

3P061

精密に組成制御された金クラスターの助触媒利用 —助触媒と光触媒の相関の解明を目指して—

(¹東理大院・総合化学,²東理大理) ○石井大樹¹、藏重亘²、富澤亮太¹、熊澤里菜²、
高山大鑑¹、岩瀬顕秀²、工藤昭彦^{1,2}、根岸雄一^{1,2}

Use of size-controlled gold cluster as co-catalyst

-Toward the elucidation of correlation between photocatalyst and co-catalyst-

(¹Graduate School of Chemical Science and Technology, Tokyo University of Science,

²Faculty of Science, Tokyo University of Science) ○Daiki Ishii¹, Wataru Kurashige², Ryota Tomizawa¹, Rina Kumazawa², Tomoaki Takayama¹, Akihiko Iwase², Akihiko Kudo^{1,2},
Yuichi Negishi^{1,2}

[序]

水分解光触媒材料は、光照射により水から水素と酸素を生成させる。こうした材料では多くの場合、反応活性点となる助触媒と呼ばれる金属粒子を光触媒上に担持させる必要がある。金属粒子の担持方法として一般的に使用されてきたのが、含浸法や光電着法である。これらを用いると、金属粒子を容易に光触媒上に担持することができるが、サイズの小さな粒子を、サイズが揃った状態で担持することは困難であった。しかしながら、液相還元法により調製した金属ナノ粒子を助触媒の前駆体を用いると、含浸法や光電着法を用いた場合よりも、より小さな金属ナノ粒子を高分散に光触媒上に担持させることが可能である。私達はこれまで、グルタチオンによって保護された $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ を助触媒の前駆体を用いることで、従来法を用いた場合よりも水分解光触媒活性を向上させることに成功している[1]。一方で、様々な光触媒と助触媒である金クラスターとの相関関係を明らかにすることができれば、水分解光触媒活性向上に向けた更なる設計指針を得ることが可能になると期待される。そこで本研究では、様々な種類の光触媒に対して $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ を助触媒の前駆体として用い、水分解光触媒活性を測定することで、光触媒と金クラスター助触媒の間にどのような相関関係があるのかを調べた。

[実験]

始めに、助触媒の前駆体として用いる $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ を既報の方法により合成した。合成した $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ と種々の光触媒 ($\text{BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ 、 SrTiO_3 、 NaTaO_3 、 TiO_2) をそれぞれ水溶液中で攪拌することで、 $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ を光触媒に対して吸着させた ($\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ - $\text{BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ 、 $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ - SrTiO_3 、 $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ - NaTaO_3 、 $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}$ - TiO_2)。吸着量は、 $\text{BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ 、 SrTiO_3 、 TiO_2 については光触媒に対してそれぞれ 0.1 wt% とし、 NaTaO_3 については 0.02 wt% とした。その後減圧下、300℃で2時間焼成することにより配位子の除去を行い、それぞれの光触媒に金クラスターを担持させた (Au_{25} - $\text{BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ 、 Au_{25} - SrTiO_3 、 Au_{25} - NaTaO_3 、 Au_{25} - TiO_2)。また比較のために、同様の担持量の金ナノ粒子を光電着法にて光触媒上に担持させた (Au_{NP} - $\text{BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ 、 Au_{NP} - SrTiO_3 、 Au_{NP} - NaTaO_3 、 Au_{NP} - TiO_2)。最後に、それぞれの光触媒の水分解活性を、流通系内部照射型反応管を用いて、Ar および CO_2 フロー条件下にて測定した。

[結果および考察]

図1、図2にクラスター吸着後のそれぞれの光触媒の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像およびクラスターの拡散反射スペクトルを示す。いずれの光触媒上にも、粒径が約 1 nm 程度の粒子が観測され、拡散

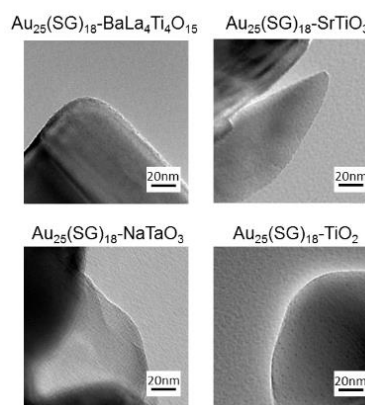


図1. 吸着後の TEM 像.

反射スペクトルにおいても、特徴的なピークが観測された。しかしながら、 $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}\text{-NaTaO}_3$ 、 $\text{Au}_{25}(\text{SG})_{18}\text{-TiO}_2$ については吸収スペクトルの形状が他の二つとは異なることが分かった。このことは、吸着させる光触媒の種類によって、金クラスターの電子構造が変化することを示唆している。以上の結果より、選択する光触媒によりクラスターの電子構造は変化するものの、化学組成を維持したままクラスターを光触媒上に吸着できることが分かった。図 3 に焼成担持後のそれぞれの光触媒の TEM 像を示す。吸着時と比較して同程度の粒子が観測されており、クラスターがほぼ単分散に光触媒上に担持されていることが分かった。このことは、金クラスターを凝集させることなく、すなわち金の原子数をほぼ変化させることなく光触媒上に担持できたことを示している。

このようにして作成した光触媒の水分解活性を測定した。図 4 に、Ar フロー条件下におけるそれぞれの光触媒の気体発生量を示す。 $\text{Au}_{25}\text{-BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ は $\text{Au}_{\text{NP}}\text{-BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ に比べて多少の活性向上が観測されたのに対し、 SrTiO_3 については、 $\text{Au}_{25}\text{-SrTiO}_3$ の方が $\text{Au}_{\text{NP}}\text{-SrTiO}_3$ よりも 2.5 倍の活性を示すことが分かった。一方で、 NaTaO_3 については、 $\text{Au}_{\text{NP}}\text{-NaTaO}_3$ に比べて $\text{Au}_{25}\text{-NaTaO}_3$ の活性が低いことが分かった。過去の私達の報告より、同じ量の金を光触媒上に担持した場合、金クラスターを担持することで表面積は大きく増大するものの、1原子あたりの活性については、金ナノ粒子よりも低いことが明らかにされている[2]。また、 NaTaO_3 に関しては、金ナノ粒子が助触媒として効果的に働くことが報告されている[3]。そのため、金クラスターを用いることで、たとえ表面積を増大させたとしても、金ナノ粒子を担持した場合の高い活性を上回ることができなかったと考えられる。一方で SrTiO_3 に関しては、 NaTaO_3 に比べて活性が低い光触媒である。それゆえに、金クラスターを担持させたことによる反応表面積の増大が、活性向上の主な要因として働いたと予想される。図 5 に、 CO_2 フロー条件下での水分解活性を示す。 $\text{BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ については、 $\text{Au}_{25}\text{-BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ の方が $\text{Au}_{\text{NP}}\text{-BaLa}_4\text{Ti}_4\text{O}_{15}$ よりも 1.5 倍活性が向上したのに対し、 SrTiO_3 の場合、 $\text{Au}_{25}\text{-SrTiO}_3$ は $\text{Au}_{\text{NP}}\text{-SrTiO}_3$ に比べて約 5 倍まで活性が向上することが分かった。このことは、流通させる気体によっても活性の挙動が変化することを示している。こうした金クラスターに有利な条件においても、 NaTaO_3 に関しては $\text{Au}_{\text{NP}}\text{-NaTaO}_3$ の方が $\text{Au}_{25}\text{-NaTaO}_3$ よりも高い活性を示した。また、 TiO_2 については従来法と同様、いずれの条件においても酸素の発生が観測されないことから、水分解反応が進行しないことが確認された。以上の結果より、光触媒と金クラスター助触媒の間には効果的な組み合わせおよび測定条件が存在することが明らかになった。

[1]Y. Negishi and A. Kudo et al., *Nanoscale*, 2013, 5, 7188.

[2]Y. Negishi and A. Kudo et al., *J. Phys. Chem. C*, 2015, 119, 11224.

[3]A. Iwase and A. Kudo et al., *Catal. Lett.*, 2006, 108, 7.

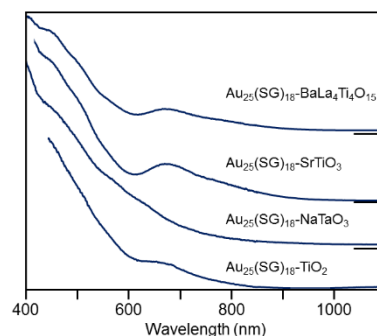


図 2. 拡散反射スペクトル。

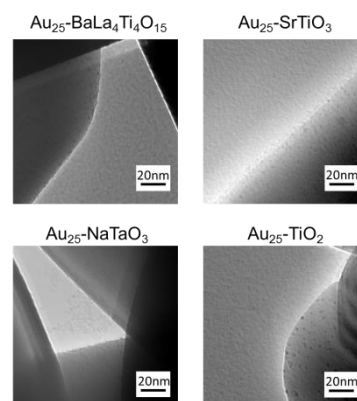


図 3. 焼成担持後の TEM 像。

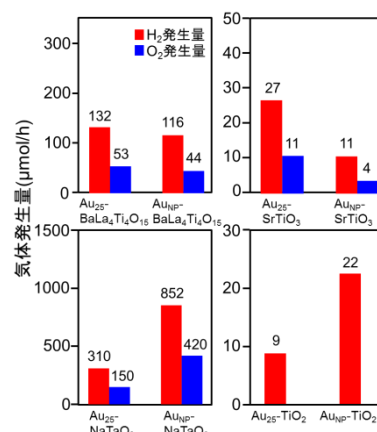


図 4. 活性評価 (Ar 条件下)。

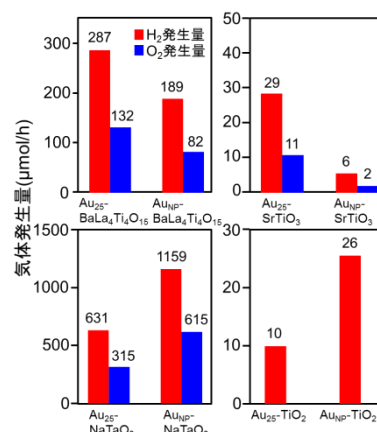


図 5. 活性評価 (CO_2 条件下)。

PdAu₁₀ クラスターの反応性(茨城大院・理¹、茨城大・理²)○川村綾¹、泉岡明²Reactivity of PdAu₁₀ cluster

(Ibaraki Univ.) Kawamura Ryo, Izuoka Akira

【序】近年金クラスターに異種金属を導入したバイメタルクラスターにおいて異種金属がクラスターに及ぼす立体的・電子的影響に興味を持たれ研究がされている。Pt が導入された Pt / Au バイメタルクラスターでは水素分子の吸脱着によってクラスターの電子数の可逆的变化¹⁾、Pd が導入されたバイメタルクラスターは溶液中での安定性の増加^{2,3)}が報告されている。今回我々は [Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₈Cl₂]⁺ を原料として Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ を調製し、配位子交換反応や金錯体の付加・脱離反応を行い、反応性を検討した。

【実験】Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ は THF 中で [Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₈Cl₂]⁺ に 1 当量の Et₄NAuCl₂ を反応させることで赤褐色の沈殿として得た。得られた Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ を塩化メチレン中で懸濁させ、PPh₃ や AuPPh₃PF₆ と反応させた。

【結果と考察】

ESI-MS より文献の方法を参考に調製した [Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₈Cl₂]⁺ の生成を確認した。図 1 に [Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₈Cl₂]⁺ と Et₄NAuCl₂ との反応で得られた Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ の ¹H-NMR スペクトルを示す。Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ (*o*':7.45、*m*':6.82、*p*':6.91 ppm) は Au₁₁(PPh₃)₇Cl₃ (*o*':7.47、*m*':6.82、*p*':6.91 ppm) と化学シフトが類似しており、原料の [Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₈Cl₂]⁺ 由来のシグナルは消失した。Au₁₁(PPh₃)₇Cl₃ は [Au₁₁(PPh₃)₈Cl₂]⁺[AuCl₂]⁻ を THF 中で反応させると生成することが確認されており、Pd が導入された場合でも類似した反応が起き、中性の Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ が生成したと考えられる。Au₁₁(PPh₃)₇Cl₃ と反応性を比較するために Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ に対して AuPPh₃⁺ の付加反応⁴⁾を行った。得られた生成物の ¹H-NMR スペクトルを図 2、ESI-MS

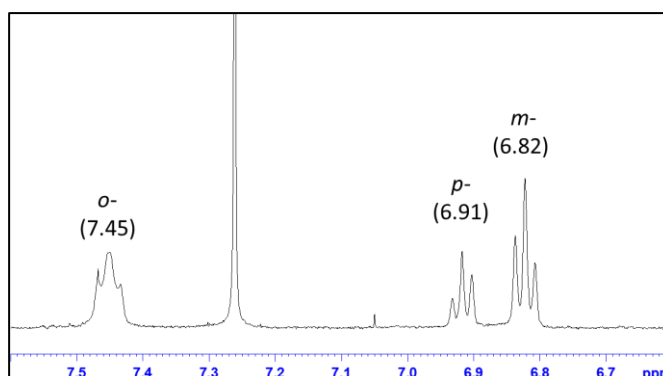


図 1. Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ の ¹H-NMR スペクトル (solv:CDCl₃)

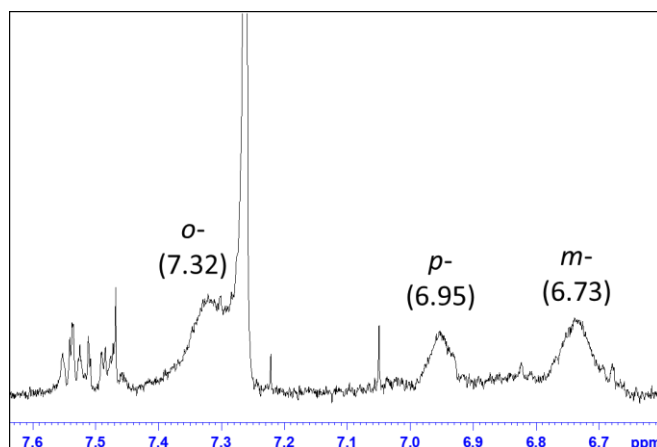


図 2. Pd(H)Au₁₀(PPh₃)₇Cl₃ と AuPPh₃⁺ の生成物の ¹H-NMR スペクトル (solv:CDCl₃)

を図 3 に示す。生成物(σ :7.32、 m :6.73、 p :6.95 ppm)はブロードニングしたシグナルを与え、化学シフトは $[\text{Au}_{12}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3]^+$ (σ :7.32、 m :6.73、 p :6.95 ppm) と類似していた。 $[\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_2]^+$ と $[\text{Au}_{12}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3]^+$ を内部標準として共存させ、測定した生成物の ESI-MS 測定結果から生成物は水素原子が取り込まれている組成の $[\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3]^+$ ($m/z = 4476.1$) と帰属した。このことから $\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ は、 $\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ と同様に AuPPh_3^+ の付加反応が起こり $[\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3]^+$ が生成していると考えられる。 $\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ の反応性を $\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ と比較するために PPh_3 と反応させた。 $\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ の場合は Cl と PPh_3 が配位子交換することで得られる $[\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_2]^+$ や、引き続き AuCl が脱離した $[\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}]^+$ が生成することが確認されている。 $\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ に PPh_3 を 1 当量反応させると配位子交換によって $[\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_2]^+$ が得られた。2 当量以上反応させた場合は図 4 に示したように $[\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_2]^+$ ($m/z = 4244.4$) やさらに H^+ と AuCl が脱離した $[\text{PdAu}_9(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}]^{2+}$ ($m/z = 2005.1$) が ESI-MS で確認できた。

以上のことから、本研究によって $\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ は $\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ と同様な配位子交換反応や段階的なクラスターコアの拡張反応によって $[\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3]^+$ や $[\text{PdAu}_{10}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_2]^+$ が生成することを確認した。また、今回得られた $[\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{11}(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}_3]^+$ や $[\text{PdAu}_9(\text{PPh}_3)_8\text{Cl}]^{2+}$ をサイズアップおよびサイズダウンさせることで生成する PdAu_{12} クラスターや PdAu_8 クラスターについても報告する予定である。

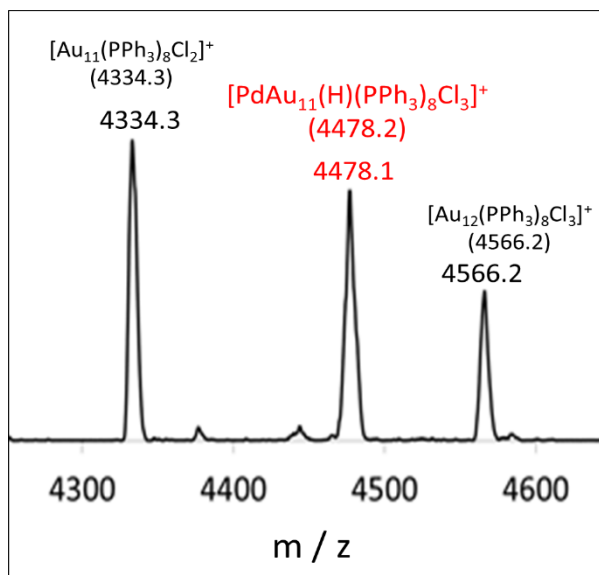


図 3. $\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ と AuPPh_3^+ の生成物の ESI-MS(solv: CH_2Cl_2) (Au_{11}^+ および Au_{12}^+ は内部標準)

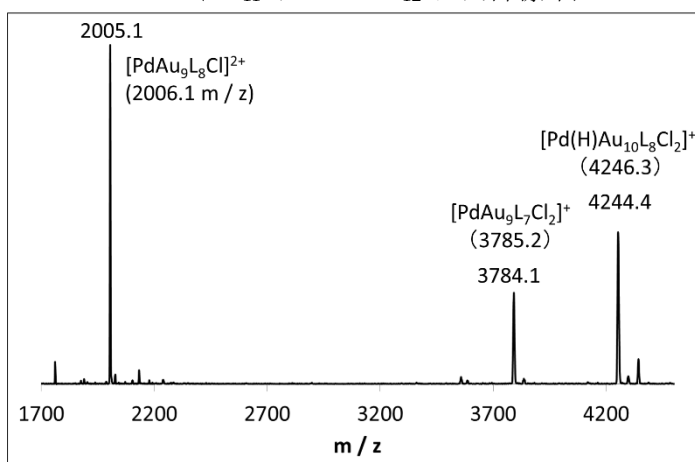


図 4. $\text{Pd}(\text{H})\text{Au}_{10}(\text{PPh}_3)_7\text{Cl}_3$ と PPh_3 (2 当量) の生成物の ESI-MS(solv: CH_2Cl_2)

- (1) T.G.M.M.Kappen, J.J.Bour, *Inorg. Chem.*, 1993, 32, 1074-1075
- (2) Wataru Kurashige, Yuichi Negishi, *J. Clust. Sci.*, 2012, 23, 365-374
- (3) Yuichi Negishi, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 6219
- (4) 櫻井麻紀、分子科学討論会(2012)

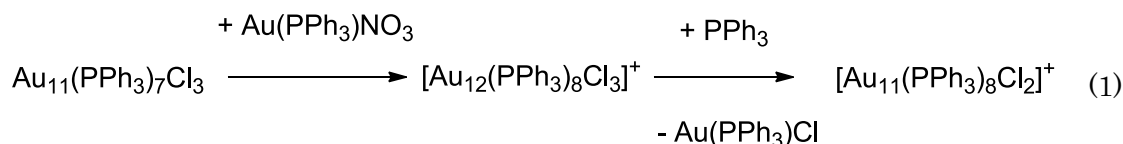
ホスフィンが Cu に配位した CuAu₁₀ クラスターの調製(茨城大院・理¹、茨城大・理²) 高木和哉¹、泉岡明²Preparation of CuAu₁₀ cluster which copper site protected by phosphine

(Ibaraki Univ.) Kazuya Takaki, Akira Izuoka

【序】近年、金クラスターの構造や反応性について様々な報告がなされており、^{1,2}金クラスターの配位子の違いによりどのように立体的、電子的性質が変化するか興味をもたれている。また金クラスターに異種金属を導入したバイメタルクラスターの研究も盛んに行われている。³当研究室では Au₁₀ クラスターを塩化メチレン中で Et₄NCuCl₂ と反応させることにより CuCl が付加した CuAu₁₀ クラスターを調製している。今回我々は PPh₃ が Cu に配位した CuAu₁₀ クラスターの構造異性体の調製を目的とし、別ルートでの CuAu₁₀ クラスターの調製法を検討した。

【実験】Au₁₁(PPh₃)₇Cl₃ の塩化メチレン懸濁溶液に 0.8 当量の Cu(PPh₃)₂BH₄⁴を加えて攪拌した。粗生成物を塩化メチレン-ヘキサンで洗浄し、生成物を得た。生成物の ¹H-NMR、³¹P-NMR、UV-vis 吸収スペクトル、ESI-MS を測定した。DFT 計算は B3LYP/6-31*(H,P)・LANL2DZ(Au,Cu) の条件で行った。

【結果と考察】当研究室では中性の Au₁₁ クラスターを Au₁₂ クラスターにサイズアップし、Au₁₂ クラスターからカチオンの Au₁₁ クラスターにサイズダウンする反応を確立している。



この反応を応用し、Au₁₁(PPh₃)₇Cl₃ と Cu(PPh₃)₂BH₄ を反応させた。反応生成物の ESI-MS を図 1 に ¹H-NMR 測定結果を図 2 に示した。

ESI-MS 測定から m/z = 4200.8 に [CuAu₁₀(PPh₃)₈Cl₂]⁺(m/z = 4202.3) のシグナルを観測した。また、弱いピークとして現れた m/z = 4068.3 と m/z = 4334.0 のピークはそれぞれ [Cu₂Au₉(PPh₃)₈Cl₂]⁺(m/z = 4068.2) と [Au₁₁(PPh₃)₈Cl₂]⁺(m/z = 4335.3) であると帰属した。

