

サイズ・形状を変えた金ナノ粒子修飾酸化チタンの電子状態評価

(関学大理工)○領木貴之、田邊一郎、尾崎幸洋

Electronic state changes of TiO₂ upon different Au nanoparticles size and shape
(Kwansei Gakuin University, School of Science and Technology)

○Takayuki Ryoki, Ichiro Tanabe, Yukihiro Ozaki

【序論】酸化チタン(TiO₂)は遠紫外-紫外光を照射することで有機物などの汚れを分解する性質を持ち、壁の防汚塗料に用いられる代表的な光触媒である。また、TiO₂に金属ナノ粒子を修飾することで、TiO₂-金属ナノ粒子界面にポテンシャル勾配を形成し、電荷分離効率を向上させることが知られている。現在では、金属ナノ粒子修飾 TiO₂は光触媒材料として幅広く実用化されていることに加え、次世代型光太陽電池材料として期待されている。しかし、TiO₂は遠紫外～紫外域で光触媒能を発現するが、強い吸収から光学特性の評価が困難という課題を持つ。また、TiO₂と金属ナノ粒子の種類・サイズ・形状などの各因子による光触媒能への系統的な影響を評価する手法が確立されていない。そこで、当研究室では、減衰全反射法を搭載した遠紫外分光システム(ATR-FUV 法)を独自に開発することで、TiO₂の ATR-FUV スペクトル(150-300 nm)の測定を実現し、遠紫外～紫外域中における機能性材料の物性評価法として確立することに成功した。本研究では、ATR-FUV 法を用いて金属ナノ粒子修飾 TiO₂のより高活性なモデルを探索する一環として、[1]Au ナノ粒子サイズ(5,10,20,60 nm)変化[2] Au ナノ粒子形状(Au ナノキューブ)変化についてスペクトル測定を行ない、各因子による遠紫外～紫外域中の電子状態変化を検討した。

【実験】 [1] TiO₂ 粉末(アナターゼ：直径 5 μm)1g に対し、Au ナノ粒子溶液(5,10,20,60 nm)をそれぞれ滴下し、溶媒が完全に蒸発するまで混合しサンプル作製後、ATR-FUV スペクトルを測定した。[2]Au ナノキューブ作製として Jihui Zhang が報告した手法に従い、合成を行った [Langmunir 2014, 30, 2480-2489]。CTAB 溶液に HAuCl₄、アスコルビン酸、NaBH₄を加え、攪拌後 28°Cの恒温槽で一晩放置し Au ナノキューブを作製した。その後、作製した Au ナノキューブを滴下し、[1]と同様にサンプルを作製後 ATR-FUV スペクトル測定を行った。図 1 に作製した Au ナノキューブの SEM 画像、図 2 に Au ナノキューブの可視吸収スペクトル、図 3 に Au ナノキューブ修飾 TiO₂の SEM 画像を示す。

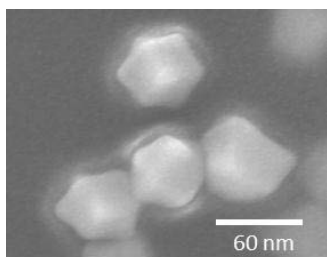


図 1. Au ナノキューブの SEM 画像

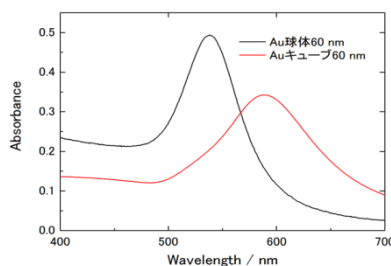


図 2. Au ナノキューブの可視吸収スペクトル

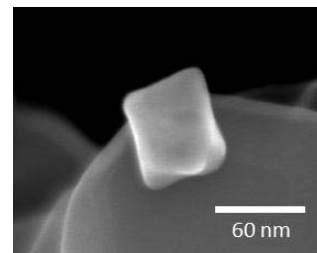


図 3. Au ナノキューブ修飾 TiO₂の SEM 画像

【結果・考察】サイズの異なる Au ナノ粒子 (5,10,20,60 nm)を修飾した TiO₂ のスペクトルについて、図 4 に示す。Au 修飾により、長波長域の吸収は減少し、短波長域の吸収は増大を示した。この金属ナノ粒子修飾によるスペクトル変化の増減は、「効果①キャリア移動による減少効果」と「効果②電荷分離効率の向上による増強効果」の足し合わせで示されていると考えられる。効果①では、TiO₂ と Au の接触時に TiO₂ から Au への電子移動が生じることでプローブ光照射前に TiO₂ 中の電子数が減少し、強度が低下する。効果②では、Au ナノ粒子が電子プールとして機能することで電荷分離効率を向上させ、強度が増大する。つまり、長波長域では効果①がより大きく反映され強度が減少を示し、短波長域では効果②がより大きく反映され強度が増強を示したと考えられる。また、図 4 の ATR-FUV スペクトルより、修飾する金属サイズが小さくなるにつれて大きなスペクトル変化を示すことが分かる。以前に報告された TiO₂-金属ナノ粒子種(Pt,Pd,Au) 変化では、仕事関数のより大きな金属ナノ粒子を修飾させるほど大きなスペクトル変化を示した。[Chem. Commun., 2014, 50, 2117-2119] さらに、光触媒活性測定をでは TiO₂-金属間の仕事関数の差が大きいほど、より大きな電荷分離効率を示していた。したがって、図 4 の金属サイズによるスペクトル変化は各金属サイズに仕事関数が依存しており、スペクトル変化が観測されたと考えられる。また、光触媒活性測定を行った結果について図 5 に示す。図 5 よりサイズが小さいほど高い光触媒活性を示し、各金属サイズと光触媒活性に相関が観測された。このことからやはり、仕事関数が金属サイズに依存している可能性が示唆される。今後は、XPS 測定から各金属サイズの仕事関数を明らかにすることを検討している。

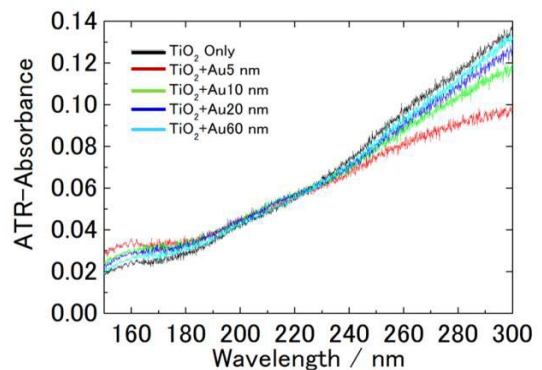


図 4. 各 Au ナノ粒子サイズを修飾した TiO₂ の ATR-FUV スペクトル

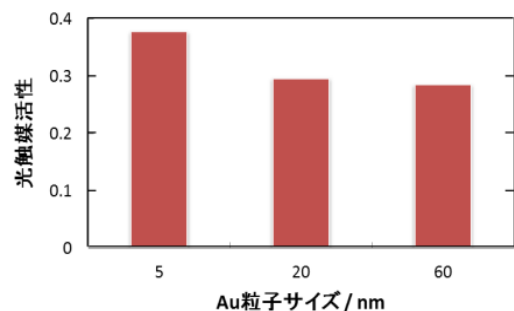


図 5. 各 Au ナノ粒子サイズを修飾した TiO₂ の光触媒活性

Au ナノ粒子形状変化について、図 1、3 より直径 60 nm Au ナノキューブの作製及び Au ナノキューブ修飾 TiO₂ の作製に成功していることが分かる。また、Au ナノ粒子形状の異なる球体型 60 nm とキューブ型 60 nm を修飾した TiO₂ について ATR-FUV スペクトル測定を行った結果、スペクトル変化に違いは観測されなかった。この結果から、形状によって電子移動量は変化しないことが分かる。以上のように、TiO₂ に修飾する金属ナノ粒子のサイズ、形状変化における電子状態変化を ATR-FUV スペクトルから明らかにし、TiO₂ の光触媒能に対する影響を系統的に評価することに成功した。

1P082

TiO₂ 微粒子の作製とそれを用いた蛍光強度増強

(広島大・理¹, 広島大院・理², 広島大・自然セ³)

○吉原久未¹, 坂本全教², 齋藤健一^{1, 2, 3}

Synthesis of TiO₂ Microparticles and the Enhanced Fluorescence of Dye Molecules.

(Factory of science¹, Graduate School of Science², N-BARD³, Hiroshima Univ.³)

○Kumi Yoshihara¹, Masanori Sakamoto², Ken-ichi Saitow^{1,2,3}

[序]

金属に光を照射すると入射光の電場により金属粒子内の自由電子が振動・共鳴し、局在表面プラズモンが生成する。局在表面プラズモンは金属粒子表面に増強電場を作り、増強電場領域の分子の蛍光強度は増強される。このような蛍光増強効果の研究は、主に Au, Ag などの貴金属において広く行われてきた。一方、非金属からなる蛍光増強の研究も、近年、盛んに行われ始め、GaP, Si, グラフェン, ZnO などでは蛍光増強効果が報告されている。特に、屈折率の高い物質の微小構造に光を照射すると微小構造内で光が全反射し、表面に電磁波が浸透する。浸透した電磁波は近接場を形成し、この電場領域で蛍光強度が増強される。我々の研究室では、Si の微粒子による蛍光増強効果^{[1], [2]}, Si マイクロアレー構造による蛍光強度増強効果^[3]を報告してきた。前者では、Si 微粒子で最大で増強度(EF)=180 が得られ、増強のサイズ効果も確認された。また、後者の Si マイクロアレー構造では、再現性が高い増強効果が観測され、EF=60 も得られた。本研究では、非金属材料として TiO₂ 微粒子を選択し、色素分子の蛍光増強効果を検証した。その結果、TiO₂ 微粒子による色素分子の蛍光強度増強を観測し、最大で EF=133 も得られた。また、増強度は表面が粗いほど大きくなることが明らかとなった。

[実験]

