuaki Kikkawa, Akihiro Morita

【序】液液界面における輸送現象は、液液抽出や界面反応、膜透過等の一過程として重要である。しかし、液液界面を移動する分子を直接観測することは非常に難しく、電気化学や分析化学に基づく間接的な実験と反応速度論や連続体近似によるモデル化により研究が進められてきた。これに加えてここ 20 年では、分子シミュレーションを用いて液液界面における輸送現象を”直接”見ようという試みが盛んに行われている。計算機の進歩もあり、近年ではより実用的かつ複雑な系に注目が集まってきている。

上記のような流れの中、我々は親水性のイオンと疎水性のイオンが共存する界面、特に相間移動触媒反応<sup>[1], [2]</sup> (図 1) に注目し分子シミュレーションを用いた研究を行っている。相間移動触媒反応では、親水性のアニオン( $X^-$ )が触媒として働く疎水性のカチオン( $Q^+$ )によって水相側から油相側に運ばれることで進行する。溶媒の選択性が高いことや後処理の容易さから工業的に重要な反応である。一方、分子論的な理論研究は近年漸く進められるようになってきたばかりであり<sup>[3]</sup>、分子論的な知見が期待されている。

親水性のイオンと疎水性のイオンが共存している系では、界面に電気二重層が形成される。電気二重層が形成されることで界面に強い電場が発生するため、シミュレーションを行う上でこれを考慮することが必要になる。界面電場が影響する空間スケールは分子シミュレーションで扱える範囲よりはるかに広範囲に及ぶことから、これをどう扱うかが問題となる。

【方法】分子シミュレーションと Poisson-Boltzmann 方程式の数値計算を組み合わせる方法<sup>[4]</sup>を利用することで、界面電場の影響を考慮した自由エネルギー曲線を作成した。この方

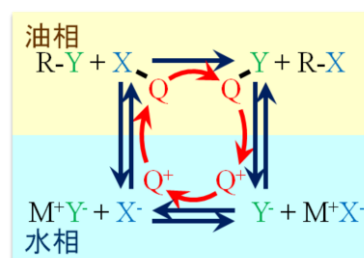


図 1 相間移動触媒反応

法は2つのステップに分かれる。

①各イオンが一分子が存在するときのそのイオンが界面を透過する時の輸送自由エネルギー $-\Delta G_i(z)$ を分子シミュレーションにより計算する。ここで  $z$  は界面垂直方向を意味し、 $z < 0$ が水相、 $z > 0$ が油相、 $z = 0$ が界面である。なお本計算では、水-クロロホルム界面のスラブモデルに親水性アニオンである  $\text{Cl}^-$ 、または疎水性カチオンである tetrabutylammonium ( $\text{TBA}^+$ ,  $\text{Bu}_4\text{N}^+$ ) を1分子加えた系を用いて熱力学的積分法による自由エネルギー計算を行った。分子モデルは Amber の分極モデルを使用した。

②Poisson-Boltzmann 方程式

$$\frac{d}{dz} \left[ \varepsilon(z) \frac{d}{dz} \varphi(z) \right] = \sum_{\text{ions}} Z_i e c_0^i \exp \left[ -\frac{Z_i e \varphi(z) + \Delta G_i(z)}{k_B T} \right]$$

を数値的に解き、電位 $\varphi(z)$ を求める。ここで、 $\varepsilon(z)$ は誘電率、 $Z_i e$ は各イオンの電荷、 $c_0^i$ は各イオンの水相( $\Delta G = 0$ )における濃度、 $k_B T$ は Boltzmann 定数と温度の積である。 $\varepsilon(z)$ は分子シミュレーションから決定することも可能だが、今回は適当な関数を用いた。 $c_0^i$ についても適当なパラメータを用いた。

【結果】界面電場の効果を含んだ各イオンの自由エネルギーは $Z_i e \varphi(z) + \Delta G_i(z)$ となる。この自由エネルギーを  $z$  に対しプロットしたものを図2に示す。疎水性アニオンの結果に注目すると、界面近傍油相側で自由エネルギーのピークがあり、その透過が油相の律速となることが分かる。このことは、アニオン、カチオン、溶媒などの分子種の

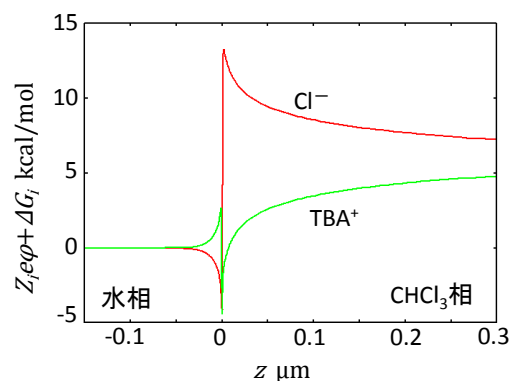


図2 自由エネルギー曲線

違いによる界面構造の違いが輸送速度に大きく影響する可能性を示している。また、界面付近の自由エネルギー差に比べて各バルク間の自由エネルギー差は小さくなっていることもわかる。これは界面電場という巨視的な効果の結果であり、カチオンの疎水性が高まるほどこの効果は大きくなる。水相と油相の自由エネルギー差が小さくなることは、油相中のアニオンが増大することを意味しており、これにより反応が起こりやすくなると考えられる。

ここで示した結果のほかにも、界面の微視的構造が自由エネルギーに与える効果<sup>[5]</sup>や $\Delta G_i(z)$ を適当なパラメータを用いた関数とした場合の全体の自由エネルギーと各パラメータの関係など検討しており、当日発表したい。

[1] C. M. Starks, *J. Am. Chem. Soc.* **93** (1971) 195

[2] C. Starks, et. al., *Phase-transfer Catalysis*, Chapman & Hall, 1994

[3] K. V. Nelson, I. Benjamin, *J. Phys. Chem. C* **115** (2011) 2290

[4] G. Luo, et al., *Science*, **311** (2006) 216

[5] N. Kikkawa, et al. *Chem. Phys. Lett.* **534** (2012) 19

## 炭素細孔中における電解質水溶液の構造モデル

(千葉大院理) 小嶋夏子, 大場友則, 加納博文

## Structural modeling of ionic solution in carbon nanopore

(Chiba Univ.) N. Kojima, T. Ohba, H. Kanoh

## 【緒言】

活性炭などに存在するナノ細孔中では、物質の構造がバルクとは異なることが報告されている<sup>1)</sup>。特に、電解質溶液のナノ細孔中における構造を理解することは、電気二重層キャパシタや生体内イオン輸送など幅広い分野の基盤となる事が期待される。ナノ細孔中における電解質水溶液の構造については、RbBr 水溶液を疎水性カーボンナノ細孔中に導入すると Rb<sup>+</sup> の水和数がバルクの水和数に比べて 20%減少することが X線吸収端微細構造の結果から示されている<sup>2)</sup>。本研究では分子シミュレーションを用い、炭素細孔中における塩化カルシウム水溶液の構造について解析を試みた。

## 【計算条件】

モンテカルロシミュレーションを用いてスリット型炭素細孔中の塩化カルシウム水溶液の構造を計算した。塩化カルシウム水溶液の濃度は  $1.0 \text{ mol dm}^{-3}$ 、温度 303 K と一定にし、細孔径は 0.4 - 2.0 nm の範囲で行った。イオンのパラメーターは CaCl<sub>2</sub> 結晶の格子エンタルピーより決定し、水分子は TIP5P モデル<sup>3)</sup> を用いた。また、細孔壁と吸着粒子間の相互作用は Steele ポテンシャルモデル<sup>4)</sup> を用いた。イオンと水分子の相互作用は Lennard-Jones ポテンシャルとクーロンポテンシャルを用い、クーロン力は長距離に及ぶ強い相互作用が働くため、Ewald 法により補正を行った。また、比較のためバルクでも同様の条件で計算を行った。