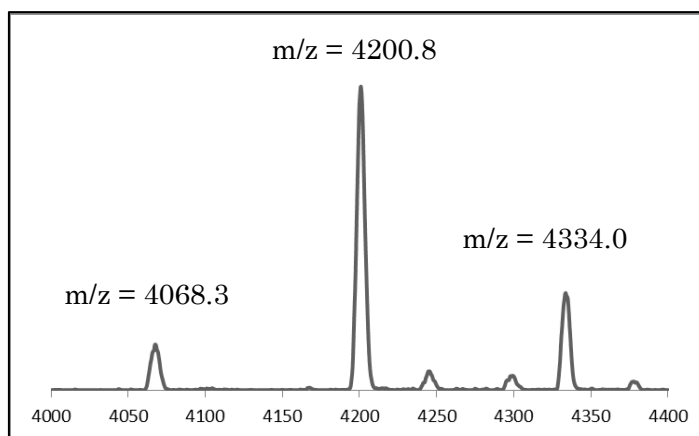
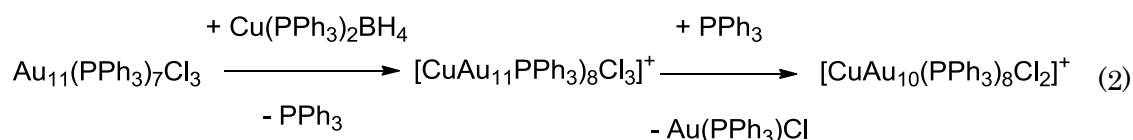


図 1 粗生成物の ESI-MS 測定結果

solv CH₂Cl₂

^1H -NMR の測定結果から生成物の化学シフトは $\delta = 6.66, 6.92, 7.30$ ppm であり、これらは CuCl が組み込まれた CuAu_{10} クラスターの化学シフトと一致した。これらの結果より、この反応において、反応スキーム(2)に示しているように CuAu_{11}^+ クラスターを経て最終的に CuAu_{10}^+ クラスターが生成したものと考えている。 Au_{11}^+ クラスターと CuAu_{10}^+ クラスターの ^1H -NMR において対応するピークの化学シフトにほとんど差がない。このことから ^1H -NMR では Cu に PPh_3 が配位子した場合と Cl が配位した場合にピークに変化が生じない可能性があるため ^{31}P -NMR を測定した。反応生成物は CuCl で付加させて調製した CuAu_{10} クラスターと同じ化学シフトにシグナルを観測した。このことはスキーム(2)において得られた生成物は Cu に Cl が配位した CuAu_{10} クラスターであることを示している。このことから、 CuAu_{11} クラスターまたは CuAu_{10} クラスターが生成した段階で速やかに PPh_3 と Cl が交換していると考えられる。またモデルクラスターの DFT 計算は PH_3 の配位したクラスターよりも Cl の配位したクラスターの方が 16.77kJ/mol 安定であるという結果となった。この結果からも Cu に PPh_3 が配位したクラスターよりも Cl が配位したクラスターが安定に生成しやすいことを支持している。

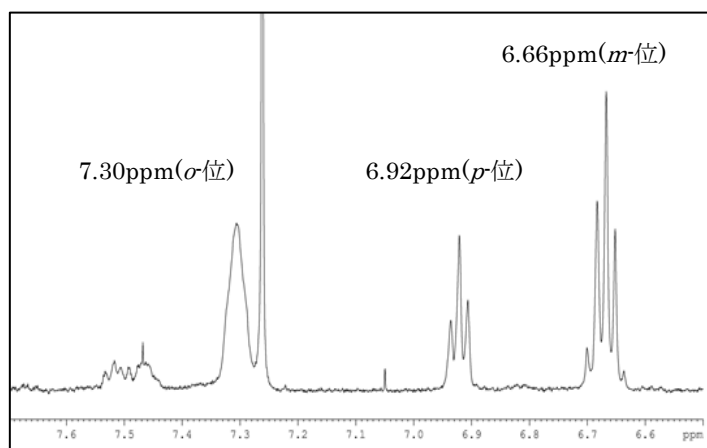


図 2 粗生成物の ^1H -NMR スペクトル測定結果

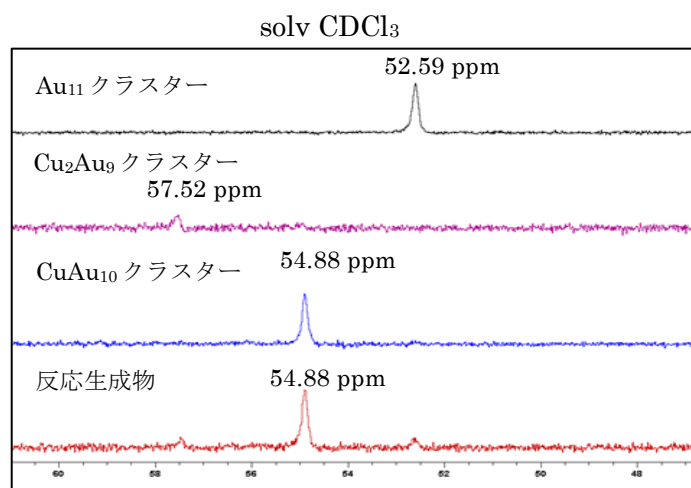


図 3 各クラスターの ^{31}P -NMR スペクトル測定結果

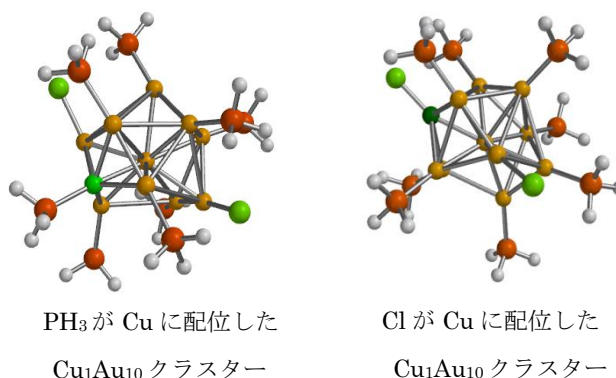


図 4 各クラスターの DFT 計算結果
(B3LYP/6-31*(H,P) · LANL2DZ(Au,Cu))

- 1) Martin Schulz-Dobrick, Martin Jasen, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2007, 633, 2326
- 2) Robin H.A. Ras *et al.* *J. Phys. Chem. Lett.*, 2014, 5, 585
- 3) Yuichi N, *et al.* *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 6219-6225
- 4) *Tetrahedron Letters* No.11pp975-978

水素化ホウ素ナトリウムによる金クラスターの電子構造の可逆的変調

(東大院理¹, 京大 ESICB²) ○石田 瞭¹, 山添誠司^{1,2}, 小安喜一郎^{1,2}, 佃達哉^{1,2}Reversible Modulation of Electronic Structures of Gold Clusters
with Sodium Borohydride(The University of Tokyo¹, ESICB Kyoto University²)○Ryo Ishida¹, Seiji Yamazoe^{1,2}, Kiichirou Koyasu^{1,2}, Tatsuya Tsukuda^{1,2}

【序】 粒径 1 nm 程度のポリビニルポリピロリドン保護金クラスター (Au:PVP) は、アルコール類の空気酸化反応に対する高活性触媒として注目されている[1]。このような極微小の Au:PVP は、高濃度の PVP の存在下で、強力な還元剤である水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) によって塩化金酸を急速に還元することで調製される。この調製過程を吸収分光法で追跡したところ、還元の初期段階に、2 nm 以上の金クラスターに特有の表面プラズモン共鳴 (SPR) 吸収[2]が出現することを見出した。例えば平均粒径 1.2 nm の Au:PVP の調製においては、 NaBH_4 水溶液添加後 1 分以内に 509 nm 付近に SPR 吸収が出現し、その強度をおよそ 30 分保った後に急速に消失した (Figure 1)。本研究ではこの現象の起源を解明するために、(1) 平均粒径があらかじめ規定された Au:PVP と NaBH_4 との反応前後での粒径変化、(2) 合成条件と SPR 吸収の保持時間の関係を調べた。

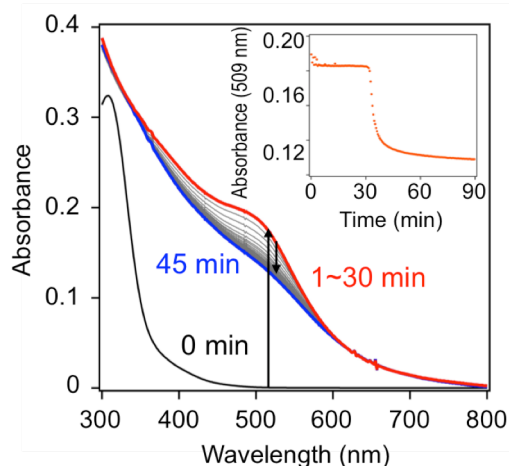


Figure 1. Time course of UV-Vis spectra of Au:PVP during the preparation.

【実験】 既報[1]に従い、塩化金酸と PVP (平均分子量 40 kDa) の混合水溶液に氷浴下で NaBH_4 を加えることにより Au:PVP を得た。調製した Au:PVP に対して NaBH_4 を反応させ、紫外可視吸収スペクトルの測定を行うとともに、反応前後の Au:PVP の粒径変化を透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察と X 線吸収分光法 (XAFS) により調べた。また、 NaBH_4 水溶液の濃度、 NaBH_4 水溶液の液性 (pH7–9)、雰囲気 (Air, Ar, O_2) を変えて Au:PVP の調製を行い、各条件での SPR 吸収の保持時間を測定した。

【結果と考察】 まず、Figure 1 に見られる SPR 吸収の出現と消失が金クラスターの粒径変化を伴うかを調べるために、一旦調製した Au:PVP のヒドロゾルに対して空気中で NaBH_4 水溶液を加え、吸収スペクトルの時間変化を追跡した。その結果、添加直後に SPR 吸収が出現し、およそ 70 分後に急速に消失することが確認された。そこで NaBH_4 との反応前後の金クラスターの TEM 像 (Figure 2) および Au-L_{III} 殻の EXAFS を比較したところ、反応

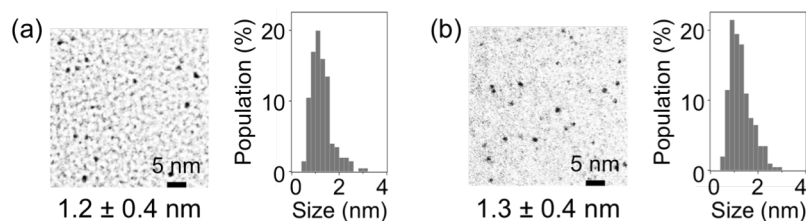


Figure 2. TEM image and size distribution of Au:PVP before (a) and after (b) the reaction with NaBH_4 .

前後で粒径の変化は見られなかった。この結果は、SPR 吸収の出現が、不可逆的な金クラスターの粒径増加によるものではないことを表している。一方、SPR 吸収の消失は水溶液中の NaBH_4 の寿命に関連しているものと予想される。

この仮説を検証するために、 NaBH_4 水溶液の濃度、 NaBH_4 水溶液の pH、雰囲気を変えながら Au:PVP を調製し、SPR 吸収の保持時間との関係を調べた。Figure 3 に示すように、 NaBH_4 水溶液の濃度とともに保持時間が長くなった (pH=7)。また、Figure 4a に示すように、 NaBH_4 を炭酸カリウム水溶液 (pH=9) に溶かすことで加水分解 ($\text{NaBH}_4 + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}_2 + \text{NaB}(\text{OH})_4$) が抑制され、SPR 吸収の保持時間が長くなった ($[\text{NaBH}_4]=0.1 \text{ M}$)。一方、雰囲気を空気から酸素に置き換えることで SPR 吸収の保持時間は短くなったが、アルゴンに置き換えると保持時間が顕著に長くなった (Figure 4b)。これらの結果は、SPR 吸収が、生成した Au:PVP (平均粒径 1.2 nm) と NaBH_4 との反応によって出現し、 NaBH_4 が水溶液中に存在する間は保持され、 NaBH_4 の濃度低下とともに消失することを表している。

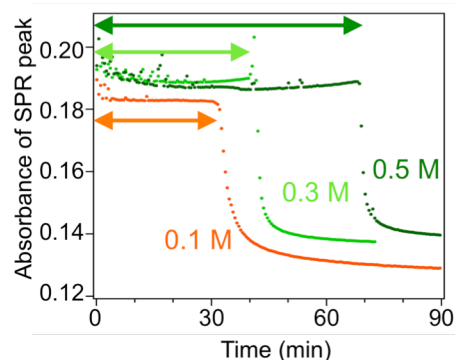


Figure 3. Time course of absorbance of SPR at different concentration of NaBH_4 (air, pH=7).

平均粒径 1.2 nm の Au:PVP は光吸収によって離散的な電子準位間の一電子遷移が誘起されるが、これが NaBH_4 と反応することで SPR を発現した機構を考察する。気相金クラスター Au_n^- とその水素置換体 $\text{Au}_{n-1}\text{H}^-$ の電子構造が酷似していることから、水素原子が金原子の電子的等価体のように振舞うことが指摘されている[3]。このことから、 NaBH_4 との反応によって Au:PVP の表面に水素が吸着することで電子密度が増加し、SPR 吸収が観察されたものと結論した。また、溶存酸素による SPR 吸収の消失は、酸素分子により金クラスターに吸着した水素が除去されること、および水素の供給源である NaBH_4 の分解が加速されることによるものと考えられる。この現象は、金原子の電子的等価体である水素を表面に吸着させたり脱離することによって金クラスターの電子状態を可逆的に変調できることを示唆している。

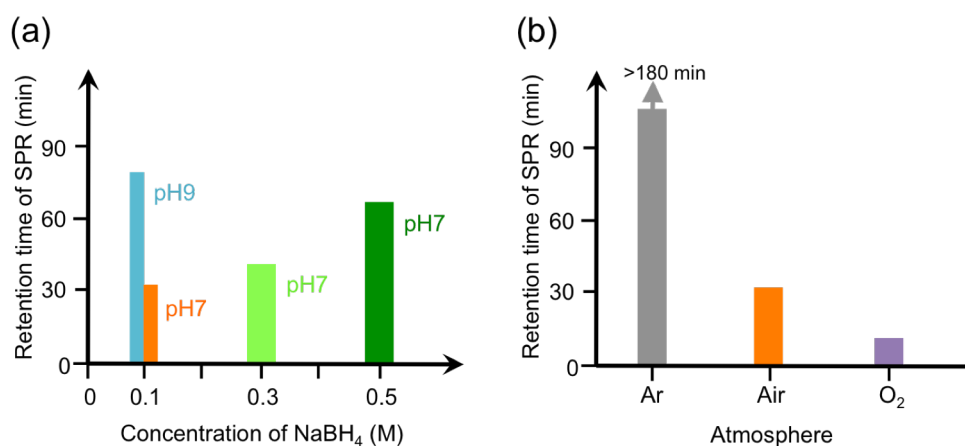


Figure 4. Dependence of retention time of SPR on (a) concentration of NaBH_4 (air, pH=7) and pH ($[\text{NaBH}_4]=0.1 \text{ M}$, air) and (b) atmosphere ($[\text{NaBH}_4]=0.1 \text{ M}$, pH=7).

【参考文献】

- [1] Tsunoyama, H.; Ichikuni, N.; Sakurai, H.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7086.
- [2] Negishi, Y.; Nakazaki, T.; Malola, S.; Takano, S.; Niihori, Y.; Kurashige, W.; Yamazoe, S.; Tsukuda, T.; Häkkinen, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1206.
- [3] Buckart, S.; Ganteför, G.; Kim, Y. D.; Jena, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14205.

銀ナノ微粒子のレーザートラッピングを用いた酵母細胞の高感度測定

(関西学院大院理工*, 産業技術総合研究所*)

○林 宏彰*, 北濱 康孝*, 伊藤 民武**, 尾崎 幸洋*

Sensitive detection from yeast cells by optically-trapped silver nanoparticle

(Kwansei Gakuin University*, Advanced Industrial Science and Technology**)

○Hiroaki Hayashi*, Yasutaka Kitahama*, Tamitake Itoh**, Yukihiro Ozaki*

【序論】酵母細胞とヒト細胞は共に細胞内に核を持つ構造を持つ。このため、酵母細胞を研究することで人体構造の解明に繋がると考えられている。酵母細胞を研究する際に、ラマン散乱を用いることで、細胞内の部位についての成分の違いをスペクトルとして観察することができる。しかし、ラマン散乱は非常に感度が低いという欠点を持っている。近年、金属ナノ粒子を用いて感度を大きく増強できる表面増強ラマン散乱(SERS)が注目されている。また、レーザートラッピング法と呼ばれる近赤外の光を用いて金属を補足し任意の位置に移動できる技術がある。これらの技術を用いて、細胞内の部位による違いや異なるレーザー照射時間にすることで、酵母細胞について研究を行った。

【実験】酵母細胞と濃縮した銀ナノコロイド分散液を混合したバルク状態のサンプルに、514nmのレーザーを照射することで SERS スペクトル測定を行った。次に、この装置ではレーザートラッピングを行えないため、当研究室では 1064 nm の近赤外光によるレーザートラップ機能を持つ暗視野顕微分光システム(励起光波長: 532 nm)を利用した装置を作製した。この装置を用いて、異なる部分からの酵母細胞の SERS 測定を行った。さらに、酵母内の近い部位からの短時間近赤外光を照射したものと、長時間近赤外光を照射したものの SERS スペクトルの比較も行った。また、酵母細胞からの近赤外光のみを用いた表面増強ハイパーラマン散乱(SEHRS)の測定を行ったが、シグナルを検出できなかった。このため、酵母細胞に色素分子であるクリスタルバイオレットを吸着させるグラム染色法を用いて、単一色素分子と比較を行うことで酵母細胞と色素分子の関係についての考察を行った。

【結果と考察】バルク状態である酵母細胞からの SERS スペクトルを Fig.1 に示す。次に、近赤外光で酵母細胞に銀ナノ粒子をトラップしている状態を Fig.2 に示す。この図の中心の十字の部分に近赤外光が照射されており、銀ナノ粒子を捕捉することができている。銀ナノ粒子が吸着した異なる位置から SERS スペクトルの測定を行った。ある部分における近赤外光を短時間照射したものと長時間照射したものの差分スペクトルを Fig.3 に示す。過去に報告された酵母上の単一銀ナノ粒子からの SERS スペクトル[1]とこれらのスペクトルを比較したが、バンドの位置は異なるという結果が得られた。また、近赤外光を長時間照射することで、スペクトルの S/N が良くなったと言える。近赤外光を照射し続けることで、細胞膜に銀ナノ微粒子を動かす力が加わり続け

る。この力によって、銀ナノ粒子が細胞膜を破って酵母内に押し込まれたと考えた。銀ナノ粒子が細胞内に入ることによって細胞内の成分も観測されたことから S/N が向上したと考えられる。

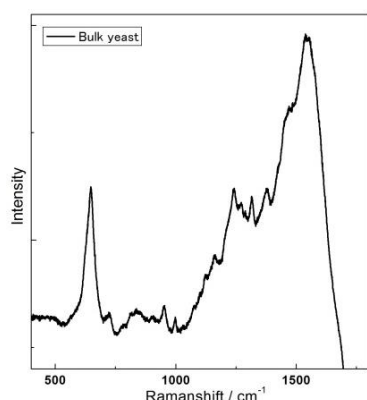


Figure 1

バルク状態の酵母細胞から得られた SERS スペクトル

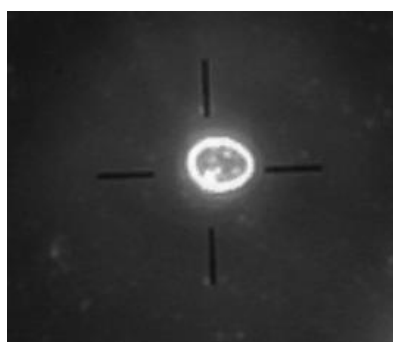


Figure 2

酵母細胞に銀ナノ粒子をトラップしている状態

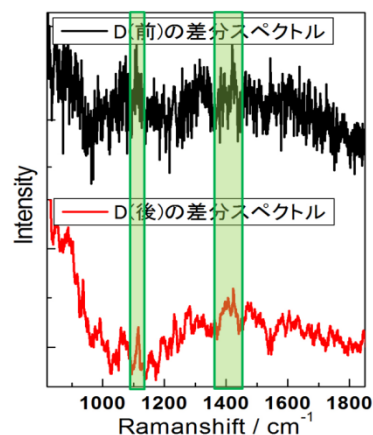


Figure 3

近赤外光の照射時間の違いによる差分スペクトル

グラム染色法を用いた酵母細胞と単一色素分子を比較したスペクトルを Fig.4 に示し、ピーク位置を Table 1 に示す。グラム染色を行うことで、バンドのピーク位置に変化が起こった。これは、酵母細胞と色素分子の間で相互作用が起きていると考えている。現在、どのような相互作用が起きているか分かっておらず、同様に相互作用が起きた原因についてもわかっていない。今後は、これについて考察していく。

本研究は JSPS 科研費 25410029 の助成を受けたものです。

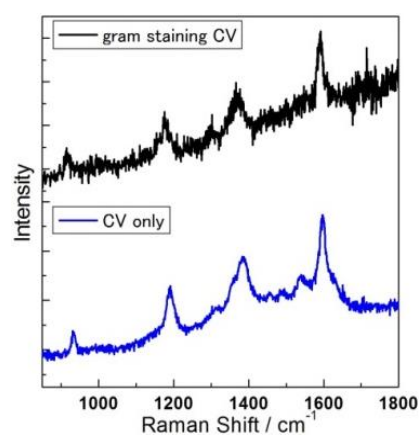


Figure 4

グラム染色した酵母細胞と単一色素の比較

Table 1 ピーク位置変化

Raman Shift / cm ⁻¹	
グラム染色(CV)	色素のみ(CV)
915	934.8±0.9
1176	1190.8±3.3
1366	1380.6±3.0
1592	1595.6±3.9

参考文献

[1] A. Sujit, T. Itoh, H. Abe, K. Yoshida, M. S. Kiran, V. Biju, M. Ishikawa, *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 1803–1809 (2009)

3P066

$[\text{Cu}_2(\text{X-BA})_4(\text{pyz})]_n$ (X=H, 3-F, 2,3-F) の水素およびエチレン吸蔵と 吸蔵された分子の運動状態

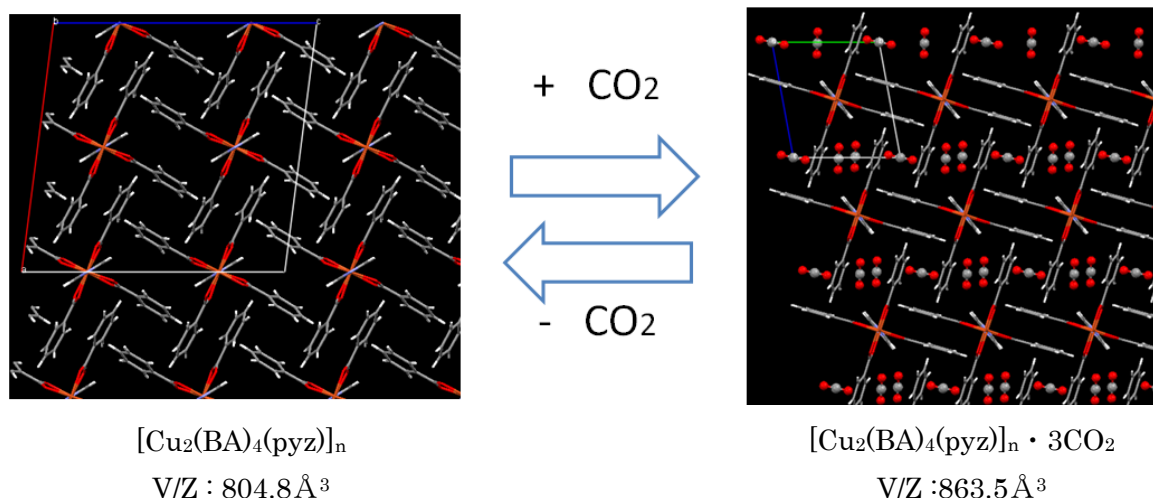
(北大・院総化*, 北大・院理**) ○眞田孝輔*, 景山義之**, 丸田悟朗**, 武田定**

H_2 and C_2H_4 adsorption of $[\text{Cu}_2(\text{X-BA})_4(\text{pyz})]_n$ (X=H, 3-F, 2,3-F) and their dynamics in the host crystal.

(Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ.*, Faculty of Sci., Hokkaido Univ.**)

○Kosuke Sanada*, Yoshiyuki Kageyama**, Goro Maruta**, Sadamu Takeda**

【序】多孔性配位高分子錯体 (MOF) は、その気体吸蔵性から、近年、研究が進められてきた。その中でも、当研究室では、 $[\text{Cu}_2(\text{BA})_4(\text{pyz})]_n$ (以下、BA 錯体) について研究を行ってきた。この BA 錯体の特徴として、気体吸蔵に伴う構造相転移がある。先行研究^[1]では、 CO_2 吸蔵における BA 錯体の構造相転移が報告されており、吸蔵前後で BA 錯体は、7%もの体積変化を示すことが分かった。(Fig.1) そこで、本研究では CO_2 と同様に分子間引力が大きい C_2H_4 について、その吸蔵特性やホスト・ゲスト相互作用を調べた。また、BA 錯体と異なる配位子をもつ、 $[\text{Cu}_2(3\text{-FBA})_4(\text{pyz})]_n$ (3-FBA 錯体)、 $[\text{Cu}_2(2,3\text{-FBA})_4(\text{pyz})]_n$ (2,3-FBA 錯体) ^[2] についても、 C_2H_4 の吸蔵特性を調べ、BA 錯体と比較した。一方、分子間引力の小さい H_2 についても、各錯体での吸蔵特性を調べた。



(Fig.1) BA 錯体の CO_2 吸蔵における構造および体積変化

【実験】

I) BA 錯体について、 C_2H_4 と He の混合ガス (全圧は、1013 hPa) 気流中で、DSC 測定を行った。このとき、 C_2H_4 の分圧のみを下げながら測定することで、相転移温度の C_2H_4 分圧依存性を調べ、その結果から BA 錯体と C_2H_4 のホスト・ゲスト相互作用を検討した。また、その結果を CO_2 の場合と比較した。

II) 3-FBA 錯体、2,3-FBA 錯体の C_2H_4 吸蔵挙動を DSC 測定で調べた。また、自作した装置により、BA 錯体を含めた各錯体の C_2H_4 吸蔵量も調べた。

III) 各錯体の H_2 吸蔵挙動を、DSC 測定で調べた。また、 C_2H_4 と同様に、各錯体の H_2 吸蔵量を

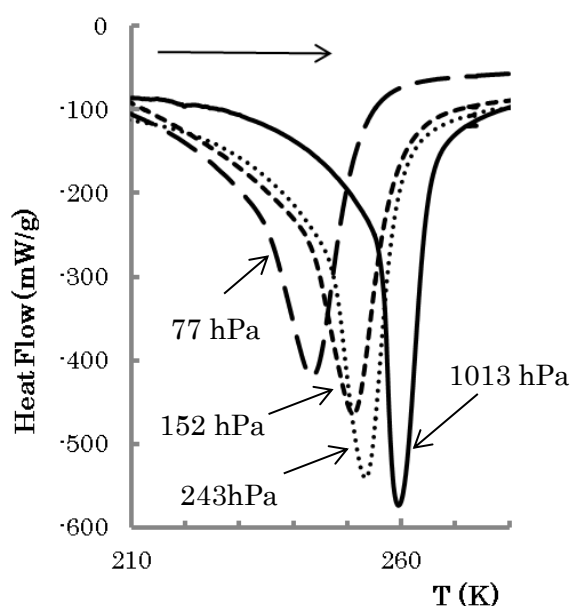
調べた。

【結果と考察】

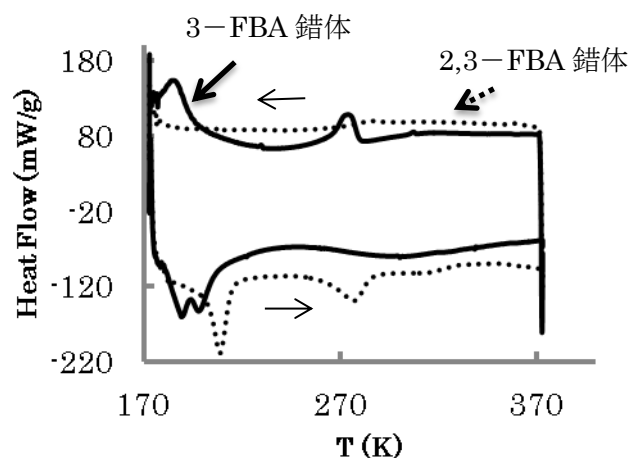
I) BA 錯体結晶と平衡にある C_2H_4 の分圧を下げていくと構造相転移温度（ここでは便宜的に DSC カーブの peak top とした）が低温側にシフトした。(Fig.2) このとき、相転移温度の逆数に対して C_2H_4 分圧をプロットしたところ、クラウジウスクラペイロンの式でよく説明ができた。この結果から、錯体のホスト格子に取り込まれた C_2H_4 の気化熱を求めた。また、 CO_2 の結果と比べ、比較検討した。詳細は当日報告する。

II) 2,3-FBA 錯体、3-FBA 錯体に対し、 C_2H_4 1 気圧下で、DSC 測定を行った。(Fig.3) 2,3-FBA 錯体に注目すると、昇温過程で 2 回にわたって気体放出と構造相転移が起こっている。さらに、吸蔵量実験から、1 つの相転移に伴って、 $[Cu_2(2,3-FBA)_4(py)_2] 1 \text{ mol}$ あたり、約 1 mol の C_2H_4 が放出されていることが分かった。今後は、固体 NMR を用いて、錯体に取り込まれた C_2H_4 の運動状態について検討を行う予定である。

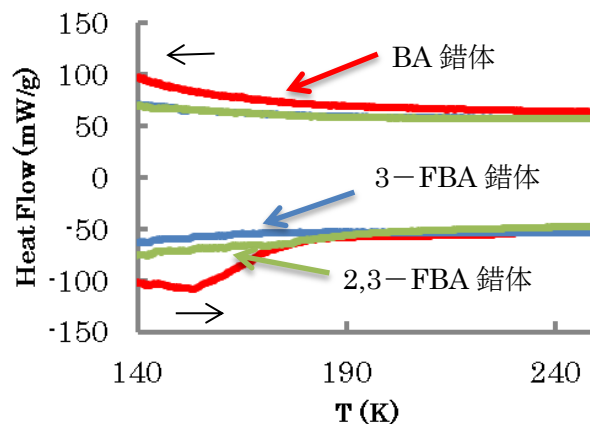
III) 各錯体の H_2 1 気圧下での DSC 測定結果を Fig.4 に示した。これより、各錯体は低温で H_2 を吸蔵することが分かった。また、当研究室では、BA 錯体中において、水素分子は、2 つの site を flip-flop していることを見出している。^[3] 今後は、BA 錯体以外についても、吸蔵された水素分子の運動状態を調べる予定である。



(Fig.2) さまざまな C_2H_4 分圧下での DSC 測定



(Fig.3) C_2H_4 雰囲気下 DSC 測定



(Fig.4) H_2 雰囲気下 DSC 測定

[1] : S. Takamizawa, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 3783-3792

[2] : K. Takahashi, *et al.*, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 9081-9089

[3] : 柿崎圭紀, 修士論文, 2011

Pd に吸蔵された水素のダイナミクスにおけるナノサイズ効果

(1京大院理、2JST-CREST、3阪府大院理)

○出倉駿¹、小林浩和^{1,2}、池田龍一^{1,2}、前里光彦¹、久保田佳基³、北川宏^{1,2}

Nano-size effect on the dynamics of hydrogen absorbed inside Pd

(1Graduate School of Science, Kyoto Univ.; 2JST-CREST;

3Graduate School of Science, Osaka Pref. Univ.)

○Shun Dekura,¹ Hirokazu Kobayashi,^{1,2} Ryuichi Ikeda,^{1,2} Mitsuhiro Maesato,¹Yoshiki Kubota,³ Hiroshi Kitagawa^{1,2}

【緒言】パラジウム(Pd)は古くから知られている水素吸蔵金属であり、水素圧の上昇に伴い α 相と呼ばれる水素固溶相(Pd + H)から β 相と呼ばれる水素化物相(Pd-H)へと一次相転移し、吸蔵された水素は面心立方構造を有する Pd 格子の八面体間隙を占めることが知られている。一方、Pd の粒子径をナノサイズまで減少させると、 α 相と β 相の二状態間の相転移挙動が不明瞭になることが報告されているが¹、その特異な相挙動の起源は明らかとなっていない。我々は最近、水素圧を精確に制御しながら in situ で固体 NMR 測定が可能な測定装置を開発し、バルクおよびナノサイズの Pd における水素圧力下 in situ 固体 NMR 測定を行った。バルクの Pd では、 α 相の水素のシグナルは常磁性シフトにより高磁場側に、 β 相の水素はナイトシフトにより低磁場側に観測され、水素の吸蔵に伴い高磁場側から低磁場側へとシグナルがシフトすることがわかっている。他方 Pd ナノ粒子ではサイズの減少に伴い、水素吸蔵量が少ない状態であっても NMR シグナルがより低磁場側に見られ、2.0 nm の Pd ナノ粒子においては水素圧力—組成等温(PCT)曲線、NMR 測定ともに相転移が見られなくなることを明らかにした(図 1)^{2,3}。これは、Pd のサイズの減少に伴い α 相の電子状態が β 相に近付いていくことを示唆している。しかしながら、Pd ナノ粒子の特異な水素吸蔵特性をより詳細に理解するには、Pd 内部の水素の静的な状態に加えて、そのダイナミクスについても詳細に議論しなければならないが、Pd 内部の水素のダイナミクスにおけるナノサイズ効果について系統的に研究した例は無

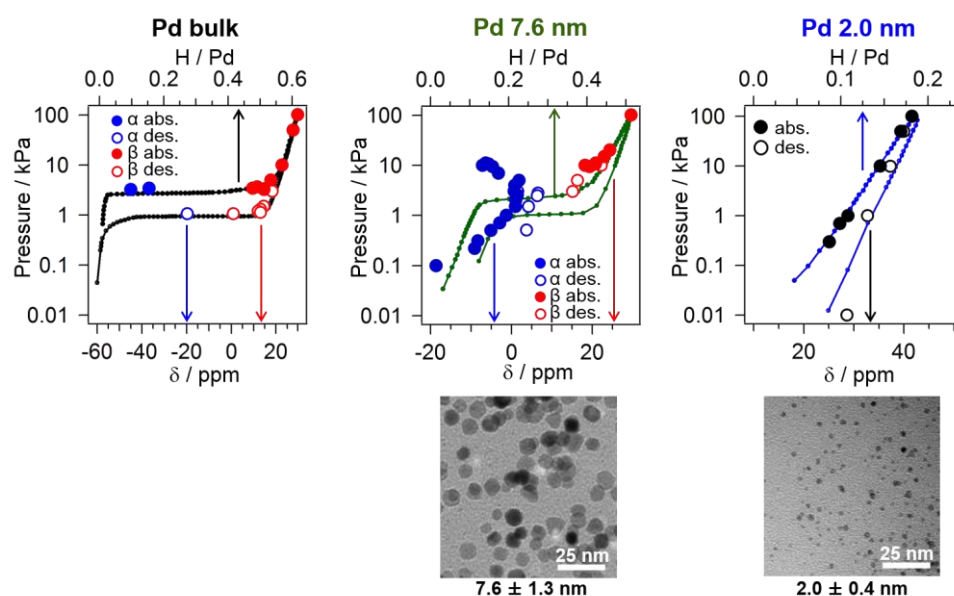


図 1.(上部)バルク、7.6 nm および 2.0 nm の Pd 各試料についての、水素圧力下 in situ 固体 NMR 測定により得られた NMR シフトの水素圧力依存性と PCT 曲線との比較。(下部) 7.6 nm および 2.0 nm の Pd ナノ粒子の透過型電子顕微鏡(TEM)写真。

い。本研究では水素吸蔵速度測定、水素圧力下 *in situ* 固体 NMR による縦緩和時間(T_1)測定、磁場勾配パルス NMR(PFG-NMR)法による拡散係数測定により、Pd に吸蔵された水素のダイナミクスにおけるナノサイズ効果を詳細に調べることを目的とした。

【実験】測定には液相法で合成した 2.0 nm 及び 7.6 nm の Pd ナノ粒子を用い、比較のためバルクの Pd として市販の粉末 Pd を用いた。水素吸蔵速度のサイズ依存性を調べるために、試料を含む定積容器内における水素圧力の経時変化を測定し、水素吸蔵量の経時変化を調べた。水素の初期圧力および平衡圧力は図 2 (a)中の通りであった。また、Pd 内部での水素のダイナミクスについて調べるために、 ^2H 核の共鳴周波数 61.4 MHz にて重水素圧力下 *in situ* 固体 ^2H NMR 測定により各試料における T_1 の水素濃度依存性を、さらに PFG-NMR 測定により拡散係数を測定した。

【結果と考察】303 K における水素吸蔵速度の測定結果(図 2 (a))より、サイズの減少に伴い平衡圧に達するのに要する時間が長くなり、水素吸蔵速度が下がっていくことが明らかとなり、Pd のサイズ減少に伴い表面で乖離した水素原子の表面およびサブサーフェスから内部への拡散が遅くなっていくことが示唆された。また、バルクおよび 7.6 nm の Pd ナノ粒子については β 相の領域、2.0 nm の Pd ナノ粒子については 1 気圧付近の重水素圧力において、重水素圧力下 *in situ* 固体 ^2H NMR による T_1 の水素吸蔵量依存性を測定した結果(図 2 (b))、Pd のサイズの減少に伴い T_1 が短くなる傾向が確認された。BPP 理論⁴によれば、水素吸蔵量が多いほど磁気双極子相互作用により T_1 は短くなることが予想され、バルクおよび 7.6 nm の Pd の測定結果からも水素濃度の低下による T_1 の減少傾向は見られなかったが、水素吸蔵量が少ない 2.0 nm の Pd ナノ粒子の T_1 が最も短い結果となっており、この結果は本質的にナノサイズ効果によるものであると考えられる。このことから、サイズの小さい Pd においては Pd 内部におけるジャンプ頻度が高く、より速く拡散している、もしくは構造が乱れており、水素が理想的でない八面体間隙を占め四極子緩和がより支配的になっている、ということが考えられる。当日は T_1 の温度依存性および PFG-NMR 測定結果についても詳細に議論する。

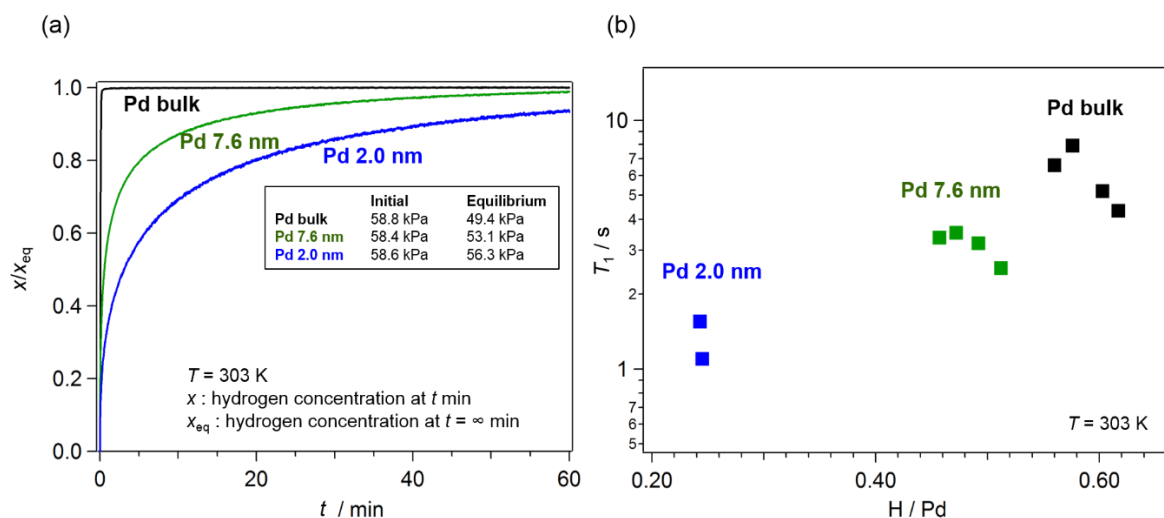


図 2. (a)各試料の水素吸蔵量の経時変化。(b) β 相もしくは 1 気圧付近の重水素圧力下における各試料の T_1 の水素濃度依存性。

- [1] M. Yamauchi *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, **112**, 3294 (2008).
- [2] S. Dekura *et al.*, *The 8th Annual Meeting of Japan Society of Molecular Science*, 3C07 (2014).
- [3] S. Dekura *et al.*, *The 95th CSJ Annual Meeting*, 1F1-05 (2015).
- [4] N. Bloembergen *et al.*, *Phys. Rev.* **73**, 679 (1948).