湿式ボールミリング法により TiO₂ 微粒子溶液を作製した。粉碎容器の中に粉碎ボール 40g, TiO₂ 1g, 溶媒 6g を入れ、遊星型ボールミルで TiO₂ 微粒子溶液を作製した。ミリングにより生成した TiO₂ 微粒子溶液を、メタノールと水で、それぞれで希釈した。希釈した溶液を超音波洗浄した ITO ガラスに滴下し乾燥させた。レーザー顕微鏡により、TiO₂ 基板上の微小構造、表面粗さの測定を行った。測定条件は、対物レンズ×100、評価領域は 129μm×129μm である。この基板を用い、顕微分光法で蛍光分子のスペクトルを測定した。蛍光色素分子はクリスタルバイオレット (CV) 溶液である (濃度 3.6×10^{-5} M)。この溶液を TiO₂ 基板とともに自作の薄層セルに入れカバーガラスで封入した。蛍光スペクトルの測定条件は、励起光は $\lambda=633$ nm, レンズは長作動対物レンズ(×100 N.A.0.6) である。

[結果と考察]

図 1 は、レーザー顕微鏡で測定した基板の表面の様子である。a は希釈溶媒がメタノールで、b は水である。表面構造を定量化するために、レーザー顕微鏡で平均高さ Sa を算出した。その結果、希釈溶媒がメタノールの時 Sa=0.297μm, 希釈溶媒が水の時 Sa=1.360μm と大きく異なった。

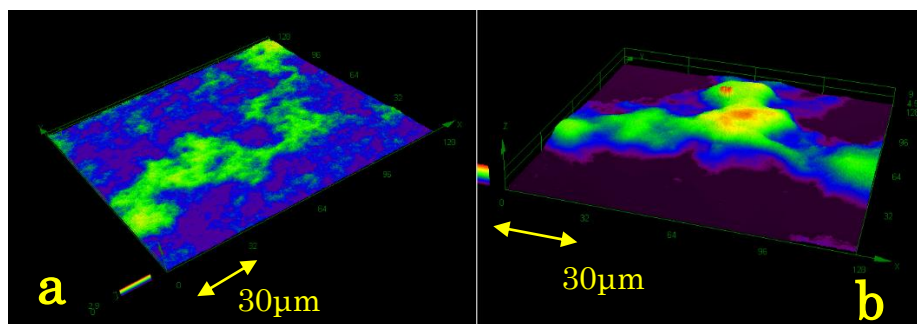


図1：溶媒をメタノール(a)，水(b)として乾燥させたTiO₂の増強基板

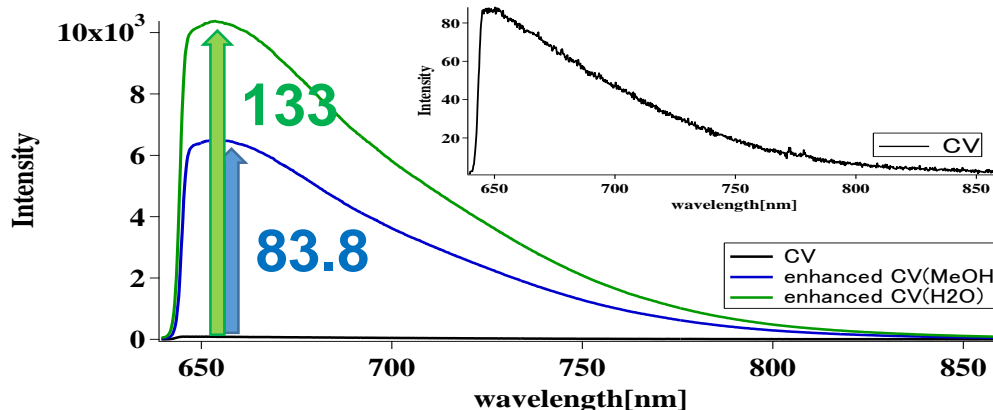


図2：CV(黒)，増強後のCV(メタノール：青，水：緑)の蛍光スペクトル

すなわち，希釈溶媒が水の時，表面粗さは4.6倍大きくなることが明らかとなった。

図2は，CVの蛍光スペクトルであり，それぞれ溶液（黒線），製作手順で希釈溶媒として水に分散させ，乾燥させた増強基板を用いたとき（緑線），希釈溶媒としてメタノールに分散させ，乾燥させた増強基板を用いたとき（青線）の結果である。右上はCVスペクトル（黒線）を拡大した図である。これらの結果から，TiO₂基板を用いるとCVの蛍光強度が著しく増加することがわかる。また，メタノールを用いて作製した増強基板と，水を用いて作製した増強基板では，後者の増強基板が1.6倍大きな増強度を与えた。すなわち，基板の表面が粗いとCVスペクトルはより強く増強されることを示している。この結果は，乱雑に堆積したTiO₂表面の近接場が重なり合い，大きな局所電場（ホットスポット）が形成されたことによると推測した。

以上，蛍光増強研究においてTiO₂の増強効果を確認することができた。TiO₂による蛍光強度増強の研究は，我々の知る限り初めての研究である。既報の非金属による蛍光の増強度（EF）と比較すると，EF(ZnO)=20，EF(Graphene Oxide)=80，EF(Si)=120，EF(GaP)=140であるため，TiO₂も同程度の値であることがわかる。

参考文献

- [1] K. Saitow, H. Suemori, and H. Tamamitsu, *Chem. Commun.* **50**, 1137 (2014).
- [2] H. Sun, S. Miyazaki, H. Tamamitsu, and K. Saitow, *Chem. Commun.* **49**, 10302 (2013).
- [3] 坂本，玉光，齋藤 第74回応用物理学会秋季学術講演会 17a-P9-3 (2013).

1P083

近赤外フェムト秒時間分解吸収およびフェムト秒誘導ラマン分光を用いたバクテリオロドプシンの励起状態ダイナミクスの研究

(¹理研・田原分子分光、²東工大・生命理工、³理研・光量子工学研究領域)

○田原 進也^{1,2}、竹内 佐年^{1,3}、大谷 弘之²、田原 太平^{1,3}

The excited-state dynamics of bacteriorhodopsin investigated by near-IR femtosecond time-resolved absorption and femtosecond stimulated Raman spectroscopy

(¹Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN, ²Tokyo Tech., ³RIKEN Center for Advanced Photonics)

○Shinya Tahara^{1,2}, Satoshi Takeuchi^{1,3}, Hiroyuki Ohtani², Tahei Tahara^{1,3}

【序】バクテリオロドプシン(bR)はレチナール発色団を有する膜タンパク質である。bRは光を吸収すると発色団の trans-cis 異性化を起こし、光サイクル反応を通じてプロトンポンプ機能を発現する。この機能発現の分子機構を解明するため、bRの光反応ダイナミクスはこれまで様々な時間分解分光法によって研究されてきた[1]。

bRの励起状態における構造ダイナミクスの観測は、中赤外時間分解吸収分光法によって試みられている[2]。一方で時間分解共鳴ラマン分光法を用いると、共鳴増強効果により励起状態における発色団およびその近傍のダイナミクスを選択的に観測できると期待される。bRのS₁状態の寿命は約500フェムト秒と短いため[3]、測定には100フェムト秒程度の高い時間分解能が要求される。しかし時間分解自発ラマン分光法においては、ラマン励起光のフーリエ限界から時間分解能を高くすると必然的に波数分解能は低くなってしまふ。これに対し、フェムト秒誘導ラマン分光法[4]を用いれば、10 cm⁻¹程度の波数分解能を保ちつつ100フェムト秒程度の遅延時間精度でスペクトルを得ることができる。近年、この手法を用いて809 nmのラマン励起波長によりbR励起状態の発色団構造の観測が試みられたが[5]、得られたスペクトルはローレンツ型ではなく、分散型に歪んだバンド形状を示した。この分散型に歪んだバンドは基底状態あるいは励起状態の振動に対応すると考えられるが、両者を判別することは容易ではない[5,6]。

ラマン励起光が純粋な励起状態吸収帯あるいは誘導放出帯に共鳴する場合、それぞれストークス領域および反ストークス領域において励起状態に由来する歪みのないローレンツ型のバンドが観測されると予想される。そこで近赤外領域に広がっている誘導放出帯を選択的に励起しうるラマン励起光(850~1550 nm)を用いてフェムト秒誘導ラマン分光測定を行い、bR発色団の励起状態の構造ダイナミクスの観測を試みた。

【実験】*Halobacterium Salinarum*を培養し、低酸素濃度条件においてbRの発現を誘導した。透析法を用いて菌体を破碎し、ショ糖濃度勾配超遠心分離法によりbR三量体を多数含む紫膜を単離した。紫膜懸濁液を超音波破碎機により均一化し、測定に用いた。

図1に波長可変近赤外フェムト秒誘導ラマン分光装置の概略を示す。Ti:Sapphire再生増幅器の出力(800 nm, 1.2 mJ/pulse, 80 fs duration)の一部(0.2 mJ/pulse)を非同軸光パラメトリック増幅器に導入し、bRの励起状態を生成するための励起光(640 nm, 110 nJ/pulse, 40 fs duration)を発生させた。再生増幅器出力の残りから、光パラメトリック過程によってアイドラー光(~2000 nm)を発

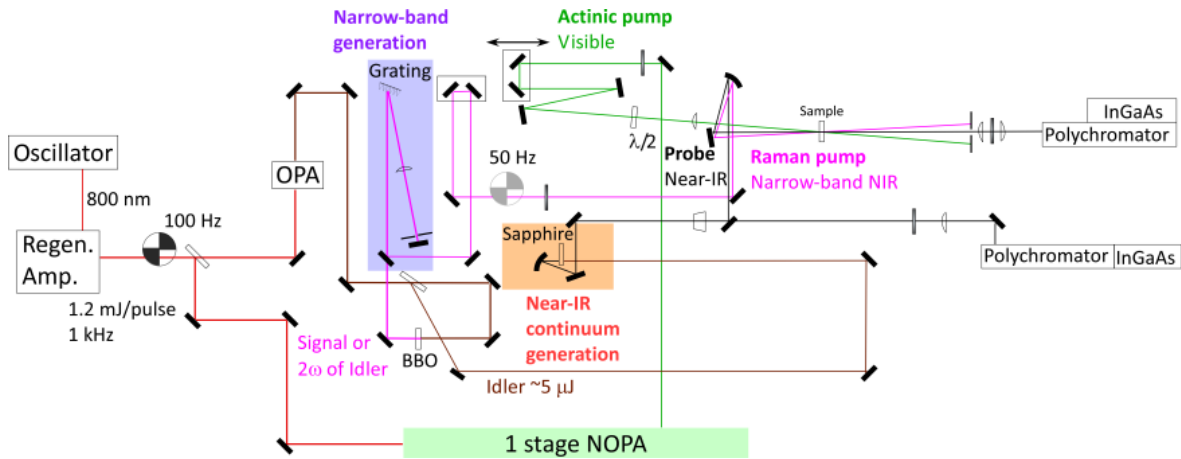


図 1. 波長可変近赤外フェムト秒誘導ラマン分光装置

生させ、これをサファイア結晶に集光することで得られる、近赤外広帯域光をプローブ光として用いた。また、アイドラー光の第二高調波あるいはシグナル光を、4f 光学系配置のグレーティングフィルタにより狭帯域化し、狭帯域近赤外ラマン励起光を得た。これらを試料に集光し、プローブ透過光をポリクロメーターにより分光し、512 チャンネル InGaAs 検出器により検出した。