## 【結果と考察】

分子シミュレーションにより、平衡状態における炭素細孔中の塩化カルシウム水溶液の構造が得られた。細孔内のイオンや水分子の分布をみると、水分子は層状構造をとっており、その数は細孔径に比例していた。さらに詳細な構造解析を行うために動径分布解析を行った。Fig.1 に細孔径 0.5 nm、1.0 nm、バルク中における Ca<sup>2+</sup> -H<sub>2</sub>O 間の動径分布関数を示す。これをみると細孔径が小さくなるにつれてピークの位置が近距離側へシフトしており、形状も鋭くなっていた。これは細孔径が小さいほど、カルシウムイオン周辺の水分子が秩序だった構造をとっていることを示している。

そこで、カルシウムイオン周辺の水分子間の水素結合に着目し、細孔径 0.5 nm、1.0 nm、バルク中におけるカルシウムイオンに配位した水分子の O-H 間の動径分布関数、および純水中の O-H 間の動径分布関数を求めた (Fig.2)。カルシウムイオンに配位した水分子間の動径分布関数の形状をみると、水分子のみの場合とは大きく異なり、ピーク位置も遠距離側へシフトしていた。したがってカルシウムイオン周辺の水分子の水素結合は通常よりも弱められていることがわかった。また、細孔径 0.5 nm におけるカルシウムイオンに配位した水分子間の動径分布関数では、細孔径 1.0 nm と大きく異なり、ピークがよりはっきりと表れていた。このことから、細孔径 0.5 nm では、水素結合が弱められているにもかかわらず、カルシウムイオンに配位した水分子は秩序だった構造を

とっていることが示唆される。

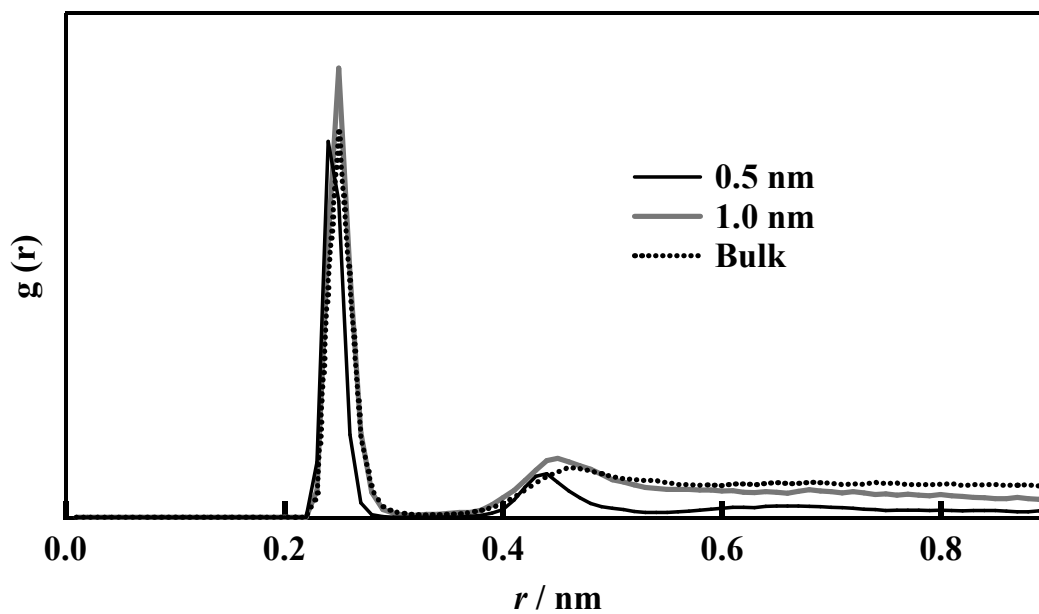


Fig.1 細孔およびバルク中における  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}$  間動径分布関数

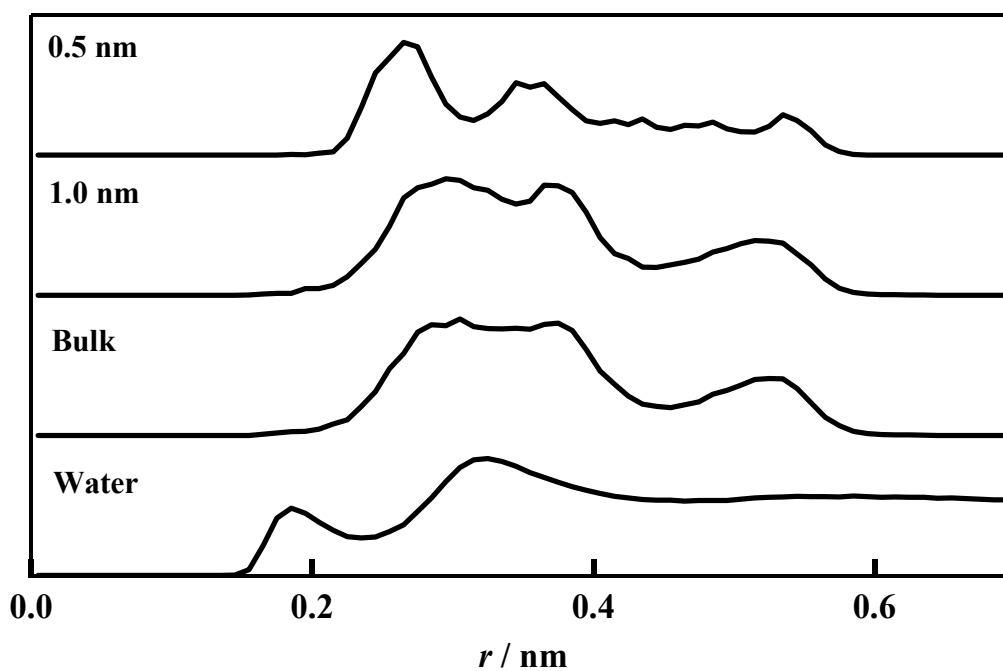


Fig.2 カルシウムイオンに配位した水分子の O-H 間動径分布関数

#### 【参考文献】

- 1) Kaneko, K.; Ohba, T.; Ohkubo, T.; Utsumi, S.; Kanoh, H.; Yudasaka, M.; Iijima, S. *Adsorption* **2005**, *11*, 21.
- 2) Ohkubo, T.; Konishi, T.; Hattori, Y.; Kanoh, H.; Fujikawa, T.; Kaneko, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11860.
- 3) Mahoney, M. W.; Jorgensen, W. L. *J. Chem. Phys.*, **2000**, *112*, 8910.
- 4) Steele, W. A. *Surf. Sci.* **1973**, *36*, 317.