半導体ナノ材料のゼーベック係数における緩和時間の影響

(京大国際センター, エジプト日本科技大)

○中村 康一

熱電変換特性を表す指標の一つであるゼーベック係数は、ボルツマン輸送方程式

$$\left(\frac{\partial f}{\partial t}\right)_{\text{coll}} = \left(\frac{\partial}{\partial t} + \frac{d\mathbf{r}}{dt} \cdot \nabla_{\mathbf{r}} + \frac{d\mathbf{k}}{dt} \cdot \nabla_{\mathbf{k}}\right) f = \frac{\partial f}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \frac{\partial f}{\partial T} \nabla_{\mathbf{r}} T - \frac{e}{\hbar} \mathbf{E} \cdot \nabla_{\mathbf{k}} f$$

に暗に含まれる起電力 $\mathbf{E}$ と温度勾配 $\nabla_{\mathbf{r}} T$ の比として与えられる。半導体中の電子が平衡状態でフェルミディラック分布 f_0 (フェルミエネルギー ε_F) に従うとして、定常状態での速度分布関数 f は一次近似では緩和時間 $\tau(\varepsilon)$ を用いて

$$f(\varepsilon) - f_0(\varepsilon) = \tau(\varepsilon) \mathbf{v}(\varepsilon) \frac{df_0}{d\varepsilon} \cdot \left(e\mathbf{E} + \frac{\varepsilon - \varepsilon_F}{T} \nabla_{\mathbf{r}} T \right)$$

とボルツマン輸送方程式から導出でき、ゼーベック係数 S は電流密度 $\mathbf{J} = \mathbf{0}$ の条件において

$$S = -(1/eT) \left[\left(\int g(\varepsilon) \tau(\varepsilon) \varepsilon v^2(\varepsilon) (df_0/d\varepsilon) d\varepsilon / \int g(\varepsilon) \tau(\varepsilon) v^2(\varepsilon) (df_0/d\varepsilon) d\varepsilon \right) - \varepsilon_F \right]$$

としてキャリア状態密度 $g(\varepsilon)$ を用いて表現される^[1,2]。ただし積分区間はキャリア電子またはホールが占有しているエネルギー領域とする。キャリア速度の2乗 $v^2(\varepsilon)$ はバンドエネルギーの $\mathbf{k}$ に関する微分の2乗、あるいは波動関数に運動量演算子 $-i\hbar \nabla_{\mathbf{r}}$ を作用させたものの2乗から見積もれるので、 $g(\varepsilon)$ と合わせて有限温度 T 下の第一原理バンド計算を通してエネルギー依存が明らかになる。すなわち、緩和時間 $\tau(\varepsilon)$ 以外の物性量は第一原理計算のレベルによって一意に決まり、緩和時間のエネルギー依存を無視した場合はその温度依存性に関係なく緩和時間自身の効果が相殺される。緩和時間は一般的なキャリア伝導率を決定する因子として古くから議論が展開されており、イオン化不純物散乱、音響・光学フォノン散乱、谷間散乱などに関する緩和時間を考慮することによって S の値をより正確に予測計算できる。伝導帯が多谷構造をもつ場合、系全体のゼーベック係数はそれぞれの伝導帯の谷由来のキャリア伝導率を重みとした各谷のゼーベック係数の加重平均となる。

上記の第一原理計算に基づくシミュレーション手法に従って、単結晶シリコンやシリコンカーバイド (3C-SiC; 2H-SiC; 4H-SiC; 6H-SiC)、酸化亜鉛などの n 型および p 型半導体について、とりわけ熱電変換特性の向上に効果的なキャリア状態密度を示すとされるナノ構造を対象にゼーベック係数の数値計算を行い、各種散乱に関する緩和時間のエネルギー依存を考慮して、これらがゼーベック係数にどのような影響を及ぼすかを議論した。実際には緩和時間のエネルギー依存・温度依存を考慮するためのすべての必要なパラメータを第一原理的に導出するのは困難であり、本研究では誘電率、

フォノン変形ポテンシャル、フォノン温度、物質中の音速について実験由来のパラメータを用いて検討した。

結果的にフェルミディラック分布のエネルギー微分の効果が強いことから、低温では緩和時間の影響はきわめて小さく、緩和時間のエネルギー依存を無視しても問題ないことが確認できた。高温ではイオン化不純物散乱をメインに緩和時間の影響によってゼーベック係数に変化が生じ、とりわけ 2H-SiC のナノシート^[3]やひずみのあるシリコンなど、谷間のエネルギー差が小さい（ゼロではない）多谷構造をもつ場合はゼーベック係数のシミュレーション値に有意な差があることが示された。ナノ構造に対するシミュレーション結果など、詳細は当日に発表する。

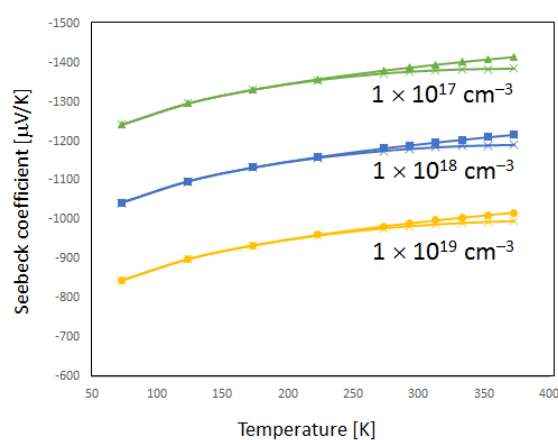


Fig. 1. Temperature and carrier concentration dependences of the calculated Seebeck coefficients for n-doped bulk silicon model. Circle, square, and triangle plots respectively mean the carrier concentration of 1×10^{19} , 1×10^{18} , and $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$, and X plots include the effect of relaxation time.

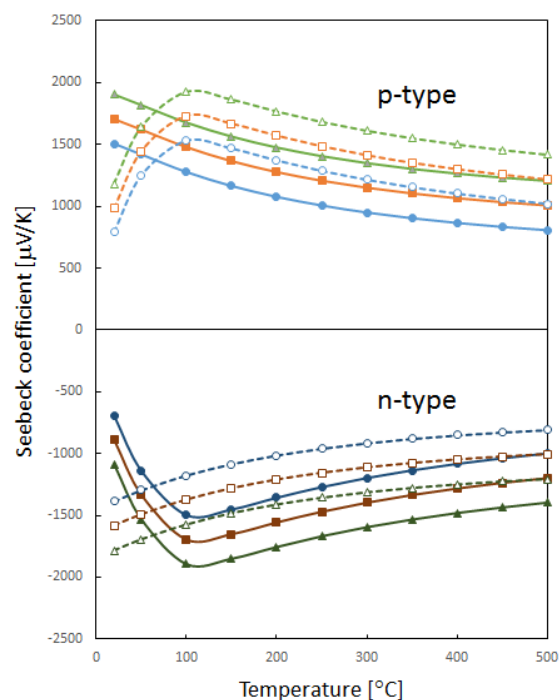


Fig. 2. Temperature and carrier concentration dependences of the calculated Seebeck coefficients for silicon carbide nanowire models: solid and dashed lines respectively denote 3C-SiC(0001) $((\text{SiC})_{37}\text{H}_{42})$ and 2H-SiC(0001) $((\text{SiC})_{25}\text{H}_{30})$ models at $2R$ (diameter) = 1.3 nm. Circle, square, and triangle plots respectively mean the carrier concentration of 1×10^{19} , 1×10^{18} , and $1 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$.

- [1] M. Lundstrom, *Fundamentals of Carrier Transport* (Cambridge University Press, Cambridge, 2000).
- [2] P. Pichanusakorn and P. Bandaru, Mater. Sci. Eng. R **67**, 19 (2010).
- [3] K. Nakamura, T. Toriyama, and S. Sugiyama, Jpn. J. Appl. Phys. **50**, 06GE05 (2011).

Zr ドープ酸化チタン粒子触媒を用いたシュウ酸の電気化学的還元反応

(九大 WPI-I2CNER¹, JST-CREST²)○ 秦 慎一^{1,2}、山内 美穂^{1,2}Electrochemical reduction of oxalic acid using Zr-doped TiO₂ particle catalyst(International Institute for Carbon-Neutral Energy Research (WPI-I²CNER), KyushuUniversity¹, JST-CREST²)Shinichi Hata^{1,2}, Miho Yamauchi^{1,2}

【序論】持続可能な社会の形成が実現されるためには、CO₂ 排出のない高効率なエネルギー循環システムの構築が求められる。直接アルコール型燃料電池の酸化廃棄物であるカルボン酸から、再生可能エネルギー由来の電力を使ってアルコールを合成し、燃料として再利用することができれば、CO₂ を排出せず再生可能エネルギーを循環させることが可能となる⁽¹⁾。しかしながら、カルボン酸の電気化学的還元によるアルコール合成に関する系統的な研究は行われていない。最近、我々は TiO₂ 微粒子を電極還元触媒に用いることで、ジカルボン酸であるシュウ酸からグリコール酸（一価アルコール）を合成することに初めて成功した⁽²⁾。本研究では Ti の同族元素である Zr を混合した Ti-Zr 複合酸化物粒子を調製し、その構造及び電子状態とシュウ酸に対する還元特性を調べることを目的とする。

【実験】Ti-Zr 複合酸化物粒子は、ソルボサーマル法で作製した。Ti および Zr のアルコキシドの混合比を変えることで、金属組成の異なる複合酸化物 (Ti_{100-x}Zr_x, x=0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100) を調製した。焼成処理を施したそれらは、透過型電子顕微鏡(TEM)、粉末 X 線回折(XRPD)測定により形状および結晶構造を調べた。試料の比表面積・細孔径を求めるために、窒素吸脱着等温線を測定し BET 法による解析を行った。さらに作製した触媒の電子状態を明らかにするために、UV-vis 拡散反射スペクトルを測定した。また Ti-Zr 複合酸化物粒子を電極触媒に用いて、シュウ酸に対する還元特性を二室セルによるクロノアンペロメトリーにより調べた。反応条件は 50 °C、2 時間とし、反応生成物は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使って評価した。

【結果と考察】XRPD 測定の結果 (Fig.1(a))、ソルボサーマル法で作製した x=0~15 の Zr を含む複合酸化物は、アナターゼ型の回折ピークを示した。一方、x=20~75 の Zr を含む試料では、明瞭な回折ピークが観測されなかったことから、これらの試料は結晶性の低いアモルファスの構造で

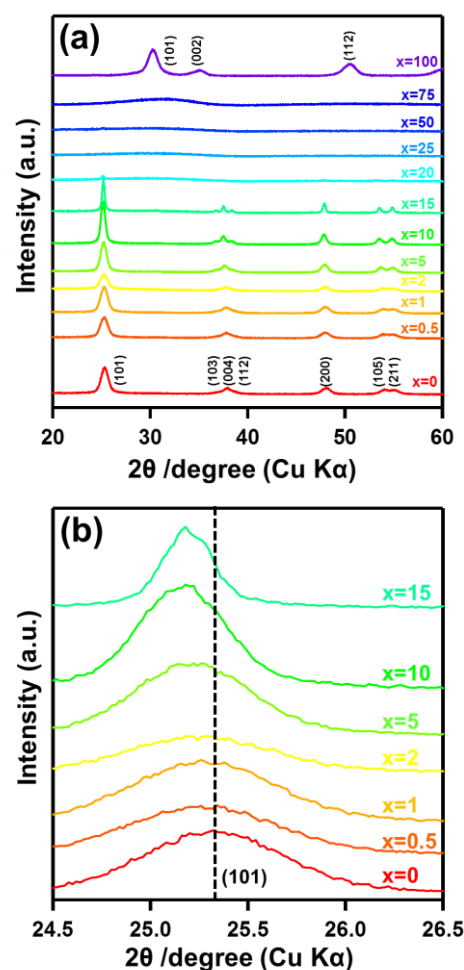


Fig.1 XRPD pattern (a) and anatase (101) diffraction peak (b) of the TiO₂/ZrO₂ binary catalysts.

あると考えられる。 $x=100$ は他の報告と同様に正方晶に帰属される回折パターンを示した。

Fig.1(b)に作製した Ti-Zr 複合酸化物粒子のアナターゼ(101)面の回折ピークを示す。Zr 比の増加に伴い、その回折ピークは純な TiO_2 よりも徐々に低角度にシフトしている。これは Ti のイオン半径よりも大きい Zr イオンが、次第と TiO_2 中の Ti サイトに固溶されることで、格子が拡張していることを示している。また、Zr 比が増加するとその回折ピークの半値幅が小さくなっていることから、その結晶性は向上しているものと考えられる。作製したアナターゼ相の Ti-Zr 複合酸化物粒子の窒素吸脱着等温線、TEM 観察の結果、その比表面積は $100\sim 130\text{ m}^2/\text{g}$ 程度であり、メソポーラス構造を有していることが確認できた。

次に作製した Ti-Zr 複合酸化物粒子を用いて、シュウ酸の電気化学的還元反応に関する触媒試験を行った (**Fig.2**)。その結果、アナターゼ相の Ti-Zr 複合酸化物粒子では全体のファラデー効率はおよそ $80\sim 100\%$ であり、 TiO_2 および JRC-TiO-2 (アナターゼ相の TiO_2 参照触媒) と比べて非常に高い値であった。またそのときのシュウ酸の 4 電子還元体かつ目的のアルコール物質であるグリコール酸の収率は、約 20% 程度であった。一方で Ti-Zr 複合酸化物の結晶構造がアナターゼ相からアモルファスへ転移するとファラデー効率は 40% 程度までに低下したことから、アナターゼ構造の形成がシュウ酸の還元触媒に求められる重要な性質であることが明らかとなった。

Ti-Zr 複合酸化物の格子定数と UV-vis 拡散反射スペクトルの吸収端から求めたバンドギャップエネルギーの関係を **Fig.3** に示す。アナターゼ相の TiO_2 にわずか $0.5\text{atm}\%$ の Zr を固溶することで、格子定数およびバンドギャップエネルギーが大きく増加している。これはアナターゼ相の Ti-Zr 複合酸化物粒子では、Ti3d と Zr4d 混成軌道により形成された伝導帯が TiO_2 のそれよりもエネルギーの高い位置にあるため、シュウ酸がより効率的に還元されると推測される。さらに当日は、X 線光電子分光(XPS)の結果と合わせ、反応メカニズムについて詳細な議論を行う。

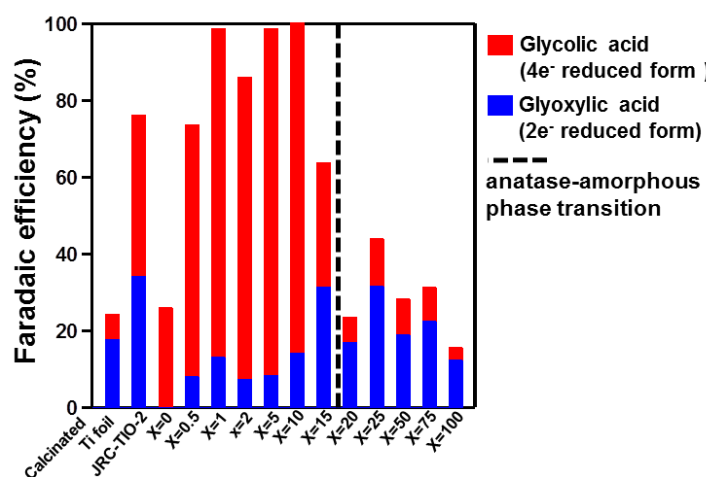


Fig.2 Faradaic efficiencies for products generated in electroreduction of oxalic acid using calcined Ti foil and JRC-TiO-2, prepared $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$ binary catalysts deposited onto calcined Ti foil.

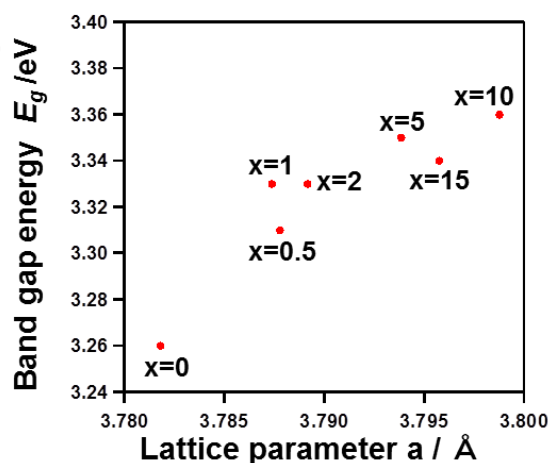


Fig.3 Relation between band gap energy and lattice parameter a of the $\text{TiO}_2/\text{ZrO}_2$ binary catalysts.

[References] (1) Takeguchi, T. et al., *ECS Transaction.*, **41**, 1755-1759. 2011. (2) Watanabe, R. et al., *Energy Environ. Sci.*, **8**, 1456-1462, 2015.

3P070

VSFG 検出赤外超解像顕微鏡法による毛髪 α -ケラチンの分子配向イメージング -各振動モードにおける偏光依存性測定-

(東工大資源研)

○牛尾公平、渡瀬五常、藤井正明、酒井誠

Orientation-sensitive molecular imaging of human hair α -keratins by using VSFG detected IR super-resolution micro-spectroscopy -Polarization dependency measurements-

(Tokyo Institute of Technology)

○Kohei Ushio, Yukihiwa Watase, Masaaki Fujii, Makoto Sakai

【序】振動和周波発生 (VSFG) 法を顕微鏡技術と融合させた赤外超解像顕微鏡は、通常の光学顕微鏡と同程度の空間分解能を有しながら、界面選択性や分子配向に敏感であるという特徴を併せ持つ。我々は昨年までに、毛髪横断面 {図 1 : $\alpha = 0^\circ$ } の α -ケラチンのアミドⅢバンド領域において赤外超解像イメージングを行い、アミドⅢバンド (1250 cm^{-1}) においては高感度で α -ケラチンが検出される一方、アミドⅠバンド (1650 cm^{-1}) では α -ケラチンが全く観測されない現象を見出した。 $\alpha = 0^\circ$ から $\alpha = 45^\circ$ 角度をつけた斜め断面でアミドⅠの信号が検出されたこと {図 2} から、 α -ケラチンが毛髪伸長方向にきれいに配向しており、 α -ケラチンの分子配向が VSFG の信号強度に影響を及ぼしたと結論した[1, 2]。また、VSFG の信号強度が分子配向に加え、入射光 (可視光、赤外光) や VSFG 光の偏光の組み合わせに

対して大きく依存すること[3]を利用し、アミドⅠの $\alpha = 45^\circ$ 断面の偏光依存性を測定したところ、明瞭な偏光依存性が観測された {図 3}。一方、解析が不十分のままであった。本研究では、2つの α -ヘリックスが二重螺旋を形成する α -ケラチンのキラリティを考慮に入れて、アミドⅠの解析を再考すると共に、アミドⅢを含む他の振動モードにおける偏光依存性を測定することで α -ケラチンの分子配向、物性について詳細な情報を得ることが目的である。

【実験】励起光源に使用した赤外光と可視光は再生増幅器によって増幅された Ti:Sapphire レーザーのピコ秒パルス波長変換して用いた。赤外光は $2.5\text{--}9\text{ }\mu\text{m}$ ($1111\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$)、可視光は 613 nm の波長を用いた。これらの光をビームコンバイナーで同軸に合わせた後、BaF₂ レンズ (焦点距離: 50 mm) を用いて直径約 $100\text{ }\mu\text{m}$ の大きさで毛髪試料全体に照射して、赤外カットフィルター、バンドパスフィルターを通した後に ICCD カメラ上に結像した。偏光依存性測定では、 $1/2$ 波長板、偏光フィルターで VSFG 光、可視光、赤外光における偏光を変えて測定した。毛髪試料には、日本人毛髪をエポキシ樹脂に包埋した後、ミクロトームで毛髪伸長方向の直交軸に対して

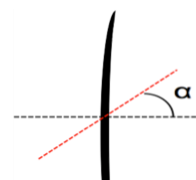


図 1 : 毛髪の断面の角度 α
横断面は $\alpha = 0^\circ$ 、斜め断面は $\alpha = 45^\circ$ 、縦断面は $\alpha = 90^\circ$ に相当する

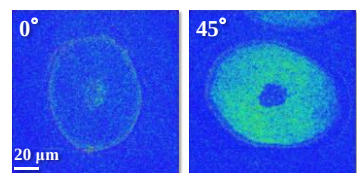


図 2 : 毛髪断面の角度 α の異なるアミドⅠバンドにおける VSFG 像 (画像の左上は角度 α 、赤外光と可視光の偏光は直交関係)

$\alpha = 0, 45, 90^\circ$ で断面を切り出し、カバーガラス基板上に載せ、エタノールで馴染ませることにより基板上に半固定したものを用いた。厚みは全て $3\ \mu\text{m}$ で調製した。

【結果・考察】図3は $\alpha = 45^\circ$ 断面のアミド I バンドにおける偏光依存性測定結果である。画像横方向が X 偏光、縦方向が Y 偏光とし、VSFG 光、可視光、赤外光に関して、全 8 通りの偏光の組み合わせで測定を行った。 α -ケラチンの階層構造から繊維に沿った面を界面とし、実験上の光学配置における分子と VSFG 光、可

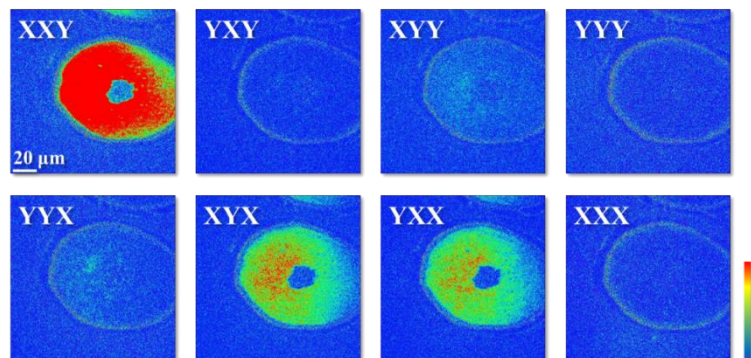


図3： $\alpha = 45^\circ$ 断面のアミド I におけるVSFG像の偏光依存性（画像の左上はVSFG光、可視光、赤外光の順に表記した偏光の組み合わせ）

視光、赤外光の電場の向きを考慮して解析すると、信号が強く観測されている $\text{XXY}, \text{XYX}, \text{YXX}$ は全てキラルな分子からの信号に相当する。ここで、アミド I が毛髪伸長方向に直交な配向成分 (XXY)でも観測されているのは、2つの α -ヘリックスが二重螺旋を形成する際のねじれにより Y 方向の成分が生じたためと考えられる。一方、その他のアキラルな信号 ($\text{YYX}, \text{YXY}, \text{XYY}, \text{XXX}$) はほとんど観測されていないことが分かった。次に、この解析をもとに、アミド III の結果についても再考した。序論で述べた通り、アミド III では $\alpha = 0^\circ$ でも高感度で信号が検出されている {図4}。 XXY, YYX ともに信号が検出されているが、 $\alpha = 0^\circ$ ではアミド III は α -ヘリックスの螺旋に沿った振動なので、両者は試料を回転させたものに対応する。このとき、 XXY と YYX では強度変化が小さい。これに対し、 $\alpha = 90^\circ$ 断面では XXY で観測された強い信号が YYX ではほとんど見られなかった。これは、アミド III の振動方向は縦方向に偏っており、試料を回転させると信号強度は大きく変化することに対応する。一方、 $\alpha = 45^\circ$ 断面では、 XXY で著しく強い信号が観測された。これは、 $\alpha = 0, 90^\circ$ で観測された信号とは、明らかに別の由来によるものであり、アミド I の結果との対比からキラルな信号であると示唆される。これに対し、 $\alpha = 0, 90^\circ$ や $\alpha = 45^\circ$ の YYX の信号は赤外の電場と分子振動の向きで決まるアキラルな信号が観測されたと考えられる。発表では、他の偏光の組み合わせの結果と VSFG 理論を照らし合わせると共に、CH 及び NH 伸縮振動モードの偏光依存性も合わせて報告する。

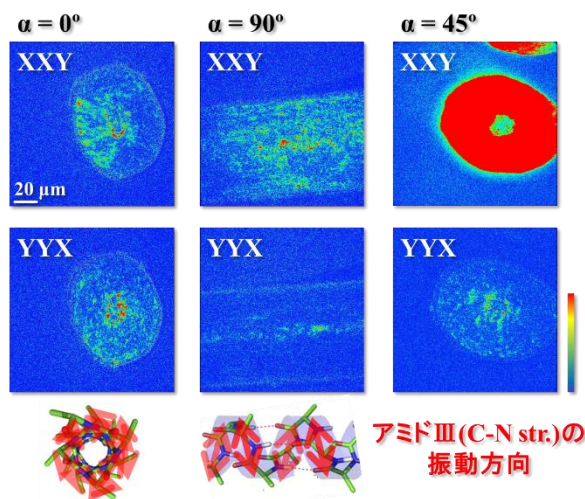


図4： $\alpha = 0, 90, 45^\circ$ 断面でのアミド III バンドにおける XXY, YYX の VSFG 像

【参考文献】

- [1] S. Nagase, T. Shinozaki, M. Tsuchiya and H. Tsujimura., *J. Soc. Cosmet. Chem.* **43** (2009) 3.
- [2] M. Sakai, K. Kikuchi and M. Fujii., *Chem. Phys.* **419** (2013) 261.
- [3] Y. R. Shen and V. Ostroverkhov., *Chem. Rev.* **106** (2006) 1140

3P071

クライオ近赤外 1 分子イメージングのための蛍光分子の評価

(東工大 物理) ○内藤貴也・田邊大明・虎谷靖泰・藤芳 暁・松下道雄

Characterization of near-infrared fluorescent probe of single-molecule imaging at a few K.