【結果および考察】 all-trans 体 bR のフェムト秒領域の近赤外時間分解吸収スペクトルを測定したところ、1300 nm より短波長側では誘導放出、長波長側では弱い励起状態吸収が観測された(図 2)。これらは 500 fs の時定数で減衰した。この時定数は過去に報告された S_1 状態の寿命と一致する[3]。ゆえにこの過渡吸収信号は S_1 状態に由来すると考えられる。

次にこの誘導放出領域に共鳴した 1053 nm から 1303 nm までのラマン励起光を用いて、反ストークス領域にて測定したところ、図 3 に示すように分散型形状のバンドを示すスペクトルが観測された。このことは誘導放出領域(<1300 nm)においても誘導放出信号だけではなく励起状態吸収信号が重なっていることを示唆する。

当日の発表では本研究で観測された分散型形状のバンドが生じる機構について議論する。

【参考文献】

- [1] U. Haupts *et al.* *Annu. Rev. Biophys.* **1999**, 28, 367-399.
- [2] J. Herbst *et al.* *Science* **2002**, 297, 822-825.
- [3] M. C. Nuss *et al.* *Chem. Phys. Lett.* **1985**, 117, 2-7.
- [4] M. Yoshizawa *et al.* *Phys. Rev. A.* **1999**, 61, 013808.
- [5] D. W. McCamant *et al.* *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 10449-10457.
- [6] K. Niu *et al.* *J. Chem. Phys.* **2010**, 132, 084510.

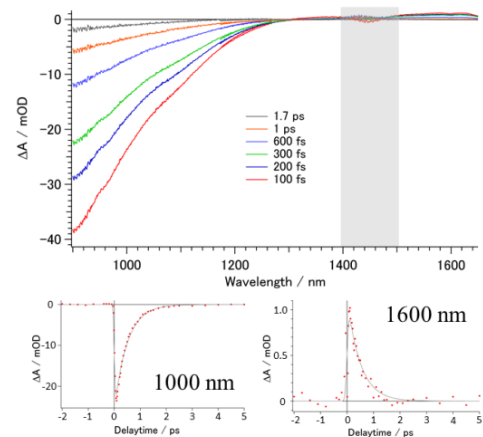
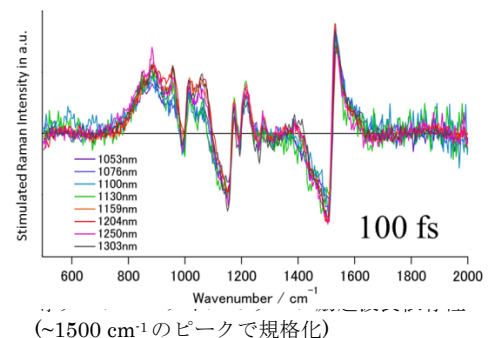


図 2. bR の近赤外時間分解吸収信号



(~1500 cm⁻¹ のピークで規格化)

1P084

2, 2, 2-トリフルオロエタノール水溶液のゆらぎと タンパク質の二次構造への効果

(千葉大院・融合) ○大木 裕代, 今村 比呂志, 森田 剛, 西川 恵子

Fluctuation in 2,2,2-trifluoroethanol aqueous solution and its effects on proteins' secondary structures

(Chiba Univ.) ○Hiroyo Ohgi, Hiroshi Imamura, Takeshi Morita, Keiko Nishikawa

【序】アルコールは、タンパク質の α -ヘリックス形成を誘導する。特にトリフルオロエタノール (TFE)はこの効果が大きく、メタノールやエタノールよりも低濃度で α -ヘリックスの形成を誘導することが知られている¹⁾。従って TFE の効果については、溶媒の極性低下のみで説明がつかず、TFE 水溶液の微細構造が注目された。過去の小角 X 線散乱 (Small-angle X-ray Scattering, SAXS) 実験において TFE 水溶液による強い散乱が観測され、溶液中に TFE のミセル様のクラスターが形成すると解釈された^{1,2)}。TFE のタンパク質への効果が大いことは、このクラスターがタンパク質に局所的な非極性環境を与えるためと考えられている^{1,2)}。我々は TFE 水溶液の混合状態や各分子種間の相互作用について、より定量的に議論するために、SAXS の更なる実験・解析を行い、ゆらぎ³⁾を決めた。ゆらぎは溶液の混合状態の不均一さを定量的に表現する物理量である。そして、TFE 水溶液のゆらぎとタンパク質の構造変化の関連性について考察した。

【実験】TFE のモル分率 (c_A) が 0-0.37 の TFE 水溶液の SAXS を測定した。装置は Anton Paar 社製の Kratky 型光学系を用いた SAXSess を使用した。X 線は、波長 1.54 Å の Cu K α 線を使用した。検出器はイメージングプレートを使用した。セルは、直径 1 mm の石英キャピラリーセルを使用した。温度は 25.0 °C に設定し、15 分間露光した。

また、 c_A が 0-0.50 の TFE 水溶液中のリゾチームの円偏光二色性 (CD) 分光測定を、JASCO 製 J-805 と光路長 1 cm の石英セルを用いて室温にて行い、波長 222 nm における平均残基モル楕円率 ($[\theta]_{222}$) を得た。これは、タンパク質の α -ヘリックス形成量を反映する。

【結果と考察】得られた散乱プロファイルから、散乱強度の散乱角 0 度への外挿値 $I(0)$ を関数フィッティングにより求めた。 $I(0)$ の c_A 依存性を図 1 に示す。 $I(0)$ は $c_A \sim 0.14$ で最大になった。これは既報の SAXS 実験¹⁾の結果と同様の傾向である。

$I(0)$ は、密度ゆらぎ $S_{NV}(0)$ 、濃度ゆらぎ $S_{CC}(0)$ 、相関項 $S_{NC}(0)$ の情報を含み、次式で表される。

$$I(0)/N = (c_\alpha Z_\alpha + c_\beta Z_\beta)^2 S_{NV}(0) + (Z_\alpha - Z_\beta)^2 S_{CC}(0) + 2(c_\alpha Z_\alpha + c_\beta Z_\beta)(Z_\alpha - Z_\beta) S_{NC}(0)$$

N : 系中の分子数, c : モル分率, Z : 一分子中の電子数
下付きの α, β : 分子種

$S_{NV}(0)$ と $S_{NC}(0)$ は、 $S_{CC}(0)$ と熱力学量 (部分モル体積・等温圧縮率) の関数となっているため、 $I(0)$ とこれら熱力学量がわかれば $S_{NV}(0)$, $S_{CC}(0)$, $S_{NC}(0)$ を計算できる^{3,4)}。これらの c_A 依存性を図 2 に示す。 $S_{NV}(0)$ は $c_A \sim 0.14$ にピークを持つ。 $S_{CC}(0)$ は $c_A \sim 0.2$ にピークを持つ。 $S_{NV}(0)$ は $S_{CC}(0)$ に対して

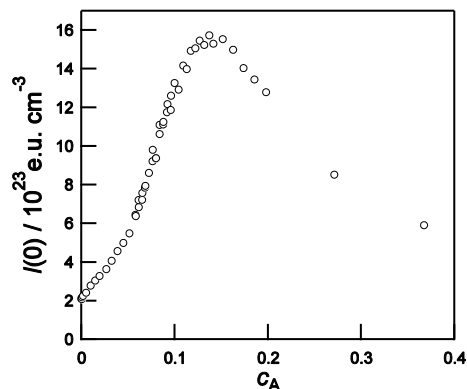


図 1: $I(0)$ の c_A 依存性

値が大きいことから、 $I(0)$ の値に大きく寄与していると考えられる。

Kirkwood-Buff のパラメータは $G_{\alpha\beta} = \int [g_{\alpha\beta}(r) - 1] 4\pi r^2 dr$ と定義されており、成分 α の 1 個の分子の周りに存在する成分 β の分子の分布について、均一な分子分布と比較した過剰量を表す $^5)g_{\alpha\beta}(r)$ は動径分布関数である。 G_{AA}, G_{WW}, G_{AW} を、 $S_{NN}(0), S_{CC}(0), S_{NC}(0)$ を用いて計算した $^6)$ (下付きの A は TFE, W は水を表す)。これらの c_A 依存性を図 3 に示す。図 3 から TFE 分子の周りには TFE 分子が、水分子の周りには水分子が存在しやすくなっていることがわかる。 G_{AA}, G_{WW} のピーク位置はそれぞれ $c_A \sim 0.11, c_A \sim 0.20$ となっており、TFE 分子同士、水分子同士で特に親和性の高い濃度領域が異なった。

$\rho_\alpha G_{\alpha\beta}$ を計算すると、各成分の密度ゆらぎが得られる $^7)$ 。 ρ_α は成分 α の数密度である。 $\rho_\alpha G_{\alpha\beta}$ の c_A 依存性を図 4 に示す。 $c_A = 0.14$ の周辺で TFE 分子の分布も水分子の分布も不均一さを持つ。この位置は、 $I(0)$ や $S_{NN}(0)$ のピーク位置とも一致する。水分子の密度ゆらぎは TFE 分子のそれの約 3 倍大きい。 $c_A \sim 0.14$ では TFE 分子のダイナミッククラスターが形成しているとされていたが、我々はこれによる不均一さを、TFE 分子と水分子それぞれのゆらぎとして定量化して捉えた。

図 4 に、CD で測定したタンパク質の α -ヘリックス形成量 ($[\theta]_{222}$) の c_A 依存性を重ねた。これらは、実測したリゾチームのデータと文献中の β -ラクトグロブリンのデータである。リゾチームの $[\theta]_{222}$ は TFE の密度ゆらぎが大きい濃度領域で増加する。 β -ラクトグロブリンの $[\theta]_{222}$ はより低濃度領域で増加する。低濃度領域では、ゆらぎ以外の効果がタンパク質に及んでいると考えられ、この濃度領域は注目に値する。低濃度における TFE の効果について検討することが今後の課題である。

【参考文献】

- 1) Hong *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8427 (1999).
- 2) Kuprin *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1151 (1995).
- 3) Bhatia and Thornton, *Phys. Rev. B.* **2**, 3004 (1970).
- 4) Nishikawa *et al.*, *J. Phys. Chem.* **91**, 3694 (1987).
- 5) Kirkwood and Buff, *J. Chem. Phys.* **19**, 774 (1951).
- 6) Nishikawa, *Chem. Phys. Lett.* **132**, 50 (1986).
- 7) Nishikawa *et al.*, *J. Phys. Chem.* **93**, 6559 (1989).