## 一次元に束縛された水の輸送促進機構

(千葉大院・理<sup>1</sup>, 信州大・ENC 拠点<sup>2</sup>, 産業技術総合研究所<sup>1</sup>) 大場 友則<sup>1</sup>, 金子 克美<sup>2</sup>, 遠藤 守信<sup>2</sup>, 畠 賢治<sup>3</sup>, 加納 博文<sup>1</sup>

## Mechanism of Water Transportation through One-Dimensional Nanopores

(Chiba Univ.<sup>1</sup>, Shinshu Univ.<sup>2</sup>, AIST<sup>3</sup>) Tomonori Ohba<sup>1</sup>, Katsumi Kaneko<sup>2</sup>, Morinobu Endo<sup>2</sup>, Kenji Hata<sup>3</sup>, and Hirofumi Kanoh<sup>1</sup>

【緒言】 水は様々な化学反応、生化学活性において重要な役割を果たしているのは言うまでもない。例えば、ウォーターチャネルではナノオーダーの狭い空間(ナノ空間)で、水輸送を制御することで生化学活性のコントロールをおこなっている。<sup>1</sup> それゆえ、ナノ空間中での水の輸送機構の研究が活発になされているが、ウォーターチャネルの複雑な構造と柔軟性のため詳細な挙動の解明には至っていない。ところで、カーボンナノチューブの内部空間は 1 次元の疎水性ナノ空間であり、ウォーターチャネルのような生体膜通過チャネルのモデル構造となることが提唱されている。<sup>2</sup> また、このような 1 次元ナノ空間において特異な挙動が発現することが期待されている。例えば、1 次元ナノ空間中の水は氷様の構造を形成することが分子動力学シミュレーションや X 線構造解析から報告されている。<sup>3</sup> Holt らは 1 次元ナノ空間を通過する水が空気よりも早く輸送されることを示した。<sup>4</sup> しかしながら、なぜ高速輸送が可能となるのか明らかとなっておらず、特異的な輸送メカニズムの解明が望まれている。本研究では 2 種類の疎水性 Carbon Nanotube を用いて、水の 1 次元ナノ空間中の輸送メカニズムの解明をおこなった。

【実験・分子動力学シミュレーション】 カーボンナノチューブの平均直径を透過型電子顕微鏡観察 (JEM-2100F; JEOL Co.)、77 K での N<sub>2</sub> 吸着等温線、ラマン分光 (NRS-3100; JASCO Co.) 測定から求めた。カーボンナノチューブ中を水が輸送する速度を 303 K における水蒸気吸着速度測定から調べた。比較として、SF<sub>6</sub> の吸着速度測定もおこなった。吸着した水の赤外分光 (FT/IR-410; JASCO Co.) 測定をおこない、クラスター形成について検討した。

カーボンナノチューブ中の水の輸送をリープフラッグアルゴリズムによる分子動力学シミュレーションにより調べた。水分子間の相互作用は TIP-5P モデルを用い、<sup>5</sup> 水とカーボンナノチューブ間の相互作用は Lennard-Jones ポテンシャルモデルを用いて計算した。ここで、温度は 303 K 付近にコントロールし、0.1 fs 毎に分子間力の計算をおこなった。

【結果】 カーボンナノチューブの平均直径を上記の測定法により、総括的に求めると 2 種のカーボンナノチューブはそれぞれ平均直径 1、2 nm であることが明らかとなった。よって、カーボンナノチューブのカーボンサイズを差し引くと有効直径がそれぞれ 0.6、1.7 nm の 1 次元ナノ空間となる。ここでは上記カーボンナノチューブをそれぞれ Narrow-NT、Wide-NT とよぶ。図 1 は水と SF<sub>6</sub> の吸着速度を横軸ログ表示で示している。水の吸着速度は SF<sub>6</sub> と比べ、著しく遅い。水は

分散力と水素結合によって水分子間で強く相互作用するのに対し、 $\text{SF}_6$  は分散力のみで弱い分子間相互作用しか働かないためであると考えられる。また、充填率 0.1 以上において Wide-NT 中の水と比べ、Narrow-NT 中の水の吸着速度は速い。上記のように、水素結合形成が各 NT 中の水輸送に強く影響していると考えられる。

水素結合形成について調べるために、各 NT に吸着した水分子の赤外分光スペクトルを測定した。Wide-NT に吸着した水分子は水蒸気のピークと同じ位置にシャープなピークがみられるとともに、バルクの液体に近い位置にブロードなピークが得られた。これは水素結合によりクラスターが形成したためであると考えられ、<sup>6</sup> このとき 3 分子程度のクラスターを形成していることが明らかとなった。一方で Narrow-NT に吸着した水分子はクラスター由来のピークはみられず、単分子のピークのみがみられた。すなわち、Narrow-NT では吸着した水分子の水素結合が著しく制限されるために、速い水輸送が可能になると考えられる。これは分子動力学シミュレーションの結果からも示された。

すなわち、1 次元疎水性ナノ空間において、水素結合形成が抑制されるために、水分子が自由に動くことができ、水の高速度輸送がなされることが明らかとなった。

1. Agre, P.; Brown, S.; Nielsen, S. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1995**, *7*, 472–482.

2. Sansom, M. S. P.; Biggin, P. C. *Nature* **2001**, *414*, 156–157.

3. (a) Koga, K.; Gao, G. T.; Tanaka, H.; Zeng, X. C. *Nature* **2001**, *412*, 802–805. (b) Maniwa, Y.; Kataura, H.; Abe, M.; Udaka, A.; Suzuki, S.; Achiba, Y.; Kira, H.; Matsuda, K.; Kadowaki, H.; Okabe, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *401*, 534–538.

(c) Ohba, T.; Taira, S.; Hata, K.; Kaneko, K.; Kanoh, H. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3634–3637.

4. Holt, J. K.; Park, H. G.; Wang, Y.; Stadermann, M.; Artyukhin, A. B.; Grigoropoulos, C. P.; Noy, A.; Bakajin, O. *Science* **2006**, *312*, 1034–1037.