(Department of Physics , Tokyo Institute of Technology) Takaya Naito, Hiroaki Tabe,
Yasuharu Toratani, Satoru Fujiyoshi & Michio Matsushita

【序】 量子収率が1に限りなく近い光検出器の発明により、蛍光顕微鏡で一つ一つの分子を個別にイメージングすることが可能になっている。蛍光イメージングと生体試料とは相性が良く、この1分子蛍光イメージングも細胞内部にある個々のタンパク質分子の3次元空間配置を観るために用いられている[1]。しかし、細胞内1分子イメージングには大きく分けて、2つの課題がある。一つは、タンパク質の多くが細胞内を自由に拡散しているため[2]、1分子観察に必須の有限な露光時間の間に、蛍光画像がぼやけてしまうことである。もう一つは、細胞内物質 (NADH やフラビン) の自家蛍光[3]により、1分子からの微弱な発光が簡単に隠されてしまうことである。前者の対策として我々は、試料全体をガラス転移温度 (135 K) 以下に急速凍結し、ガラス化した細胞を測定することで、拡散を完全に止めて観察している[4]。これにより、例えば、外部刺激や細胞周期に合わせて急速凍結することで、凍結する瞬間の状態を長時間かけて観察することが可能である。一方、後者の背景光の問題は、細胞内物質の自家蛍光がすくない近赤外波長で蛍光する色素を用いることで克服しようと考えている。そこで、極低温で使える近赤外色素の探索をおこなっている。本発表では、温度 80 K におけるL細胞の自家蛍光イメージを示した後、市販品の中でも良く使われている近赤外蛍光性色素 Alexa Fluor 750(Alexa750)の室温、80 K での1分子蛍光の結果をしめす。

【実験】 蛍光顕微鏡には、我々が 2014 年に開発した反射型三次元共焦点顕微鏡を用いた[5]。この顕微鏡の特長は、反射型であるため色収差が無く、レーザーの広がり角および入射角を変えることで、光の焦点を三次元に空間走査できることにある。対物レンズには、焦点距離が 2 mm、開口数が 0.53 のものを用いた。当該研究では、波長 473 nm、と 727 nm の半導体レーザーを用いて、それぞれ、L 細胞と Alexa Fluor 750 を光励起した。L 細胞には BK7 基板上に培養した後、固定化したものを用い、Alexa Fluor 750 の測定では、ポリビニルアルコールを 1% 混ぜた濃度 10^{-11} M の溶液 (リン酸緩衝溶液 pH6.7 または DMSO) のスピンコート膜を用いた。

【結果】 L細胞の自家蛍光 図 1a に、温度 80 K で測定したL細胞の蛍光イメージをしめす。励起波長は 473 nm である。画像の中には、10 個くらいの細胞が写っている。この細胞の蛍光スペクトルを測定すると、520 nm 付近に極大を持つブロードな蛍光が検出された (図 1b)。また、図 1a を見ると、核にあたる部分の蛍光が弱く、細胞質がより強く蛍光している。これらは、フラビンに由来する自家蛍光の特徴と一致する[3]。よって、この自家蛍光は主にフラビン分子およびフラビンタンパク質に由来すると考えられる。このフラビンの1光子励起の吸収端は~500 nm であり、これよりも長波長で光励起できる色素を選ぶことが重要である。

室温(296 K)での Alexa750 の吸収蛍光 フリーおよび抗体 IgG、goat anti-Rabbit IgG (H+L)、に結合した Alexa750 のリン酸緩衝溶液、フリーの Alexa750 の DMSO 溶液における吸収と蛍光スペクトルをしめす。図 2a のように、DMSO 中では、緩衝溶液中に比べて、~17 nm 長波長シフトしている。また、フリーと IgG に結合した Alexa750 の吸収を比べると、IgG に結合したものでは、700 nm 付近に肩が現れているのが分

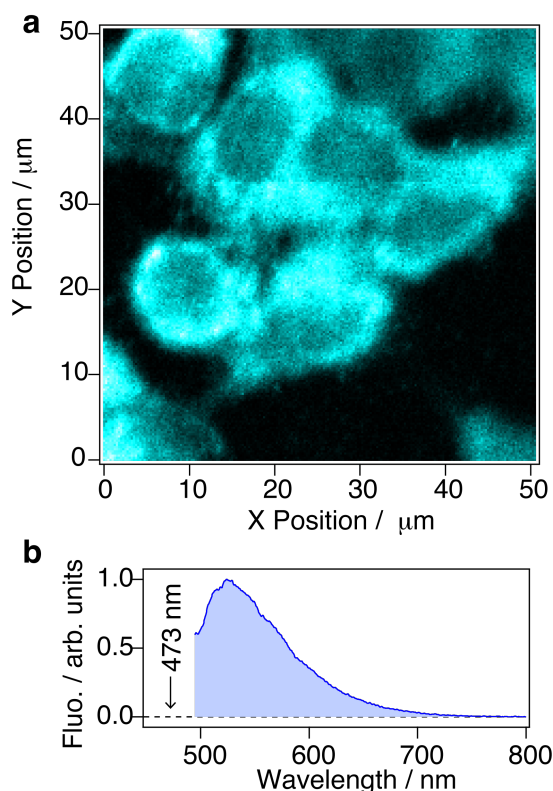


図1. 温度80 KにおけるL細胞の自家蛍光イメージ(a)とスペクトル(b). 励起波長は473 nm.

かる。IgG には平均 3 個の Alexa750 が結合しており、Alexa750 のような長波長蛍光性のシアニン色素は、色素間の相互作用により短波長シフトした吸収が現れることが知られている[6]。

図 2b の蛍光スペクトルの縦軸は、蛍光強度を励起波長 727 nm における吸光度(～0.02)で割った後に、DMSO の強度で規格化した相対蛍光強度である。蛍光測定における濃度は 10^{-7} M である。蛍光極大は 700 nm よりも長波長であり、図 1b の自家蛍光スペクトルと重なりがなく、細胞内観察用の蛍光色素として有望である。一方、蛍光強度は周囲の環境に大きく依存するため、使用には注意が必要なが分かった。Alexa750 は DMSO 中でもっと良く蛍光し、IgG に結合すると蛍光が消光した。この消光は、吸収スペクトルと同様に、色素間の相互作用によるものであると考えられている[6]。1 分子からの信号は本質的に微弱であるため、さらに量子収率が低下すると、検出が不可能になる。よって、免疫染色によって 1 分子観察を行う際には、IgG への平均結合数を 1 個以下にする必要がある。

温度 80 K での DMSO 溶液中の Alexa750 の 1 分子蛍光観察

80 K における Alexa 750 の 1 分子蛍光観察をおこなった。溶媒は最も量子収率の高い DMSO を用いた。励起波長は 727 nm であった。図 3a のように、個々の Alexa750 が個々の輝点として、1 分子ずつ観察できた。一つの Alexa750 分子に焦点を合わせて測定した蛍光強度 I_f の励起光強度依存性 I_{ex} を図 3b、信号対ノイズ(S/N)比を図 3c にしめす。ノイズは、座標(x, y) = (7 μ m, 5 μ m)の輝点が無い場所を選んだ。図のように $I_f = 2000 \text{ s}^{-1}$ で蛍光強度は飽和するものの、その時の S/N 比は 53 であった。例えば 2011 年に報告されたフラビンタンパク質のクライオ蛍光観察[7]では、励起波長が 440 nm であったため、S/N 比は約 1 であった。これに比べ、1 桁以上高い S/N 比である。

図 1 で測定した L 細胞は、京都大学大学院医学研究科の喜井勲博士から提供して頂きました。ここで、改めてお礼を申し上げます。

1. 例えば、Fernandez-Suarez, M. & Ting A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 929-943 (2008).
2. Li G.W., & Xie X.S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature*, **475**, 308-315 (2011).
3. Aubin J.E. Autofluorescence of Visible Cultured Mammalian Cells. *J. Histochem. Cytochem.* **27**, 36 – 43 (1979).
4. Inagawa, H. et al, *Sci. Rep.* (2015) in press.
5. Maruo, M., Inagawa, H., Toratani, Y., Kondo, T., Matsushita, M., & Fujiyoshi, S. Three-dimensional laser-scanning confocal reflecting microscope for multicolor single-molecule imaging at 1.5 K. *Chem. Phys. Lett.* **591**, 233-236 (2014).
6. Gruber H.J. et al. Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin. *Bioconjugate Chem.* **11**, 696-704 (2000).
7. S. Fujiyoshi et al. Structural Change of a Cofactor Binding Site of Flavoprotein Detected by Single-Protein Fluorescence Spectroscopy at 1.5 K. *Phys. Rev. Lett.* **106**, 078101 (2011).

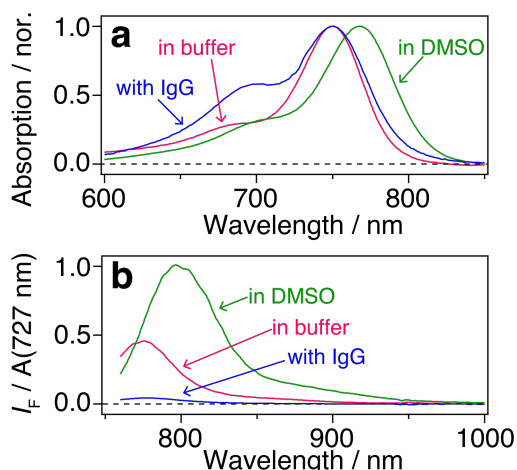


図2. 室温溶液中のAlexa Fluor 750の吸収(a)および蛍光(b)スペクトル. 蛍光スペクトルの励起波長は727 nm.

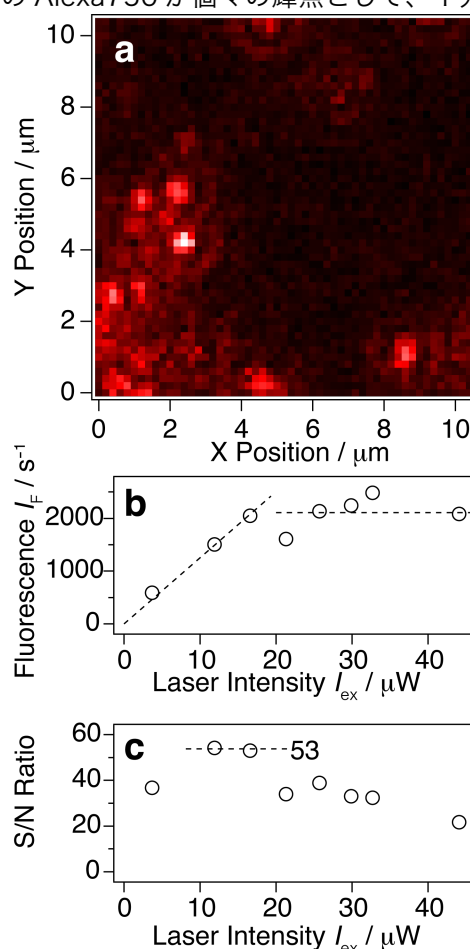


図3. (a) 温度80 KにおけるAlexa750のDMSO溶媒中の蛍光イメージ. (b) 蛍光強度 I_f の励起光強度 I_{ex} 依存性. (c) 信号対ノイズ(S/N)比の I_f 依存性.

3P072 極低温共焦点蛍光顕微鏡の開発による細胞の多色イメージング

東工大 物性物理¹・京大院 医²・京大院 生命科学³

○本橋 和也¹・若尾 圭祐¹・稲川 博敬¹・古林 琢¹・

喜井 勲²・定家 真人³・石川 冬木³・松下 道雄¹・藤芳 暁¹

Development of cryogenic confocal fluorescence microscope for multi color imaging of a cell

¹Department of Physics, Tokyo Institute of Technology², Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, Kyoto University · ³Department of Gene Mechanisms, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

○K.Motohashi¹, K.Wakao¹, H.Inagawa¹, T.Furubayashi¹, I.Kii², M.Sadaie³, F.Ishikawa³, M.Matsushita¹, S.Fujiyoshi¹

【序】生化学的手法の発達により、生きた細胞中にあるたんぱく質を蛍光色素で特異的に染色することが可能になっている[1,2]。複数の色の蛍光色素を用いれば、複数のターゲットたんぱく質の多色イメージングが可能になり、細胞内構造体の立体構造を知るなどの応用が期待できる。特に共焦点顕微鏡は、対物レンズ焦点からの光のみを検出するため、3次元構造の情報を得ることができ、最も信号-ノイズ比の高い配置であるため広く使われている。図1に共焦点顕微鏡概念図を示す。

励起光の波面を励起光側ピンホールを通して整えた後、対物レンズによって試料に照射する。試料上における励起光の強度分布 I_{ex} は対物レンズの点像分布関数に一致する。試料から出た蛍光はビームスプリッターを透過し、検出側ピンホールを抜けた分が1次元検出器によって検出される。取得できる画像は試料の蛍光強度分布 I_f を用いて $I_f \times I_{ex}$ となる。一方で、1枚の画像を得るためには構成する各点で光検出を行うために総測定時間が長くなるという欠点がある。このため生きた細胞中の流動的な構造や、生命現象の過程で変化していくような構造を観察することが難しい。そこで我々は細胞を温度 1.7 K に凍結し、生きた細胞のある一瞬の状態を観察することを目指している。今回低温に凍結した細胞を観察可能な共焦点蛍光顕微鏡を開発し、ヘリウム温度 1.7 K 下の細胞の観察に成功したので報告する。

【実験】製作した顕微鏡を図2に示す。最大の特徴は低温使用可能な NA=0.99 の反射対物レンズ[3]を使用することで、様々な波長の励起光を色収差なく回折限界程度にまで集光できることである。すでに報告した顕微鏡[3]との違いは検出側ピンホールを入れることで厳密な共焦点配置になっているところである。

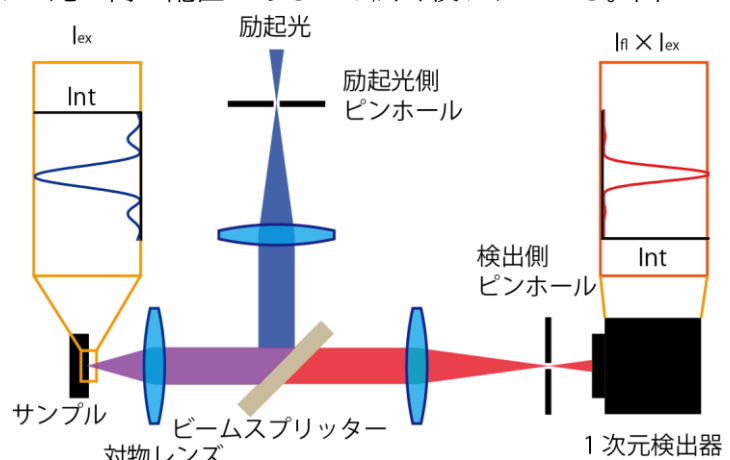


図1: 共焦点顕微鏡概念図

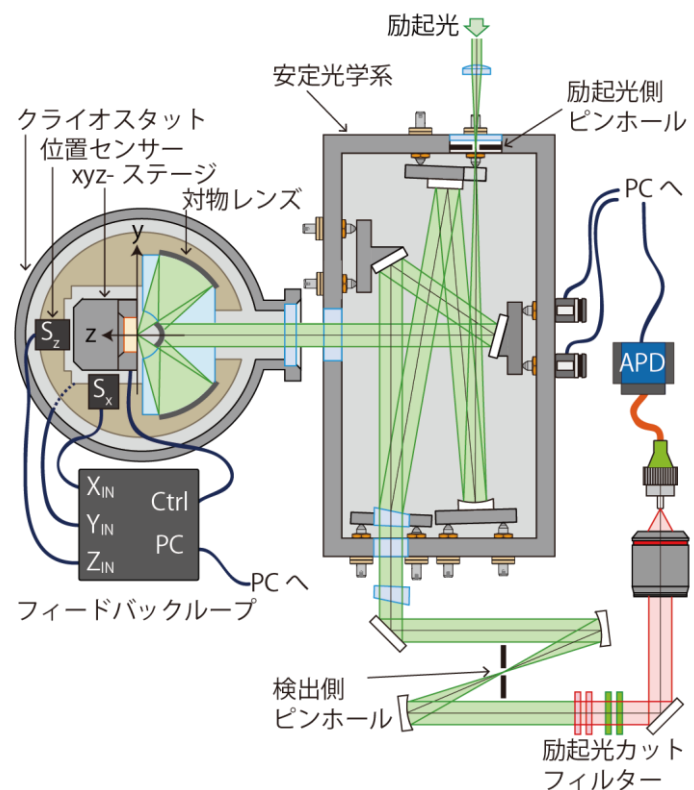


図2: 製作した低温共焦点蛍光顕微鏡

【結果】1.7 KにおけるHeLa細胞の蛍光イメージングを行った。細胞核はHoechst33342、核内のテロメアはAlexaFluor660で染色した。テロメアは核内の染色体末端にあるTTAGGGのリピートである。このテロメアは6種類のたんぱく質と複合体を作ることが知られており、そのうちの一つであるTRF1を免疫染色した。波長375 nmの励起光で核を、637 nmの励起光でTRF1をイメージングした結果を図3に示す。(b)にある白線は(a)から読み取れる核の境界を記入したものである。核内にあるテロメアが一個の輝点として検出されることが確認できた。テロメアを細胞中にある点光源と見立てることで顕微鏡の特性を調べた。561 nmおよび637 nmで光励起したTRF1の三次元蛍光イメージを図4に示す。図4をガウスフィッティングすることで $1/e^2$ 幅を求めた結果と対物レンズの点像分布関数から予測される $1/e^2$ 幅の見積もり値を表1にまとめる。見積もりに用いた点像分布関数はスピコート膜中のQdot705を $\lambda = 532, 635$ nm励起で測定した $\Gamma(532), \Gamma(635)$ を用いた[3]。 Γ が波長に比例すると仮定し、 $I_{ex}(\lambda = 561 \text{ nm})$ は $\Gamma(532)$ をもとに、 $I_{ex}(637), I_{fl}(700)$ は $\Gamma(635)$ をもとに計算し、それぞれの励起波長に対して I_{ex} と I_{fl} をかけ見積もりとした。核中でもスピコート膜から求めた値と1割以内の誤差で一致している。HeLa細胞のような厚みのある($\sim 10 \mu\text{m}$)、屈折率が異なる物質を含む環境では集光の際に波面が乱れ、像質が悪化する場合があることが知られている[4]。しかしHeLa細胞のような小さい細胞では、波面乱れが像質に及ぼす影響は小さいことがわかった。

【参考文献】

- [1]Neal K. Devaraj et al.;*Bio Chem*,**19**,2297(2008)
 [2]Georgyi V.Los et al.;*ACS Chemical Bio*,**3**,373(2008)
 [3]Inagawa et al.;Scientific Reports impress
 [4]Na Ji et al.;*Nature Methods*,**27**,1(2009)

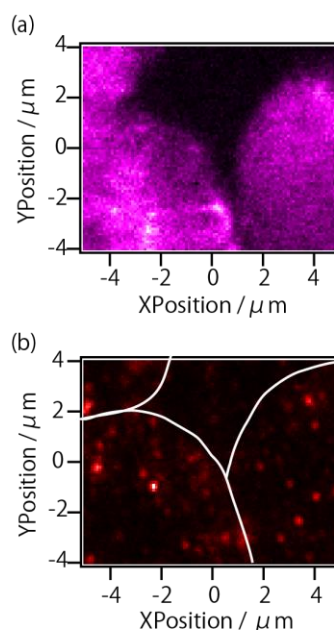


図3:1.7 KにおけるHeLa細胞の蛍光イメージング。励起波長は375 nm(a)及び637 nm(b)