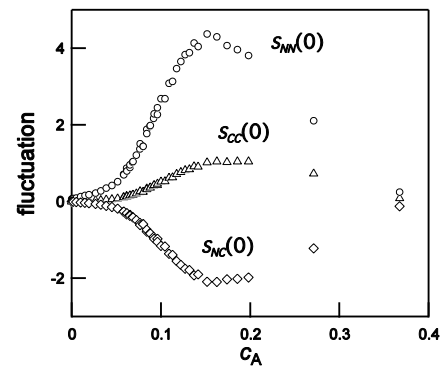


図 2：ゆらぎの c_A 依存性

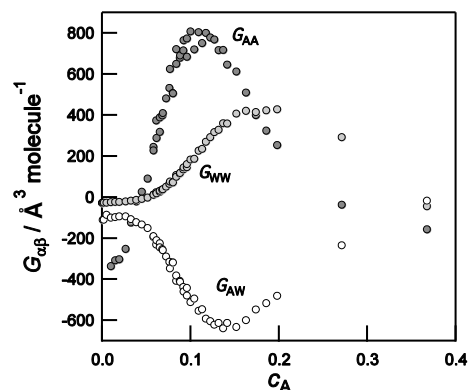


図 3：Kirkwood-Buff のパラメータの c_A 依存性

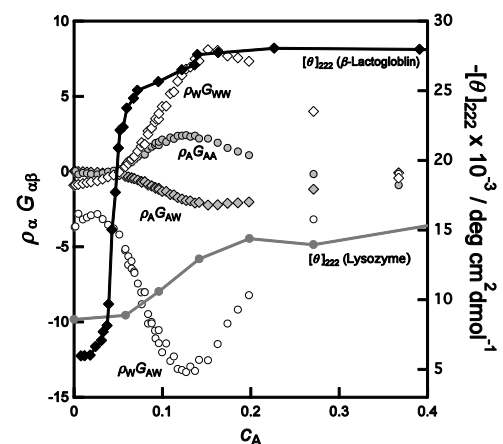


図 4：各成分の密度ゆらぎとタンパク質の $[\theta]_{222}$ の c_A 依存性

選択的蛍光寿命相関分光法の開発

(理研・田原分子分光、理研・光量子工学) ○石井 邦彦、田原 太平

Development of selective fluorescence lifetime correlation spectroscopy

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN; RIKEN Advanced Photonics Center)

○Kunihiko Ishii, Tahei Tahara

【序】我々が最近開発した二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を用いると、マイクロ秒の時間分解能で平衡状態にある生体高分子の準安定構造を蛍光寿命分布として同定することができる[1]。得られた蛍光寿命分布を基に各構造状態の自己相関関数と状態間の相互相関関数を計算すれば、構造変化の時定数が求められる。この相関計算はやや煩雑だが、Enderlein らによって提案された蛍光寿命相関分光法 (FLCS) を用いれば、既知の蛍光減衰データを基に状態選別的な相関関数を効率的に計算できる[2]。これを 2D-FLCS と組み合わせて用いることで、未知の試料に対して構造状態の分布を決定すると同時に、構造変化のダイナミクスを定量的に議論するというスキームが完成する。しかし従来の FLCS では背景光や夾雑物の寄与を含めすべての相関成分を対等に扱って計算するため、信号雑音比が低下しやすいという問題があった。本講演では、相関成分を適切に選択しながら計算を行うことで信号雑音比を大幅に改善できることを示す。

【方法】2D-FLCS, FLCS の実験では、時間相関光子計数法 (TCSPC) を用いて顕微鏡下で希薄な試料溶液からの蛍光を時間分解観測し、検出された光子ごとに測定開始からの経過時間 (T)、直近の励起パルスからの遅延時間 (t) の 2 種類の情報を取得する。測定を継続して行うことで各遅延時間チャンネル t ごとに蛍光強度の時間変化 $I(T; t)$ が求められる。FLCS では、試料中に含まれる全ての分子種の蛍光減衰曲線が既知であるとする。分子種 ξ の蛍光減衰曲線を $d_{\xi}(t)$ として、これをまとめた行列 \mathbf{D} : $D_{i\xi} = d_{\xi}(t)$ を作る。これを基に、次のように計算されるフィルター行列を求める。

$$\mathbf{F} = \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\}^{-1} \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1}. \quad (1)$$

ここで、 $\bar{\mathbf{I}}$ は T について平均した蛍光減衰曲線を表し、 $\bar{I}_t = \langle I(T; t) \rangle$ である。このフィルター行列の要素 $F_{\xi t} = f_{\xi}(t)$ と $I(T; t)$ を使って以下のように状態選別的な相関関数が求められる[2]。

$$C_{\alpha\beta}(\Delta T) = \sum_t \sum_{t'} \langle f_{\alpha}(t) I(T; t) f_{\beta}(t') I(T + \Delta T; t') \rangle - \sum_t \langle f_{\alpha}(t) I(T; t) \rangle \sum_{t'} \langle f_{\beta}(t') I(T; t') \rangle. \quad (2)$$

2D-FLCS で用いる $\mathbf{M}(\Delta T)$: $M_{tt'}(\Delta T) = \langle I(T; t) I(T + \Delta T; t') \rangle - \bar{I}_t \bar{I}_{t'}$ [1] を使ってこれを行列表示すると、

$$\mathbf{C} = \mathbf{F} \mathbf{M}(\Delta T) \mathbf{F}^T. \quad (3)$$

となる。式(3)は、実験で得られた t ごとの蛍光強度の相関の二次元マップ $\mathbf{M}(\Delta T)$ にフィルター行列を掛けるだけで状態選別的な相関関数の全ての組み合わせが同時に求められることを示している。これは、 $\mathbf{D} \mathbf{C} \mathbf{D}^T \approx \mathbf{M}(\Delta T)$ となるような \mathbf{C} の要素を最小二乗解として求めるのと等価である。しかし実際の応用においては、多くの場合 $d_{\xi}(t)$ として与える蛍光減衰曲線には、溶媒のラマン散乱や検出器の暗計数などその由来から相関を与えないことが明らかである成分や、溶液中の不純物のように自己相関をもつが測定対象分子との相互相関をもたないとみなし得る成分が存在する。式(2,3)ではこれらが与える自明な相関を未知数として扱い最小二乗計算を行うことになるため、解の誤差が本来期待されるよりも大きくなる。今回新しく提案する方法では、式(3)の \mathbf{C} に代えて、 \mathbf{C} の要素のうち自明な相関の値を零に固定した \mathbf{C}' を作る。例えば、

$$\mathbf{C}' = \begin{pmatrix} C'_{AA} & 0 \\ 0 & C'_{BB} \end{pmatrix} \quad (4)$$

のように相互相関にあたる成分を零とし、 C'_{AA}, C'_{BB} のみを使って $\mathbf{DC'D}^T \approx \mathbf{M}(\Delta T)$ となるような最小二乗解を求める。この計算のために、 \mathbf{C}' をベクトル化した表記 $\text{vec}(\mathbf{C}')$ に変更する。 $\text{vec}(\mathbf{C}')$ は行列 \mathbf{C}' を列ごとに分解して縦一列に並べ直したものである。そして $\text{vec}(\mathbf{C}')$ のうち零に固定する成分を省くため、

$$\mathbf{P}\text{vec}(\mathbf{C}') = \begin{pmatrix} C'_{AA} \\ C'_{BB} \end{pmatrix} \equiv \mathbf{c}', \quad \mathbf{P} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5)$$

となるような行列 \mathbf{P} を導入する。これを用いて、 \mathbf{C} に対して $\mathbf{c}' = \mathbf{W} \cdot \text{vec}(\mathbf{C})$ となる変換行列 \mathbf{W} を以下のように導出した。($\mathbf{X} \otimes \mathbf{Y}$ は行列 \mathbf{X} と \mathbf{Y} のクロネッカー積である。)

$$\mathbf{W} = \left[\mathbf{P} \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\} \otimes \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\} \mathbf{P}^T \right]^{-1} \mathbf{P} \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\} \otimes \left\{ \mathbf{D}^T \text{diag}(\bar{\mathbf{I}})^{-1} \mathbf{D} \right\}. \quad (6)$$