5. Mahoney, M. W.; Jorgensen, W. L. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8910–8922.

6. Xantheas, Jr. S. S.; Dunning, T. H. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 8774.

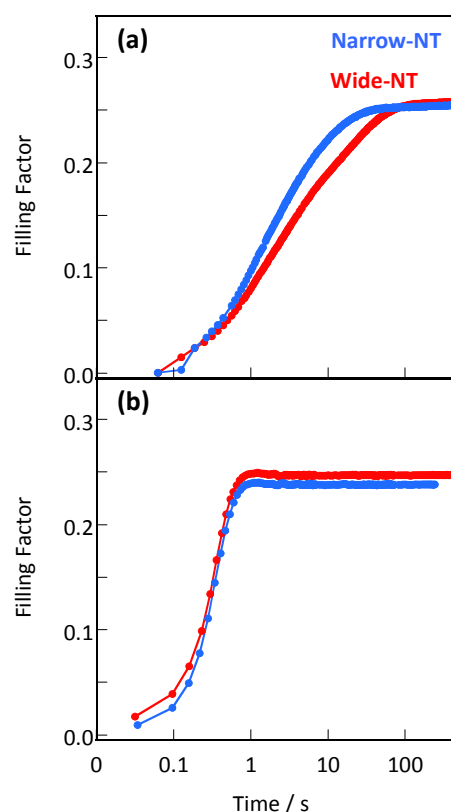


図 1 303 K における水(a)と  $\text{SF}_6$ (b)の吸着速度。

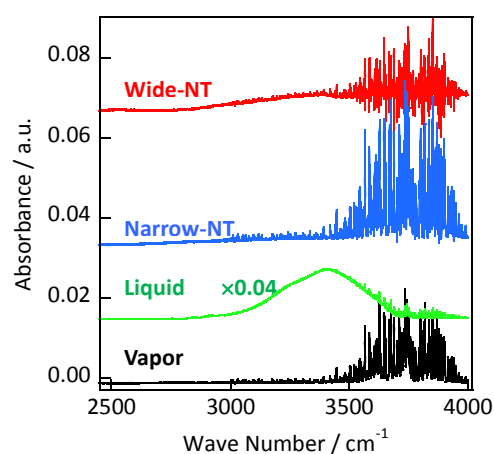


図 2 Wide-NT、Narrow-NT 中に吸着した水の赤外分光スペクトル。比較としてバルクの液体、水蒸気の赤外分光スペクトルも示す。

## 水/疎水性液体界面の構造と振動スペクトルの多様性: 分子動力学計算から得られる知見

(東北大院・理) ○石山達也, 佐藤 祐史, 森田明弘

**【序】** 水/有機液体界面のような液/液界面は, ミセル, 生体膜構造, タンパク質折り畳み, 分離, 抽出, 相間移動触媒など多くの物理化学過程において重要である. Richmond らは, 界面選択的な和周波発生(SFG)分光法を用いて水/空気, 水/四塩化炭素( $\text{CCl}_4$ ), 水/1,2 ジクロロエタン(DCE)界面の OH 伸縮振動スペクトルを測定したところ, 図 1 のような結果を得た[1]. 図 1 の結果をみると, それぞれの界面における水の構造は全く違ったもののように見える. 特に, 水/DCE のスペクトルはほぼ消失しているように見えるが, これは水分子の配向構造が消失したことを意味するのだろうか? 本研究は, 分子動力学(MD)シミュレーションによって, 水/空気, 水/ $\text{CCl}_4$ , 水/DCE 界面の構造と SFG スペクトルを直接計算することによって, 図 1 のスペクトルがどのような界面構造を意味しているのかを明らかにした.

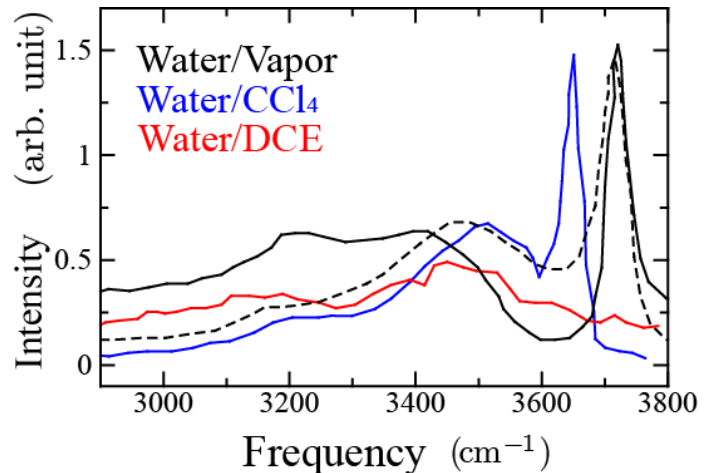


図 1: 実験で報告された液液界面での和周波スペクトル[1].

### 【計算方法】

振動かつ分極(point dipole)モデルを用いた分子動力学シミュレーションを行った. 水モデルとして我々が以前 SFG スペクトルを計算するために開発したもの[2]を用いた. 一方,  $\text{CCl}_4$  と DCE のモデルは Dang らにより開発されたモデルを用いた[3]. 和周波スペクトルの計算には, 時間相関関数の方法を用いた[4]. シミュレーションの詳細については, 文献[5]を参照されたい.

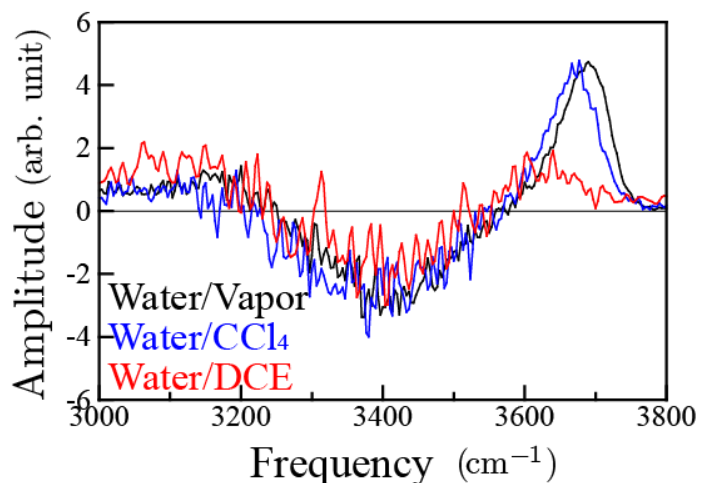


図 2: MD シミュレーションによって計算された  $\text{Im}[\chi]$ .

### 【結果】

SFG スペクトルは, 界面の二次感

受率  $\chi$  の絶対値の二乗に比例する ( $|\chi|^2$ ). MD シミュレーションにより計算された SFG スペクトル  $|\chi|^2$  は、図 1 に示した実験のスペクトルをよく再現することがわかった[5].

二次感受率  $\chi$  の虚部の符号は分子の配向構造を直接反映するため、ここでは、計算された  $\text{Im}[\chi]$  について議論する. 図 2 に結果を示す. 水/空気界面の結果 (黒線) をみると、(1)  $3700\text{cm}^{-1}$  あたりで正、(2)  $3400\text{cm}^{-1}$  あたりで負、(3)  $3100\text{cm}^{-1}$  あたりで正の符号を示している. (1) のピークは界面において水素結合していない dangling OH、(2) のピークは水素結合している H-bonded OH、(3) は界面平行方向に強く水素結合している strongly H-bonded OH の伸縮振動にそれぞれ帰属される[6].

水/  $\text{CCl}_4$  の結果(青線) をみると、水/空気の結果(黒線) とほぼ類似していることがわかり、水の配向構造は両者でほとんど変わらないことを示している. 従って、図 1 に示した  $|\chi|^2$  の黒線と青線のスペクトルの違いは、構造由来ではなく  $\chi$  の非共鳴項の違いに由来していることが示される[5](ただし、水/  $\text{CCl}_4$  界面における Dangling ピークのレッドシフトは、水/  $\text{CCl}_4$  の相互作用に由来する).

次に、水/DCE 界面の結果(赤線) をみると、他の 2 つと比べて、特に上記(1)の  $3700\text{cm}^{-1}$  あたりの dangling OH のピークがかなり弱くなっていることがわかる. この原因は、DCE 相側を向いた OH が DCE 分子の Cl サイトと強く相互作用し、OH 振動が大きくレッドシフトしたためであることが本研究から明らかとなった. 実際、図 3 に示すように、界面において DCE 分子の Cl サイトと強く相互作用している水分子が多く見られた.  $\text{CCl}_4$  と比較して DCE の Cl サイトの方が陰性を帯びており、プロトンを強く引き付けることになる. これが原因で、図 2 の  $3700\text{cm}^{-1}$  あたりのピークが強くレッドシフトし、上記(2)の負のピークと打ち消し合うことにより、結果的に図 1 の赤線のスペクトルが消失しているようにみえることがわかった.

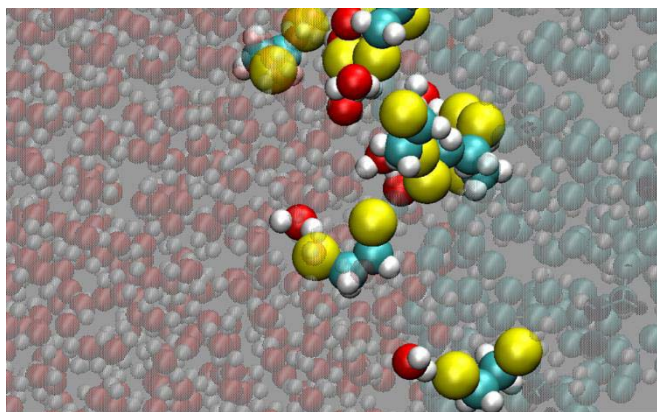


図 3: MD シミュレーションによる水/DCE 界面のスナップショット. 左側が水相, 右側が DCE 相である. 水の H と DCE の Cl の距離が動径分布の first minimum 値よりも小さいペアを濃く描いている.