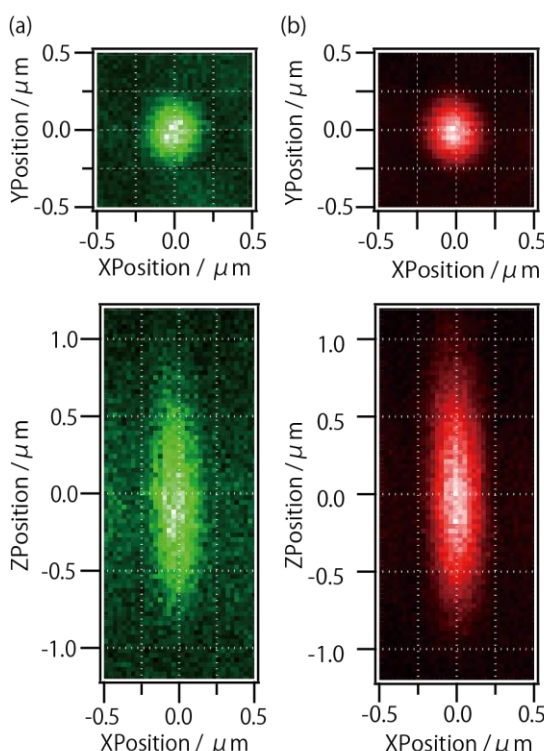


図4:1.7 Kにおける一つのテロメアの蛍光イメージ。励起波長は561 nm(a)及び637 nm(b)

表1:1.7Kにおける顕微鏡の光分解能と見積もり値

λ_{ex}/nm	$\Gamma_{xy}/\mu\text{m}$		$\Gamma_z/\mu\text{m}$	
	細胞中	薄膜中	細胞中	薄膜中
561	0.182	0.165	0.712	0.707
637	0.202	0.177	0.849	0.760

3P073

マイクロ秒分解一分子 FRET 測定による
タンパク質折り畳みダイナミクスの追跡
(東北大・多元研¹, 東大院・総合文化², 浜松ホトニクス³,
光産業創成大学院大⁴, 岡山大院・自然科学⁵)

○小井川 浩之¹, 新井 宗仁², 深澤 宏仁^{3,4}, 横田 浩章⁴, 井出 徹⁵, 高橋 聡¹

Tracking microsecond single-molecule FRET dynamics on protein folding

(IMRAM, Tohoku Univ.¹, Dept. Life Sci., Univ. Tokyo², Hamamatsu Photonics³, GPI⁴, Grad. Sch. Nat. Sci. and Tech., Okayama Univ.⁵)

○Hiroyuki Oikawa¹, Munehito Arai², Atsuhito Fukasawa^{3,4}, Hiroaki Yokota⁴, Toru Ide⁵, Satoshi Takahashi¹

【序】 タンパク質の構造変化と機能の関わりを理解するためには、タンパク質のダイナミクスの詳細を追跡することが有効である。近年、長時間の分子動力学計算によってミリ秒以内に起きる構造変化が重要な役割を果たすことが明らかになってきている。一方で、タンパク質の高速運動を観察し、分子動力学計算の結果と比較できるような実験的手法として、一分子蛍光測定が挙げられる。しかし、従来の一分子蛍光測定法では、時間分解能がミリ秒程度に制限されるため、ミリ秒以内の構造変化を、一分子追跡することは困難だった。

私達は、一分子蛍光分光法を用いることで、タンパク質の折り畳み運動の詳細を追跡することを目指している。私達はライン共焦点光学系とマイクロ流路チップを組み合わせることでフローセル中を高速で流れる一分子の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率を 100 マイクロ秒以下の時間分解能で数ミリ秒間継続観察できる装置を開発した¹。この装置を用いて二重蛍光標識したプロテイン A の B ドメイン(BdpA)の平衡変性における構造変化を追跡し、BdpA の変性状態がミリ秒以下の時間スケールで見ると比較的不均一な構造集団であることを示した^{1,2}。

【実験】 通常の共焦点光学系で溶液中の蛍光標識されたタンパク質を観察する場合、レーザーの励起スポットに拡散してきたタンパク質分子からの蛍光を検出する。このときの信号の継続時間は分子が励起スポットを横切る時間である数ミリ秒である。通常の実験条件では、試料溶液にレーザーを強く照射しても、得られる蛍光光子数には限度がある。しかし、試料溶液を高速で流しながら観測を行うと、試料溶液中の溶存酸素分子の働きにより単位時間内に観察できる蛍光光子数が格段に増加する。こ

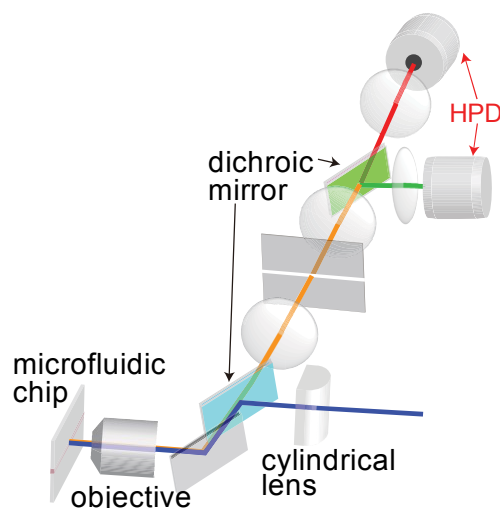


図 1 HPD とマイクロ流路チップを組み込んだ二色蛍光ライン共焦点顕微鏡

の現象を利用するために、私達が開発した装置では、石英ガラス製のマイクロ流路チップ使った試料のフロー装置と、レーザーの照射領域をフローセルの流路方向に伸長させたライン共焦点光学系組み合わせている。この工夫により単位時間内に得られる光子数は増やしつつ、試料分子が励起スポットに滞在する時間を延長することに成功した¹。

しかし、私達がとらえたい折り畳み構造転移は、多くても数ミリ秒に一回程度しか起こらないまれな現象であり、またその構造転移も 100 マイクロ秒以下の時間スケールで終了してしまう。したがって、折り畳みの構造転移の詳細を追跡するためには、時間分解能のさらなる向上と一分子の継続観察時間の延長が必要である。

私達のこれまでの装置では流路を流れる一分子の軌跡を CCD カメラで撮影して、事前に測定した流速をもとに、蛍光強度の時間変化を求めていた。したがって、時間分解能を向上させるためには、より速く試料溶液を流す必要があった。しかし、それでは時間分解能は向上しても、一分子当たりの継続観察時間は短くなってしまう。そこで、光学系はほぼそのまま検出器を CCD から光子計数型の検出器であるハイブリッド光検出器(HPD)に変更した装置を開発した(図 1)。HPD は一分子からの蛍光を検出できる高感度と高速応答性を兼ね備え、しかも受光面が大きいという性質を持つため、CCD カメラを容易に置き換えることができる。また、HPD を使えば流速に関係なく蛍光強度の時間変化をマイクロ秒時間分解能で記録することができる。

【結果】 HPD を使った装置で二重蛍光標識された BdpA 一分子の FRET 効率変化を測定した結果が図 2 である。10 マイクロ秒以下の時間分解能で、5 ミリ秒以上の間、一分子の FRET 効率を追跡することができた。

この改良によって得られた高時間分解能の測定結果について報告する。

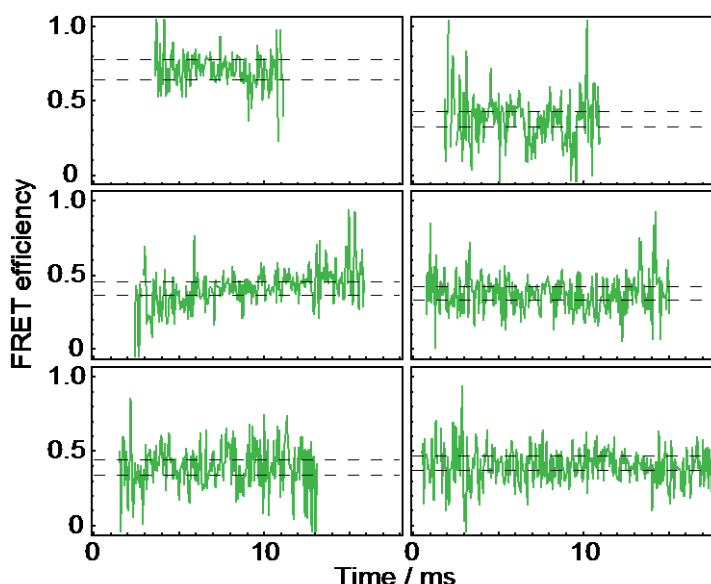


図 2 HPD を使った装置で測定した変性剤溶液中での二重蛍光標識された一分子 BdpA の FRET 効率変化

[1] H. Oikawa *et al.*, *Sci. Rep.*, 3, 2151, (2013). [2] H. Oikawa *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 119, 6081, (2015).

3P074

グロイオバクターロドプシン K 中間体における発色団とプロトンドナーとの長距離カップリング

(阪大院理¹, 名工大院工²)

○及川 健太郎¹, 水野 操¹, 神取 秀樹², 水谷 泰久¹

Long-range coupling between the chromophore and the proton donor
in the K intermediate of *Gloeobacter* rhodopsin

(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

○Kentaro Oikawa¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

序 グロイオバクターロドプシン (GR) は真正細菌シアノバクテリア由来の微生物型ロドプシンである。GR はバクテリオロドプシン (BR) と同様に光駆動プロトンポンプ機能を有している。GR は光を吸収すると、複数の中間体を経て始状態へと戻る (GR→K→L→M→N→O→GR) [1]。この光サイクル中の M 中間体では、レチナール発色団のシッフ塩基が脱プロトン化しており、N 中間体でシッフ塩基が再プロトン化される[2]。この再プロトン化のためのプロトンドナーは 132 番目のグルタミン酸 (Glu132) だと考えられている。低温でトラップした K 中間体の FTIR スペクトルから、K 中間体生成に伴い、Glu132 が形成する水素結合の強度が変化することが報告されている[3]。このようなプロトンドナーの変化は、他の微生物型ロドプシンでは見られない。Glu132 の挙動を明らかにすることは GR のプロトンポンプ機能を理解する上で重要である。本研究では野生型 GR、および Glu132 をアスパラギン酸に置換した E132D 変異体について、室温における GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果、GR では K 中間体の生成に伴い、レチナール発色団と Glu132 との間に長距離相互作用が形成されることがわかった。

実験 野生型 GR および E132D 変異体は、大腸菌に発現させ、可溶化したのちにカラムクロマトグラフィーで精製したものを用いた (pH 9)。レーザー光の強度変化を利用した中間体測定には、Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 20 ns) を用いた。時間分解共鳴ラマン測定においては、ポンプ光に Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 20 ns)、プローブ光には Ti:Sapphire レーザーの第二高調波 (475 nm, 40 ns) を用いた。

結果および考察 図 1 に、野生型および E132D 変異体における GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトルを示す。野生型と変異体のスペクトルを比較すると、いずれの状態においてもスペクトルはよく似ていることが分かった。ここで、1620–1650 cm⁻¹ 付近に観測される C=N 伸縮振動バンドに注目する。C=N 伸縮振動モードは、N–H 変角振動とカップルしており、レチナールシッフ塩基の水素結合強度の良いマーカーバンドである。シッフ塩基の水素結合が強い場合、C=N 伸縮振動バンドはより高波数側に現れ、大きな重水素シフトを示すことが知られている[4]。図 2A, B および C はそれぞれ、GR、K および L 中間体の C=N 伸縮振動バンドの拡大図である。図 2A および B を見ると、C=N 伸縮振動バン

ドは GR では完全に一致しているが、K 中間体では野生型の方が低波数側に現れた。これは、野生型と E132D 変異体のシッフ塩基の水素結合強度は、始状態では差がないのに対し、K 中間体では差があることを意味する。すなわち、レチナールシッフ塩基と Glu132 が、K 中間体生成に伴って相互作用を形成することを示している。シッフ塩基と Glu132 とは 10 Å 以上離れているにもかかわらず、このような相互作用が生じることは興味深い。また図 2C に示すように、L 中間体においても、C=N 伸縮振動バンドは野生型と変異体との間で波数に差が見られた。したがって、K 中間体生成時に生じた相互作用は L 中間体においても維持されていると考えられる。

以上から、GR では K および L 中間体に

おいて、レチナールシッフ塩基と Glu132 が相互作用を形成していることが分かった。Glu132 は N 中間体生成時において、シッフ塩基にプロトンを供与すると考えられている。本研究の結果は、それよりも早い段階で Glu132 とシッフ塩基との間に相互作用が形成されていることを示している。このような長距離相互作用は、M 中間体に対するシッフ塩基の再プロトン化を促進し、光サイクル全体のターンオーバーの速度を速めていると考えられる。

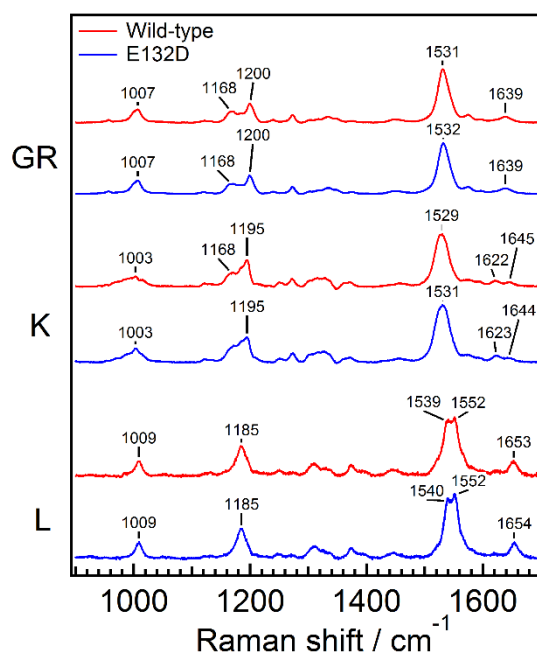


図 1. 野生型 (赤) および E132D 変異体 (青) における、GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトル

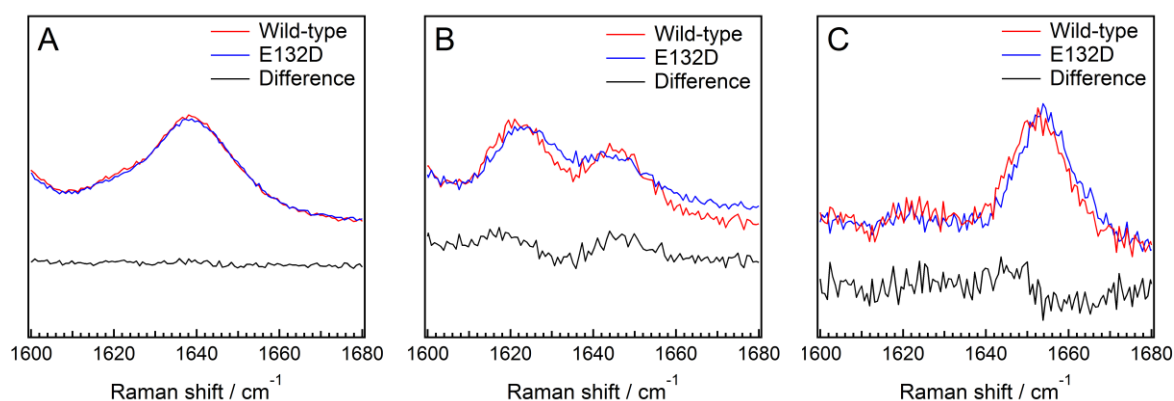


図 2. GR のラマンスペクトルの 1600–1680 cm^{-1} 領域を拡大したもの. (A) 始状態, (B) K 中間体, (C) L 中間体

参考文献 [1] Miranda, et al., *Biophys. J.* **96** (2009) 1471. [2] 中嶋ら, 第 9 回分子科学討論会 2015 (東京), 4C09. [3] Hashimoto, et al., *Biochemistry*. **49** (2010) 3343. [4] Smith, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 3108.

水素結合強度変化による FixL のリン酸化活性制御機構

(阪大院・理¹, 理研・播磨²) ○山脇竹生¹, 石川春人¹, 水野操¹, 中村寛夫², 城宜嗣², 水谷泰久¹

A Role of Hydrogen Bond of Tyr201 in Kinase Regulation of Oxygen Sensor Protein FixL

(Osaka University¹, RIKEN HARIMA²) ○Takeo Yamawaki¹, Haruto Ishikawa¹, Misao Mizuno¹, Hiro Nakamura², Yoshitsugu Shiro², Yasuhisa Mizutani¹

序論 FixL は、マメ科植物と共生する根粒菌に含まれる酸素センサータンパク質で、細胞内酸素濃度を感知する。FixL はセンサードメインとキナーゼドメインから構成される。高酸素濃度下ではセンサードメイン内にあるヘムに酸素が結合し、センサードメインは構造変化を起こす。この変化がキナーゼドメインへと伝達することで、キナーゼドメインはリン酸化活性を抑制すると考えられている。しかし、キナーゼドメインの立体構造や、構造変化の情報はこれまで報告されていない。このため、酸素の結合・解離に伴う FixL の構造変化と活性制御の関係はよくわかっていない。

これまで私たちは FixL の構造変化と活性制御の関係を明らかにするため、野生型、および変異体 FixL の紫外共鳴ラマン測定とリン酸化活性測定を行ってきた。紫外共鳴ラマン測定の結果、センサードメインにあるアミノ酸番号 201 のチロシン残基 (Tyr201) が酸素の結合に伴って Y8a バンドの強度を増大させたことから、酸素の結合によって Tyr201 の水素結合強度が増加することを示唆した。また、リン酸化活性測定の結果、酸素の結合による Tyr201 の水素結合強度の増加は活性抑制に関わっていることを明らかにした¹。今回、酸素の脱離に伴う FixL の構造ダイナミクスを調べるため、リガンド分子の光解離を利用して時間分解紫外共鳴ラマン測定を行った。この結果から FixL の活性制御ダイナミクスを提案する。

実験 タンパク質試料は大腸菌発現したものをカラムクロマトグラフィーで精製した。時間分解共鳴ラマンスペクトル測定は、ポンプ光に波長 532 nm、プローブ光に波長 233 nm のパルス光をもちいて行った。Tyr201 に由来するスペクトルへの寄与を求めるため、Tyr201 の残基をフェニルアラニン (Phe) 残基に置換した変異体を作製した。

結果 図 1 に野生型 (WT) の酸素結合形 FixL の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。得られたスペクトルの強度は 934 cm^{-1} に現れる過塩素酸イオン由来のバンドを用いて規格化した。各スペクトルは光照射後各々の遅延時間で得たスペクトルから光照射前のスペクトルを等倍で引いたものである。光照射後 0.16–25 μs の間で Tyr 残基由来の Y7a, Y8a, Y9a バンドの強度が時間とともに減少していることがわかった。特に強度変化の大きい Y8a バンドの強度に着目し、光照射前 WT の Y8a バンド強度に対する、各遅延時間での Y8a バンドの強度変化の割合を計算し図 2 に●で示した。

酸素の解離に伴う WT の Y8a バンドの強度変化は 2 つの指数関数の和で記述でき、時定数はそれぞれ 0.21 μs 、3.6 μs であった。一方、Y201F 変異体の Y8a バンドの強度変化 (図 2, ▲) は、時定数 0.23 μs で減衰し、8.6 μs で増大が見られた。

考察 WT と変異体のどちらも Y8a バンドの強度に時定数約 0.2 μs の速い減衰がみられた。この減衰は酸素分子が光解離して生じたヘムポケット周辺の構造変化を反映していると考えられる。

変異体のスペクトルでは Tyr201 を Phe 残基に置換しているため、Tyr 残基由来のバンドに Tyr201 の寄与は含まれない。このことから、WT でみられた時定数 3.6 μs の減衰は Tyr201 に由来する変化であると考えられる。一方、Y201F 変異体は時定数 8.6 μs で増大しているが、これは Phe 残基が水素結合を形成できず、Tyr201 の水素結合を通じた構造変化の伝達が起きないため、200 ns 以降は WT とは異なる構造変化が起きたことによると考えられる。

Hiruma らの時間分解可視共鳴ラマン分光法による先行研究²では、時定数約 1–2 μs でヘムの平面性が変化し、時定数 3.3 μs でヘムのプロピオン酸基が変化すると報告されている。図 2 に示す結晶構造では、Tyr201 が位置するヘリックスは His196 を介してヘムと結合している。したがって、酸素脱離に伴うヘムの構造変化は His196 を通じて Tyr201 に伝達すると考えられる。さらに、FG ループはキナーゼドメインと相互作用すると予想されている部位であることから、Tyr201 の構造変化はループを通じてキナーゼドメインへと伝達されると考えられる。この伝達は Tyr201 の水素結合の強度変化によって起こることが以前の我々の研究¹からわかっている。以上から、酸素脱離→ヘム→His196→Tyr201 の水素結合→ループ→キナーゼドメインと構造変化が伝達することで活性を制御するモデルを提案する。

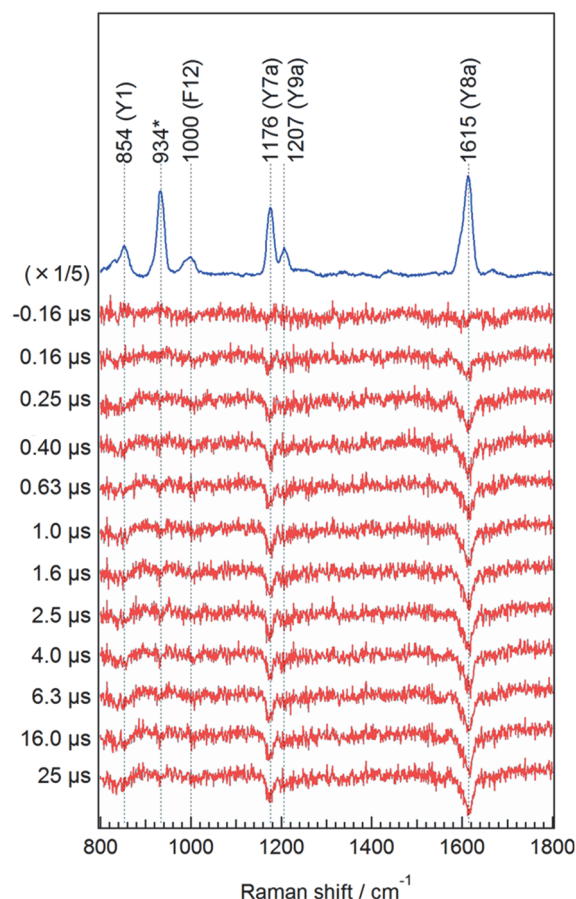


図 1: 酸素結合形 WT-FixL の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。光解離後スペクトルから光解離反応前のスペクトルを引いた差スペクトルを示す。最上段には比較のため酸素結合形のスペクトルを載せた。

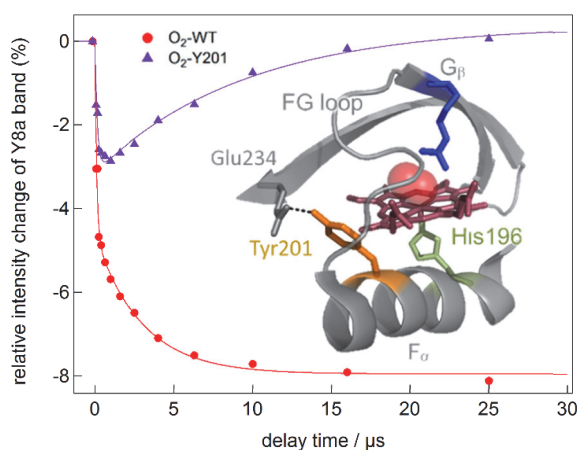


図 2: 酸素脱離に伴う WT および Y201F 変異体の Y8a バンド強度の時間変化。●: WT, ▲: Y201F 変異体。挿入図は構造既知のダイズ根粒菌由来の酸素結合形 FixL のセンサードメインの立体構造。F ヘリックスから H シートまでを示す。アミノ酸番号は本研究で用いたアルファルファ根粒菌由来の FixL に対応する番号を表示した。

- (1) 山脇他, 日本化学会第 94 春季年会 2014, 講演番号 2D2-45.
- (2) Hiruma, Y.; Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y. *Biochemistry* 2007, 46, 6086.