従来のFLCSで計算される \mathbf{C} にこの \mathbf{W} を作用させることで、直ちに \mathbf{c}' を求めることができる。

【結果】 この方法を蛍光寿命の異なる分子種の混合物からなる系に適用した。試料は相補的な配列をもつ2種類の一本鎖DNAオリゴマーで、FRET対をなす蛍光色素を片方ずつ標識した。アクセプター鎖の濃度をドナー鎖の半分にするすることで、二本鎖を形成したDNA(1)とドナー鎖が一本鎖のままのDNA(2)が共存する条件とした。この時ドナー蛍光の蛍光寿命(図a)は、1でFRETが起こることを反映して二成分的な減衰を示す。ここから2のみで測定した蛍光減衰曲線をtail matchingにより差し引き、1と2それぞれの $d_i(t)$ を見積もった。これらを用いてFLCSの解析を行った結果が図b,cである。従来のFLCS(図b)の結果から、1と2の相互相関がほぼ零であることが分かる。これは二本鎖がFCSの時間スケールで十分安定で、1と2の交換が起こっていないことを示している。一方これらの相関曲線を注意深く見ると、2本の相互相関曲線 (C_{12}, C_{21})のノイズパターンが良く一致していること、それが自己相関曲線 (C_{11}, C_{22})のノイズと逆位相になっていることが分かる。そこで C_{12}, C_{21} を零に固定して自己相関曲線 C'_{11}, C'_{22} を求めると(図c)、このノイズが解消され、信号雑音比が向上することが分かった。講演では構成成分の蛍光寿命の比によって本手法の効果がどのように変化するかをモンテカルロシミュレーションを用いて検討した結果についても紹介する。

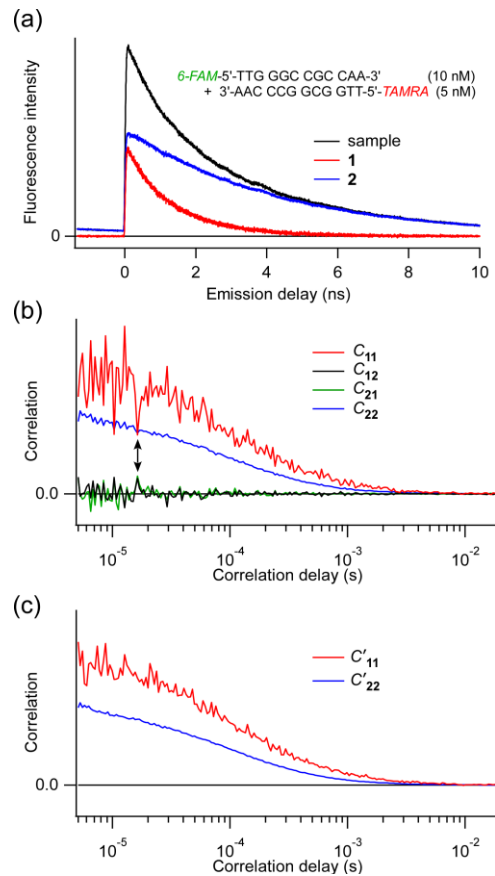


図 (a) 黒線：試料のドナー蛍光の蛍光減衰曲線。青線：ドナー鎖のみで測定したもの。赤線：黒線から青線を tail-matching して引いたもの。(b) FLCS 解析の結果。矢印でノイズが顕著に相関を示している部分を示した。(c) 選択的 FLCS 解析の結果。

【参考文献】

- [1] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11414 (2013), *J. Phys. Chem. B* **117**, 11423 (2013).
 [2] I. Gregor and J. Enderlein, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 13 (2007).

微量試料計測に対応した真空紫外円二色性分光システム

とタンパク質・糖の構造解析への応用

(産総研・計測フロンティア¹, 神戸大・人間環境²)

○田中真人¹, 中川和道²

Development of vacuum ultraviolet circular dichroism measurement system for small amount of sample and its application to conformational analysis of protein and sugar

(Research Institute of Instrumentation Frontier, AIST¹, Kobe University²)

○Masahito Tanaka¹, Kazumichi Nakagawa²

【序】

円二色性(CD)分光計測はタンパク質の二次構造解析などキラル物質の分子構造解析やキラリティ・光学純度の決定に広く用いられている。この CD スペクトルの計測波長領域を真空紫外線領域に拡張することで、タンパク質二次構造解析で得られる情報の増加 (α ヘリックス、 β シートの本数) や従来では困難な糖試料の計測などが可能になり、いくつかの放射光施設で真空紫外域での CD 計測用のビームラインが整備されている。

本研究ではこの真空紫外域での CD スペクトルの応用範囲をさらに広げるべく、希少タンパク質や糖鎖などの微量しか獲得が困難な試料の計測と構造解析を目指して開発を進めている縮小光学系を用いた真空紫外円二色性分光システムの詳細と現状について報告を行う。

我々は今までにアンジュレータを用いた世界初の極紫外域までの CD スペクトル計測[1]に成功してきた。また過去山田らによってアンジュレータからの紫外光を縮小光学系を用いて約 $1\mu\text{m}$ 以下に縮小化して、紫外域の CD 計測と二次元 CD マッピングが報告されている[2]。これら知見を融合することで、上記目標の達成が可能になる。現状は光源としてランプを用いており、マシンタイムの制約の無い汎用的な装置としての実用化を目指している。

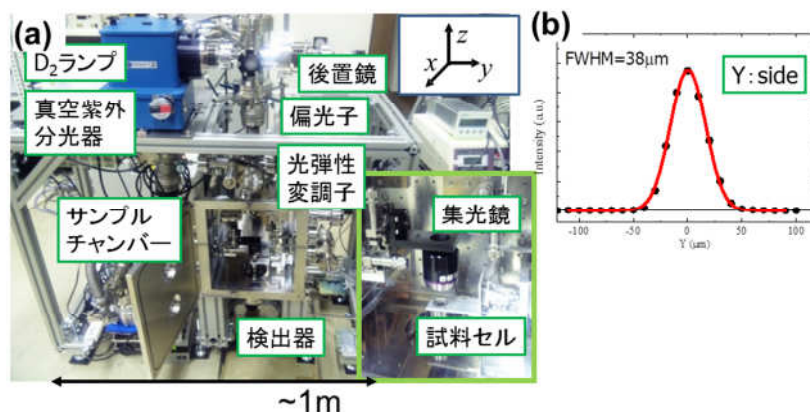


図 1 (a)開発している縮小光学系を有した真空紫外 CD スペクトル計測システム、(b)横方向の光プロファイル

【装置の詳細】

図 1 (a)に開発を進めている真空紫外域に対応した CD 計測システムを示す。光源として重水素ランプを用いており、真空紫外分光器(Acton 社製 VM502)で分光した後、後置鏡で鉛直方向に光を曲げている。これは試料の配置・交換を容易にするためである。その後、偏光子(フッ化マグネシウム製ローションプリズム)・光弾性変調子(フッ化カルシウム製)を用いて左右円偏光を交流的に発生している。

サンプルチャンバー部に縮小光学系としてシュバルツシルトミラーが挿入されている。これにより通常 7mm 角程度の計測光サイズを、現在 $40\mu\text{m}\times 80\mu\text{m}$ にまで縮小化することに成功している(図 1(b))。試料透過光をシンチレータで可視光に波長変換した後、光電子増倍管で光強度を観測している。その後ロックインアンプを用いて、CD 信号を検出している。

図 2(a)、(b)に本システムで計測した L-チロシン薄膜(膜厚 50nm、フッ化カルシウム基板に製膜)の吸収スペクトルと CD スペクトルを示す。図からわかるようにシュバルツシルトミラーの有無で吸収、CD スペクトルともに大きな変化は観測されなかった。このことから本システムではミラーを入れても偏光度に大きな変化が起きておらず、縮小化した光でも CD スペクトルを正確に計測できることが明らかになった。また本システムでは現在波長 140nm~350nm 程度の領域で CD スペクトルが計測可能である。

今後、縮小化光に対応した溶液セルの開発、偏光解析手法開発や更なる光の縮小化や高感度化など計測システムの高度化を進めていき、希少タンパク質や糖鎖の計測に資するシステムとして実用化を目指していく。講演では本装置を用いて計測した糖試料などの測定結果などについても議論を行う予定である。

【謝辞】

本研究の一部は文科省科学研究費補助金若手 A からの支援を受けて行われました。

【参考文献】

- [1] M. Tanaka, et al., *J. Synchrotron Rad.* **16** (2009) 455.
- [2] T. Yamada, et al. *Jpn. J. Appl. Phys.* **39** (2000) 310.

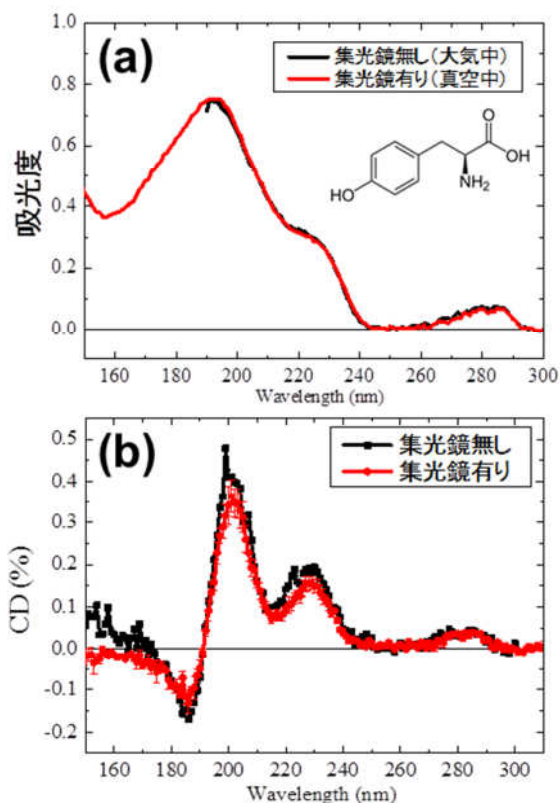


図 2 開発した CD システムで計測した L-チロシン薄膜の吸収スペクトルと CD スペクトル

テラヘルツ時間領域分光法によるタンパク質低振動ダイナミクスの水和および温度依存性の観測

○山本直樹¹、田村厚夫²、富永圭介^{1,2}

(¹神戸大学分子フォトサイエンス研究センター、²神戸大学大学院理学研究科)

Temperature and Hydration Dependence of Low-frequency Dynamics of a Protein studied by Terahertz Time-domain Spectroscopy

○Naoki Yamamoto¹, Atsuo Tamura², Keisuke Tominaga^{1,2}

(¹Molecular Photoscience Research Center and ²Graduate School of Science, Kobe University)