#### 【参考文献】

- [1] Moore, F. G.; Richmond, G. L. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 41, 739.
- [2] Ishiyama, T.; Morita, A. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 721.
- [3] Chang, T.; Dang, L. X. *J. Chem. Phys.* **1996**, 104, 6772., Wick, C. D.; Dang, L. X. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 112, 647.
- [4] Morita, A.; Ishiyama, T. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 5801.
- [5] Ishiyama, T.; Sato, Y.; Morita, A. *submitted for publication*.
- [6] Ishiyama, T.; Morita, A. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 16299., *ibid J. Chem. Phys.* **2009**, 131, 244714., Ishiyama, T.; Takahashi H.; Morita, A. *J. Phys.: Condens. Matter* **2012**, 24, 124107., *ibid Phys. Rev. B* **2012**, 86, 035408.



4B16

## Ultrafast Vibrational Dynamics of Water at a Charged Interface Revealed by Two Dimensional Heterodyne-Detected Vibrational Sum-Frequency Generation (2D HD-VSFG) Spectroscopy

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN) Prashant Chandra Singh, Satoshi Nihonyanagi, Shoichi Yamaguchi, Tahei Tahara

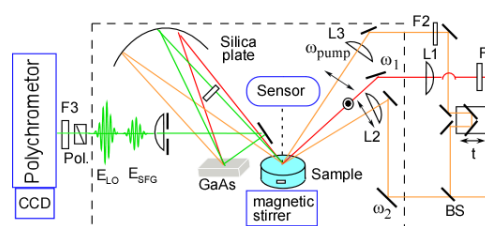
### [Introduction]

The water dynamics in the bulk has been intensively studied by various time-resolved (TR-) spectroscopies, and the ultrafast dynamics relating to the spectral diffusion, inhomogeneity, energy transfer etc. have been observed. Especially, two-dimensional infrared (2D-IR) spectroscopy is a powerful tool and it has been playing a key role.<sup>1</sup> On the other hand, the dynamics of water at interfaces is much less understood because an interface-selective spectroscopy is needed to probe only interfacial water in the presence of bulk water behind. The 2nd-order nonlinear spectroscopy, in particular vibrational sum-frequency generation (VSFG), has intrinsic interface specificity and has been widely utilized to study steady-state properties of water at various interfaces. Recently, TR-VSFG measurements (i.e., pump-probe and 2D-VSFG) have been realized at aqueous interfaces.<sup>2</sup> Since heterodyne detection (HD-) enables us to directly measure  $\chi^{(2)}$  spectra, it is very crucial to realize heterodyne detection in TR-VSFG measurements to elucidate true vibrational dynamics of interfacial water.<sup>3</sup> Here, we report the extension of our TR-HD-VSFG method to two-dimensional spectroscopy, which enabled us to observe 2D-HD-VSFG spectra at an aqueous interface for the first time.

### [Experimental Setup]

Figure 1 shows the TR-HD-VSFG setup which is the combination of IR pump and HD-VSFG probe. A narrow band visible ( $\omega_1$ ) and broadband IR ( $\omega_2$ ) beams are used for the HD-VSFG probe. In the TR-HD-VSFG setup, a pump IR pulse ( $\omega_{\text{pump}}$ ) was obtained by splitting ca. 80% of the energy from the IR output of the different frequency generator.

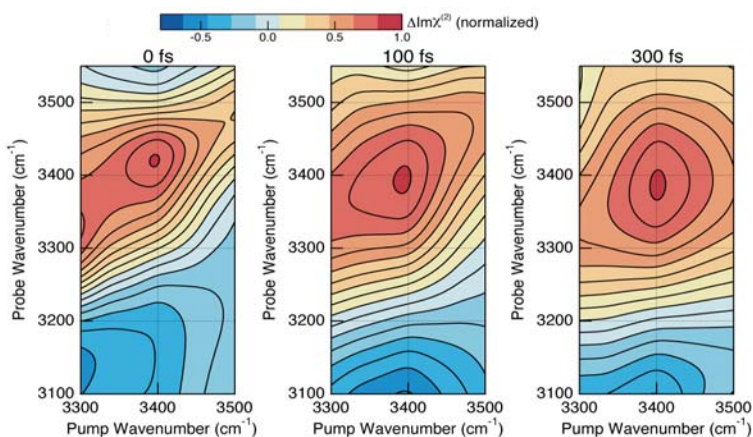
The  $\omega_{\text{pump}}$  pulse was passed through a band pass filter to narrow the bandwidth down to  $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$ . In order to make 2D HD-VSFG, the  $\omega_{\text{pump}}$  dependence of  $\Delta \text{Im}\chi^{(2)}$  was measured for the five different pump whose center wavenumber was at 3300, 3340, 3400, 3475, and 3500  $\text{cm}^{-1}$ . The SF,  $\omega_1$ ,  $\omega_2$ ,  $\omega_{\text{pump}}$  beams were s-, s-, p-, and p-polarized, respectively.



**Figure 1:** The optical Scheme of the 2D HD-VSFG setup.

## [Results and Discussion]

Figure 2 shows the 2D HD-VSFG spectra in the OH stretch region of HOD in D<sub>2</sub>O at an interface positively charged by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) measured at the delay times of 0, 100, and 300 fs after IR photoexcitation. In the 2D HD-VSFG spectra, the horizontal and vertical axes represent pump and probe wavenumbers, respectively. The red lobe of the spectra represents positive  $\Delta\text{Im}\chi^{(2)}$



**Figure 2.** 2D HD-VSFG spectra of the OH stretch of HOD in D<sub>2</sub>O at the CTAB interface for 0, 100, and 300 fs delay times after photoexcitation. The concentration of CTAB is 0.5 mM and water isotope ratio is H<sub>2</sub>O: HOD: D<sub>2</sub>O = 1:8:16. In the 2D HD-VSFG spectra red color represent bleaching of the 0–1 transition, whereas negative peaks blue color indicate the hot band due to the 1–2 transition. The color scales are shown at the top of the figures.

associated with ground-state bleaching of the 0–1 transition, and the blue represents negative  $\Delta\text{Im}\chi^{(2)}$  associated with the 1–2 transition. The 2D HD-VSFG spectra clearly represent the overall feature of ultrafast vibrational dynamics in the OH stretch region at the charged water interface. In fact, the spectrum at 0 fs is diagonally elongated, which indicates the memory of the pump wavenumber and the initial inhomogeneous frequency distribution on the 0–1 and 1–2 transitions. At 100 fs, the elongation becomes less prominent, because the initial frequency distribution is getting randomized by spectral diffusion. At 300 fs, the elongation almost disappears, and the slope of the node separating the 0–1 and 1–2 transitions becomes nearly parallel with the horizontal axis. This demonstrates that the memory of the pump wavenumber is nearly lost and the spectral diffusion is almost completed at 300 fs. Inhomogeneity and spectral diffusion of water at the charged interface is clearly exhibited by the 2D HD-VSFG technique, which shows the novelty of this technique.