ナトリウムポンプ型ロドプシンの光反応中間体構造のカチオン依存性

(1 阪大院理、2 名工大院工)

○西村 尚¹、水野 操¹、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

Cation dependence of the chromophore structure in the photointermediates of sodium ion pump rhodopsin

(¹Osaka University, ²Nagoya Institute of Technology)ONao Nishimura¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

【序】ナトリウムポンプ型ロドプシン (NaR) は光照射によりナトリウムイオンを細胞内から細胞外へ能動輸送する光駆動型カチオンポンプである。また、ナトリウムイオン非存在下ではリチウムイオンやプロトン輸送する。その輸送機構はまだ解明されていないが、他の光駆動型イオンポンプと同様に、いくつかの反応中間体を経るサイクル反応を示すことが知られている[1]。イオン輸送機構を明らかにするためには、各反応中間体のレチナール発色団の構造を明らかにすることが重要である。本研究では時間分解共鳴ラマン測定を行い、NaRの反応中間体におけるレチナール発色団の構造、およびそのカチオン依存性を調べた。その結果、NaRはいずれの中間体においてもレチナール発色団のシッフ塩基が強い水素結合を形成していることがわかった。また、反応中間体のスペクトルはカチオン依存性をもつことがわかった。

【実験】実験に用いたNaRは*Krokionobacter eikastus*由来で、KR2とも呼ばれている。大腸菌中で発現したNaRをカラムクロマトグラフィーにより精製した。この試料を、界面活性剤を含んだバッファー (pH 8.0) に可溶化し、フローセル中に循環させて時間分解共鳴ラマン測定を行った。K中間体の測定では波長532 nmのパルス光を使用し、パワーの強弱差により過渡種のスペクトルを得た。L中間体の測定にはポンプ光に波長532 nmの光を、プローブ光には波長475 nmの光を使用し、ポンプ-プローブ法で時間分解測定を行った。

【結果と考察】図1に、ナトリウムイオン存在下での、未反応状態のNaRおよび反応中間体の共鳴ラマンスペクトルを示す。これらのスペクトルには、共鳴効果によってレチナール発色団のラマンバンドが選択的に観測されている。未反応状態のスペクトルにおいて、レチナール発色団の構造を示すマーカーバンドであるC-C、C=C、C=N伸縮振動バンドが1199、1531、1639 cm^{-1} に観測された。K中間体のスペクトルでは、後者2つのバンドはそれぞれ1531、1635 cm^{-1} に観測され、C-C伸縮振動バンドは1186、1197 cm^{-1} に2本観測された。1186 cm^{-1} のバンドはレチナール発色団が13-*cis*形構造をとっていることを示すマーカーバンドであり、K中間体までの段階で、レチナール発色団がall-*trans*形から13-*cis*形に構造変化していることを示す。また、C=N伸縮振動バンドは1639 cm^{-1} から1635 cm^{-1} に低波数シフトした。C=N伸縮振動はN-H変角振動とカップルしているため、その振動数はシッフ塩基が形成している水素結合の強度を反映する[2]。水素結合が強いとC=N伸縮振動バンドの振動数は高くなり、重水素置換したときの波数シフトがより大きくなる。このことからK中間体では光反応前と比べて水素結合が弱くなっていることがわかった。L中間体のスペクトルではC=C、C=N伸縮振動バンドが、それぞれ1546、

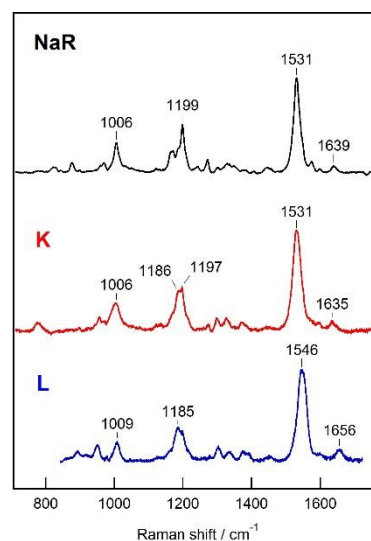


図1. NaRの共鳴ラマンスペクトル。

1656 cm^{-1} に観測された。 $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動バンドは、未反応状態、およびK中間体に比べて高波数側にあり、これらと比べてL中間体では、より強い水素結合を形成していることがわかった。また、未反応状態、K、およびL中間体の $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動バンドは重水素置換による波数シフトを示し、それぞれのシフト幅は21、20、35 cm^{-1} であった。これらの値は他のロドプシンのものと比べても大きく、 $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動バンドの振動数自体も高いことから、未反応状態、K、およびL中間体すべてにおいて、プロトン化シッフ塩基は強い水素結合を形成することがわかった。

L 中間体において $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動バンドは、未反応状態と比べると高波数側にシフトした。 $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動バンドの振動数はレチナール発色団の吸収極大波長と相関があり、吸収極大が長波長側にシフトすると $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動バンドは低波数シフトする。NaR の定常状態の吸収極大波長は 525 nm、L 中間体の吸収極大波長は 505 nm であることがわかっており、この実験事実はいままで知られている相関関係で説明できる。

図 2 に、バッファー中のカチオンの種類が異なる NaR の共鳴ラマンスペクトルを示す。未反応状態のスペクトルをカチオン間で比較すると $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動バンドがナトリウムイオン、リチウムイオン、カリウムイオン存在下で、それぞれ 1531、1532、1534 cm^{-1} に観測された。各試料の吸収極大波長は 525、520、517 nm であり、上述した $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動の振動数と、吸収極大波長の相関関係を満たしていた。1640 cm^{-1} 付近に観測されている $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動バンドの振動数、および 1200 cm^{-1} 付近に観測されている $\text{C}-\text{C}$ 伸縮振動バンドの形も、カチオン間で異なっていた。このように、未反応状態の NaR のスペクトルにはカチオン依存性が見られ、レチナール発色団の構造にカチオンが影響を及ぼしていることがわかった。K 中間体では、ナトリウムイオン、リチウムイオン存在下でのスペクトルは、互いによく似ているが、カリウムイオン中でのスペクトルは他の 2 つのスペクトルとは異なっていた。一方、L 中間体のスペクトルにはカチオン依存性が見られなかった。NaR は、ナトリウムイオン、あるいはリチウムイオン存在下では、これらを輸送するが、カリウムイオン存在下では、プロトンを輸送することが知られている[1]。本研究で観測された、スペクトルのカチオン依存性は、K 中間体において、輸送されるカチオンが発色団に近づき、L 中間体においては、それらが発色団から遠ざかることを示唆している。

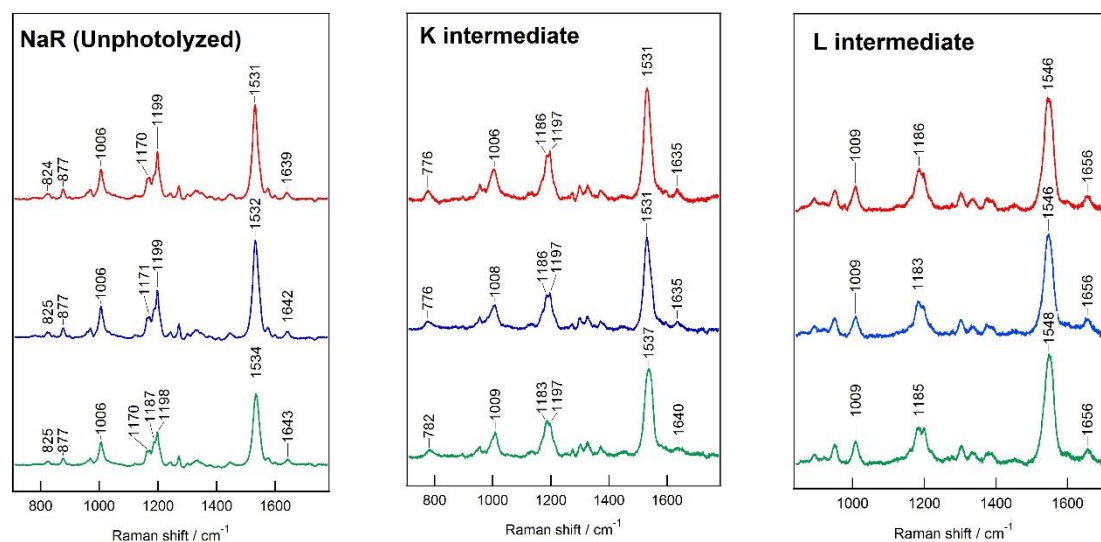


図 2. NaR の共鳴ラマンスペクトルのカチオン依存性。左から未反応状態、K 中間体、L 中間体のスペクトルで、各パネル中の赤、青、緑のスペクトルは、それぞれナトリウムイオン、リチウムイオン、カリウムイオン存在下のスペクトルを示す。

- 参考文献 [1] K. Inoue et al., *Nature Communication* **2013**, 4, 1678.
[2] T. Baasov et al., *Biochemistry* **1987**, 26, 3210.

光駆動塩化物イオンポンプの反応初期中間体の発色団構造

(阪大院理¹、名工大院工²) ○久保田 真司¹、水野 操¹、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

Chromophore structures in the early intermediates of light-driven chloride ion pumps
(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Shinji Kubota¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

【序】*Fulvamarina* rhodopsin (FR) は光駆動塩化物イオンポンプである。FR は発色団として *all-trans* レチナールをもち、その光異性化により開始するサイクル反応に伴ってイオン輸送が起こる。塩化物イオンポンプとしては、これまでにハロロドプシン (HR) がよく研究されている。HR で機能に重要と考えられているアミノ酸残基が FR では異なっている[1]。また、中間体の寿命も両者で違いがみられる。FR と HR を比較することは、タンパク質の塩化物イオン輸送メカニズムを明らかにするうえで重要である。本研究では、時間分解可視共鳴ラマン分光法を用いて、FR のサイクル反応の初期段階にみられる反応中間体の発色団構造を調べ、その特徴を HR と比較して議論した。

【実験】大腸菌で発現させた FR を精製し、200 mM MOPS-NaOH (pH 8.0)、1 M NaCl、0.03% β -DDM に可溶化したものを試料として用いた。時間分解共鳴ラマン測定はフローセル中に氷冷した試料を流し、ポンプ-プローブ法 (ポンプ光 532 nm、プローブ光 475 nm、パルス幅約 20 ns) により行った。遅延時間は-200 ns から 50 μ s までの 13 点について測定した。

【結果と考察】図 1 に、FR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。図 1(a)は始状態の FR のスペクトルで、971、1164、1170、1200、1537、1629 cm^{-1} にバンドが観測された。図 1(b)は遅延時間 30 ns のスペクトルで、954、973、1194、1548、1619、1634 cm^{-1} に、図 1(c)の遅延時間 50 μ s のスペクトルでは 953、1186、1198、1550、1646 cm^{-1} にバンドが観測された。両者のスペクトルでは異なる波数にバンドが観測された。これは、反応開始後 50 μ s までの間に少なくとも 2 つの中間体が存在することを示している。

時間分解スペクトルにはレチナール発色団の構造を反映するマーカーバンドが観測された。1150-1250 cm^{-1} にみられるバンドは C-C 伸縮振動バンドで、これはレチナールのコンフィギュレーションを敏感に反映する。始状態で観測された 1164、1170 cm^{-1} のバンドの強度は、2 つの中間体のスペクトルでは減少し、代わりに $\sim 1190 \text{ cm}^{-1}$ のバンドが強くなった。これは、レチナールが *all-trans* 形から 13-*cis* 形へ異性化した際にみられる特徴であり、2 つの中間体では発色団は 13-*cis* 形をとっていることを示唆している。次に、波数が 650-1000 cm^{-1} のバンドは C-H 面外変角振動モード (HOOP モード) に帰属される。このバンドはレチナールのポリエーテル鎖が平面である場合は観測されないため、レチナールのポリエーテル鎖の歪みの程度を示すマーカーとなる。始状態では 971 cm^{-1} 、50 μ s では 953 cm^{-1} にバンドが観測されたのに対し、30 ns では 973、954 cm^{-1} などの弱いバンドが数本観測された。このことから、始

状態と 50 μs では歪みの箇所が異なり、30 ns ではその遷移の途中段階にあると考えられる。さらに、1610–1650 cm^{-1} にみられるのは C=N 伸縮振動モードの寄与を含むバンドである。C=N 伸縮振動は N-H 面内変角振動とカップルしている。重水中ではシッフ塩基のプロトンは重水素に置換されるため、同位体効果により N-D 変角振動は大きく低波数シフトする。このため、重水置換により C=N 伸縮振動バンドはデカップリングによる低波数シフトを起こす。また、N-H 変角振動はプロトン化シッフ塩基がつくる水素結合強度が強くなると振動数が高くなる。よって、重水素化による C=N 伸縮振動数のシフトの大きさはプロトン化シッフ塩基の水素結合強度のマーカーとなる。軽水中と重水中での時間分解スペクトルを比較すると、始状態、30 ns、50 μs での C=N 伸縮振動の波数シフトはそれぞれ 13、9、27 cm^{-1} であった。したがって、FR のプロトン化シッフ塩基の水素結合強度は光異性化から 30 ns でいったん弱くなり、50 μs で始状態よりも強くなることがわかった。

共鳴ラマンスペクトルにより明らかになった FR の発色団の特徴を HR のそれ[2]と比較した。まず、中間体が現れる時間領域とスペクトルの概形から、FR の光サイクル中の 30 ns、50 μs で観測された中間体はそれぞれ HR の K 中間体、L 中間体に対応すると考えられる。次に、重水素置換による C=N 伸縮振動バンドのシフトは、HR の始状態、K 中間体、L 中間体でそれぞれ 10、9、31 cm^{-1} と報告されている。したがって、FR、HR はともに、シッフ塩基の水素結合強度は K 中間体形成でいったん弱まり、L 中間体形成で始状態よりもさらに強くなるという共通の性質をもつことがわかった。一方で、HOOP バンドの強度は、HR の K 中間体に比べて FR の K 中間体の方が弱かった。このことは、FR の K 中間体のレチナールのポリエーテル鎖の歪みが、HR の K 中間体に比べて小さいことを示唆する。

【参考文献】

- [1] Inoue, K et al., *J. Phys. Chem. B*, **2014**, 118 (38), pp 11190–11199
- [2] 水野ら, 第 7 回分子科学討論会, **2013**, 3D19

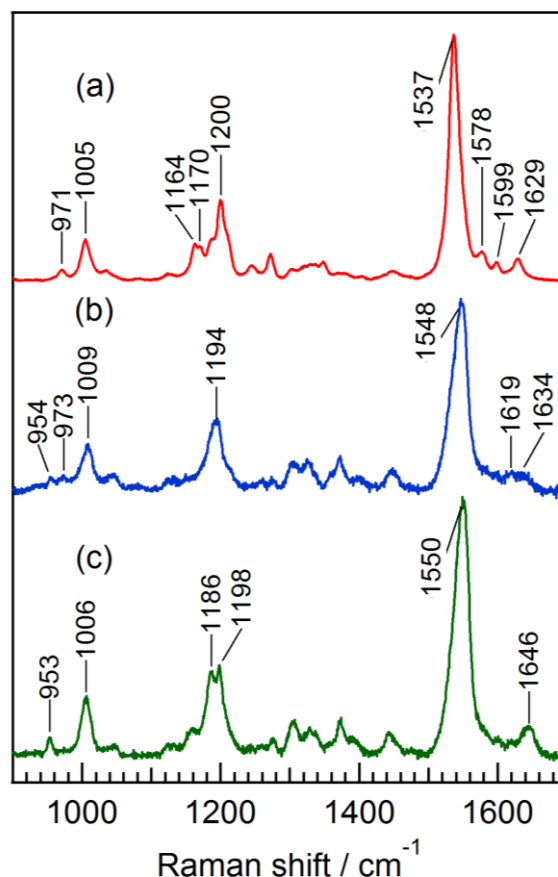


図 1. FR の時間分解共鳴ラマンスペクトル。(a) 未反応の FR。遅延時間が (b) 30 ns、(c) 50 μs の時間分解スペクトル。(b)、(c) については未反応の寄与を除いてある。

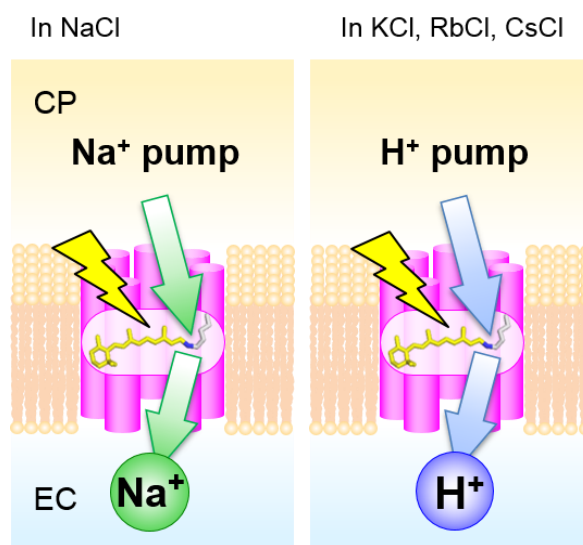
光駆動ナトリウムポンプの速度論的研究

(名古屋工業大学¹, JST さきがけ²) ○加藤善隆¹, 井上圭一^{1,2}, 吉住 玲¹, 神取秀樹¹Kinetic study of light-driven Na⁺ pump(Nagoya Institute of Technology¹, JST PREST²) ○Yoshitaka Kato¹, Keiichi Inoue^{1, 2},
Rei Abe-Yoshizumi¹, Hideki Kandori¹

【序】光駆動外向きプロトンポンプ機能を持つバクテリオロドプシン (BR)、内向きクロライドポンプ機能を持つハロロドプシン (HR) は、1970 年代に高度好塩古細菌から発見された。多くの分光実験や X 線結晶構造解析の結果から、機能メカニズムについての理解が深まっている[1]。これらの微生物型ロドプシンはタンパク質内部に発色団としてレチナールをシッフ塩基結合している。BR の場合、内部に結合したレチナールが光異性化を起こすと、シッフ塩基に結合した H⁺ の移動が起こる。また、HR の場合はプロトン化シッフ塩基と相互作用した Cl⁻ の移動が起こる。このように、シッフ塩基周辺でのイオンの動きがポンプ機能を可能にしているため、プロトン化したシッフ塩基に結合できない Na⁺ をポンプすることはないと考えられていた。

そのような中、我々は海洋性細菌 *Krokinobacter eikastus* 由来の新規ロドプシン KR2 が Na⁺ を細胞外側へとポンプするナトリウムポンプ型ロドプシンであることを 2013 年に報告した [2]。KR2 は K⁺, Rb⁺, Cs⁺ 等の大きなカチオンを輸送できず、それらのカチオンを含む溶液中では H⁺ を外向きにポンプすることもわかっている (図 1)。また、それぞれの条件下で光反応サイクルを比較すると、NaCl 中ではミリ秒スケールの速い光反応を示し、KCl 中では数百ミリ秒の遅い光反応を示すことがわかった [2, 3]。その後、77 K での光誘起赤外差スペクトルの測定により、KR2 はレチナール異性化が起きた段階では同一の構造を持ち、どのイオンを輸送するかはわからないという結果が得られた [4]。今年 4 月には東大濡木研との共同研究により KR2 の結晶構造を報告した [5]。この構造から、シッフ塩基近傍に存在するアスパラギン酸側鎖の動きが Na⁺ 輸送を可能にしていることが示唆された。また、イオンの取込みが起こる細胞質側に親水性キャビティの存在が確認され、変異体実験を組み合わせることで、カチオン選択性に関わるアミノ酸を特定した [5]。