【序】タンパク質は生命活動を営む上で必要不可欠な分子である。タンパク質は常に溶媒である水の熱揺らぎにさらされながら機能していることから、熱揺らぎ程度の分子運動が機能発現と関連していると考えられる。過去の研究より、そのような分子運動は、テラヘルツ領域に観測されることが示唆されてきた¹。ここで、1 テラヘルツ (THz; 1 THz = 10¹² Hz) は約 33.3 cm⁻¹ の振動数に相当する。テラヘルツ時間領域分光法は、テラヘルツ領域の分子運動を観測するための適した手法であり、テラヘルツ波パルス波形を直接観測することにより、強度および位相の両方の情報を得ることが可能である。例えば、テラヘルツ分光における複素誘電率の虚部は全双極子モーメントの時間相関関数、 $\langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle$ により以下の式で表される。

$$2n(\nu)\kappa(\nu) = \frac{\pi(1 - e^{-\beta h\nu})}{3\epsilon_0 hV} \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{-i2\pi\nu t} \langle \mathbf{M}(0) \cdot \mathbf{M}(t) \rangle$$

ここでは周波数、 $n(\nu)$ は屈折率、 $\kappa(\nu)$ は消衰係数、 $\beta = k_B T$ (k_B , T はそれぞれボルツマン定数と絶対温度)、その他の記号は一般的な物理量をそれぞれ表す。これまで種々のタンパク質およびポリペプチドについて、温度および水和量をパラメータとした測定が行われてきた^{2,3}。その結果、水和することによって、約 200 K 付近で吸光係数などの物理量が乾燥状態と比較して飛躍的に増大する現象が観測されてきた。一方、それに寄与するスペクトル成分の解釈はまだ行われておらず、そのためにはより低周波数側のスペクトルを測定する必要があると示唆されてきた。そこで本研究では、典型的な小型球状タンパク質であるリゾチームを用いて、テラヘルツ領域の複素誘電率を温度および水和量依存的に測定するとともに、室温において、サブテラヘルツ領域のスペクトル、およびギガヘルツ領域のスペクトルを測定し、テラヘルツ領域のスペクトルと結合させることによって、テラヘルツ領域に寄与するスペクトル成分の同定を行った。

【実験】市販のニワトリ卵白リゾチームを室温で3時間透析したのち、凍結乾燥することで測定用の粉末試料を得た。測定の際は錠剤成型器を用いてこの粉末試料を加圧してペレット状にし、12時間真空乾燥したものを乾燥状態の試料とした。試料の水和は、ペレット状サンプルを飽和蒸気圧下の箱に任意時間静置することで制御した。ここで、水和量として、水和水の重さをタンパク質の重さで割った値である h を用いた。テラヘルツ時間領域分光計は、時間幅 10 フェムト秒程度のパルスレーザーを1対の光伝導アンテナに誘導し、一方をテラヘルツ波発生、もう一方を検出に用いた。0.3 ~ 1.8 THz (10 ~ 60 cm⁻¹) のスペクトルはダイポール型、0.1 ~ 0.3 THz (3.3 ~ 10 cm⁻¹) のスペクトルについてはスパイラル型の光伝導アンテナを用いることによってテラヘルツ波パルスを得た。また、0.5 ~ 20 GHz (0.017 ~ 0.067 cm⁻¹) の複素誘電率スペクトルは、Agilent 社のネットワークアナライザ E5070 を用いることにより取得した。

【結果と考察】図1にテラヘルツ時間領域分光法によって得られた複素誘電率スペクトルを示す。乾燥状態ではスペクトルは温度と共に線形的に増加する一方、水和状態では約 180 K 付近からスペクトル成分が非線形的に増加することが分かる。特に、低振動数側の増加が著しいことが見て取れる。図2に $h = 0.34$ の時の、室温における 20 GHz ~ 1.8 THz 領域での複素誘電率スペクトルを示す。GHz 領域に大きなスペクトル成分が存在することがわかり、過去の報告と照らし合わせると、水和水の回転緩和成分が大きく寄与していることが示唆される⁴。そこで、以下のモデル関数を用いてスペクトルのフィッティングを行った。

$$\varepsilon^*(\nu) = -\frac{\sigma}{i2\pi\nu} + \sum_{j=1}^2 \frac{\Delta\varepsilon_j}{1 - (i2\pi\nu\tau_j)^{\beta_j}} + \frac{A_\nu}{\nu_\nu^2 - \nu^2 - i\nu\gamma_\nu} + \varepsilon_{\text{inf}}$$

ここで、右辺の第1項は電気伝導の効果(σ は定数)、第2項は2つの誘電緩和成分($\Delta\varepsilon_j$, τ_j , β_j はそれぞれ強度、緩和時間、およびブロードニング因子を表す)、第3項はテラヘルツ領域の振動成分(A_ν , ν_ν , γ_ν はそれぞれ強度、中心周波数、および摩擦項を表す)、第4項は周波数無限大での定数項をそれぞれ表す。フィッティング結果は図2に重ね書きしている。この結果より、約5 GHz にピークを持つ誘電緩和成分が、テラヘルツ領域に顕著に侵入していることがわかり、高温領域ではこの誘電緩和成分を考慮に入れてスペクトル成分を解釈する必要が分かった。この結果を踏まえ、テラヘルツ領域の温度依存性スペクトルを、誘電緩和成分を考慮したモデル式でフィッティングし、時定数等の温度依存性を得た。その結果、約 220 K 以上では、誘電緩和の成分が顕著に侵入してくることが明らかになった。

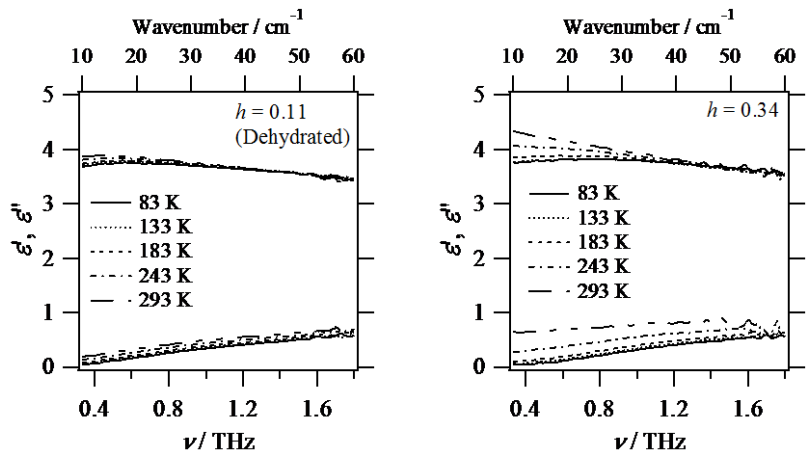


図1. テラヘルツ領域における温度依存性複素誘電率スペクトル左が乾燥状態、右が水和状態。各パネルで上部集団が実部、下部集団が虚部を表している。

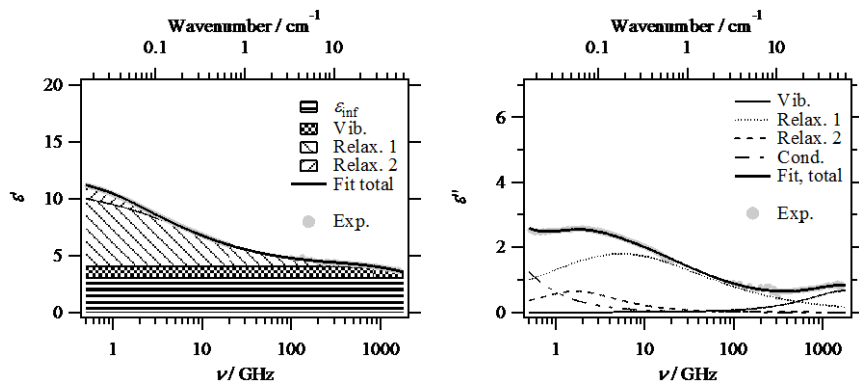


図2. $h = 0.34$, 293 Kにおいて、ネットワークアナライザおよびテラヘルツ時間領域分光計を用いて得られた複素誘電率スペクトルの実部(左)および虚部(右)。実験値(Exp.)は丸印で表している。フィッティング結果のうち、Relax. 1及び2の成分は、誘電緩和の第一及び第二成分を表している。実部は高周波数側からスペクトルを足し合わせる手法で描画している。

【引用文献】1. M. Levitt, *et al.*, *JMB* 181, 423-47 (1985)
 2. S. Kawaguchi, *et al.*, *PCCP* 12, 10255-10262 (2010).
 3. N. Yamamoto, *et al.*, *Soft Matter* 8, 1997-2006 (2012).
 4. S. Khodadadi, *et al.*, *JPC* 112, 14273-14280 (2008).

1P088

産業用カメラを利用した高速度画像記録装置の開発:

正確かつ持続した長時間記録に向けて

(広島市大院¹、就実大²)

○池田祐介¹, 藤原久志¹, 石渡孝¹, 青山正人¹, 高橋賢¹, 洲崎悦子²

Construction of a high speed image recording system based on an industrial camera:
technical information for sustained accurate recording

(Hiroshima City University,¹ Shujitsu University²)

○Y. Ikeda,¹ H. Fujiwara,¹ T. Ishiwata,¹ M. Aoyama,¹ S. Takahashi,¹ and E. Suzaki²

【序】 我々は「生細胞の高速動態観測」を念頭に置き、産業用カメラを利用した高速度画像記録装置を開発している。そして、近年では 600 MB/s を超える記録速度を達成している¹⁾。しかし、装置の性能検証を進める中で、撮影画像の記録漏れ(コマ落ち)が生じていることが分かってきた。本研究では、こうしたコマ落ちを定量的に検出する方法を開発し、正確かつ持続した長時間記録が可能な装置の完成を目指す。

【高速度画像記録装置の概要】 高速度画像記録装置は、高速度 CMOS カメラ (MV2-D1280-640-CL, Photonfocus) とパーソナルコンピュータの組み合わせで構築した。まず、高速度カメラの仕様は、1280×1024 画素(白黒 8 ビット/画素)で最大撮像速度 488 枚/秒である。一方、コンピュータの仕様は、CPU (Core i7-4960X Processor Extreme Edition, Intel)、マザーボード (P9X79-E WS, ASUS) で、OS として Windows 7 Professional 64-bit (Microsoft) をインストールしている。さらに画像記録用に、1 TB 容量のハードディスク 8 台と RAID カード (RocketRAID 4320, HighPoint) で RAID0 を構築した。また、カメラとコンピュータの接続には、カメラリンクボード (microEnable IV AD4-CL, Silicon Software) を採用した。CMOS カメラの画像撮影・表示・記録を行うプログラムは、Win32 Application Programming Interface (API) 関数およびボードのライブラリ関数を主体として作成した。