## [References]

1. E. T. J. Nibbering, and T. Elsaesser, *Chem. Rev.* **104**, 1887 (2004).
2. J. A. McGuire, and Y. R. Shen, *Science* **313**, 1945 (2006).
3. S. Nihonyanagi, P. C. Singh, S. Yamaguchi, and T. Tahara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **85**, 758 (2012).

## 4B17 X線反射率法によるタンパク質の界面吸着ダイナミクスの観測 V: ミリ秒計測を目指した測定系の飛躍的迅速化

(近畿大<sup>1</sup>, 東京学芸大<sup>2</sup>, 高工研-PF<sup>3</sup>, JASRI SPring-8<sup>4</sup>)

○矢野陽子<sup>1</sup>, 荒川悦雄<sup>2</sup>, Voegeli Wolfgang<sup>3</sup>, 松下正<sup>3</sup>, 宇留賀朋哉<sup>4</sup>

生体が物質を認識する、ということは、物質表面にタンパク質が吸着することによって起こる。また、人工組織や生体物質を使った新しい機能性材料の開発など、医学的および技術的応用の両面においても生体物質と界面の相互作用を知ることは非常に重要である。我々はこれまで X 線反射率法をもちいてタンパク質の界面吸着過程を分オーダーの時間分解能で観測し、界面変性のメカニズムについて考察してきた。しかしながら、分オーダーの時間分解能では、測定対象が限られていた。今回は、新しい測定系を使って 1 秒の時間分解能を達成したので報告する。

### 1. 序論

タンパク質が気液界面に吸着平衡に到達するまでの時間は、タンパク質によって様々であり、数秒から数日に渡ることが知られている。一般に、タンパク質の表面疎水性が高く、構造安定性の低いものほど吸着速度が速い。図 1 は同じ濃度（混合後の濃度は 0.07mM）の球状の 3 つのタンパク質 (LSZ: lysozyme, BSA: bovine serum albumin,  $\beta$ -LG:  $\beta$ -lactoglobulin) の表面圧の変化を示したものであるが、リゾチームは数時間かかるのに対し、BSA や $\beta$ -ラクトグロブリンでは数分で吸着平衡に達してしまう [1]。

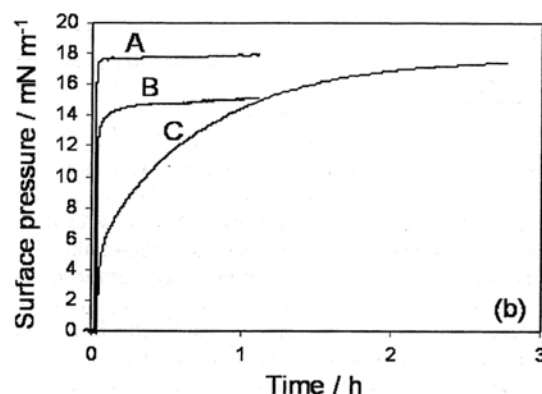


図 1 表面圧の時間変化 [1]  
 $\beta$ -LG (A), BSA (B), LSZ (C)

X 線反射率法は、X 線の全反射現象を利用した界面の構造解析手法である。界面深さ方向の電子密度分布をサブナノメートルオーダーの分解能で観測できることから、表面に吸着したタンパク質の 3 次構造に関する構造を得ることができ、2 次構造を観測する振動分光法とは相補的な実験手法である。これまで我々は SPring-8 の溶液界面反射率計を用いてリゾチーム (LSZ) の気液界面吸着過程を 3 分の時間分解能で観測してきた [2]。一方、もっと吸着速度の速いタンパク質について観測するためには、時間分解能を上げる必要がある。そこで今回は、現在開発中の『波長・角度同時分散型時分割 X 線反射率計 [3]』を用いて、様々なタンパク質の気液界面吸着過程を 1 秒の時間分解能で計測することに成功したので報告する。

### 2. 実験装置

X 線反射率測定では界面での鏡面反射強度の散乱ベクトル  $q (= 4\pi \sin \alpha / \lambda, \lambda$  は X 線の波長)

依存性を測定することにより、表面深さ方向の密度分布を得ることができる。X線の波長を固定し入射角度を走査する角度走査法が一般的であるが、角度走査型の回折計では、たとえ放射光を光源に用いたとしても、メカニカルな動作時間が律速となって、少なくとも3分程度の測定時間を要してしまう。本研究で新たに用いた『波長・角度同時分散型時分割X線反射率計[3]』は、測定中にメカニカルな動作を伴わないため、迅速な測定を行うことができる。図2に測定系の概略図を示す。広い散乱ベクトル $q$ の範囲にわたる反射率曲線プロファイルと同時に迅速に測定することを可能とするために、Siの薄板結晶を水平方向には彎曲させ鉛直方向には捻ったポリクロメータを用いて $\lambda$ と $\alpha$ を同時に変化させている。

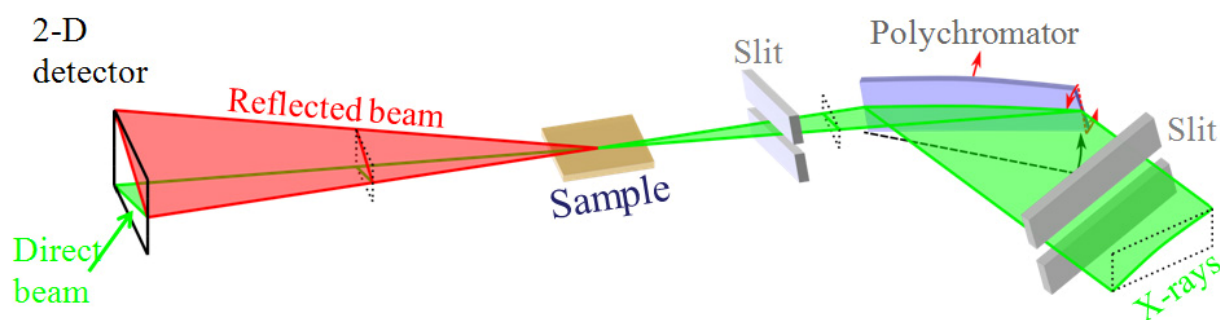


図2 波長・角度同時分散型時分割X線反射率計

この装置を高エネルギー加速器研究機構の放射光科学研究施設 PF-AR に設置して 15.4nm の金薄膜の測定を行ったところ、その厚さの効果による干渉パターン (Kiessig フリンジ) が観察された。測定時間 0.1 秒のものでも、Kiessig フリンジは十分な S/N で観測されていることが確認できている (図3、[4])。タンパク質の気液界面吸着過程についての結果は、当日報告する。

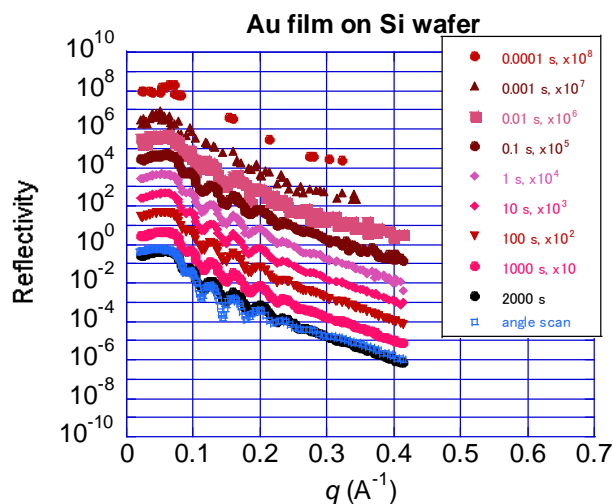


図3 15.4nm の金薄膜のX線反射率曲線

#### 参考文献

- [1] M. D. Lad, *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 2179-2186 (2006)
- [2] Y. F. Yano, *et al.*, *Langmuir*, **25**, 32-35 (2009); *J. Phys. Chem. Lett.*, **2**, 995-999 (2011)
- [3] 松下 正、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラム「波長角度同時分散型時分割X線反射率計の開発」(開発期間 H22-25)
- [4] 荒川悦雄ら、日本放射光学会第25回年会発表(2012年1月)