このように Na⁺ の輸送メカニズムに関しては徐々に明らかになっている。しかしながら、もう一つの機能である H⁺ ポンプメカニズムや Na⁺ と H⁺ の選択性についてはほとんど情報がなかった。本研究では KR2 に対して紫外可視過渡吸収測定を行い、Na⁺ と H⁺ の選択性を反応速度論的に解析した。

図 1 Na⁺と H⁺をポンプする KR2

【実験】C 末端に His タグ配列を導入した KR2 を、大量発現用に形質転換した大腸菌 C41(DE3) 株を用いて発現した。細胞膜に発現した KR2 を界面活性剤によって可溶化し、Co²⁺-NTA カラムを用いて精製した。可溶化状態にある精製 KR2 を脂質膜に再構成した後に、測定用のバッファーに交換した。バッファーに含まれる pH や NaCl の濃度を調節し、室温で光励起後の過渡吸収変化を測定し、光反応中間体の生成・減衰の速度を解析した。

【結果と考察】様々な NaCl 濃度・pH における紫外可視過渡吸収測定の結果、NaCl 濃度の低い条件では KCl 中と類似した遅い光反応を示すことがわかった。また、光反応中に形成される M 中間体の減衰速度が NaCl 濃度の増加、pH の低下（プロトン濃度の増加）によって加速されることが確認され、Na⁺と H⁺の取込みが共に M 中間体の減衰時に起こることが明らかになった。400 nm 付近に吸収極大をもつ M 中間体は、シッフ塩基が脱プロトン化した状態であるため、M 中間体減衰の促進はシッフ塩基の再プロトン化が促進されることを意味している。

そこで M 中間体の減衰時に H⁺と Na⁺との取込みが競合的に起こるという反応モデルを立て、H⁺と Na⁺の選択性を、Na⁺取込みと H⁺取込みの反応速度定数の比 (k_H / k_{Na}) として求めたところ、その比は 8,000 前後であることが明らかになった。この結果は、ナトリウムイオンとプロトンが同濃度である場合に KR2 は H⁺を 8,000 倍も取り込みやすいことを示している。しかしながら、KR2 が発見された海洋では、[Na⁺] = 4×10^{-1} M、pH 8 ([H⁺] = 10^{-8} M) とナトリウムイオン濃度が圧倒的に高く、8,000 倍という速度定数の比を乗り越えて Na⁺の取込みが優先的に起こると考えられる。

ポスター発表では、過渡吸収測定で観察された Na⁺および pH 依存性について詳しく紹介し、光駆動ナトリウムポンプの光反応モデルを提案する。

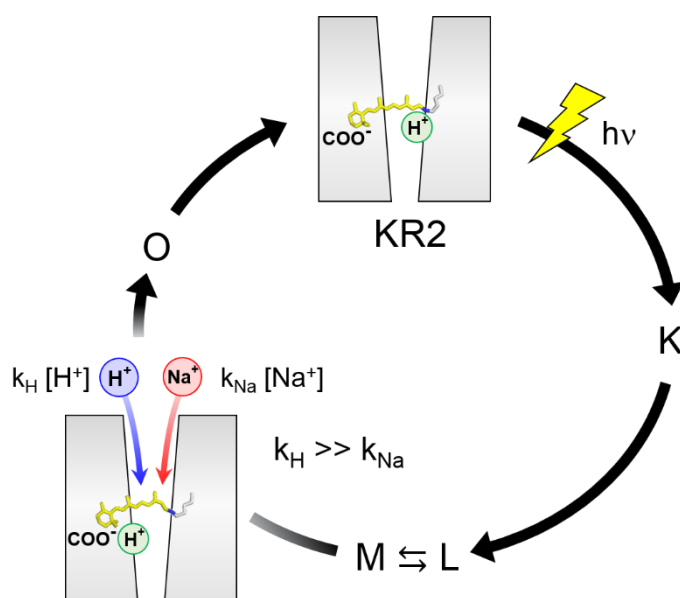


図2 Na⁺と H⁺の競合取込みモデル

【参考文献】 [1] O. Ernst et al. *Chem. Rev.* **114**, 126 (2014). [2] K. Inoue et al. *Nat. Commun.* **4**, 1678 (2013). [3] K. Inoue et al. *Trends Microbiol.* **23**, 91 (2014). [4] H. Ono et al. *J. Phys. Chem. B* **118**, 4784 (2014). [5] H. E. Kato et al. *Nature* **521**, 48 (2015).

ナトリウムイオン輸送機能を有するレチナールタンパク質 KR2 の
超高速ダイナミクス

(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
⁴名工大・院工、⁵JST・さがけ)

田原 進也 ^{1,2}、○竹内 佐年 ^{1,3}、吉住 玲 ⁴、井上 圭一 ^{4,5}、大谷 弘之 ²
神取 秀樹 ⁴、田原 太平 ^{1,3}

Ultrafast dynamics of a sodium-ion-pumping retinal protein KR2

(¹Molecular Spectroscopy Lab., RIKEN, ²Biomol. Eng., Tokyo Tech., ³RAP, RIKEN
⁴Dept. Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology, ⁵PRESTO, JST)

Shinya Tahara^{1,2}, ○Satoshi Takeuchi^{1,3}, Rei Yoshizumi⁴, Keiichi Inoue^{4,5}
Hiroyuki Ohtani², Hideki Kandori⁴, Tahei Tahara^{1,3}

【序】レチナールタンパク質は光駆動のイオン輸送やセンサー機能を有する光受容タンパク質である。その発色団であるレチナールはリシン残基側鎖のアミノ基とプロトン化シッフ塩基結合している。バクテリオロドプシンなどのプロトン輸送レチナールタンパク質は、シッフ塩基のプロトンを送り出し、その反対側からプロトンを受け取ることで、その機能を発揮している。一方、プロトン化シッフ塩基は正の電荷を持ち、静電反発を生じるため、プロトン以外のカチオンをポンプするレチナールタンパク質は存在しないと考えられてきた。ところが近年、ナトリウムイオンを輸送する新しいレチナールタンパク質 KR2 が発見された[1]。KR2 はその機能からオプトジェネティクスツールとしても期待されている。そのため KR2 のナトリウムイオン輸送機構は赤外吸収分光、X線回折、マイクロ-ミリ秒の時間分解吸収分光により活発に研究されている。

典型的な微生物型レチナールタンパク質であるバクテリオロドプシン(bR)では、Asp85 がレチナールプロトン化シッフ塩基のカウンターイオンである(図 1 上)。M 中間体においてプロトン化シッフ塩基のプロトンは Asp85 に移動する。これに続くプロトンの授受によって最終的にプロトン輸送を達成する。一方、KR2 のプロトン化シッフ塩基のカウンターイオンは Asp116 である(図 1 下)。M 中間体においてプロトン化シッフ塩基のプロトンは Asp116 に移動する。これにより Asp116 側鎖が Ser70 の方向を向くことが X 線回折の結果から示唆されている[2]。このダイナミクスがシッフ塩基とナトリウムイオンの間の静電反発を弱めるため、ナトリウムイオンがシッフ塩基近傍を通過できると考えられている。このように KR2 のプロトン化シッフ塩基周辺のアミノ酸配置は、KR2 に特異な反応ダイナミクスを生じさせ、ナトリウムイオン輸送を可能にしていると考えられる。したがって KR2 の光反応ダイナミクスの研究は、ナトリウムイオン輸送機構の理解に重要である。本研究ではフェムト秒時間分解吸収分光法により、KR2 の超高速光反応ダイナミクスの観測を初めて行った。

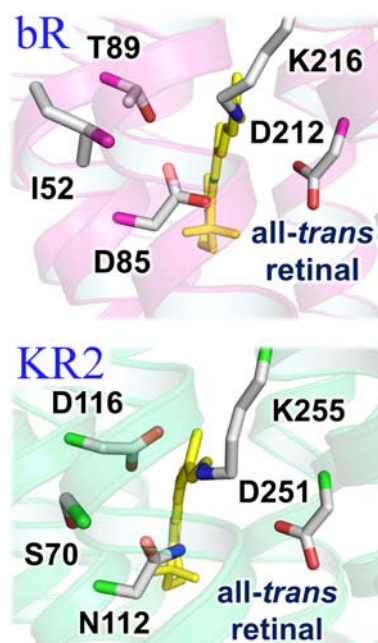


図 1 bR, KR2 の発色団周辺アミノ酸配置

【実験】KR2 を大腸菌 C41(DE3)株に大量発現させ、それを可溶化、精製した。バッファーは 100 mM NaCl, 0.05% n-Dodecyl- β -D-maltoside(DDM)を含む 50 mM Tris-HCl(pH 8)溶液を用いた。575 nm の励起パルス光、超広帯域プローブパルス光をこの試料に集光し、透過したプローブ光をポリクロメーターにより分光し、CCD カメラによって検出した。励起パルス光とプローブパルス光の間の光路差を掃引することにより、各遅延時間における時間分解吸収スペクトルを得た。時間分解能は約 100 fs であった。

【結果および考察】図 2 に KR2 のフェムト秒時間分解吸収スペクトルを示した。KR2 の励起直後、460 nm 付近に S_1 状態からより高い電子励起状態 (S_n 状態)への励起状態吸収帯、550 nm 付近に S_0 状態 KR2 の減少を反映したブリーチング、720 nm 付近に S_1 状態から S_0 状態への誘導放出帯が観測された。励起状態吸収帯および誘導放出帯は 1 ps 以内にほとんど 0 に減衰した。それに伴い、620 nm 付近に吸収帯が現れた。これは光反応生成物に由来すると考えられる。したがって光反応生成物は 1 ps 以内に S_1 状態から直接生成することが示唆される。さらにこの光反応生成物の吸収帯はピコ秒の時間領域で短波長シフトを示した。このような短波長シフトはバクテリオロドプシンやセンサーロドプシン I の超高速ダイナミクスにおいても観測されており、光サイクルの最初の間接帯である J 中間体から K 中間体への反応に帰属されている。これに基づき、KR2 において観測されたピコ秒領域の短波長シフトを KR2 の J 中間体から K 中間体への反応に帰属した。200 ps における時間分解吸収スペクトルは、すでに報告されている K 中間体と S_0 状態 KR2 の差スペクトルにほぼ一致する。

本研究から S_1 状態の KR2 は直接 J 中間体を与え、そこから K 中間体を生成することが明らかとなった。反応時定数解析の結果も含め、KR2 の超高速光反応ダイナミクスのスキームを図 3 に示した。このダイナミクスはバクテリオロドプシンなどの典型的なレチナルタンパク質に比べ、数倍速い。これは KR2 のプロトン化シッフ塩基周辺のアミノ酸配置の特異性によるものと考えられる。

発表では解析の詳細についても説明する。

【参考文献】

- [1] Inoue, K., et al., *Nat. Commun.*, **4**, 1678 (2013)
- [2] Kato, H. E., et al., *Nature*, **521**, 48-53 (2015)

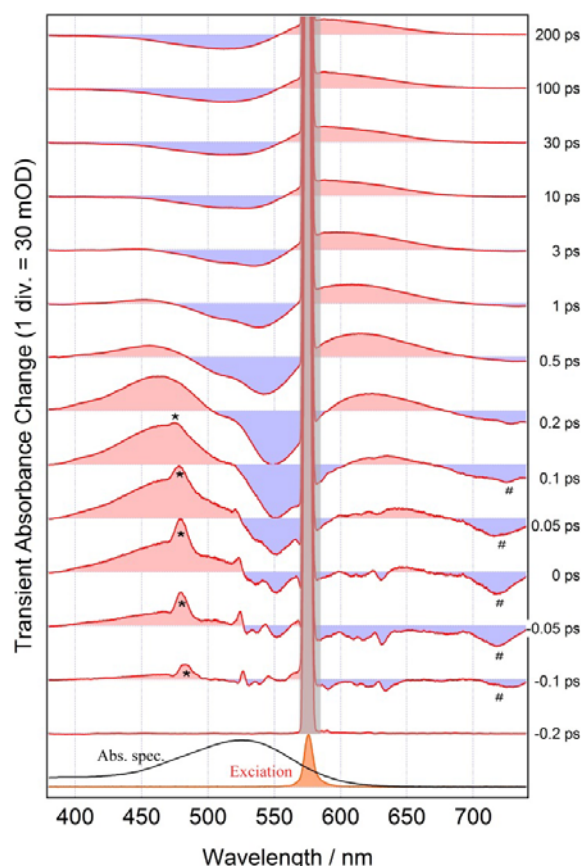


図 2. KR2 のフェムト秒時間分解吸収スペクトル。*は水の OH 伸縮振動の逆ラマン信号、#はその誘導ラマン利得が誘導放出に重なっている。

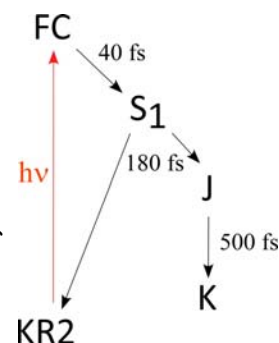


図 3. KR2 の超高速光反応ダイナミクス

非線形マルチモーダル顕微鏡を用いた iPS 細胞のリプログラミング過程の in vivo 追跡

(筑波大・数理¹ 東大院・理² 筑波大・医³)

○米山弘亮¹, 瀬川尋貴², 西村健³, 福田綾³, 久武幸司³, 加納英明¹

In vivo visualization of reprogramming process of iPS cells by nonlinear multimodal spectral microscopy

(University of Tsukuba¹, The University of Tokyo², University of Tsukuba³)

○Hiroaki Yoneyama¹, Hiroki Segawa², Hisatake Koji³, Fukuda Aya³, Nishimura Ken³, and Hideaki Kano¹
hiro1028.bass@gmail.com

【序】現在、iPS 細胞を再生医療へ応用する研究が盛んに進められている。しかしながら、十分な多能性の有る良質な iPS 細胞を選別する方法が未だに確立されていない。iPS 細胞は、培養時に多能性の無い細胞が発生することがあり、この多能性の無い細胞が移植の際に混入すると、生体組織内に腫瘍を形成する可能性があるため、再生医療への大きな妨げとなっている。そこで本研究では、非線形ラマン分光イメージング法を用いて、非破壊・非侵襲・非染色・非標識にて iPS 細胞の分子イメージングを行い、多能性を有する良質な iPS 細胞を識別・スクリーニングする方法の開発を試みた。

【実験】測定には、研究室で開発したマルチプレックス CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 分光システム[1]を用いた。本研究では、図 1 に示す二種類の iPS 細胞を用いた。一つは通常通り準備した多能性を有する iPS 細胞、もう一つは、体細胞に導入する Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの転写因子のうち、Klf4 の導入量を減らすことでできる、多能性の無い細胞である[2]。両者は共に高い増殖能を持ち、同様な細胞塊を形成する。これら二種類の細胞の違いは、多能性発現の識別マーカーの一つである Nanog 遺伝子の発現の有無で確認できる。この遺伝子発現を図 2 のように緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) による蛍光イメージングで確認しながら、CARS 測定を行った。

【結果】2 種類の細胞の実験結果を図 3、図 4、図 5 に示す。図 3 のスペクトルは、測定で得られた CARS スペクトルから最大エントロピー法 (Maximum Entropy Method: MEM) を用いて抽出した $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトルを特異値分解 (Singular Value Decomposition: SVD) 解析して得られたものである。

図 3 のスペクトルは、図 4 の矢印で示した領域に対

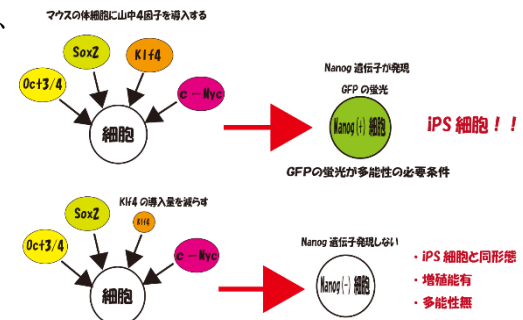


図 1 測定した二種類の細胞の概略

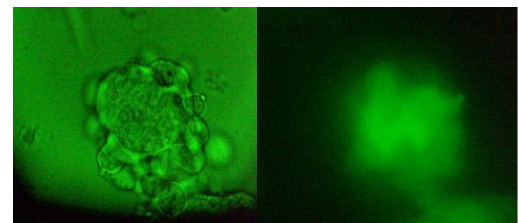


図 2 iPS 細胞塊の光学像(左)と GFP 蛍光像(右)

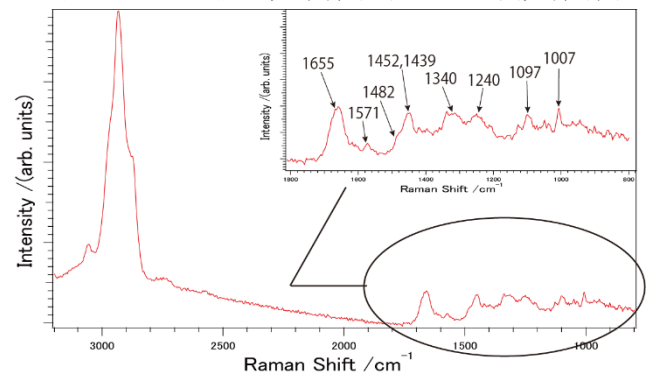


図 3 iPS 細胞の核小体の位置 (図 2 矢印) における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル

応しており、主にたんぱく質、核酸に由来するラマンバンドが観測された。

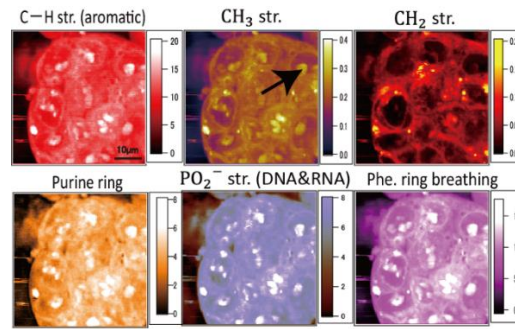


図 4 各ラマンバンドから再構成した iPS 細胞のイメージ

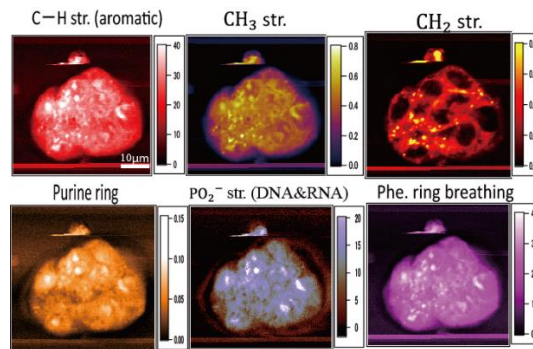


図 5 各ラマンバンドから再構成した多能性の無い細胞のイメージ

図 4 に iPS 細胞の各ラマンバンドを用いて再構成したイメージを、図 5 に同様に作成した多能性の無い細胞のイメージを示す。複数の細胞がコロニーを形成している様子が可視化されている。特に、細胞の大部分の領域を細胞核が占めており、CH₂伸縮振動など脂質のバンドによるイメージでは、信号強度の弱い丸い領域が多数可視化されている。この中に複数の顆粒状のオルガネラがあるが、これらは核小体と考えられる（図 4 の矢印）。本研究では、体細胞に 4 つの転写因子を導入してからの経過日数が異なる 2 つの細胞の測定を行った。多能性のある細胞についての結果を図 6 に示す。細胞全体の領域におけるスペクトルを積分したところ、DNA に由来する複数のラマンバンド (A, G @1564cm⁻¹, C, T @794cm⁻¹) に違いが見られた。

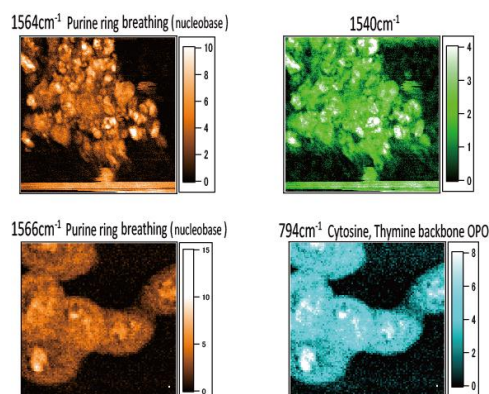


図 6 細胞初期化後 5 日目（上）と 7 日目（下）の細胞の DNA に由来するバンドのイメージ

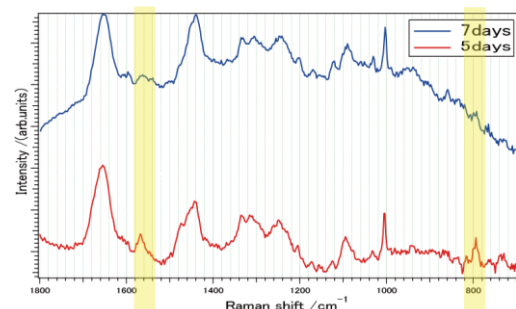


図 7 細胞初期化後 5 日目（赤）と 7 日目（青）の細胞の $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル

[1] Hiroki Segawa *et al. Optics Express*, 20 (9), 9551-9557 (2012)

[2] Ken Nishimura *et al. Stem Cell Reports*, 3, 915-929 (2014)