【性能試験】 コマ落ちを検出するため、目印つき円盤(直径 10 cm)を高速回転させる装置を自作した。円盤は、速度制御付きモーター (BMU230A-A-2, オリエンタルモーター) により 2100 rpm で反時計回りに回転する。この円盤には、動き検出用の目印として高反射率を有する円形シールを張り付けている。この円盤の回転を高速度画像記録装置で 50 万回(約 18 分間)撮影・記録した。

【データ解析法】 得られた画像データを解析し、円盤の回転角度を算出するソフトウェアを、Win32 API 関数を主体として作成した。その演算手順は、①反射シールの重心座標の算出、②回転円盤の回転中心の検出、③回転角度の算出の三つである。

具体的には、まず各撮影画像を二値化処理し、反射シールに対応した画素を抽出し、反射シールの重心座標(x_i, y_i)を求める(i は画像番号)。そして、回転円盤の中心座標(a, b)は、得られた重心座標(x_i, y_i)を通る円(半径 r)の中心座標に一致すると考えられる。この時、実験で得られる複数の重心座標(x_i, y_i)から中心座標(a, b)を求めること

は、重回帰分析の問題に帰着出来る²⁾。具体的には、

$$Y_i = x_i^2 + y_i^2, \beta_1 = r^2 - a^2 - b^2, \beta_2 = 2a, X_{2i} = x_i, \beta_3 = 2b, X_{3i} = y_i$$

として、以下の重回帰方程式を導くことができる。

$$Y_i = \beta_1 + \beta_2 X_{2i} + \beta_3 X_{3i}$$

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ の推定には最小二乗法、すなわち誤差項の平方和 $S = \sum \varepsilon_i^2$ が最小となる条件を用いる。その結果、次式が得られる。

$$\begin{pmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum x_i & \sum x_i^2 & \sum x_i y_i \\ \sum y_i & \sum x_i y_i & \sum y_i^2 \\ \sum 1 & \sum x_i & \sum y_i \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sum (x_i^3 + x_i y_i^2) \\ \sum (x_i^2 y_i + y_i^3) \\ \sum (x_i^2 + y_i^2) \end{pmatrix}$$

これより、 $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ が得られ、 a および b が計算できる。最後に、 $i-1$ 番目の画像と i 番目の画像の間に円盤が回転した角度 θ_i は、図1のベクトル \vec{l}_{i-1}, \vec{l}_i を定義し、それらの内積と外積を利用して求めることができる。

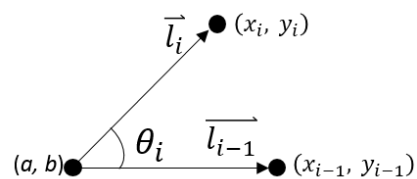


図1 角度計算のためのベクトルの定義

【結果および考察】 以前の試作機¹⁾の性能試験データ

の解析例を図2に示す。横軸が画像番号、縦軸が算出した回転角度である。全体を通して回転角度はほぼ一定である。しかし、5個の赤点では回転角度が大きく異なっている。このとき、対応した画像番号付近の撮影画像を再生すると確かにコマ落ちを生じており、コマ落ちを定量的に検出する手法を確立できた。

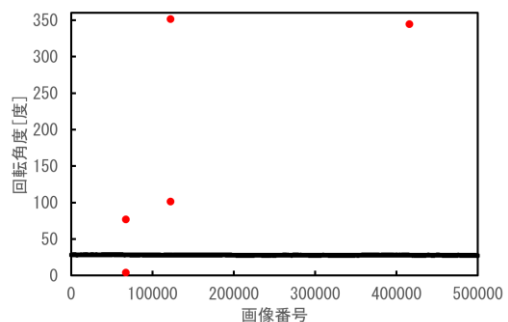


図2 コマ落ちの検出例

次に、今回構築した高速度画像記録装置の性能試験データの解析例を図3に示す。全体を通して回転角度はほぼ一定であり、コマ落ちは検出されなかった。コマ落ちが生じなかった要因としては、大容量のリングバッファを用意したことにより、画像記録処理とオペレーティングシステムとの競合を低減できたためと考えている。

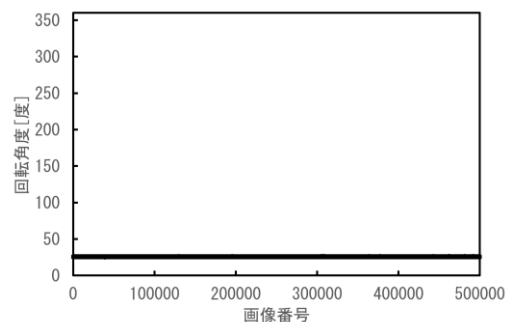


図3 本装置の試験データの解析例

今後は、より長時間の安定した画像記録を目指して、必要な条件を検討してゆく予定である。

【参考文献】

- 1) 藤原久志、石渡孝 第49回日本生物物理学会年会 2N1636 姫路 (2011) .
- 2) 松原望、縄田和満、中井検裕、統計学入門、pp.257-274 (東京大学出版会、東京、1991) .

銀・金ナノコロイド微粒子を用いた抗原抗体反応の高感度 SERS 検出

(¹ 関西学院大学理工、² 産業技術総合研究所健康工学研究部門、香川大学³)

○荒木大知¹、伊藤民武²、北濱康孝²、山本裕子³、尾崎幸洋¹

High sensitive SERS detection of antigen-antibody reaction using silver
and gold colloidal nanoparticles

(Kwansei Gakuin Univ.¹, Health Research Institute, National Institute of
Advanced Industrial Science and Technology (AIST)²)

Daichi Araki¹, Tamitake Itoh², Yuko S. Yamamoto², Yasutaka Kitahama²,
Yukihiro Ozaki¹

[序] 表面増強ラマン散乱(Surface-enhanced Raman scattering: SERS)は金属ナノ微粒子間の増強電場を用いてラマン散乱をより高感度に検出する方法である。特に近年、生体分子計測への応用が試されている。これまで、様々な SERS による検出が行われてきたが[1]、免疫系で重要な働きをする抗原抗体反応などは蛍光色素などを修飾して検出されていた。そこで本研究では、抗原抗体反応の蛍光色素などを修飾しないラベルフリーな検出を目標にして、銀・金ナノコロイド微粒子を用いて抗原抗体反応前後における SERS スペクトルを測定し、その違いを観察した。また、励起波長を変化させてみてどのような違いがあるのかを調べた。

[実験] 銀ナノコロイド分散液は、水に硝酸銀とクエン酸三ナトリウムを加えて攪拌しながら約 1 時間還流して調製した。また、金ナノコロイド分散液は、クエン酸三ナトリウムを水に溶かし、それから H₂AuCl₄ を入れてから NaBH₄ を入れ攪拌し、2~4 時間放置して調製した。

まず、銀ナノコロイド微粒子を用いて測定した。抗原として働く一次抗体(免疫グロブリン G: IgG)と銀コロイド分散液を混合して基板上に滴下した後に、種類の異なる二次抗体をそれぞれ滴下してスペクトルを測定した。また、金ナノコロイド微粒子を用いた実験も同様の手法で行った。このときラマン検出に用いた励起波長は 785 nm であった。

次に、励起波長を先ほどから変更した 514 nm のレーザーを用いて実験を行った。尚、実験方法に関しては上記の手法と同様であった。

実験に用いた試薬は一次抗体 3 種類、二次抗体 5 種類である。

[結果と考察]

まず、IgG+銀コロイド分散液と各二次抗体との実験および IgG+金コロイド分散液と各二次抗体との実験結果を図 1 に示す。この 2 つの実験結果を比べてみると、銀コロイド分散液を用いた場合には 560 cm⁻¹ 付近(図 1 中青く囲った部分)にブロードなピークが見られた。しかし、金コロイド分散液を用いた場合だとそのようなピークを観測することが出来なかった。また、このピークは初めに一次

抗体を加えてピークが出ており(図 1 最下部)、二次抗体を加えても Biotin が修飾されたもの以外では変化が無かった。

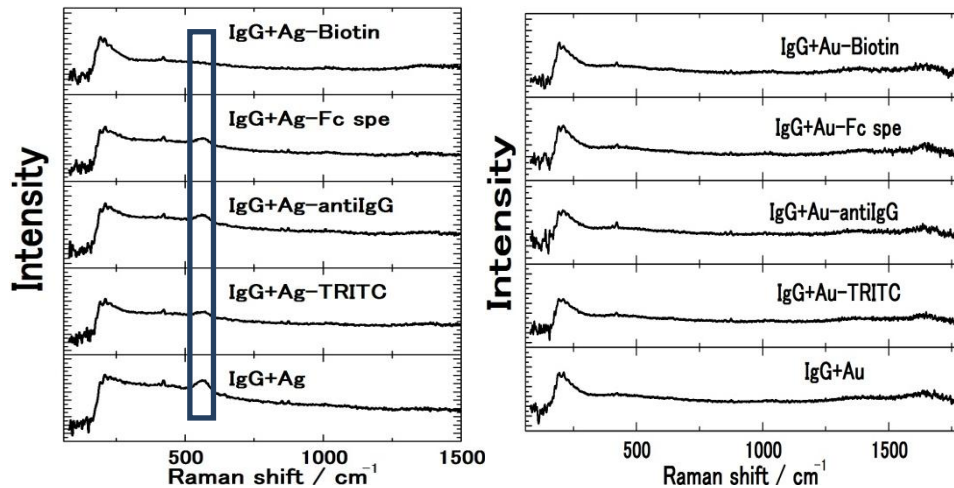


図 1 一次抗体に銀錯体溶液を混ぜたもの(左)と金錯体溶液を混ぜたもの(右)に二次抗体を滴下した場合のスペクトル

この銀コロイド分散液を用いた時に出てきたピークは、銀と IgG による電荷移動錯体形成による共鳴ラマンのピークではないかと考えている[2]。

また、図 1 中でビオチンが修飾された二次抗体を用いるとそのピークは消えているが、これはビオチンが、抗体の銀への吸着を引きはがす作用を起こして共鳴ラマンのピークが見えなかったのではないかと考えている[3]。この他にもある抗体領域に特異的に結合する二次抗体(ビオチン修飾)とそれぞれの抗体領域(Fab, Fc)を反応させてみたが、図 2 のように結合を起こさない場合ではピークが見えていた。この事から、溶液中のビオチンが銀に吸着して一次抗体の吸着を引きはがす力は無いと考えられる。これは、吸着した一次抗体の量が少ない(ただし SERS での検出は可能)なために、ビオチンが一次抗体を選択的に排除するには至らないためと思われる。一方、抗原抗体反応によって吸着部位に接近すると、選択的に一次抗体の吸着を引きはがすことができるのではないかと考察している。