## 4B18

### 表面増強赤外分光法による古細菌ロドプシン単分子膜の光反応の検討

(ベルリン自由大学 物理学研究科) ○安宅憲一、Joachim Heberle

【序】細胞膜上に存在する様々な膜受容タンパク質は、光、電位等の外部信号を受けてその構造を変化させながら細胞内へ情報を伝達すると同時に、この信号を複合的に判断し環境に応じてその反応を自ら制御できる。この様なタンパク質反応機構の解明は、生物の多様な機能の本質的理解に迫ると同時に、この機能を模したインテリジェント分子のデザインにも寄与すると期待される。本研究ではこの様な「バイオ修飾電極」によるタンパク質機能解析の一例として、古細菌ロドプシン（センサリーロドプシンII: SRII）の高配向なタンパク質単分子膜を構築し、その光サイクル反応時の構造変化の様子を表面増強赤外分光法 (SEIRAS)により検討した。さらに、電極電位を制御する事により、細胞膜における膜間電位差を印可した状態を吸着タンパク質に再現できる。様々な電位制御下で上記計測を行い、光サイクル反応時における膜間電位差の影響を検討した。

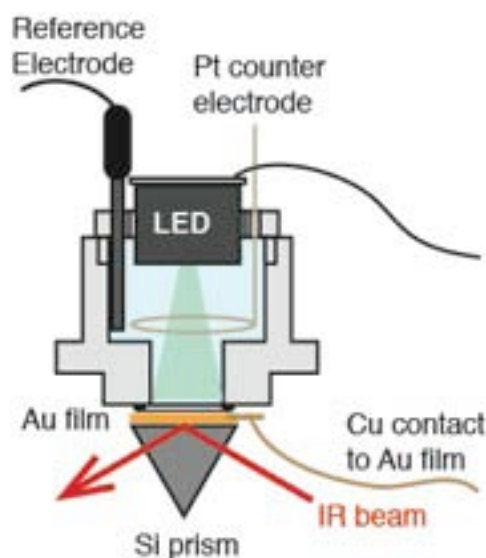


図1 表面増強赤外分光法の実験セットアップ

【実験】図1に表面増強赤外分光法の実験セットアップの概略図を示す。Siプリズム上に金薄膜を無電解メッキ法により作成した。金薄膜は吸着種のシグナル増強と同時に、電極としても用いた。赤外プローブ光はプリズム後方より全反射条件で入射し(ATR-Krestchmann光学配置) SEIRAスペクトルを測定した。光サイクル反応の励起光源としては500nm波長のLEDを用いた。サンプルには *Natronobacterium pharaonis*由来のSRIIを可溶化、精製したものを用いた。金電極上への高配向タンパク質単分子膜の作成には、アフィニティークロマトグラフィーの原理を応用した。金属電極表面をニッケル-ニトリ

ロトリアセチック酸(Ni-nitrotriactic acid: Ni-NTA)を末端にもつチオール化合物で自己集合的に修飾する。この表面にHis-tag標識されたSRIIを導入し、His-tagとNi-NTAの特異的に配位結合を介して、高配向に単分子吸着させる。SRIIは界面活性剤で可溶化して配向吸着させた後、Bio-beadsを用いて脂質二分子膜内に再構成させた。

【結果および考察】 図2に様々な電位におけるセンサリーロドプシンII (SRII) 単分子膜の光反応時における構造変化のSEIRAスペクトルを示す。-0.4 Vを境にスペクトルが大きく変化している。SRIIは光反応時に幾つかの反応中間体を経るが、この実験条件下では最も反応速度が遅い中間体がスペクトルとして捕らえられる。ここで  $>-0.4V$ で見られるスペクトルはO-中間体、 $<-0.4V$ の領域の物はM-中間体に対応する。この変化は-0.4Vを境に光反応律速がO-からM-中間体に移行したことを示している。また電位の変化によって生じる電極表面の局所的なpH変化を特定のアミノ酸残基 (Asp193) が感知しプロトン化される事が明らかとなった。これがシグナル伝達経路の水素結合ネットワークの再配列を誘引し、光センサー分子のレチナール周りの構造を変化させて反応中間体の律速状態をコントロールしている事が示唆された。

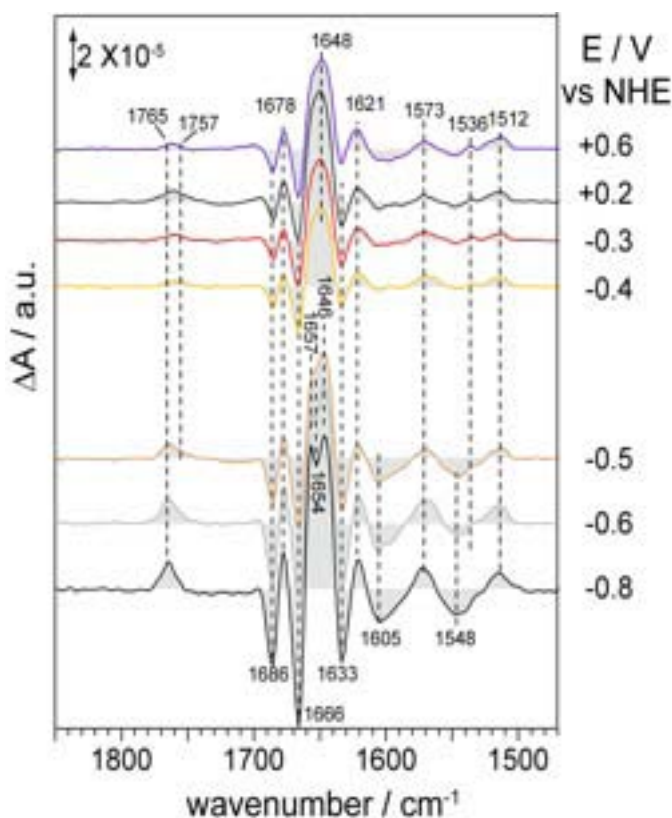


図2. 様々な電位におけるSRIIの光反応のSEIRAスペクトル

【参考文献】 1) Xiue Jiang, Martin Engelhard, Kenichi Ataka\*, and Joachim Heberle, J. Am. Chem. Soc., 132 (31), 10808-10815 (2010)

## リン脂質の酸解離平衡を利用したベシクル内部への物質輸送

(神奈川大理<sup>1</sup>, 東大院複雑系生命システム研究セ<sup>2</sup>, 東大院総合<sup>3</sup>)  
 鈴木健太郎<sup>1,2</sup>, 網干亮<sup>3</sup>, 大倉優作<sup>3</sup>, 栗原顕輔<sup>3</sup>, 豊田太郎<sup>2,3</sup>, 菅原正<sup>1,2</sup>

## Transportation to an Inner Water Pool of Giant Vesicles on the Basis of Vesicular Adhesion and Fusion Caused by an Acid-Dissociation Equilibrium of Phosphor Lipids

(Kanagawa Univ.<sup>1</sup>, Univ. of Tokyo<sup>2</sup>)

Kentaro Suzuki<sup>1,2</sup>, Ryo Aboshi<sup>2</sup>, Yusaku Okura<sup>2</sup>, Kensuke Kurihara<sup>2</sup>, Taro Toyota<sup>2</sup>, Tadashi Sugawara<sup>1,2</sup>

## 【序】

リン脂質が水中で自己集合して形成されたベシクルが示す分散と凝集に関する研究は、人工細胞研究やドラッグデリバリーへの活用などで注目されている。コロイドの一種であるベシクルが、分散液中で準安定的に拡散できるのは、ベシクル間に働く引力的な van der Waals 相互作用に対して、電気二重層間の静電相互作用が斥力的に働くことによる。通常コロイドは、pH 変化による酸解離平衡などにより電気二重層を破壊すれば、すみやかに凝集が起こる。ところが、ホスファチジルコリン(PC)のような両イオン性脂質の場合は、リン酸部位をプロトンしてもカチオン性部位が残るため(Fig. 1)、pH を低下しても膜表面の電荷が失われることはない。ところが、昨今我々は、PC からなるベシクルに、10%の PG を混入させたハイブリッドベシクルでは、特定の pH 周辺で凝集および融合が起こることを見いだした[1]。この現象には、ベシクルを構成する脂質分子の酸解離平衡に加え、試料調整時の組成ゆらぎが重要な働きをする。また、ここで見られる機構を応用することで、ターゲットを指定したベシクル内水相への分子輸送が実現された。[2]

## 【結果と考察】

## 1. 組成ゆらぎによって実現される特定 pH でのハイブリッドベシクル凝集

両イオン性リン脂質 POPC (PC)と、アニオン性リン脂質 POPG(PG)とからなるハイブリッドベシクル (PC:PG = 9:1)を、クロロホルム溶液から薄膜法により調整した。これらベシクル分散液に、1 N HCl 溶液を滴下し、分散液の pH を酸性へと変化させたところ、pH 2.5 付近で凝集体の形成を確認した。一方、pH 2 以上および 3 以下の溶液では、凝集は見られず、ベシクルは分散したままであった。さらに、凝集状態にあるベシクルを、半日以上静置するとベシクル同士が融合した。

ここで見られるダイナミクスは、ハイブリッドベシクルを構成するリン脂質の酸解離平衡に関連づけられる。リン脂質ベシクルの親水部のホスフェート部位は、分散液の pH 低下と共にプロトンされる(Fig. 1)。これにより膜上にあるホスフェートの数が減少し、もともと全体としてアニオン性を呈していたハイブリッ

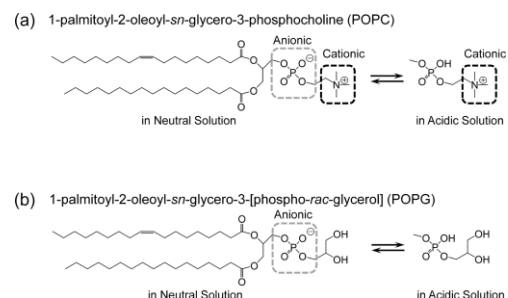
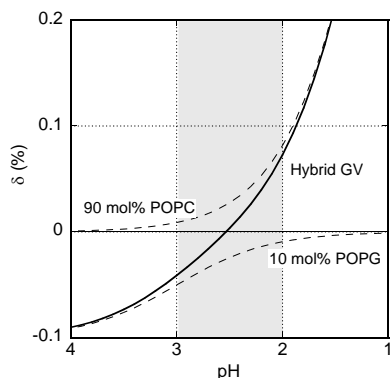
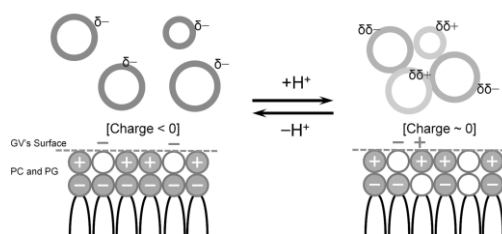


Fig. 1 PC および PG の酸解離平衡



**Fig. 2** ハイブリッドベシクル表面電荷の pH 依存性

ドベシクル表面のアニオン性は低下する(Fig. 2, 3)。さらに、アニオン性の源であるプロトネーションされていない PG の数よりも、カチオン性の源であるプロトネーションされた PC の数が勝ると、ハイブリッドベシクル表面電荷はカチオン性へと変化していく。PC および PG の  $pK_a$  はそれぞれ 1 および 3 付近にあるため、膜表面がアニオン性からカチオン性に切り替わる pH はほぼ 2.5 付近となる(Fig. 2)。このことから、ベシクル凝集は、ハイブリッドベシクルの表面電荷と関連していると考えられる。しかし、この pH 付近であっても、 $pK_a$  が 1 である PC の 97% は、プロトネーションされずに残っている。そのため、ハイブリッドベシクルの電気二重層は、中性における PC ベシクルと同程度には存在しており、表面電荷がゼロになることが接着の直接の原因とは考えにくい。そこで、ベシクル組成のゆらぎに着目した。薄膜法における薄膜調整時において、ベシクルの組成は仕込み比を中心とした分布を持ち、計算上表面電荷がゼロとなる pH においても、PG 含有量が少なくカチオン性を呈すベシクルと、逆に PG 含有量が多くアニオン性を呈すベシクルとが多数存在し、それらの間に静電引力が生じると考えられる(Fig. 3)。またこの機構では、接着した膜間の相互作用は、膜面内の一部のアニオン種とカチオン種との間で局所的に起こるため、部分的に膜構造のほつれが起きやすく、膜全体で複数のベシクルが均等に接合する場合よりも、ベシクル間融合が生じ易いのではないかと考えられる。このように、一見均質な系であっても、それらのわずかの組成ゆらぎから個々の要素が新しい役割を獲得し、特徴的な集団挙動が出現する機構は興味深い。



**Fig. 3** 組成ゆらぎに起因するベシクル接着過程の模式図: ベシクル膜の表面電荷(上)。リン脂質の親水部の電荷(下)

## 2. ベシクル組成比の違い特定 pH でのハイブリッドベシクル凝集

リン脂質の酸解離平衡を利用した、ベシクル間融合を利用して、標的となるベシクル内水相に、輸送体ベシクルを利用して分子輸送を行うことを試みた。輸送体と標的との役割を明確化するために、酸添加後のベシクル表面電荷を考慮して、両ベシクルの組成を調整した。輸送体ベシクルは、PG とコレステロール (Chol) の比率が 9:1 のベシクルをメンブレンフィルタにより粒径を 0.1  $\mu\text{m}$  に調整し、輸送物として水溶性フルオロセインを内封した。一方標的ベシクルとしては、PC:PG:Chol = 8:1:1 の比率で調整したジャイアントベシクルを用いた。これらベシクル表面電荷は、中性の溶液中ではともにアニオン性を呈すが、酸性条件では輸送体ベシクルのみがカチオン性となり、標的ベシクルとの間に引力的相互作用が期待される。実際に、これらの分散液を混合し pH を 3 付近まで下げると、標的表面上に輸送体が接着と、さらに約半日程経て標的内水相への蛍光分子の輸送が行われたことが確認された[2]。

この結果を踏まえ、本系による物質輸送の酵素反応系への利用を確認するために、PCR 酵素反応系のうち、反応基質である dNTP 以外を封入した標的ベシクルに、dNTP を内封した輸送体ベシクルを、先と同様の操作で融合させた。その後、PCR 熱サイクルを作用させると、標的ベシクル内での DNA の複製反応の進行が確認された[3]。