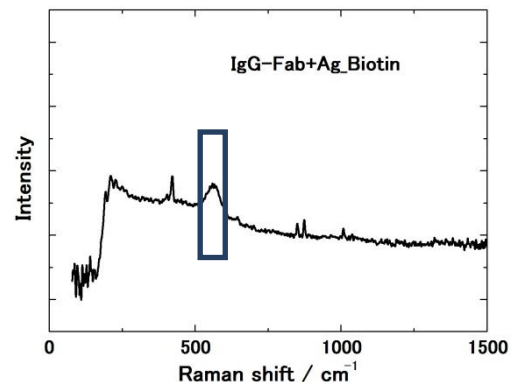


図 2 一次抗体 Fab 領域と銀コロイド分散液に Fc 領域に特異的に反応する二次抗体(Biotin 修飾)を滴下した場合のスペクトル

[参考文献]

- [1] Y. Kitahama, T. Itoh, P. Pienpinijtham, S. Ekgasit, X. X. Han and Y. Ozaki, ACS Symp. Ser., 2013, 1113, 181.
- [2] J. R. Lombardi, R. L. Birke, T. Lu and J. Xu, J. Chem. Phys., 1986, 84, 4174.
- [3] G. G. Huang, M. K. Hossain, X. X. Han and Y. Ozaki, Analyst, 2009, 134, 2468

1P090

プリンヌクレオチド生合成系における酵素反応機構の理論的解析

(千葉工大¹, 電通大²) ○安藤 祥樹¹, 三瓶 巖^{1,2}, 河合 剛太¹, 尾上 薫¹, 山本 典史¹

Computational Study about the Biosynthesis of Purine Nucleotide in Glycinamide Ribonucleotide Synthetase, PurD

(Chiba Institute of Technology¹, The University of Electro-Communications²)

○Yoshiki Ando¹, Gen-ichi Sampei², Gota Kawai¹, Kaoru Onoe¹, Norifumi Yamamoto¹

序論

プリンヌクレオチド生合成系は、14ステップの反応過程を経てアデニル酸とグアニル酸を生成する経路である。三瓶らは、この反応系で炭素付加が起こるステップが構造的に類似する酵素 (PurD, PurN, PurU) で触媒されることを明らかにした [1,2]。PurD は N ドメイン, ATP-grasp ドメイン, C ドメインで構成される。PurN は N ドメインと C ドメインのみで構成される。このことから PurD は、進化の過程で PurN に ATP-grasp ドメインが挿入することで形成されたと予想される。また PurU は、PurN のアミノ末端に ACT ドメインを持った構造である。PurD, PurN および PurU は、共通する祖先タンパク質から派生したひとつのファミリーに属する酵素であり、類似の反応機構を利用すると予想される。したがって、これらの酵素群の反応機構を解析して比較することから、これらの酵素群の形成過程を明らかにできる。

PurD は次の2つの反応 (式1と2) を促進する触媒としてはたらく。はじめにグリシン (Gly) を基質とし、ATP の加水分解を伴い、グリシルリン酸 (GP) を生成する:



続いて、ホスホリボシルアミン (PRA) のアミノ基部位が GP のカルボキシル基を求核的に攻撃することで、グリシンアミドリボヌクレオチド (GAR) を生成する:



このように PurD が触媒する反応では、ATP を利用して Gly のカルボキシル基を活性化することで進行する。一方 PurN では、ホルミル基が付加したテトラヒドロ葉酸 (N^{10} -formyl THF) を利用して GAR のホルミル転移反応が進行する:



本研究では、量子化学計算を用いた理論的解析に基づき、PurD, PurN, PurU 酵素が関与する反応のメカニズムを明らかにし、それぞれの反応機構を比較することから、これらの酵素群が形成されるに至った進化的な過程の解明に取り組んでいる。

方法

PurD と PurN 中で進行する酵素反応 (式1-3) について、基質・酵素複合体モデルを文献 (PurD [1] および PurN [2]) に基づき構築し、ストリング法 [3] を用いることで各反応の最小エネルギー経路 (MEP) を決定した。基質・酵素複合体モデルについては、QM/MM-ONIOM 法に基づき、基質部分は量子力学 (QM), 酵素部分は分子力学 (MM) として扱った。QM 部分は B3LYP/6-31(d,p) 精度, MM部分は Amber 力場を用いて計算した。すべての量子化学計算には Gaussian 09 を用いた。QM/MM 法と組み合わせたストリング法は、in-house で実装したプログラムを用いて実行した。

結果と考察

PurD 中で進行する反応 (式 1) について, 対応する MEP に沿ったエネルギー変化を図 1 に示す。エネルギー変化から, この反応の活性化エネルギーは $13.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり, 終状態に至るエネルギー変化は $8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。図 1 の 4 地点 (a-d) に対応する基質付近の構造を図 2 に示す。図 2 では, 基質分子を ball-and-stick モデル, 基質分子と相互作用するアミノ酸残基を licorice モデル, 酵素を cartoon モデルで表している。

始状態 (図 2 a) では, 基質結合部位の極性残基 Lys や Arg が ATP のリン酸基とグリシンのカルボキシル基と水素結合を介してそれぞれ相互作用する。遷移状態 (図 2 b) では, グリシンのカルボニル酸素が ATP の γ -リン酸基部位を攻撃することで ATP-Gly 活性複合体を形成する。この過程 (a \rightarrow b) では, ATP-Gly 複合体の形成にともなってエネルギーはしだいに高くなり, 遷移状態で $13.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ に至る。その後 (b \rightarrow c), ATP の β - γ リン酸結合が切断することでグリシルリン酸を生成する。この過程では, エネルギーは徐々に低くなり, グリシルリン酸を形成した時点 (図 2 c) で 0 kcal mol^{-1} に至る。このとき, Lys や Arg と基質分子が形成する水素結合の組み替わりが起こる。a の時点で ATP のリン酸基と相互作用していた Lys が, c の時点ではリボース部位と相互作用する。同様に, a の時点ではグリシンのカルボキシル基と相互作用していた Arg が, c の時点でグリシルリン酸のリン酸基と相互作用する。グリシルリン酸を生成した後 (c \rightarrow d), ADP のリン酸基が Lys と相互作用を形成し, 酵素との結合状態がさらに安定化されることで, エネルギーが低くなり, 終状態 (図 2 d) では $-8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ に至る。以上のように, PurD 中で進行する反応 (式 1) の MEP を解析した結果, 結合部位近傍のいくつかのアミノ酸残基が基質分子と適宜に相互作用することで, 反応が巧みに促進されることが明らかとなった。PurN 中で進行する反応の MEP 解析については, 討論会の当日にポスター発表する予定である。

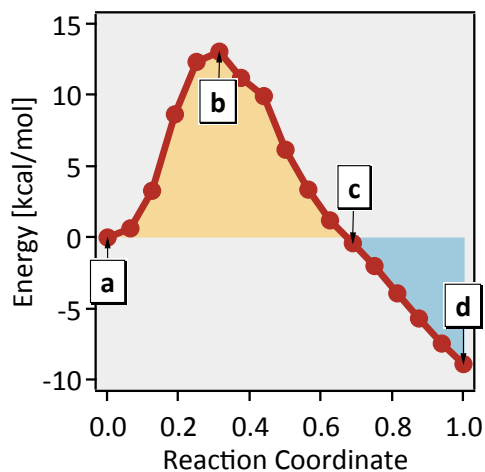


図 1. MEP に沿ったエネルギー変化

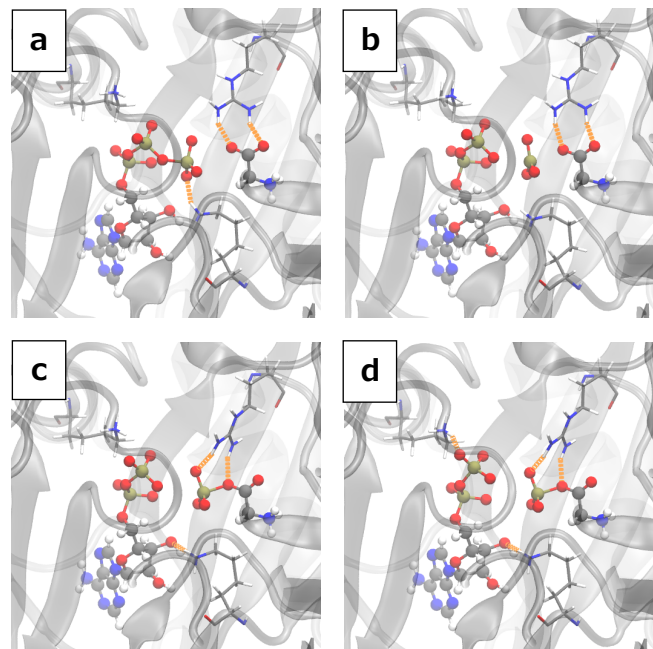


図 2. MEP に沿った構造変化

参考文献

- [1] Sampei, G., et al., *J. Biochem.*, **148**, 429 (2010)
- [2] Sampei, G., et al., *J. Biochem.*, **154**, 569 (2013)
- [3] E, W., et al., *Phys. Rev. B*, **66**, 052301 (2002)